

Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce

Nauki medyczne i nauki o zdrowiu

Część III



www.mlodzinaukowcy.com

Poznań 2021

Redakcja naukowa

dr Jędrzej Nyckowiak

dr hab. Jacek Leśny, prof. UPWR

Wydawca

Młodzi Naukowcy

www.mlodzinaukowcy.com

wydawnictwo@mlodzinaukowcy.com

ISBN (całość 978-83-66743-20-5)

ISBN (wydanie online 978-83-66743-45-8)

ISBN (wydanie drukowane 978-83-66743-46-5)

Ilość znaków w książce: 372 tys.

Ilość arkuszy wydawniczych: 9.3

Data wydania: sierpień 2021

Niniejsza pozycja jest monografią naukową. Jej rozdziały zostały wydrukowane zgodnie z przesłanymi tekstami po ich zaakceptowaniu przez recenzentów. Odpowiedzialność za zgodne z prawem wykorzystanie użytych materiałów ponoszą autorzy poszczególnych rozdziałów.

Spis treści

1. Wpływ mikrobiomu jelitowego na funkcjonowanie ośrodkowego układu nerwowego	7
<i>Paula Anna Banderowicz</i>	
2. Wiedza uczniów oraz studentów katowickich szkół średnich i uczelni wyższych dotycząca transplantacji narządów	13
<i>Aleksandra Dziura, Karolina Krupa-Kotara, Agata Wypych-Ślusarska</i>	
3. Epidemiologia transplantacji na podstawie danych zawartych w biuletynach Poltransplantu w latach 2010-2019.	21
<i>Aleksandra Dziura, Agata Wypych-Ślusarska, Karolina Krupa-Kotara</i>	
4. Komórki glejowe ośrodkowego układu nerwowego w procesach uczenia się	29
<i>Glinka Marta</i>	
5. Starzenie poznawcza a komponenty układu immunologicznego	35
<i>Glinka Marta</i>	
6. Zastosowanie endoskopowej terapii próżniowej w leczeniu nieszczelności zespoleń	41
<i>Martyna Janczewska, Emilia Langa, Oliwia Lulko, Joanna Kobak, Norbert Nowak</i>	
7. Czy nowe znaczy lepsze? Porównanie laparoskopowej vs. robotycznej gastrektomii.	47
<i>Martyna Janczewska, Stanisław Dziurda, Joanna Kobak, Emilia Langa, Oliwia Lulko, Norbert Nowak</i>	
8. Współczesne modele aktywności komórki nerwowej	54
<i>Kania Maciej</i>	
9. Heterogenność brzuszego pola nakrywki śródmózgowia	60
<i>Kozłowska Katarzyna, Anioł Anna, Kubiak Aleksandra, Jerzemowska Grażyna</i>	
10. Kombinacja immunoterapii z inhibitorami deacetylaz histonów w leczeniu chorób nowotworowych	67
<i>Monika Orzechowska</i>	
11. Wykorzystanie metody RP-TLC i badań <i>in silico</i> do oceny parametrów farmakokinetycznych acylowych pochodnych betuliny	72
<i>Pęcak Paweł, Chrobak Elwira, Monika Kadela-Tomanek</i>	
12. Analiza wybranych parametrów fizykochemicznych fosforanowych pochodnych betuliny	80
<i>Pęcak Paweł, Monika Kadela-Tomanek, Chrobak Elwira</i>	
13. Badania genetyczne w ocenie ryzyka zachorowania na nowotwory dziedziczne	87
<i>Karolina Sobczyk, Mateusz Grajek, Łukasz Olszewski</i>	
14. Rehabilitacja lecznicza pacjentów z chorobą nowotworową układu pokarmowego	93
<i>Karolina Sobczyk, Mateusz Grajek, Łukasz Olszewski</i>	
15. Cyklosporyna A (CsA) – cykliczny polipeptyd szeroko stosowany w medycynie	99
<i>Szafran Klaudia</i>	

Przedmowa

Szanowni Państwo, wydawnictwo „Młodzi Naukowcy” oddaje do rąk czytelnika kolekcję monografii naukowych dotyczących szerokiego spektrum nauk. Znajdują się tutaj pozycje dotyczące nauk medycznych i nauk o zdrowiu, nauk przyrodniczych, nauk technicznych i inżynierskich oraz szeroko pojętych nauk humanistycznych i społecznych.

W prezentowanych monografiach poruszany jest bardzo szeroki przekrój zagadnień, jednak każda z osobna składa się z kilkunastu rozdziałów, spójnych tematycznie, dających jednocześnie bardzo dobry przegląd tematyki naukowej jaką zajmują się studenci studiów doktoranckich lub ich najmłodsi absolwenci, którzy uzyskali już stopień doktora.

Czytelnikom życzymy wielu przemyśleń związanych z tematyką zaprezentowanych prac. Uważamy, że doktoranci i młodzi badacze z pasją i bardzo profesjonalnie podchodzą do swojej pracy, a doświadczenie jakie nabierają publikując prace w monografiach wydawnictwa „Młodzi Naukowcy”, pozwoli im udoskonalać swój warsztat pracy. Dzięki temu, z pewnością wielu autorów niniejszych prac, z czasem zacznie publikować prace naukowe w prestiżowych czasopismach. Przyczyni się to zarówno do rozwoju nauki, jak i każdego autora, budując jego potencjał naukowy i osobisty.

Redakcja

1. Wpływ mikrobiomu jelitowego na funkcjonowanie ośrodkowego układu nerwowego

Influence of the intestinal microbiome on the functioning of the central nervous system

Paula Anna Banderowicz

Paula Anna Banderowicz: paularok@gmail.com

nr orcid: 0000-0001-6517-7163

Słowa kluczowe: mózg, bakterie, jelita, depresja, neurodegeneracja

Streszczenie

Mikrobiota jelitowa obejmuje swoim składem bakterie, wirusy, archea, pierwotniaki i grzyby, które tworzą w układzie pokarmowym złożony ekosystem, zaś mikrobiom tworzą mikroorganizmy oraz ich geny. Według badań naszą mikrobiotę jelitową w ponad 90% zasiedlają beztlenowe bakterie, do których zaliczamy producentów kwasu mlekowego: Bifidobacterium, Lactobacillus oraz producentów krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych: Bacteroidaceae oraz Eubacterium. Drogą komunikacji, za pośrednictwem której mikroby porozumiewają się bezpośrednio z mózgiem jest nerw błędny, za pomocą którego zebrane informacje z narządów trzewnych dostarczane są w postaci informacji zwrotnej do mózgu. Mikrobiota jelitowa może mieć bezpośredni wpływ na układ immunologiczny oraz pośredni za pośrednictwem produkcji cytokin przeciw i prozapalnych. Drobnoustroje zasiedlające nasz układ pokarmowy wywierają wpływ na neuronowe przetwarzanie sygnałów sensorycznych obejmujących oś podwzgórze-przysadka-nadnercza, która stanowi układ hormonalny odgrywający znaczącą rolę w procesach adaptacji organizmu do nowego środowiska, jak i reakcjach organizmu na stres. Mikrobiom jelitowy odgrywa istotną rolę w patogenezie depresji oraz chorobach neurodegeneracyjnych. Czynniki wpływającymi na skład mikroflory jelitowej są: rodzaj powodu, stres, dieta, antybiotyki oraz wysiłek fizyczny.

1. Wstęp

Mikrobiota jelitowa może pośrednio wpływać na funkcjonowanie układu nerwowego za pomocą metabolizmu, którego końcowymi produktami są krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe. Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe wykazują właściwości przeciwzapalne i regulują syntezę hormonów jelitowych oraz mają wpływ na produkcję substancji neuroaktywnych. Drobnoustroje zasiedlające nasz układ pokarmowy wywierają wpływ na neuronowe przetwarzanie sygnałów sensorycznych za pośrednictwem osi podwzgórze-przysadka-nadnercza, działającej na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego. Oś podwzgórze-przysadka-nadnercza nadzoruje syntezę glikokortykosteroidów, neurosteroidów oraz wywiera wpływ na nastrój, emocje i zachowania seksualne. Działanie osi podwzgórze-przysadka-nadnercza uzależnione jest od działania neuroprzekaźników takich jak: glutaminian, kwas gamma-aminomasłowy, czy serotonina. Zaburzenia w prawidłowym funkcjonowaniu osi podwzgórze-przysadka-nadnercza, objawiają się wieloma chorobami takimi jak: depresja, nadciśnienie, zespół chronicznego zmęczenia, zespół Cushinga czy zespół stresu pourazowego.

2. Opis zagadnienia

W powstawaniu depresji istotne znaczenie mają czynniki zapalne, powodujące nadmierną aktywację enzymu indoloamino-2,3-dioksygenazy, przekształcającego tryptofan w kinureninę. Kinurenina wykazuje toksyczne działanie na układ nerwowy, a tryptofan wykorzystany do jej syntezy nie zostaje przekształcony w serotoninę, której niedobór odgrywa znaczącą rolę w patofizjologii depresji (Kelly i in. 2016). W przypadku depresji ważnym czynnikiem jest obecność stanu zapalnego w organizmie, który może być skutkiem zaburzenia ciągłości bariery jelitowej. W konsekwencji bakterie jelitowe oraz ich metabolity przedostają się do krwiobiegu, przyczyniając się do

nadaktywności układu immunologicznego, co może skutkować wzrostem stężenia cytokin prozapalnych takich jak: czynnik martwicy nowotworów, interleukina 1 oraz 6, stymulujących syntezę kortykoliberyny. Podwyższenie poziomu kortykoliberyny aktywuje oś przysadka-podwzgórze-nadnercza, co prowadzi do wzrostu ilości adrenokortykotropiny oraz kortyzolu. Nadmiar kortyzolu objawia się zwiększeniem poziomu tkanki tłuszczowej w organizmie, nadciśnieniem tętniczym, zaburzeniami nastroju, zaburzeniami menstruacyjnymi u kobiet oraz spadkiem libido u mężczyzn.

Ośrodkowy układ nerwowy rejestruje oraz analizuje bodźce, które biegną drogą nerwów obwodowych od receptorów do odpowiednich ośrodków nerwowych mózgowia. Mózgowie oraz rdzeń kręgowy stanowią część ośrodkowego układu nerwowego. Podwzgórze to część podkorowa mózgowia należąca do międzymózgowia, odpowiadająca za kontrolę podstawowych funkcji fizjologicznych. Przysadka stanowi nadrzędny gruczoł dokrewny zlokalizowany w zagłębieniu kości klinowej. Przednia część przysadki mózgowej odpowiada za sekrecję hormonu wzrostu, hormonu tyreotropowego, hormonu lutenizującego, hormonu folikulotropowego, hormonu adrenokortykotropowego, prolaktyny oraz endorfin. Środkowa część przysadki mózgowej odpowiada za sekrecję proopiomelanokortyny oraz melanotropiny. W tylnej części przysadki mózgowej magazynowane są hormony peptydowe, oksytocyna oraz wazopresyna. Podwzgórze, przysadka mózgowa oraz nadnercza tworzą oś podwzgórze-przysadka-nadnercza. Nerw błędny to dziesiąty nerw czaszkowy. Odpowiada on za przekazywanie bodźców aferentnych do ośrodkowego układu nerwowego. Za pośrednictwem nerwu błędnemu bodźce czuciowe trafiają do mózgu.

Neurodegeneracja stanowi postępujący proces zwyrodnieniowy komórek nerwowych, prowadzący do obumierania neuronów. Z przeprowadzonych przedklinicznych oraz klinicznych badań na modelach zwierzęcych wynika, iż mikrobiom jelitowy odgrywa bardzo ważną rolę w patofizjologii chorób neurodegeneracyjnych. Jedną z takich chorób jest choroba Parkinsona, w patogenezie której można zaobserwować odkładanie się białka alfa-synukleiny. Alfa-synukleina jest białkiem, które obecne jest w ośrodkowym układzie nerwowym i odpowiada za neurotransmisję. Nieprawidłowa forma tego białka odkłada się najpierw w nerwowym systemie jelitowym, co może prowadzić do zaburzeń pracy układu pokarmowego. Nerw błędny stanowi drogę, przez którą alfa-synukleina przedostaje się do mózgu. Obecność alfa-synukleiny w mózgu, powoduje aktywację mikrogleju, która może prowadzić do zwiększenia syntezy prozapalnych cytokin, indukujących proces zapalny w organizmie (Marizzoni i in. 2017). Najbardziej powszechnymi czynnikami wpływającymi na skład mikroflory jelitowej są: stres, dieta, wysiłek fizyczny, rodzaj porodu oraz przyjmowane leki, głównie antybiotyki.

3. Przegląd literatury

Przeprowadzono badanie, w którym wykorzystano metodę przeszczepu mikrobioty jelitowej od pacjentów ze zdiagnozowaną depresją, wykorzystano zwierzęta sterylne (Kelly i in. 2016). U zwierząt z przeszczepioną mikrobiotą zaobserwowano obniżoną zdolność odczuwania przyjemności oraz stany lękowe. Na anhedonię wskazywało rzadsze wybieranie przez zwierzęta roztworu wody z sacharozą a częstsze wybieranie roztworu samej czystej wody. Wskaźnikiem zachowań lękowych było unikanie przebywania w otwartych przestrzeniach. W przeprowadzonym badaniu oprócz zmian w zachowaniu zwierząt, zaobserwowano również zmiany zachodzące na poziomie chemicznym. Zwierzęta po przeszczepieniu mikrobioty jelitowej od osób ze zdiagnozowaną depresją miały podwyższone stężenie kinureniny w osoczu, co zaburzało prawidłowy jej poziom względem tryptofanu. Zaburzenia w działaniu szlaku kinureninowego obserwuje się w przypadku nadaktywności osi podwzgórze-przysadka-nadnercza oraz w przypadku nieprawidłowego działania ośrodkowego układu nerwowego.

W kilku badaniach wykazano na poprawę nastroju na skutek długoterminowego przyjmowania probiotyków. Suplementacja probiotyków takich jak: *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus thermophiles* oraz *Lactobacillus acidophilus*, stosowana przez 8 tygodni spowodowała obniżenie wyników w Skali Depresji Becka u pacjentów ze zdiagnozowaną depresją, opornych na farmakoterapie inhibitorami wychwytu zwrotnego serotoniny (Bambling i in. 2017). W pokrewnym badaniu, u pacjentów ze zdiagnozowaną depresją na skutek podaży przez 8 tygodni probiotycznego koktajlu, złożonego ze szczepów bakteryjnych takich jak: *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium*

bifidum oraz *Lactobacillus acidophilus* również zaobserwowano obniżenie wyników w skali Becka świadczących o zmniejszeniu nasilenia depresji. Dodatkowo nastąpiło zmniejszenie stężenia insuliny u tych pacjentów oraz wzrost poziomu glutationu w organizmie (Akkasheh i in. 2016). W przeprowadzonym badaniu z udziałem osób zdrowych, suplementacja przez 30 dni probiotyków takich jak: *Bifidobacterium longum* oraz *Lactobacillus helveticus* powodowała zmniejszenie poziomu kortyzolu w moczu w porównaniu z niesuplementowaną grupą kontrolną (Chrobak i in. 2016). W badaniu funkcjonalnym z wykorzystaniem obrazowania metodą rezonansu magnetycznego wykazano, że procesy poznawcze i emocjonalne są ściśle powiązane z działaniem układu pokarmowego (Tillisch i in. 2013).

Wyniki najnowszych badań wskazują, iż zwiększony udział w mikrobiocie bakterii z rodzaju *Verrucomicrobia* pozytywnie koreluje z funkcjami pamięciowymi oraz wykonawczymi u zdrowych osób starszych (Manderino i in. 2017). W przeprowadzonym badaniu wykazano również pozytywny związek bakterii typu Firmicutes obecnych w mikrobiocie jelitowej a zachodzącymi procesami pamięciowymi. Zwiększona ilość bakterii typu Proteobacteria oraz Bacteroidetes korelowała z gorszymi wynikami uzyskanymi w testach funkcji poznawczych. W innym badaniu przeprowadzonym z udziałem zdrowych starszych osób dowiedziono, że suplementacja bakterii z gatunku *Lactobacillus helveticus* przez 12 tygodni, znacząco wpływa na poprawę funkcji poznawczych sprawdzanych za pomocą testów uwagi i pamięci, w stosunku do grupy kontrolnej niesuplementowanej (Chung i in. 2014). W pokrewnym badaniu przeprowadzonym na większej liczbie osób, wykazano pozytywny wpływ suplementacji stosowanej przez 12 tygodni gatunkiem bakterii *Lactobacillus plantarum* DR7 na pamięć, uwagę, funkcje społeczno-emocjonalne oraz uczenie asocjacyjne u osób suplementowanych, w stosunku do osób które nie przyjmowały szczepu bakteryjnego *Lactobacillus plantarum* DR7. Największe efekty zaobserwowano w grupie osób suplementowanych powyżej 30 roku życia, w stosunku do grupy osób młodszych oraz placebo (Chong i in. 2019).

Z przeprowadzonych badań wynika, że u osób z chorobą Parkinsona często obserwuje się nieszczelność jelit, oraz migrację endotoksyn takich jak lipopolisacharyd do krwiobiegu. Lipopolisacharyd poprzez nerw błędny przyczynia się do agregacji białka alfa-synukleiny w komórkach neuronalnych, co skutkuje ich stopniową neurodegeneracją (Marizzoni i in. 2017). W wyniku wzrostu ekspresji natywnej postaci alfa-synukleiny dochodzi do zwiększenia stężenia jej monomerów, które następnie ulegają oligomeryzacji i fibrylizacji. Zwiększona ekspresja zmutowanej alfa-synukleiny prowadzi bezpośrednio do oligomeryzacji tego białka. Oligomery alfa-synukleiny aktywują powstawanie reaktywnych form tlenu, które z kolei indukują oligomeryzację i fibrylizację oraz proces agregacji alfa-synukleiny tworząc tzw. „błędne koło”. Agregacja alfa-synukleiny może wynikać z mechanizmu obronnego przed działaniem toksycznych oligomerów oraz endotoksyn. Powstałe agregaty białkowe mogą powodować mechaniczne uszkodzenia komórek oraz prowadzić do degeneracji neuronów (Kaźmierczak i in. 2013). W badaniu przeprowadzonym na szczurach, podawanie im dootrzewnowo lipopolisacharydu przyczyniało się do nadmiernej aktywacji mikrogleju obserwowanej przez 12 miesięcy, która skutkowała utratą neuronów dopaminergicznych w istocie czarnej śródmózgowia (Brown 2019).

Aktywność osi stresu odgrywa znaczącą rolę w syntezie cytokin pro i przeciwzapalnych. Oś podwzgórze-przysadka-nadnercza ma istotne znaczenie w fizjologicznej adaptacji organizmu w odpowiedzi na bodziec stresogenny. W przeprowadzonym badaniu weryfikowano, czy bakterie jelitowe mogą koordynować odpowiedź ze strony osi podwzgórze-przysadka-nadnercza na bodziec stresowy. W populacji myszy sterylnych odpowiedź na sytuację stresującą była silniejsza i zaobserwowano wyższe stężenie hormonu adrenokortykotropowego w osoczu, w stosunku do myszy skolonizowanych pewną ilością bakterii (Sudo 2014).

Innym, bardzo ważnym czynnikiem modulującym skład mikrobioty jelitowej jest dieta. Prawidłowo funkcjonująca i różnorodna mikrobiota jelitowa dostarcza organizmowi wiele korzyści, między innymi przyczynia się do unieszkodliwiania czynników patogennych przywracając naturalną homeostazę organizmu. Niektóre bakterie jelitowe mają zdolność przekształcania składników pochodzących z żywności w neuroprzekazniki np. tryptofan w serotoninę, na skutek czego w sposób pośredni mogą wpływać na poprawę samopoczucia. Dieta zachodnia charakteryzująca się wysoką

podają węglowodanów prostych i nasyconych kwasów tłuszczowych prowadzi do zmian ilościowych mikroflory jelitowej. U zwierząt spożywających dietę wysokowęglowodanową, w której spożycie energii z węglowodanów wynosiło 70% i wysokotłuszczową, w której spożycie energii z tłuszczów wynosiło 45%, zaobserwowano wzrost ilości bakterii z rodzaju Clostridiales, a spadek liczby bakterii z rodzaju Bacteroidales (Noble i in. 2017). Obserwacje zwiększenia ilości bakterii z rodzaju Clostridiales oraz redukcja liczby bakterii z rodzaju Bacteroidales skorelowane były z pogorszeniem funkcji poznawczych oraz gorszym rozwiązywaniem zadań labiryntu wodnego Morrisa. Najgorsze wyniki zaobserwowano w grupie szczurów, w których dziecię były węglowodany proste. Badanie to podkreśla istotną rolę diety, która ma wpływ na obecność poszczególnych szczepów bakteryjnych mogących wpływać na funkcjonowanie naszego organizmu.

Z literatury naukowej wynika, iż osoby spożywające dietę opartą na nisko fermentowanych oligosacharydach, disacharydach, monosacharydach oraz polioliach (dieta FODMAP- Fermentable Oligosaccharides, Disaccharides, Monosaccharides And Polyols), mają zwiększoną liczbę gatunków bakterii z rodzaju Bacteroidaceae, Erysipilotracheae i Clostridiales, które prowadzą do większej zdolności metabolizmu sacharolitycznego, podczas gdy osoby nie stosujące diety ubogiej w FODMAP mają wyższy poziom bakterii z rodzaju Turicibacter (Chumpitazi i in. 2015).

Z badań naukowych wynika, że dzieci które zostały urodzone poprzez cesarskie cięcie oraz osoby, które przyjmowały antybiotyki z grupy makrolidów są bardziej podatne na rozwój otyłości na skutek niekorzystnych zmian, jakie zaszły w ich mikroflorze jelitowej. W badaniu przeprowadzonym przez Muccioli i in. w 2010 roku na mysim modelu zaobserwowano, że myszy z mikrobiotą jelitową karmione tym samym pokarmem o takiej samej kaloryczności co myszy jałowe miały mniejszą tendencję do przybierania na wadze.

Na podstawie piśmiennictwa naukowego można wywnioskować, że sportowcy mają lepszą odporność i mniej chorują. Z badań naukowych udowodniono, że przyjmowanie probiotyków zmniejsza częstotliwość oraz czas trwania infekcji u osób trenujących. Suplementacja probiotykami przyczynia się do poprawy wydolności organizmu. Badanie, które wskazuje na poprawę wydolności organizmu na skutek suplementacji probiotyków zostało przeprowadzone przez Shing i in. w 2014 roku pośród biegaczy, wśród których wyodrębniono dwie grupy. Grupa badawcza otrzymywała przez 4 tygodnie probiotyk złożony ze szczepów bakteryjnych: Streptococcus strains, Bifidobacterium oraz Lactobacillus, zaś grupa kontrolna przez ten sam czas otrzymywała placebo. Po upływie 4 tygodni osoby z obu grup zostały poddane próbie biegu do wyczerpania w temperaturze powietrza 38 stopni Celsjusza. Osoby z grupy suplementowanej probiotykami uzyskały znacząco średnio lepsze wyniki (37:44 min/sek.) w stosunku do osób z grupy placebo (33:00 min/sek.). Zaobserwowano, że osoby z grupy przyjmującej probiotyki zgłaszały mniej dolegliwości ze strony układu pokarmowego.

4. Podsumowanie i wnioski

Mikrobiom jelitowy odgrywa istotną rolę w patogenezie depresji, dzięki możliwości przekształcania składników żywnościowych między innymi tryptofanu w neuroprzebieżniki takie jak serotonina, których niedobór w organizmie prowadzi do stanów lękowych oraz obniżonego nastroju. Bakterie probiotyczne takie jak: Bifidobacterium bifidum, Streptococcus thermophiles, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei przyczyniają się do zmniejszenia liczby punktów w skali depresji Becka, dlatego ich suplementacja u osób z depresją może być korzystna. Bakterie z gatunku: Bifidobacterium longum oraz Lactobacillus helveticus przyczyniają się do zmniejszenia ilości kortyzolu w moczu.

Bakterie jelitowe poprzez wpływ na ośrodkowy układ nerwowy wpływają na unerwienie jelit, na skutek modulacji ilości sekrecji neuroprzebieżników takich jak: serotonina oraz kwas gamma-aminomasłowy. Pozytywny wpływ na funkcje poznawcze wykazują bakterie takie jak: Verrucomicrobia, Firmicutes, Lactobacillus helveticus oraz Lactobacillus plantarum DR7, w przeciwieństwie do bakterii z rodzaju Proteobacteria oraz Bacteroidetes, które ujemnie korelują z funkcjonowaniem procesów poznawczych.

Bakterie Gram-ujemne posiadają w swojej budowie lipopolisacharyd, który może powodować nieszczelność jelit, prowadząc do wzrostu stężenia cytokin prozapalnych w organizmie. Lipopolisacharyd obecny w błonie komórkowej bakterii Gram-ujemnych, przyczynia się do

odkładana białka alfa-synukleiny w komórkach neuronalnych, co prowadzi do nadmiernej atywacji mikrogleju i obumierania komórek nerwowych. Proces ten odgrywa istotną rolę w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych, między innymi w chorobie Parkinsona. W patofizjologii choroby Parkinsona istotną rolę odgrywa układ nerwowy oraz nerw błędny.

Bakterie jelitowe przyczyniają się do redukcji zachowań lękowych oraz wystąpienia otyłości. Dieta ma ogromny wpływ na skład mikrobiomu jelitowego. Dieta uboga w FODMAP przyczynia się do wzrostu ilości bakterii z rodzaju Bacteroidaceae, Erysipilotracheae i Clostridiales, które prowadzą do większej zdolności metabolizmu sacharolitycznego. Osoby niestosujące diety ubogiej w FODMAP mają wyższy poziom bakterii z rodzaju Turicibacter.

Bakterie probiotyczne przyczyniają się do wzrostu wydolności organizmu oraz zmniejszają czas trwania infekcji. Bakterie takie jak: Streptococcus strains, Bifidobacterium oraz Lactobacillus przyczyniają się do wzrostu wytrzymałości organizmu oraz zmniejszają objawy dyspeptyczne.

Mikrobiom jelitowy odgrywa szczególną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu ośrodkowego układu nerwowego. Bakterie jelitowe przyczyniają się do utrzymania homeostazy organizmu, poprzez modulację syntezy neurotransmiterów, oddziaływanie przez nerw błędny na mózg oraz wpływ na oś przysadka-podwzgórze-nadnercza.

5. Literatura

- Akkasheh G, Kashani-Poor Z, Tajabadi-Ebrahimi M, et al. (2016) Clinical and metabolic response to probiotic administration in patients with major depressive disorder: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrition* 32: 315-20.
- Bambling M, Edwards SC, Hall S, et al. (2017) A combination of probiotics and magnesium orotate attenuate depression in a small SSRI resistant cohort: an intestinal anti-inflammatory response is suggested. *Inflammopharmacology* 25: 271-274.
- Brown GC (2019) The endotoxin hypothesis of neurodegeneration. *Journal of Neuroinflammation* 16(1): 180.
- Chong HX, Yusoff NAA, Hor YY, et al. (2019) Lactobacillus plantarum DR7 alleviates stress and anxiety in adults: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Beneficial Microbes* 10: 355-373.
- Chrobak AA, Nowakowski J, Dudek D (2016) Interactions between the gut microbiome and the central nervous system and their role in schizophrenia, bipolar disorder and depression. *Archives of Psychiatry Psychotherapy* 2: 5-11.
- Chumpitazi BP, Cope JL, Hollister EB, et al. (2015) Randomised clinical trial: gut microbiome biomarkers are associated with clinical response to a low FODMAP diet in children with the irritable bowel syndrome. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 42(4): 418-27.
- Chung Y, Jin H, Cui Y, et al. (2014) Fermented milk of Lactobacillus helveticus IDCC3801 improves cognitive functioning during cognitive fatigue tests in healthy older adults. *Journal of Functional Foods* 10: 465-474.
- Encyklopedia Neurofizjologii NeuroExpert. Oś podwzgórze-przysadka-nadnercza. <https://neuroexpert.org/wiki/os-hpa/>
- Każmierczak A, Adamczyk A, Benigna-Strosznajder J (2013) The role of extracellular alpha synuclein in molecular mechanisms of cell death. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 67: 1047-1057.
- Kelly JR, Borre YO, Brien C, et al. (2016) Transferring the blues: Depression-associated gut microbiota induces neurobehavioural changes in the rat. *Journal of Psychiatric Research* 82: 109-118.
- Manderino L, Carroll I, Azcarate-Peril MA, et al. (2017) Preliminary evidence for an association between the composition of the gut microbiome and cognitive function in neurologically healthy older adults. *Journal of the International Neuropsychological Society* 23: 700-705.
- Marizzoni M, Provasi S, Cattaneo A, et al. (2017) Microbiota and neurodegenerative diseases. *Current Opinion in Neurology* 30: 630-638.

- Muccioli GG, Naslain D, Bäckhed F, et al. (2010) The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. *Molecular System Biology* 6:392.
- Nęcki T (2019) Ośrodkowy układ nerwowy budowa i funkcje. <https://www.poradnikzdrowie.pl/zdrowie/uklad-nerwowy/osrodkowy-uklad-nerwowy-oun-budowa-i-funkcje-aa-cWBK-fViK-GCKo.html>
- Noble EE, Hsu TM, Kanoski SE (2017) Gut to brain dysbiosis: mechanisms linking western diet consumption, the microbiome, and cognitive impairment. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 11: 9.
- Reichelt AC, Loughman A, Bernard A., et al. (2018) An intermittent hypercaloric diet alters gut microbiota, prefrontal cortical gene expression and social behaviours in rats. *Nutritional Neuroscience* 613-627.
- Shing CM, Peake JM, Lim CL, et al. (2014) Effects of probiotics supplementation on gastrointestinal permeability, inflammation and exercise performance in the heat. *European Journal of Applied Physiology* 114(1): 93-103.
- Sudo N (2014) Microbiome, HPA axis and production of endocrine hormones in the gut. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 817: 177-94.
- Sun MF, Shen YQ (2018) Dysbiosis of gut microbiota and microbial metabolites in Parkinson's disease. *Ageing Research Reviews* 45: 53-61.
- Tillisch K, Labus J, Kilpatrick L, et al. (2013) Consumption of fermented milk product with probiotic modulates brain activity. *Gastroenterology* 144(7): 1394-1401.

2. Wiedza uczniów oraz studentów katowickich szkół średnich i uczelni wyższych dotycząca transplantacji narządów

Knowledge of high school and University students on organ transplantation on the example of the city of Katowice

Aleksandra Dziura⁽¹⁾, Karolina Krupa-Kotara⁽²⁾, Agata Wypych-Ślusarska⁽²⁾

⁽¹⁾ Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Epidemiologii, Wydziału Nauk o Zdrowiu w Bytomiu, Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

⁽²⁾ Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Wydział Nauk o Zdrowiu w Bytomiu, Katedra Epidemiologii i Biostatystyki, Zakład Epidemiologii

Aleksandra Dziura: dziura.aleksandra.26@vip.onet.pl

Słowa kluczowe: przeszczep narządów, postawa, młodzież

Streszczenie

Wstęp. Transplantacja narządów uznawana jest za jedną z najskuteczniejszych metod leczenia osób chorych. Celem pracy była ocena wiedzy uczniów oraz studentów katowickich szkół średnich i uczelni wyższych dotycząca transplantacji narządów.

Materiał i metoda. Na przełomie 2018/2019 roku przeprowadzono badanie wśród 208 osób uczących się w Katowicach w szkołach średnich i uczelniach wyższych. Autorski kwestionariusz zawierał pytania dotyczące wiedzy i postaw wobec transplantacji narządów. Analizę statystyczną przeprowadzono w programie Statistica 13.0, zastosowano test chi-kwadrat, przyjęto poziom statystycznej znamienności $p < 0,05$.

Wyniki. Ponad 80% badanych zna prawidłową definicję transplantacji. Równocześnie 69,2% badanych nie wie czym jest Centralny Rejestr Sprzeciwu, częściej są to uczniowie szkół średnich (77,2%) niż studenci (59,0%); $p = 0,005$. Chęć oddania narządów za życia deklaruje 58,6% badanych, a po śmierci – 83,1%, częściej są to kobiety niż mężczyźni. Równocześnie 82,2% badanych wyraziłoby zgodę na oddanie narządów do przeszczepu po śmierci bliskiej osoby, statystycznie znamienne częściej studenci niż uczniowie szkół średnich ($p = 0,007$).

Wnioski. Grupa badanych osób posiada dobrą ogólną wiedzę na temat transplantacji narządów, chociaż lepszą znajomością szczegółowych zagadnień wykazują się studenci niż uczniowie. Opinia badanej grupy na temat dawstwa narządów za życia i po śmierci jest pozytywna, jednak podjęcie decyzji wiąże się z poziomem kształcenia się i płcią.

1. Wstęp

Transplantacja narządów jest tematem coraz częściej poruszonym i obecnym w dzisiejszym świecie. Zyskuje coraz większe zainteresowanie środowiska lekarskiego, pacjentów jak i osób związanych z ochroną zdrowia, a także coraz częściej pojawia się w środkach masowego przekazu. Metoda transplantacji narządów jest aktualnie uznana za jedną z najlepszych, jak i najskuteczniejszych metod leczenia pacjentów z niewydolnością narządów. Przeszczepianie narządów jest czasami jedynym sposobem na ratowanie przed śmiercią wielu chorych (Ścisło i in. 2013). Natomiast celem przeszczepu jest przywrócenie choremu aktywności życiowej i zawodowej. W ostatnich latach transplantologia kliniczna rozwinęła się, związane jest to z kolejnymi przeszczepami poszczególnych narządów w Polsce. Dzięki takim działaniom lekarzy możliwe jest poprawianie i ratowanie życia, każdego człowieka na świecie. Rozwój metod pobierania, przechowywania i przeszczepiania narządów, tkanek oraz komórek, pozwoliło lekarzom przedłużyć życie wielu pacjentów. Również rozwój rynku farmaceutycznego i poznanie działania leków immunosupresyjnych, wpłynęły na wydłużenie życia pacjentów po przeszczepie narządu. W Polsce wyróżnia się dwa warianty pobrania narządów w celu przeszczepienia. Pierwszy *ex mortuo* (od osoby zmarłej) i *ex vivo* (od dawcy żywego) (Olejniczak i Kukiela 2012; Monastyrska i in. 2014; Gryczman i in. 2013). Lekarze transplantolodzy zwracają uwagę że przeszczepienie narządów jest ściśle

powiązane z dawstwem narządów, które jest decyzją indywidualną i niemożliwą do zaplanowania w systemowych rozwiązaniach (Woderska 2014).

Transplantolodzy wskazują, że przeszczepianie narządów ściśle uzależnione jest od dawstwa narządów. Pomimo rozwoju transplantologii, poza nadzorem lekarzy jest liczba narządów, które można przeszczepić osobie chorej. Problem liczby narządów do przeszczepiania leży u podstaw działań, czyli decyzji każdego człowieka. Jest ona uwarunkowana świadomą i dobrowolną decyzją, która uwarunkowana jest od wiedzy i świadomości na dany temat. Pierwszym ważnym wydarzeniem, które wpłynęło na zrozumienie tematu transplantacji i problematyki, było stworzenie przez Jana Pawła II Encykliki *Ewangelium Vitae*. W tym dziele papież przekazał kluczowe słowa dla każdego człowieka „jednym ze sposobów kształcenia prawdziwej kultury życia jest dawanie organów w sposób dopuszczalny z etycznego punktu widzenia, a mianowicie mając na uwadze stwarzanie szansy na zdrowie, a nawet życie osobom chorym, które często nie mają żadnej innej nadziei” (Jan Paweł II 1995). Tematyka pobierania narządów, jak również ich przeszczepiania jest bardzo trudna, często dla społeczeństwa niezrozumiała. Wiele problemów, które pojawiają się w tym zakresie wynika z braku wiedzy, świadomości, jak również lęku Polaków. Wiedza jest bardzo ważnym czynnikiem kształtującym postawy ludzi, wpływająca na ich decyzje w przyszłości (Gorzkowicz i in. 2010; Woderska 2014). Osoby pozbawione możliwości edukacji w tym zakresie, często nie mają szansy na świadome i odpowiedzialne podjęcie decyzji w sferze bycia dawcą. Edukacja na temat transplantacji oraz łączącego się z nią dawstwa narządów w przyszłości mogłaby zwiększyć liczbę osób chętnych oddać narządy (za życia lub po śmierci) oraz polepszyć perspektywę osób chorujących. Zgodnie z ustawą transplantacyjną jako dawcę uważa się żywego dawcę lub zwłoki ludzkie, od których pobiera się narządy, tkanki i komórki. W Polsce pojawia się wiele mitów utrudniających znalezienie dawców. Następnie prowadzi to do wydłużenia czasu oczekiwania na konkretny narząd, zaś w efekcie końcowym może zakończyć się to śmiercią potencjalnego biorcy (osoby chorej). Brak wiedzy, mała świadomość, nieskuteczna edukacja w temacie transplantacji ma poważne skutki. Działania organizacji odpowiedzialnych za edukację społeczeństwa i przeprowadzanie transplantacji, pozwala na zwiększenie liczby dawców w Polsce. W związku z przytoczonymi argumentami zaplanowano badanie, którego celem była ocena wiedzy uczniów szkół średnich oraz studentów dotycząca transplantacji narządów na przykładzie miasta Katowice.

2. Materiał i metoda

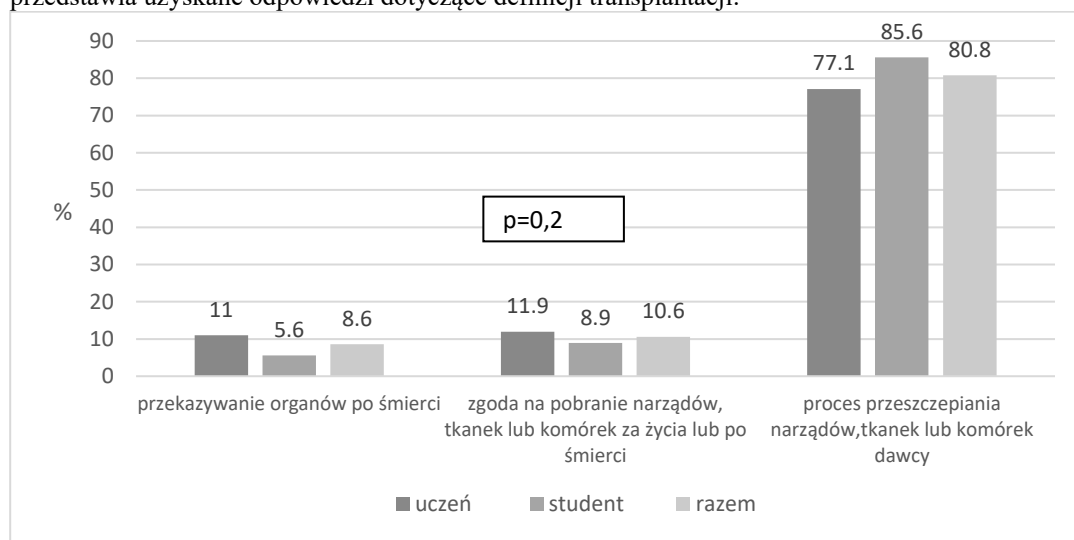
Badanie prowadzone było od grudnia 2018 do lutego 2019, metodą sondażu diagnostycznego w oparciu o autorski kwestionariusz, składający się z metryczki oraz 19 pytań (otwarte i zamknięte). Udział w badaniu kwestionariuszowym był dobrowolny, anonimowy, a ankietowani zostali poinformowani o celu badania.

Osoby ankietowane były uczniami i studentami katowickich szkół średnich i uczelni wyższych. W badaniu uwzględniono dwie szkoły średnie: Zespół Szkół Technicznych i Ogólnokształcących nr 2 w Katowicach oraz Zespół Szkół Zawodowych im. Romualda Mielczarskiego w Katowicach. Kolejną część badania obejmowała uczelnie wyższe: Politechnika Śląska w Katowicach, Akademia Wychowania Fizycznego im. Jerzego Kukuczki w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Wyższa Szkoła Techniczna w Katowicach, Uniwersytet Śląski w Katowicach. Nie dokonywano porównań pomiędzy poszczególnymi uczelniami i szkołami ze względu na stosunkowo małe liczebności w poszczególnych podgrupach. Natomiast skupiono się na ocenie różnic pomiędzy odpowiedziami uczniów szkół średnich a odpowiedziami studentów. Analizę statystyczną przeprowadzono w programie Statistica 13.0. W ocenie różnic pomiędzy grupami zastosowano test chi-kwadrat, przyjęto poziom statystycznej znamienności $p < 0,05$.

3. Wyniki

W badaniu wzięło udział 208 osób, w tym 100 kobiet (48,1%) i 108 mężczyzn (51,9%). Uczniowie szkół średnich stanowili 56,7% badanych, natomiast studenci – 43,3%. Większość badanych zamieszkiwała miasta (93,3%), a jedynie 6,7% respondentów to mieszkańcy wsi.

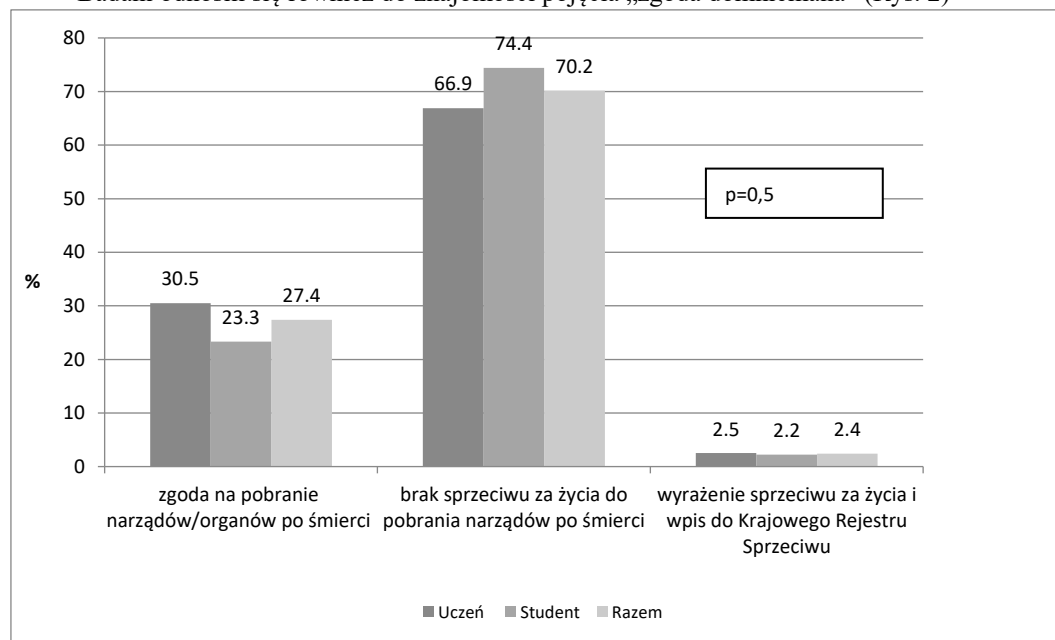
Respondenci odpowiadali na pytania dotyczące wiedzy na temat transplantacji narządów. Rys. 1 przedstawia uzyskane odpowiedzi dotyczące definicji transplantacji.



Rys.1. Definicja transplantacji w opinii respondentów.

Prawidłową odpowiedź wskazało prawie 81% badanych, częściej byli to studenci niż uczniowie, jednak różnice między grupami nie okazały się statystycznie znamienne ($p=0,2$).

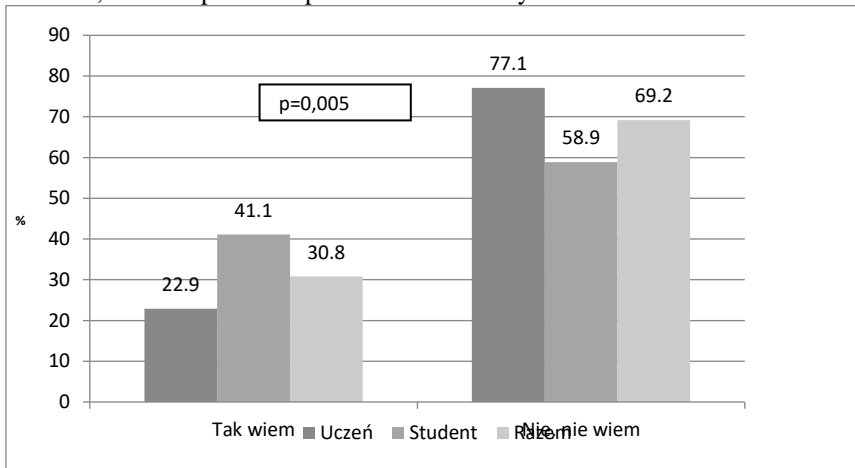
Badani odnosili się również do znajomości pojęcia „zgoda domniemana” (Rys. 2)



Rys. 2. Definicja „zgody domniemanej” w opinii osób badanych.

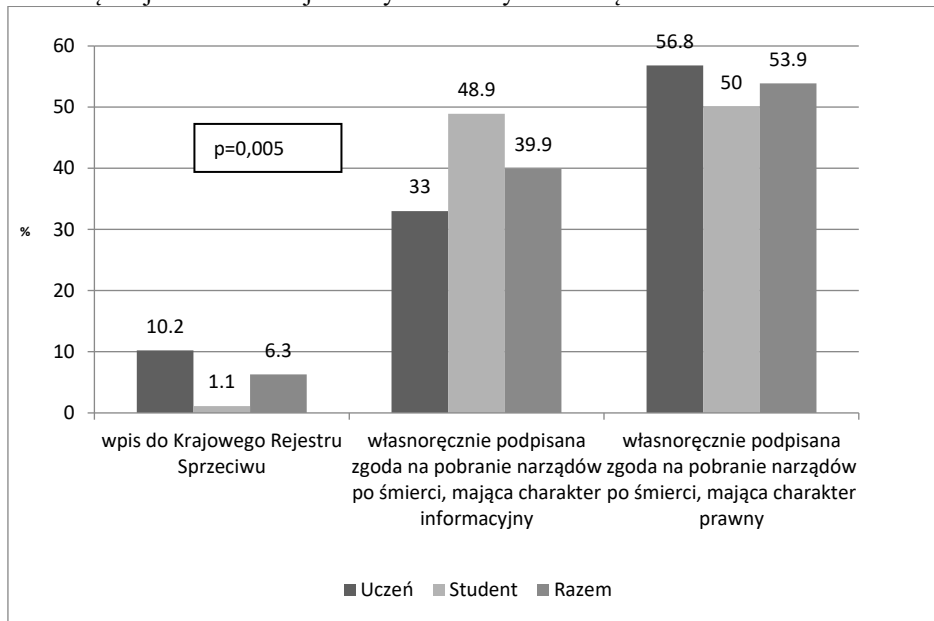
Odpowiedź prawidłową: „brak sprzeciwu za życia do pobrania narządów po śmierci” wskazało 70,2% respondentów, częściej byli to studenci niż uczniowie, jednak i w tym przypadku zaobserwowane różnice nie okazały się statystycznie znamienne.

Badanych zapytano również o znajomość pojęcia Centralny Rejestr Sprzeciwu oraz oświadczenie woli, a ich odpowiedzi przedstawiono na Rys. 3 i 4.



Rys. 3. „Centralny Rejestr Sprzeciwu” w opinii badanych.

Prawie 70% ankietowanych nie wie, czym jest Centralny Rejestr Sprzeciwu, statystycznie znacznie częściej brakiem takiej wiedzy charakteryzowali się uczniowie niż studenci.



Rys. 4. „Oświadczenie woli” w opinii badanych.

Prawie 40% badanych wiedziało, czym jest „oświadczenie woli”, statystycznie znacznie częściej taką odpowiedź wybierali studenci niż uczniowie. Niemal ¼ respondentów wiedziało również, że polskie przepisy regulują dawstwo narządów po śmierci, odpowiedziało tak 78,8% uczniów i 68,9% studentów, a różnice między grupami nie były istotne statystycznie.

Uczniowie i studenci wskazywali również, które z organów są najczęściej przeszczepiane w Polsce. Spośród odpowiedzi najczęściej wskazywali nerkę (73,1%), wątrobę i jej fragmenty (53,4%), serce (34,6%) i płuco (11,5%). Pojedyncze osoby wymieniały również trzustkę (7,7%) oraz jelito (4,8%). Zastanawiające jest jednak, że jedynie 53,4% badanych (24,6% uczniów i 91,1% studentów)

wiedziała, kto pierwszy w Polsce dokonał przeszczepu. Różnice w wiedzy uczniów i studentów okazały się istotne statystycznie ($p < 0,001$).

Oprócz wiedzy młodych ludzi na temat transplanatacji narządów badano ich postawy wobec dawstwa narządów za życia i po śmierci (Tab. 1).

Tab. 1. Akceptacja i decyzja na oddanie narządów/ tkanek za życia w opinii respondentów.

Czy akceptuje i zdecydowałaby się Pani/Pan na oddanie narządów/tkanek za życia?	Uczeń		Student		Razem		Wartość p
	n	%	N	%	n	%	
Zdecydowanie tak	9	7,6	19	21,1	28	13,5	<0,001
Raczej tak	43	36,4	51	56,7	94	45,2	
Raczej nie	54	45,8	17	18,9	71	34,1	
Zdecydowanie nie	12	10,2	3	3,3	15	7,2	
Czy akceptuje i zdecydowałaby się Pani/Pan na oddanie narządów/tkanek po śmierci?	Uczeń		Student		Razem		Wartość p
	n	%	n	%	n	%	
Zdecydowanie tak	30	25,4	32	36,0	62	30,0	0,02
Raczej tak	61	51,7	49	55,1	110	53,1	
Raczej nie	23	19,5	5	5,6	28	13,5	
Zdecydowanie nie	4	3,4	3	3,4	7	3,4	

Badani wyrażają pozytywne postawy wobec oddawania swoich organów za życia (58,7% odpowiedzi zdecydowanie tak i raczej tak) oraz po śmierci (83,1%), chociaż takie deklaracje statystycznie znacznie częściej satwiają studenci niż uczniowie.

Również na pytanie dotyczące wyrażenia zgody na pobranie narządów od zmarłej osoby bliskiej, większość ankietowanych wyraziłaby zgodę (81,7% dla odpowiedzi zdecydowanie tak i raczej tak). Dokładne analizy przedstawiono w Tab. 2.

Tab. 2. Wyrażenie zgody na pobranie narządów od osoby bliskiej, po śmierci w opinii ankietowanych.

Czy akceptuje i zdecydowałaby się Pani/Pan na oddanie narządów od bliskiej osoby po śmierci?	Uczeń		Student		Razem		Wartość p
	n	%	n	%	n	%	
Zdecydowanie tak	11	9,3	20	22,2	21	14,9	0,007
Raczej tak	80	67,8	60	66,7	140	67,3	
Raczej nie	23	19,5	6	6,7	29	13,9	
Zdecydowanie nie	4	3,4	4	4,4	8	3,8	

4. Dyskusja

Każdego roku w Polsce i na świecie wzrasta liczba osób potrzebujących przeszczepienia komórek, tkanek lub narządów. Wraz z biegiem lat, społeczeństwo nabiera świadomości dotyczącej transplantacji narządów, dzięki czemu jest zdolne do podjęcia świadomej i zgodnej ze swoim poglądem decyzji o byciu dawcą. Zmiany światopoglądowe, zaprzestanie unikania tematów dotyczących śmierci, oddania narządów oraz własnej woli, pozwala na świadome decydowanie o narządach swoich i bliskich. W dzisiejszym świecie coraz częściej propaguje się idee dawstwa krwi, szpiku oraz organów. Transplantacja narządów jest tematem bardzo trudnym i często niezrozumiałym, przez co ludzie go unikają. Współczesne szkolnictwo i nastawienie ludzi do tematyki przeszczepów kształtuje młodych ludzi przez, co w dorosłym życiu są zdolni dokonywać własnych, odpowiedzialnych wyborów.

Badania wiedzy Polaków dotyczących transplantacji pokazują, że społeczeństwo posiada ograniczoną wiedzę na tematy transplantacji. Wiele autorów w swych analizach badało poziom wiedzy społeczeństwa na szeroko rozumiany temat transplantacji. W badaniach własnych wykazano, że osoby ankietowane posiadają wiedzę w zakresie podstawowych pojęć odnoszących się do transplantacji. Zauważono, że w pracach innych autorów rzadko bada się aspekt prawnej wiedzy na temat oddawania narządów (Żaba i in. 2009, Kliś i Trzczińska 2015). Zdecydowanie częściej analizuje się opinię społeczeństwa i ich nastawienie do omawianego tematu.

Porównywanie uzyskanych wyników w stosunku do innych badań, pozwala na znalezienie elementów wspólnych i odróżniających się. Wyniki badań kwestionariuszowych prezentowane w niniejszej pracy wskazują na stosunkowo wysoką wiedzę uczniów, jak i studentów na temat zgody domniemanej. Wśród grupy badanej 70,2% wskazało, że jest to „brak sprzeciwu za życia do pobrania narządów po śmierci”. Badania Makary-Studzińskiej i in. wskazały, że 68% pielęgniarek posiada podobną wiedzę na ten temat (Makara-Studzińska i in. 2012). Należy zauważyć, iż wyniki są bardzo zbliżone do badań własnych, co może sugerować, że w tym przypadku stopień wykształcenia nie ma wpływu na wiedzę badanych. Takiego stwierdzenia nie można jednak odnieść do pozostałych wyników. Zaskakująca bowiem okazuje się obserwacja wskazująca na brak wiedzy dotyczącej osoby, która jako pierwsza dokonała w Polsce przeszczepu. Jedynie 24,6% uczniów w porównaniu do 91,1% studentów wiedziała, że chodzi o prof. Zbigniewa Religę. Również w temacie Centralnego Rejestru Sprzeciwu oraz „oświadczenia woli” studenci wykazywali się wyższą wiedzą niż uczniowie. Obserwacja ta sugeruje wdrożenie tematyki transplantacji do szkół średnich, gdyż bardzo często z wiedzą związane są konkretne zachowania. W przypadku badania własnego widoczne jest to to w odniesieniu do deklaracji dawstwa narządów po śmierci i za życia. Tu również uwidaczniają się różnice między porównywanymi grupami. To studenci częściej niż uczniowie deklarują pozytywne postawy wobec transplantacji. Dostrzeżono również, iż decyzja ta zależy od zaistniałych okoliczności. Ankietowani wykazywali większą wolę oddania narządów po śmierci, niż za życia. Ponad połowa respondentów (58,7%) akceptuje i zdecydowałaby się oddać narządy za życia. Więcej osób zdecydowałoby się na oddanie swoich narządów po śmierci – 83,1% badanych. Wynik ten nieznacznie różni się od rezultatów prac zagranicznych autorów. Shireen i in. wykazali, że 87,5% studentów Kolegium Medycznego w Kalaburagi, wyraża chęć oddania własnych organów po śmierci (Shireen et al. 2018). W kwestionariuszu własnego autorstwa został poruszony aspekt wyrażenia zgody na pobranie narządów od bliskiej osoby (zmarłej). Respondenci w 82,2% wyraziliby zgodę na pobranie narządów. Zupełnie inne stanowisko zostało przedstawione w sondażu przeprowadzonym przez Centrum Badania Opinii Społecznej (CBOS) w 2016 roku, w którym 67% ankietowanych wyraziło sprzeciw (Feliński 2016). Jest to niższa wartość, niż w poprzednim okresie badanym (2012), w którym sprzeciw wynosił, aż 76%.

Badanie stanu wiedzy społeczeństwa i zapoznanie się z opiniami na temat transplantacji narządów powinny być bazą do tworzenia programu propagującego idee bycia dawcą krwi, szpiku lub narządów. Należałoby podkreślić, że w pracach innych autorów porusza się rozumienie oddania narządu, jako formę darowizny (Nair-Collins et al. 2015). Takie podejście do tematyki transplantacji, może rodzić wiele negatywnych sytuacji np. chęć oddania narządu dla korzyści finansowych. Bowiem można podejrzewać, że część ludzi oczekuje rekompensaty, za pozostanie dawcą.

W badaniach własnych, nie zostały poruszone problemy mogące pojawiać się, gdy ludzie nie oddają bezinteresownie organu. Należy pamiętać, że decyzje o oddaniu narządów po śmierci (*ex mortuo*), są ściśle zależne od wielu elementów np. przekonań religijnych, wartości tradycyjnych, wiarygodności instytucji zajmujących się procedurą rejestracji dawców, takie czynniki wpływają na chęć i nastawienie społeczeństwa do pozostania dawcą (Aijing et al. 2016). Zmiana podejścia do tematów trudnych, jak śmierć bliskiej osoby, a zarazem wspieranie młodych ludzi w podejmowaniu świadomych decyzji, może wiele zmienić w polskim społeczeństwie. Korzystając z dostępnej bazy wiedzy o medycynie transplantacyjnej istnieje ogromna szansa, że wraz ze wzrostem wiedzy Polaków, wzrośnie liczba dawców za życia (*ex vivo*) i po śmierci (*ex mortuo*). Działania na rzecz propagowania medycyny transplantacyjnej są potrzebne, mają one wpływ na decyzje społeczeństwa, zaś od niej zależy ludzkie zdrowie i życie.

5. Wnioski

- a) Grupa badanych osób posiada dobrą ogólną wiedzę na temat transplantacji narządów. Nieco lepszą wiedzą wykazują się natomiast studenci.
- b) Pozytywne opinie na temat dawstwa narządów za życia i po śmierci częściej deklarują studenci niż uczniowie szkół średnich.
- c) Tematyka przeszczepiania komórek, tkanek i narządów jest związana z wieloma problemami. Wyniki przeprowadzonych badań sugerują konieczność podejmowania problematyki transplantacji wśród uczniów szkół średnich, celem kształtowania pozytywnych postaw wobec przeszczepu narządów i tkanek.

6. Literatura

- Aijing L, Wenzhao X, Wei W et al. (2016) Public opinion on organ donation after death and its influence on attitudes toward organ donation. *Ann Transplant* 21: (516-524)
- Antoszkiewicz K, Czerwiński J (2018) Pobieranie i przeszczepianie narządów w Polsce. *Poltransplant biuletyn informacyjny* 1(26): (13-29)
- Feliksiak M (2016) Komunikat z badań. Postawy wobec transplantacji narządów Centrum Badania Opini Społecznej (1-14)
- Gorkowicz B, Majewski W, Tracz E (2010) Opinia na temat dawstwa narządów wśród studentów uczelni wyższych Szczecina. *Via Medica* 18 (111-116)
- Gryczman R, Marchelek-Myśliwiec M, Gryczman M i in. (2013) Forum Nefrologiczne Przygotowanie dawcy do pobierania narządów-najczęstsze problemy kliniczne. 6 (3) : (161-164)
- Juszczak K, Michalak A, Gawłowicz K i in. (2016) Analiza postaw i czynników wpływających na podjęcie decyzji o transplantacji narządów wśród społeczności wiejskiej. *Pielęgniarstwo Chirurgiczne i Angiologiczne*. (3) : (141-145)
- Kliś A, Trzeńska A (2015) Opinia pielęgniarek i położnych na temat transplantacji narządów. *Pielęgniarstwo Chirurgiczne i Angiologiczne* 3: (182-186)
- Majchrowicz B, Kalita K (2012) Postawy wybranych grup społecznych wobec świadomej zgody na pobieranie narządów do przeszczepów. *Przegląd Medyczny Uniwersytetu Rzeszowskiego i Narodowego Instytutu Leków w Warszawie* (1): (86-97)
- Makara-Studzińska M, Kowalska J-A, Jakubowska K (2012) Poziom wiedzy oraz opinie pielęgniarek na temat transplantacji organów. *Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu* 18 (1): (31-36)
- Monastyrska EM, Beck O (2014); Psychologiczne i prawne aspekty transplantacji *ex vivo*. *Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu* 20 (2): (145-148)
- Nair-Collins M, Sydney R G, Sutin A R et al. (2015) Abandoning the dead donor rule? A national survey of public views on death and organ donation. *Journal of Medical Ethics* 41: (297-302)
- Olejniczak E, Kukiela B (2012) Medialny obraz transplantacji *ex mortuo* a przepisy prawa. *Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego* 46 : (86-102)

- Paszkowska M (2011) Dopuszczalność prawna transplantacji jako metody leczenia. Przegląd Medyczny Uniwersytetu Rzeszowskiego i Narodowego Instytutu Leków w Warszawie (4): (545-552)
- Shireen N, Ansari MW, Indupalli A et al. (2018) Knowledge and Attitude about Organ Donation and Transplantation among Students of Medical College in Kalaburagi: National Journal of Community Medicine : 9 (4) : (278-292)
- Ścisło L, Partyka E, Walewska E i in. (2013) Postawy i wiedza mieszkańców wsi i miast na temat transplantacji narządów. Hygeia Public Health 48 (1) : (40-45)
- Woderska N (2014) Wiedza i opinie młodzieży dotyczące dawstwa narządów do transplantacji. Kujawsko- Pomorskie Stowarzyszenie na rzecz transplantacji (19-89)

3. Epidemiologia transplantacji na podstawie danych zawartych w biuletynach Poltransplantu w latach 2010-2019.

Aleksandra Dziura⁽¹⁾, Agata Wypych-Ślusarska⁽²⁾, Karolina Krupa-Kotara⁽²⁾

⁽¹⁾ Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Epidemiologii, Wydziału Nauk o Zdrowiu w Bytomiu, Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

⁽²⁾ Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Wydział Nauk o Zdrowiu w Bytomiu, Katedra Epidemiologii i Biostatystyki, Zakład Epidemiologii

Aleksandra Dziura: Dziura.Aleksandra.26@vip.onet.pl

Słowa kluczowe: statystyka, dawcy, narządy, przeszczep

Streszczenie

Wstęp. Transplantacja jest czasami jedyną metodą ratowania życia ludzi ze skrajną niewydolnością narządów. Każdego roku w Polsce jak i na świecie pojawiają się osoby potrzebujące przeszczepu narządu. W zależności od stopnia zaawansowania choroby oraz rodzaju potrzebnego narządu, czas oczekiwania waha się od kilku miesięcy do ponad roku. Podczas procedury przeszczepiania kluczowym czynnikiem jest czas, od diagnozy do momentu znalezienia zgodnego tkankowo dawcy. Tematyka pobierania narządów, jak również ich przeszczepiania jest bardzo trudna, często dla społeczeństwa niezrozumiała, przez co wiąże się z szeregiem problemów.

Materiał i metoda. W badaniu posłużono się ogólnodostępnymi danymi, które zostały pozyskane ze strony Poltransplantu. Do pracy wykorzystano biuletyny od 2011 roku do 2020 roku, czyli ostatnie 10 lat. Zebrane dane pozwoliły na analizę danych na temat wszystkich możliwych wariantów przeszczepień tkanek, narządów. Analiza porównawcza została wykonana w arkuszu kalkulacyjnym Excel firmy Microsoft Office 2010.

Wyniki. Od 2010 do 2014 roku liczba wszystkich dawców systematycznie rosła, jednak od 2015 roku trend ten został zachwiany i w 2019 r. liczba dawców zakwalifikowanych wynosiła 520, wykorzystanych 491. Były to liczby mniejsze niż 2010r. Rośnie liczba osób zarejestrowanych w Krajowej Liście Oczekujących: w roku 2010 było to 2578 osób, a w 2019 – 2747. Zaobserwowano również znaczący i systematyczny wzrost liczby niespokrewnionych dawców szpiku z 146749 w 2010 r. do 1774285 w 2019 r.

Wnioski. W ciągu ostatnich 10 lat zwiększyła się całkowita liczba osób zarejestrowanych w Krajowej Liście Oczekujących. Pozytywny trend widoczny jest w systematycznie rosnącej liczbie zarejestrowanych niespokrewnionych dawców szpiku. Istnieje obawa, że pandemia COVID-19 zaburzy procedury związane z dawstwem i przeszczepem narządów i tkanek.

1. Wstęp

Transplantologia jest szczególnym działem medycyny zajmującym się problematyką przeszczepów. Transplantacja (z łac. *transplantare*- szczepić oraz *plantare*- sadzić) jest zabiegiem chirurgicznym polegającym na przeniesieniu pobranego organu (zdrowego od dawcy) na miejsce poprzedniego (chorego u biorcy). Jest to bezpieczna, skuteczna a czasem jedyna metoda leczenia, pozwalająca na uratowanie ludzi ze skrajną niewydolnością narządów (serca, wątroby, płuc, nerek, trzustki) (Król i Zembala-John 2013). Proces przygotowania dawcy i biorcy do pobrania, a następnie przeszczepienia narządu jest niezwykle czasochłonny. Nadrzędnym problemem jest jednak nadal brak wystarczającej liczby organów do transplantacji (Stec 2016).

Medycyna transplantacyjna w swej historii ulegała wielu przemianom, ściśle związanym z aktualnie posiadaną wiedzą lekarzy, którzy podejmowali próby przeszczepiania części ciała (np. skóra, noga). Pierwsze próby transplantacji sięgają daleko wstecz, kiedy wiedza medyczna była ograniczona. Rozwinięcie wiedzy i umiejętności przeszczepiania narządów, tkanek i komórek, pozwoliło na udoskonalenie procesu przeszczepiania. Rozwój medycyny, odkrycie antygenów w krwi, jak również odkrycie mechanizmu działania leków immunosupresyjnych pozwoliło na przeszczepianie narządów, tkanek oraz komórek zakończone sukcesem.

Polska transplantologia zaczęła się rozwijać w drugiej połowie XIX wieku. Nerki i serce były organami, które polscy transplantolodzy podjęli się przeszczepiać najwcześniej (Woderska 2014). W 1965 roku po raz pierwszy podjęto próbę przeszczepienia organu od dawcy zmarłego. W 1966 roku we Wrocławiu po raz pierwszy przeszczepiono nerkę od dawcy żywego, zaś w Warszawie od dawcy zmarłego (Król i Zembala-John 2013). Jan Mol, Antoni Dziatkowiak, Kazimierz Andrzej Rybiński, 4 stycznia 1969 roku w Łodzi podjęli pierwszą w Polsce próbę przeszczepienia serca. Na pierwszą udaną operację polska medycyna czekała aż do listopada 1985 r. Wówczas to w Zabrze prof. Zbigniew Religa przeprowadził pierwszą zakończoną sukcesem operację przeszczepienia serca w Polsce. W Warszawie dokonano w 1988 roku pierwszego jednoczasowego przeszczepiania nerki, i trzustki. W 1990 roku pierwszy raz przeszczepiono wątrobę u dziecka w Warszawie, a cztery lata później przeszczepiono wątrobę osobie dorosłej. Po raz pierwszy 22 grudnia 2005 roku śląscy i zagraniczni lekarze w składzie: Yoshiya Toyoda, Jacek Wojarski, Ewa Kucewicz oraz Marian Zembala, dokonali przeszczepianie obu płuc w Zabrze (Barker i Markmann 2013). Kolejnym ważnym dokonaniem była transplantacja kończyny górnej w Trzebnicy (2006). Ostatnie istotne osiągnięcia w dziedzinie transplantologii to przeszczepienie wysepek trzustkowych w układzie auto i alogenicznym (2008), pierwsze przeszczepienie twarzy (2013) oraz pierwszy w Polsce łańcuszkowy przeszczep nerek pobranych od żywych niespokrewnionych dawców (2015), w tym samym roku dokonano pierwszego na świecie złożonego przeszczepu narządów szyi (http://www.przeszczep.pl/news_1896_krotka_historia_transplantologii.html)

Podstawowym aktem prawnym w Polsce, zawierającym uregulowania dotyczące transplantacji narządów jest *Ustawa z dnia 01.05.2005 r o pobieraniu, przechowywaniu przeszczepianiu komórek, tkanek i narządów*. Na podstawie Art. 5 pobranie fragmentów potrzebnych do przeszczepu jest możliwe, jeśli osoba zmarła za życia nie wyraziła sprzeciwu. Wszelkiego rodzaju sprzeciw woli oddania narządów po śmierci jest możliwy poprzez: wpis do centralnego rejestru sprzeciwu, pisemnego oświadczenia z własnoręcznym podpisem oraz ustnego oświadczenia, które zostało złożone w obecności świadków (minimum dwóch) potwierdzonego przez nich pisemnie. Należy pamiętać, że sam brak sprzeciwu nie stanowi jednak wyłączonej przesłanki do dokonania pobrania. Konieczne jest jeszcze stwierdzenie stanu medycznego (Sienko A 2013), czyli orzekanie o śmierci mózgu oraz nieodwracalnym zatrzymaniu krążenia.

W Polsce przez początkowe lata rozwoju medycyny transplantacyjnej nie było placówki, która zajmowałaby się tą procedurą. W związku z czym w 1996 roku powstało Centrum Organizacyjno-Koordinacyjne ds. Transplantacji-Poltransplant w Warszawie (Wyszkowski 2016). Instytucja ta jest jednostką tzw. budżetową, która podlega ministrowi spraw właściwych do spraw zdrowia. Zadania Poltransplantu są bardzo zróżnicowane, należy do nich m.in: koordynacja pobierania i przeszczepiania komórek, tkanek i narządów na terenie kraju, prowadzenie Centralnego Rejestru Sprzeciwów, Krajowej Listy Oczekujących na przeszczep, rejestru przeszczepień, żywych dawców czy prowadzenie działalności edukacyjnej (Paszowska 2011).

Celem niniejszej pracy było przybliżenie problematyki transplantacji na podstawie analizy danych z biuletynów informacyjnych Poltransplantu.

2. Materiał i metoda

W badaniu posłużono się dostępnymi danymi z biuletynów informacyjnych z lat 2011-2020 (Wałaszewski 2011; Czerwiński 2012; Danielewicz 2013, Danielewicz 2014; Danielewicz 2015, Czerwiński 2016; Czerwiński 2017; Antoszkiewicz i Czerwiński 2018; Czerwiński 2019; Czerwiński 2020). Każdy materiał został przeanalizowany w celu uzyskania najważniejszych i niezbędnych informacji w celu analizy zmian zachodzących w ostatnich latach. Biuletyny informacyjne są kompleksowym zbiorem danych z całego kraju na temat m.in. potencjalnych dawców, rzeczywistych, zmarłych jak i żywych. Informacje te zostały wykorzystane w niniejszej analizie. Skupiono się również na danych dotyczących Krajowej Listy Oczekujących na przeszczepienie. Analiza została przeprowadzona za pomocą arkusza kalkulacyjnego Excel firmy Microsoft Office 2010. Wyniki zostały przedstawione w formie tabel i rysunków.

3. Wyniki i dyskusja

Medycyna transplantacyjna jest dziedziną ciągłego rozwoju. Dane przedstawione w tej części bardzo dobrze prezentują zmiany, jakie zaszły w minionym dziesięcioleciu. Z roku na rok dochodzi do zmian w liczbach przeszczepianych narządów, zarówno od dawców zmarłych (ex mortuo) jak i żywych (ex vivo). W tabeli 1 zestawiono liczbę dawców w latach 2010-2019.

Tab. 1. Zestawienie liczby dawców w latach 2010-2019 (na podstawie biuletynów Poltransplant [Wałaszewski 2011; Czerwiński 2012; Danielewicz 2013, Danielewicz 2014; Danielewicz 2015, Czerwiński 2016; Czerwiński 2017; Antoszkiewicz i Czerwiński 2018; Czerwiński 2019; Czerwiński 2020]).

Lata	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Potencjalni	655	732	786	775	782	706	677	720	638	639
Zakwalifiko-wani	536 (82%)	573 (78,3%)	626 (80%)	609 (78,6%)	616 (78,8%)	543 (76,9%)	557 (82,3%)	578 (80,3%)	514 (80,1%)	520 (81,4%)
Rzeczywiści	509 (78%)	553 (75,5%)	615 (78%)	593 (76,5%)	594 (76%)	526 (74,5%)	542 (81,1%)	560 (77,7%)	498 (78,1%)	504 (79,5%)
Wykorzystani	497 (76%)	541 (74%)	595 (75,7%)	574 (74,1%)	572 (73,1%)	510 (72,2%)	525 (77,5%)	542 (75,3%)	479 (75,1%)	491 (77,5%)

Liczba osób potencjalnie zgłoszonych jako dawcy, różni się od liczby dawców rzeczywistych. Zjawisko takie wynika z faktu, że nie w każdej sytuacji jest możliwe pobranie narządów od potencjalnego dawcy. Czasami dochodzi do wykluczenia dawcy ze względu np. na brak zgodności tkankowej z biorcą. Zauważyć można iż w latach 2010-2012 była tendencja wzrostowa dawców rzeczywistych. Jednak w kolejnych latach wartości uległy obniżeniu w 2013 do 593 (79,5 %), a rok później do 594 (76% ogółu). W następnych latach liczba dawców w jest zmienna. Najwięcej dawców wykorzystanych zauważa się w 2012 roku (595 osób), 2013 (574 osób) oraz w 2014 (572 osób). Najniższe wartości są w 2018 roku (zaledwie 479 dawców), 2019 (491 osób) i w 2010 (497 osób).

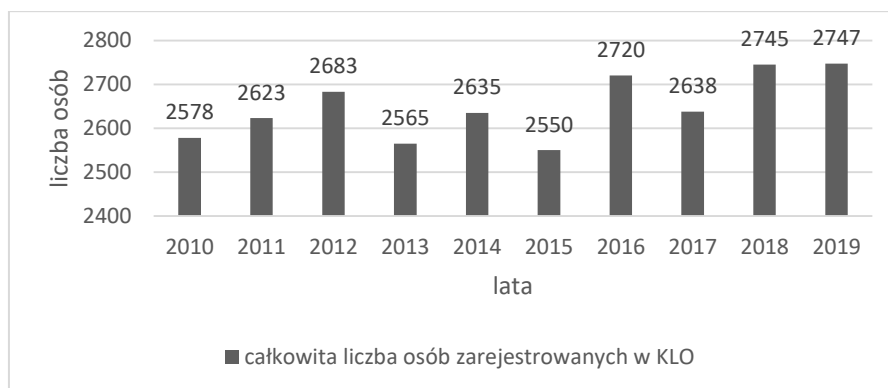
Rys. 1 przedstawia liczbę całkowitą osób, które zostały zarejestrowane od 2010 do 2019 roku w Krajowej Liście Oczekujących (KLO).

Liczba osób na przestrzeni 10 lat wahała się od 2550 do 2747. Najniższe wartości odnotowano w latach 2010 (2578 chorych), 2013 (2565 chorych) oraz w 2015 (2550 chorych). Jedne z najwyższych wyników zostały osiągnięte kolejno w 2016 (2720 chorych), 2018 (2745 chorych) oraz 2019 (2747 chorych) roku. Można domyślać się, że wraz z upływającym czasem liczba chorych potrzebujących przeszczepień będzie ulegała wzrostowi. Wynikać może to z coraz większej liczby osób chorych na: nowotwory, choroby o podłożu autoimmunologicznym, pacjentów z powikłaniami po zakażeniu SARS-CoV-2 itp. Ponadto rozwój medycyny, możliwość leczenia wielu chorób, a tym samym wydłużanie trwania życia może również wpływać na tę sytuację. Już od lat obserwuje się wydłużanie trwania życia, jednak okres ten nie jest w pełni czasem życia w pełnym zdrowiu. Najnowszy raport Głównego Urzędu Statystycznego pokazuje, że przeciętne trwanie życia dla mężczyzn w Polsce w 2019 r. 74,1 lat, natomiast oczekiwane dalsze trwanie życie w zdrowiu to już 59,7 lat, co stanowi 80,6% życia w zdrowiu. Średnia długość życia kobiet wynosi natomiast 81,7 lat i stanowi 77,5% dalszego życia w zdrowiu (GUS 2020). Oczywiście nie każdy przypadek życia z niepełnosprawnością lub chorobą przewlekłą wymaga od razu przeszczepu narządów czy tkanek, jednak ogólne trendy transformacji epidemiologicznej mogą mieć wpływ na liczbę osób oczekujących na przeszczep.

Kolejna tabela przedstawia wykorzystanie narządów od dawców żywych i zmarłych (Tab. 2).

Liczba wykorzystanych narządów zależy od rodzaju dawcy (czy jest to dawca żywy, czy zmarły). Na podstawie powyższej tabeli zauważa się, że pobrania od dawców zmarłych są zdecydowanie częstsze, niż od osób żywych. Przykładem jest przeszczepianie nerek lub wątroby, najczęściej nerek od dawców zmarłych przeszczepiono w 2012 (1091) i 2013 (1074) roku, najmniej

w 2018 (881) oraz 2019 (902). Natomiast od dawców żywych najczęściej w 2013 (57) i 2015 roku (60), najmniej w 2011 i 2018 roku (40). Przeszczepów wątroby było odpowiednio od dawców zmarłych najczęściej w 2014 (335) i 2017 roku (345), najmniej w latach 2010 (215) i 2011 (278). Najwięcej przeszczepień serc odbyło się w 2018 (145) i 2019 (138) roku, najmniej w 2010,2012 (po 79 dla każdego z tych lat) i 2014 (76) roku. Jak widać w ostatnich latach zauważa się wzrost przeszczepów serca, natomiast utrzymujący się od 2017 roku brak przeszczepów przedramienia. Zaledwie w 4 latach dokonano takowej transplantacji. Odpowiedni w 2010 (2), 2011, 2014, 2016 odpowiednio po jednym przeszczepie przedramienia.

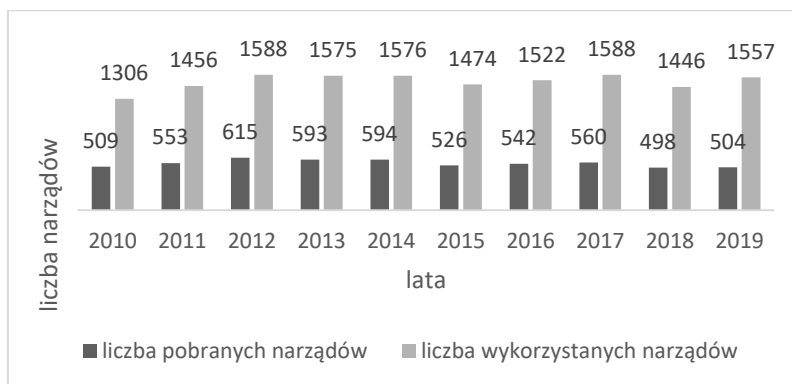


Rys. 1. Całkowita liczba osób zarejestrowanych w Krajowej Liście Oczekujących w latach 2010-2019 (na podstawie biuletynów Poltransplant [Wałaszewski 2011; Czerwiński 2012; Danielewicz 2013, Danielewicz 2014; Danielewicz 2015, Czerwiński 2016; Czerwiński 2017; Antoszkiewicz i Czerwiński 2018; Czerwiński 2019; Czerwiński 2020]).

Analizując powyższe dane widać wyraźną różnicę w wykorzystaniu narządów (np. nerki) od dawców zmarłych i żywych. Zgodnie z polskim prawem dawstwo *ex vivo* jest możliwe, gdy biorca jest spokrewniony z dawcą w linii prostej, jest jego rodzeństwem, małżonkiem lub osobą przysposobioną. Możliwa jest również donacja na rzecz osoby niespokrewnionej, jednak takie dawstwo altruistyczne jest mało popularne, co jest widoczne również w powyższych statystykach. Kolejna grafika (Rys 2) porównuje liczbę pobranych i wykorzystanych narządów.

Tab. 2. Wykorzystanie narządów od dawców żywych i zmarłych w latach 2010-2019 (na podstawie biuletynów Poltransplant [Wałaszewski 2011; Czerwiński 2012; Danielewicz 2013, Danielewicz 2014; Danielewicz 2015, Czerwiński 2016; Czerwiński 2017; Antoszkiewicz i Czerwiński 2018; Czerwiński 2019; Czerwiński 2020]).

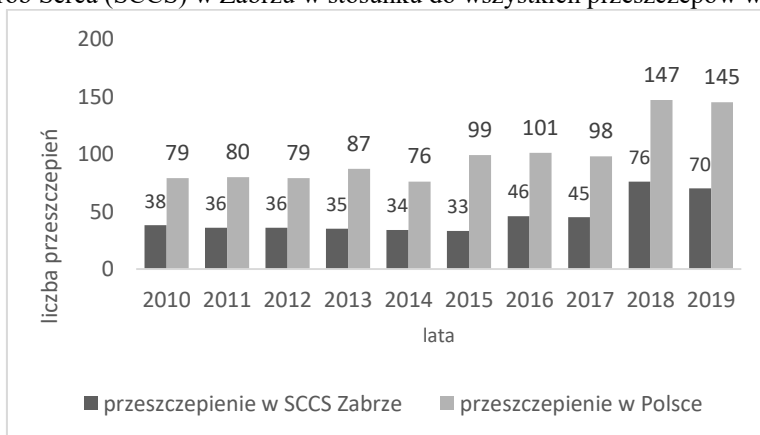
Lata	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Dawca										
Nerki od dawców zmarłych	947	998	1091	1074	1065	951	975	999	881	902
Nerki od dawców żywych	50	40	51	57	55	60	50	56	40	52
Wątroba od dawców zmarłych	215	278	311	316	335	304	314	345	288	321
Wątroba od dawców żywych	20	18	14	18	30	22	28	25	22	21
Serce	79	80	79	87	76	99	101	97	145	138
Pluca	12	15	16	17	19	24	35	39	43	56
Jednoczasowy przeszczep trzustki i nerki	19	33	34	29	28	29	31	30	19	24
Trzustka	1	1	9	3	9	12	7	11	1	5
Przedramię	2	1	0	0	1	0	1	0	0	0



Rys. 2. Wykorzystanie narządów pozyskanych od zmarłych w latach 2010-2019 ([na podstawie biuletynów Poltransplant [Wałaszewski 2011; Czerwiński 2012; Danielewicz 2013, Danielewicz 2014; Danielewicz 2015, Czerwiński 2016; Czerwiński 2017; Antoszkiewicz i Czerwiński 2018; Czerwiński 2019; Czerwiński 2020]).

Można zauważyć, iż ilość pobranych i wykorzystanych narządów znacznie się różni. W ostatnich 10 latach ilość narządów pozyskanych od osób zmarłych utrzymuje się na podobnym poziomie. Zauważa się niewielkie różnice, jednak najczęściej pobranych narządów zostało odnotowane w 2012 (615), 2013 (593) oraz 2014 (594). Najmniejsze wartości zostały zaobserwowane w 2015 (526), 2018 (498) i 2019 (504) roku. Należałoby zastanowić się od czego może zależeć zmienna liczba pozyskiwanych narządów z roku na rok. Okresowo pojawiające się wzrosty mogą świadczyć o bardziej świadomej decyzji oddania narządów po śmierci. Jeżeli takie zjawisko ma miejsce to istnieje duża szansa na znalezienie narządów, tkanek i komórek dla potrzebujących pacjentów. Z drugiej strony obecna sytuacja pandemii COVID-19 rodzi niepokoje związane z czasowym załamaniem się programu pobierania i przeszczepiania narządów. Zgodnie z wytycznymi Poltransplantu z maja 2020 roku w szpitalach, gdzie zamknięte zostały takie oddziały jak chirurgia, blok operacyjny, ortopedia, okulistyka, oddział anestezjologii i intensywnej terapii należy zawiesić działalność związaną z szeroko rozumianą procedurą transplantacji, tj. rekrutacją zmarłych dawców, pobieraniem narządów i tkanek i ich przeszczepianiem [https://zgodanazycie.pl/wp-content/uploads/2020/05/2020_05_05_Stanowisko_Poltransplantu_ws_Covid_19.pdf].

Zarówno rysunek 3 jak i Tabela 3 przedstawiają udział przeszczepów serca w Śląskim Centrum Chorób Serca (SCCS) w Zabrze w stosunku do wszystkich przeszczepów w kraju.



Rys. 3. Przeszczepienia serca w Polsce i w SCCS Zabrze w latach 2010-2019 (na podstawie biuletynów Poltransplant [Wałaszewski 2011; Czerwiński 2012; Danielewicz 2013, Danielewicz 2014; Danielewicz 2015, Czerwiński 2016; Czerwiński 2017; Antoszkiewicz i Czerwiński 2018; Czerwiński 2019; Czerwiński 2020]).

Tab. 3. Udział(%) przeszczepów serca w SCCS w Zabrze w stosunku do liczby przeszczepów w kraju (na podstawie biuletynów Poltransplant [Wałaszewski 2011; Czerwiński 2012; Danielewicz 2013, Danielewicz 2014; Danielewicz 2015, Czerwiński 2016; Czerwiński 2017; Antoszkiewicz i Czerwiński 2018; Czerwiński 2019; Czerwiński 2020]).

Rok	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Udział (%) przeszczepów w SCCS w stosunku do skali krajowej	48,1 %	45%	45,6 %	40,2 %	44,7 %	33,3 %	45,5 %	45,9 %	51,7 %	48,3 %

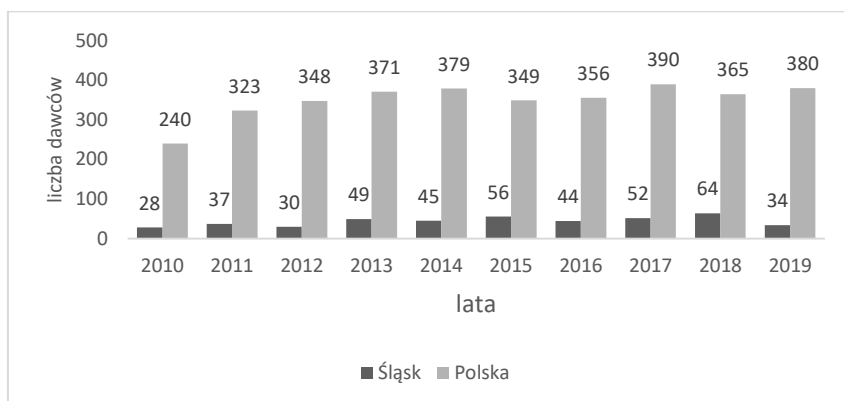
Bazując na powyższych danych można wnioskować, że udział procentowy jest dość znaczny we wszystkich latach. Jedynie w 2015 roku odnotowano najniższą wartość, 33 przeszczepy co oznacza 33,3% w stosunku do wartości krajowych. Transplantacje serca w SCCS w pozostałych latach mają udział procentowy odpowiedni od 40,2% (2013) do 51,7 % (2018). Ośrodek zlokalizowany w Zabrze ma znaczny udział w transplantacjach serca w skalo całego kraju. Jest to konsekwencją prężnie rozwijającej się i mającej swoje tradycje medycyny transplantacyjnej na Śląsku. To tutaj również powstał pierwszy i jedyny do tej pory w Polsce program transplantacji serca u dorosłych. Liczba pobrań wielonarządowych od zmarłych dawców jest przedstawiona na Rys. 4.

Pobrania wielonarządowe od osób zmarłych w skali kraju w latach 2010 do 2019 wynosiły odpowiednio od 28 (2010) do 64 (2018) w skali województwa Śląskiego. Natomiast w skali całej Polski odpowiednio od 240 w 2010 roku do 390 w 2017 roku. Na przestrzeni przedstawionych 10 lat liczba pobrań wielonarządowych od dawców ex mortuo w skali kraju jak i województwa śląskiego ulega wahaniom. Od 2010 do 2014 roku w skali kraju wykazuje tendencję wzrostową, następnie ulega spadkowi w latach 2015 (349) i 2016 (356), kolejno w 2018 (365). Wyższe wartości natomiast obserwuje się w 2017 (390) i 2019 roku (380). W skali województwa sytuacja już jest bardziej dynamiczna, nie da się jednoznacznie określić w których latach dochodzi do wzrostu, gdyż już w następnym roku jest spadek liczby dawców. Jedne z najwyższych wartości można zaobserwować odpowiednio w: 2013 (49), 2015 (56), 2017 (52) oraz 2018 roku (64). Jak już wcześniej wspomniano pandemia wirusa SARS-CoV-2 może zakłócić proces dawstwa również od zmarłych dawców. Przebycie zakażenia SARS-CoV-2 u potencjalnego dawcy stanowi nieakceptowalne ryzyko, a tym samym wyklucza taką osobę z możliwości dawstwa. Co więcej, każdorazowo przed pobraniem narządów powinien być przeprowadzony test RT-PCR w celu wykluczenia ewentualnego zakażenia. Dopuszcza się jednak w wyjątkowych sytuacjach przeprowadzenie przeszczepów po uprzedniej analizie ryzyka i korzyści dla biorcy [<https://zgodanazycie.pl/transplantacje-zalecenia-na-czas-epidemii-koronawirusa-w-polsce/#Odnosnie-pobran-i-realizacji-przeszczepien-narzadowych>].

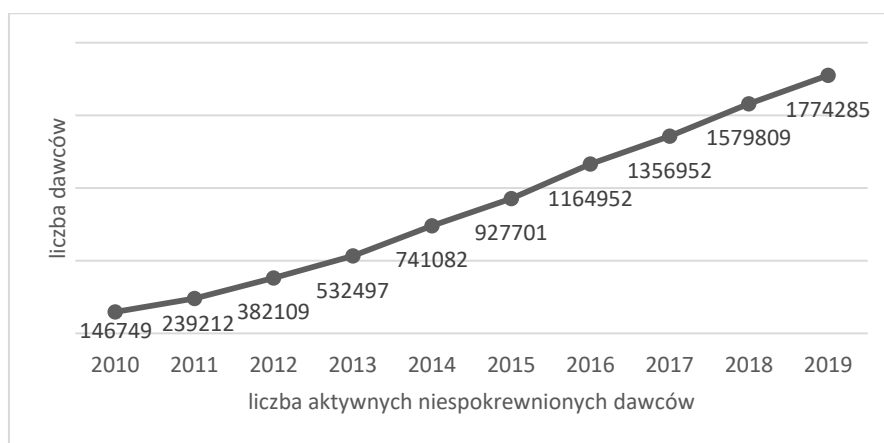
W Polsce został stworzony Centralny Rejestr Niespokrewnionych Dawców Szpiku i Krwi Pępowinowej, od początku aktywność dawców ulegała niewielkim zmianom (Rys.5).

W 2010 roku, liczba dawców niespokrewnionych wyniosła 146749. W kolejnych latach liczba dawców sukcesywnie wzrastała dzięki czemu w 2015 roku osiągnęła wartość 927701, a w roku 2019 dawców było już 1774285. Daje to nadzieję, że z roku na rok będzie przybywać nowych dawców w Centralnym Rejestrze Niespokrewnionych Dawców Szpiku i Krwi Pępowinowej. Zatem dzięki większej liczbie dawców jest większa szansa na znalezienie dawcy i wyleczenie pacjentów chorujących np. na nowotwory układu krwiotwórczego. Niewykluczone, że obserwowany wzrostowy trend zarejestrowanych niespokrewnionych dawców szpiku jest efektem działalności Fundacji DKMS, promującej właśnie tego typu aktywność. Fundacja powstała w 2008 roku, a dwa lata po jest działalność obserwuje się systematyczny i ciągły wzrost potencjalnych dawców. Tendencje te są wyraźnie różne od tych zaobserwowanych w przypadku dawstwa narządów, jak choćby nerki. Jednak różnice te nie powinny dziwić, gdyż dawstwo szpiku wiąże się z mniej inwazyjnymi procedurami niż w przypadku dawstwa nerki. Jeśli pandemia COVID-19 nie zaburzy widocznego trendu, to istnieje

realna szansa, że z roku na rok będzie coraz więcej aktywnych dawców niespokrewnionych. Dzięki zwiększającej się liczbie dawców, szanse pacjentów na wyleczenie są większe.



Rys. 4. Liczba pobrań wielonarządowych od dawców zmarłych (ex mortuo) w latach 2010-2019 (na podstawie biuletynów Poltransplant [Wałaszewski 2011; Czerwiński 2012; Danielewicz 2013, Danielewicz 2014; Danielewicz 2015, Czerwiński 2016; Czerwiński 2017; Antoszkiewicz i Czerwiński 2018; Czerwiński 2019; Czerwiński 2020]).



Rys. 5. Aktywność dawców niespokrewnionych na przestrzeni ostatnich 10 lat (na podstawie biuletynów Poltransplant [Wałaszewski 2011; Czerwiński 2012; Danielewicz 2013, Danielewicz 2014; Danielewicz 2015, Czerwiński 2016; Czerwiński 2017; Antoszkiewicz i Czerwiński 2018; Czerwiński 2019; Czerwiński 2020]).

4. Wnioski

- Liczba rzeczywistych dawców narządów w latach 2010-2019 utrzymuje się na zmiennym poziomie, wahającym się między 498 a 615 osób.
- W ciągu ostatnich 10 lat zwiększyła się całkowita liczba osób zarejestrowanych w Krajowej Liście Oczekujących.
- Istnieją wyraźne dysproporcje w liczbie przeszczepów narządów od żywych i zmarłych dawców. Pozytywny trend widoczny jest jednak w systematycznie rosnącej liczbie zarejestrowanych niespokrewnionych dawców szpiku.
- Istnieje obawa, że pandemia COVID-19 zaburzy procedury związane z dawstwem i przeszczepem narządów i tkanek.

5. Literatura

- Antoszkiewicz K, Czerwiński J (2018) Pobieranie i przeszczepianie narządów w Polsce. *Poltransplant biuletyn informacyjny* 1(26): (13-29)
- Barker CF, Markmann JF (2013) Historical Overview of Transplantation. *Cold Spring Harb Perspect Med* : 3(4)
- Czerwiński J (2012) „Poltransplant Biuletyn Informacyjny” Centrum Organizacyjno-Koordynacyjne ds. Transplantacji Poltransplant. 1 (20)
- Czerwiński J (2016) „Poltransplant Biuletyn Informacyjny” Centrum Organizacyjno-Koordynacyjne ds. Transplantacji Poltransplant. 1 (24)
- Czerwiński J (2017) „Poltransplant Biuletyn Informacyjny” Centrum Organizacyjno-Koordynacyjne ds. Transplantacji Poltransplant. 1 (25)
- Czerwiński J (2019) „Poltransplant Biuletyn Informacyjny” Centrum Organizacyjno-Koordynacyjne ds. Transplantacji Poltransplant. 2 (28)
- Czerwiński J (2020) „Poltransplant Biuletyn Informacyjny” Centrum Organizacyjno-Koordynacyjne ds. Transplantacji Poltransplant. 1 (29)
- Danielewicz R (2013) „Poltransplant Biuletyn Informacyjny” Centrum Organizacyjno-Koordynacyjne ds. Transplantacji Poltransplant. 1 (21)
- Danielewicz R (2014) „Poltransplant Biuletyn Informacyjny” Centrum Organizacyjno-Koordynacyjne ds. Transplantacji Poltransplant. 1 (22)
- Danielewicz R (2015) „Poltransplant Biuletyn Informacyjny” Centrum Organizacyjno-Koordynacyjne ds. Transplantacji Poltransplant. 1 (23)
- Góral-Radziszewska, Waśkiewicz K, Potyra M i in. (2020) Główny Urząd Statystyczny 2020. Trwanie życia w zdrowiu Polsce w latach 2009-2019.
- Król B, Zembala-John J (2013) Transplantacja narządów aspekty medyczne, prawne i organizacyjne. Ministerstwo Zdrowia: (1-13)
- Paszkowska M (2011) Dopuszczalność prawna transplantacji jako metody leczenia. *Przegląd Medyczny Uniwersytetu Rzeszowskiego i Narodowego Instytutu Leków w Warszawie* (4): (545-552)
- Sieńko A (2013) Skuteczność sprzeciwu w na pobranie tkanek i narządów w kontekście obowiązków lekarza. *Stan de lege lata i wnioski de lege ferenda. Piel. Zdr. Publ.3* (2) : (167-173)
- Stec T (2016) Donacja organów a logika daru. *Chrześcijańskie spojrzenie na problem transplantacji. Tarnowskie Studia Teologiczne* 20; 35 (2) : (125-140)
- Ustawa z dnia 01.07.2005r. o pobieraniu, przechowywaniu i przeszczepianiu komórek, tkanek i narządów. (Dz. U. z 2005 r. Nr 169, poz 1411)
- Wałaszewski J (2011) „Poltransplant Biuletyn Informacyjny” Centrum Organizacyjno-Koordynacyjne ds. Transplantacji Poltransplant. 1 (19)
- Woderska N (2014) Wiedza i opinie młodzieży dotyczące dawstwa narządów do transplantacji. *Kujawsko-Pomorskie Stowarzyszenie na rzecz transplantacji* (19-89)
- Wykowski J (2016) Dwie dekady „Poltransplantu”. *Sporo się udało, ale wyzwań nie brakuje. Rynek Zdrowia* (1-2)

4. Komórki glejowe ośrodkowego układu nerwowego w procesach uczenia się Central nervous system glial cells in learning processes

Glinka Marta

Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, Lublin

Opiekun naukowy: dr Andrzej Zykubek

Glinka Marta: martanna5@gmail.com

Słowa kluczowe: uczenie się, komórki glejowe, procesy poznawcze, neuronauka

Streszczenie

Komórki glejowe w ostatnich latach stają się obiektem coraz większej ilości badań ze względu na umożliwienie technologiczne obserwowania interakcji ich z pozostałymi elementami organizmu. Mają one również swój udział w kształtowaniu procesów poznawczych, w tym uczenia się. Każdy z typów w odmienny sposób wpływa na działanie neuronów, a w konsekwencji na działanie umysłu. Oligodendrocyty poza funkcją ochronną, zapewniają odpowiednią szybkość i poziom integracji sygnałów. Mikroglej stanowi nie tylko ochronę przed antygenami, ale też ma udział w plastyczności mózgu ze względu m.in. na zdolność do zmiany struktury poprzez przycinanie synaptyczne. Astrocyty również mają swój udział w zmienianiu sieci neuronów, są one odpowiedzialne za wyznaczanie odpowiednich szlaków dla aksonów. Inne ich m.in. funkcje to kontrola synaps i podtrzymywanie lub wygaszanie sygnału oraz kontrola spójności sygnału z informacjami przekazywanymi z pozostałych części organizmu. Wszystkie te elementy wpływają na procesy uczenia się, umożliwiając odpowiednią reorganizację struktury mózgu dla włączenia nowych informacji i chroniąc już istniejące.

1. Wstęp

Główny nurt badań dotyczących struktur mózgowych oraz biologicznych podstaw procesów umysłowych obejmuje zagadnienia dotyczące komórek układu nerwowego rozumianych jako neurony. Opracowuje się modele uwzględniające ich zdolność do przetwarzania i przesyłania informacji za pomocą sygnału elektrycznego. Koncentracja na takim podejściu sprawiła, że komórki glejowe, które w podobnej liczbie do neuronów występują w układzie nerwowym (Bartheld i in. 2016), przez lata nie znajdowały się w kręgach zainteresowań badaczy. Dodatkowym utrudnieniem dla rozpoczęcia badań uwzględniających glej był pogląd zapoczątkowany już w XIX wieku, według którego komórki te pełnią mało istotne funkcje w mózgu. Przyczynił się do tego między innymi Rudolf Virchow, który w 1856 roku stwierdził, że glej, którego nazwa pochodzi właśnie od zaproponowanego przez tego badacza słowa „Nerven Kitt” (klej neuronów), tworzy rodzaj tkanki łącznej stanowiącej wypełnienie przestrzeni mózgowej w obrębie występowania neuronów. Również obserwacje Camillo Golgiego wpłynęły negatywnie na zainteresowanie komórkami glejowymi w kręgu naukowym ze względu na stworzoną przez niego koncepcję, w której komórki glejowe zajmować miały jedynie pomocnicze funkcje względem neuronów, co niejako zamroziło badania na prawie sto lat (Somjen 1988).

Poza teoretycznymi wpływami, spowalniającymi rozwój wiedzy na temat gleju były również inne czynniki, między innymi brak dostępnych metod badania aktywności tych komórek. Dopiero w latach 80' XX wieku wykazano, że jeden z ich typów posiada zdolność komunikacji między sobą (poprzez fale wapniowe). Nowe odkrycia ujawniające ich funkcje sprawiły, że komórki glejowe pojawiły się w obszarze zainteresowania naukowego ze względu na ich udział w procesach mózgowych. Również w próbach tłumaczenia i tworzenia modeli procesów poznawczych wskazuje się na ich rolę, szczególnie uwzględniając wpływ na procesy uczenia się, co jest również tematem tej pracy.

2. Opis zagadnienia

Do komórek glejowych zalicza się kilka różnych pod względem funkcji i budowy typów. Dzieli się je na dwie podstawowe grupy: mikroglej i makroglej, obejmujący astrocyty

i oligodendrocyty w ośrodkowym układzie nerwowym oraz komórki Schwanna w obwodowym. Za główne zadanie mikrogleju zwykle się przyjmować odpowiedź immunologiczną w układzie nerwowym w wyniku wystawienia na antygeny oraz fagocytozę. Kolejny typ, astrocyty, charakteryzuje się poprzez ich funkcje odżywcze, dostarczające niezbędnych neuronom składników z naczyń krwionośnych, oraz tworzenie bariery krew-mózg. Oligodendrocyty odpowiedzialne są zaś za proces mielinizacji w ośrodkowym układzie nerwowym, analogiczną funkcję pełnią komórki Schwanna w obwodowym.

Oligodendrocyty, astrocyty i mikroglej posiadają jednak więcej funkcji niż te powyżej wymienione, co wiemy z badań dotyczących ich udziału w procesach poznawczych. Sama ich struktura jest silnie zintegrowana z systemem nerwowym. Ma to wpływ na transmisję impulsów nerwowych poprzez możliwość odpowiedzi na nie. Jest to możliwe dzięki zdolności gleju do komunikowania się za pomocą ekspresji i wychwytu neuroprzekaźników i innych cząstek oraz za pośrednictwem neksusów (znajdujących się pomiędzy błonami komórkowymi połączeń szczelinowych). Wychwycenie informacji z układu nerwowego, jak i odbiór sygnałów z pozostałych układów przez komórki glejowe ma wpływ na utrzymanie stanu homeostazy. Sugeruje się również ich udział w procesach neuronalnych i możliwość ich kontroli, podkreślając też wpływ na funkcje umysłowe.

3. Przegląd literatury

Każdy z typów gleju w inny sposób moduluje neuronalne struktury biorące udział w uczeniu się. W tym rozdziale przedstawię opis wpływu na ten proces oligodendrocytów, mikrogleju i astrocytów. Przykładem zależności między pierwszym z wymienionych typów a procesami umysłowymi jest tworzona przez oligodendrocyty mielina, czyli osłona aksonów mająca chronić je przed uszkodzeniem. Początki wytwarzania tej ochrony przypadają na okres rozwoju płodowego, ok. 12 tygodnia ciąży u człowieka (Linderkamp i in. 2009). Czas procesu mielinizacji różni się między gatunkami zwierząt. U tych, które po narodzeniu wykazują dużą samodzielność i niezależność od rodzica (np. konie i myszy) mielinizacja niemalże całkowicie ukończona jest w momencie narodzin. W przypadku człowieka proces wydaje się być spowolniony i trwa do ok. 20 roku życia (Fields 2008), pokrywając się z okresem reorganizacji struktur synaptycznych neuronów, wynikającej z nabywania nowych doświadczeń przez osobniki. Może to sugerować wpływ mieliny na procesy przetwarzania informacji i na optymalizację ich pod wpływem różnorodnych interakcji z otoczeniem.

Neurony przekazują między sobą informacje za pomocą sygnału elektrycznego i neuroprzekaźników. W tej komunikacji udział ma również mielina, która umożliwia skokowe przewodnictwo pomiędzy lukami otoczki mielinowej aksonów, zwanymi węzłami Ranviera. Sprawia to, że sygnał przemieszcza się między kolejnymi takimi przerwami przypominając nagle skoki. Węzły te gromadzą liczne kanały jonowe, dzięki czemu generowany jest tam potencjał czynnościowy. Mielina zapewniając taką strukturę wokół aksonów przyspieszać może szybkość przewodzenia sygnału od wyjściowego 0.5-10 m/s (szybkość w przypadku neuronu bez osłony) do ok. 120-150 m/s. (Purves i in. 2004), zapewniając szybszy przekaz informacji i pośrednio możliwość wykonania większej ilości operacji umysłowych. Przykładowo czas przewodzenia sygnału w ludzkim ciele modzelowatym, będącym strukturą łączącą półkule mózgowie zapewniając im komunikację, w okresie narodzin wynosi 150-300 ms, jest wtedy jeszcze strukturą niezmielinizowaną, natomiast następuje skrócenie tego czasu do ok. 30 ms w wyniku późniejszego wytworzenia mieliny (Fields 2008).

Poza przyspieszaniem przewodnictwa nerwowego mielina ma kluczowe znaczenie dla integracji impulsów nerwowych, stojącej u podstaw powstawania procesów poznawczych. Koniecznym warunkiem jest tu równoczesne odebranie przez neuron od komórek go poprzedzających sygnałów, tak by w wyniku ich kumulacji został osiągnięty próg potencjału błony komórkowej. Różne odległości między neuronami, które sygnał musi przebyć, a zatem i różne długości aksonów, stanowią problem dla „zapalenia” kolejnej komórki. Często informacja docierać musi z wielu odległych względem siebie struktur mózgowych. Czas w jakim powstaje napięcie w obrębie synaps to jedynie 2-4 ms (Nolan i in. 1999), co stanowi kolejne utrudnienie w komunikacji międzyneuronalnej. Ważna jest zatem synchronizacja sygnałów, tak aby udało się wytworzyć

odpowiedni potencjał czynnościowy. Kluczowym elementem umożliwiającym osiągnięcie tego jest regulacja czasu przewodzenia impulsu. Pomocne w tym są oligodendrocyty, które wpływają na prędkość przewodzenia sygnałów między neuronami poprzez modulowanie średnicy aksonu i grubości osłony mielinowej oraz kontrolowanie rozstawu, ilości i struktury węzłów Ranviera (Fields 2008). Modyfikacja mielinu wpływająca na szybkość przesyłania danego sygnału możliwa jest dzięki sygnalizacji zachodzącej między tym typem gleju i neuronami (Wake i in. 2011). W konsekwencji dochodzi do integracji układu nerwowego, konstytuującego działanie funkcji poznawczych przez dostosowane przetwarzanie informacji i integrację różnych obszarów struktury mózgowej.

Oligodendrocyty odgrywają również ważną rolę w procesach uczenia się ze względu na modyfikację mielinu zależnie od doświadczeń pochodzących z interakcji ze środowiskiem. Wykazano, że w przypadku szczurów przebywających w przestrzeni zawierającej dodatkowe elementy, jak obiekty do zabawy, oraz wystawionych na częstsze interakcje społeczne obserwuje się wzrost mielinu w korze wzrokowej o od 27 do 33% (Szeligo i Leblond 1977). Wprowadzenie urozmaiceń do środowiska życia skutkuje również wzrostem mielinu w obszarze ciała modelowego u szczurów, co powiązane jest też z lepszymi wynikami w testach poznawczych (Fields 2008). Ta struktura mózgowa sprawia, że możliwa jest integracja informacji płynących z obszarów różnych modalności sensorycznych, a także tych samych modalności, które znajdują się w przeciwnych półkulach. Ponadto wykazano, że urozmaicenie nauki biegu poprzez wprowadzenie nieregularnie rozłożonych szczebli kołowrotka poskutkowało zwiększeniem liczby oligodendrocytów, co powiązane było właśnie z nabywaniem nowych zdolności (Xiao i in. 2016). Podobny sprzęt wykorzystano również w innych badaniach, w wyniku których zaobserwowano w obszarach podkorowej istoty białej wzmoczoną ekspresję oligodendrocytów, która zaczęła się już po 2,5 godzinach od początku badania (McKenzie i in. 2014), co sugeruje, że komórki te mają aktywny wpływ na proces uczenia się już we wczesnych etapach, wspierając tym samym formowanie się struktur synaptycznych.

Zmiany pod wpływem uczenia się w obrębie struktury zmielinizowanych szlaków nerwowych u ludzi zostały zaobserwowane też w badaniach z użyciem metod obrazowania. W przypadku umiejętności złożonych uczenie się jest powiązane z rozwojem organizacji istoty białej mózgu w obszarze zależnym od zaangażowanych modalności zmysłowych i procesów poznawczych. Przykładowo zmiany dotyczące oligodendrocytów związane z wpływem gry na pianinie obserwuje się w tarczce wewnętrznej, która składa się z włókien połączonych z pierwszorzędowną korą czuciową i korą przedruchową (Bengtsson i in. 2005). Ponadto zaniedbywanie osób w okresie dziecięcym ma wpływ na ciało modelowe, powodując jego słabszy rozwój. Różnica objętości tej struktury pomiędzy osobami w wieku dorosłym, które miały zapewniony prawidłowy rozwój i tymi, które były zaniedbywane wynosić może nawet 17% (Teicher i in. 2004). Badania (Giedd 2004) ukazują również, że powiązane pośrednio z uczeniem się, zdolności podejmowania decyzji u osób dorosłych są gorsze, jeśli mielinizacja przodomózgowia nie będzie przeprowadzona kompletnie do 25 roku życia. Braki rozwojowe powodować mogą gorszą integrację informacji poprzez niezapewnienie odpowiedniej synchronizacji sygnałów neuronalnych. Wady istoty białej powiązane są też z zaburzeniami autystycznymi. Obserwuje się w tym przypadku powiększenie objętości istoty białej mózgu, w szczególności dotyczące połączeń między strukturami korowymi (Fields 2008). Taki rodzaj organizacji traktów nerwowych może sugerować specyficzne typy wiedzy, integrujące dużą liczbę informacji, u osób wykazujących to zaburzenie.

Podsumowując, można stwierdzić, że podstawowa funkcja oligodendrocytów, jaką jest tworzenie pewnego rodzaju mechanicznej osłony mającej na celu zabezpieczenie neuronów przed uszkodzeniem, umożliwia zarazem odpowiednią szybkość przepływu impulsów przenoszących informacje w mózgu i wspiera też tym samym procesy uczenia.

Wpływ na procesy poznawcze mogą również mieć komórki mikrogleju, zdolne do redukcji istniejących połączeń między neuronami. Funkcja ta umożliwia zmiany architektury struktur mózgowych dzięki redukcji wadliwych bądź nieskutecznych synaps. Proces ten nazywany jest przycinaniem synaptycznym, zachodzi on zarówno na wczesnych etapach rozwojowych, w których dochodzi do znacznej redukcji neuronów, jak i na mniejszą skalę w późniejszym życiu człowieka. Mikroglej zazwyczaj charakteryzuje się jako komórki stanowiące immunologiczną ochronę układu

nerwowego przed antygenami. W przypadku nieaktywowanej formy określa się go jako statyczny, nieruchomy. Komórki te jednak nawet w sytuacji braku zagrożenia badają środowisko, w którym się znajdują, dotykając powierzchni komórek w szczególności w obszarze synaps (Morris i in. 2013). Ma to na celu sprawdzanie stanu i uporządkowania sieci połączeń neuronalnych, jak i też zwiększenie możliwości wykrycia antygenów.

Ważną funkcją dla regulacji procesów mózgowych przez mikroglej jest wykrywanie aktywności neuronalnej, odbywające się za pomocą odpowiednich receptorów, neuromediatorów i neuromodulatorów (Pocock i Kattenmann 2007). Sygnały pochodzące od komórek nerwowych, w zależności od ich natężenia, pozwalają na odpowiedź mikrogleju dostosowaną do sytuacji - m.in. rozpoczęcie fagocytozy lub procesów immunologicznych skierowanych przeciw wykrytym antygenom. Między komórkami nerwowymi i mikrogleju odbywa się również komunikacja o przeciwnym kierunku. Drugie z wymienionych mogą wpływać na neurony poprzez wydzielane substancje neuroprzekaznikowych czy troficznych, jak również poprzez zmianę struktur sieci komórek nerwowych w wyniku usuwania poszczególnych jej elementów (Kattenmann 2013). Zdolności te pomagają w zapewnieniu odpowiedniej organizacji neuronalnej, dając tym samym podstawy dla poprawnego działania funkcji poznawczych takich jak uczenie się.

Jednymi z cząsteczek używanych do komunikacji na osi neurony-mikroglej są cytokiny (białka kojarzone przede wszystkim z odpowiedzią immunologiczną). Mają one również swój udział w plastyczności synaptycznej, rozumianej jako zdolność synaps do zmian strukturalnych wywoływanych sygnalizacją neuronów lub innych komórek. Do istotnych czynników wpływu na procesy uczenia się zaliczono między innymi TNF, poprzez który mikroglej bierze udział w procesach skalowania synaptycznego (zmniejszenia siły synaps komórki o ten sam współczynnik uwzględniając wagi połączeń), Interleukinę-6, białka układu dopełniacza oraz Interleukinę-1b, którą powiązano z procesami pamięciowymi (Morris i in. 2013).

Również w przypadku przycinania synaptycznego w trakcie rozwoju mózgu mikroglej wykazuje aktywność w obszarze hipokampu (prawdopodobnie również u dorosłych osobników). Proces ten zależny jest od aktywności neuronalnej. Co ciekawe, mikroglej wydaje się preferować niszczenie „słabych” synaps (Morris i in. 2013), co w odniesieniu do uczenia się wspierałoby koncepcję Hebb’a, według której ścieżki niepotrzebne nie są utrzymywane. Ponadto mikroglej wykazuje zdolność do wspierania neurogenezy poprzez pobudzanie komórek macierzystych do samoodbudowy (Walton i in. 2006). Aktywacja mikrogleju wiąże się z neurogenezą wywoływaną w hipokampie m.in. wystawieniem organizmu na oddziaływanie urozmaiconego środowiska. Komórki te kontrolują procesy integracji powstających neuronów z tymi, które już istnieją, jak i redukcję niepotrzebnych. Taka aktywność tego typu komórek glijowych istotna jest w procesach uczenia się, gdzie wymagane jest odpowiednie wkomponowanie się nowych komórek w tkankę nerwową, która już istnieje. Sprawą nierozstrzygniętą jest natomiast uzasadnienie celowościowego (lub wyglądającego na celowościowy) charakteru działań mikrogleju i „strategii” wyboru synaps do eliminacji.

Kolejnymi ważnymi dla procesów poznawczych komórkami glijowymi są astrocyty. Do najważniejszych funkcji jakie pełnią w układzie nerwowym zalicza się funkcje troficzne, regulację transmisji między neuronami, odbywającą się dzięki wpływowi na stężenie jonów magnezu i potasu w przestrzeni międzykomórkowej jak i na stężenie substancji będących w interakcji z neuronami, oraz wpływ na komórki nerwowe poprzez regulację lokalnego przepływu krwi, oddziaływującego na funkcjonowanie neuronów. Drogą komunikacji między astrocytami są tzw. fale wapniowe. W wyniku aktywacji pojedynczego astrocytu uwalniane zostają z retikulum endoplazmatycznego jony wapnia, formujące się w fale, których rozchodzenie się zależy od połączeń szczelinowych zwanych nekusami (Pereira i Furlan 2010). Mogą one być alternatywnym sposobem przesyłania informacji i wpływania na komórki nerwowe.

Połączone sieci astrocytów nie tylko komunikują się między sobą, ale również porównują sygnały transmitowane przez neurony z informacjami przekazywanymi za pośrednictwem krwi z innych części organizmu. Astrocyty kontrolują przez to zgodność „komunikatu”. Może mieć to znaczenie podczas wyboru schematów poznawczych służących tworzeniu nowych elementów pamięci. Schemat taki może zostać wzmocniony za pomocą sygnałów, które zależą od jednego

z głównych neurotransmiterów – glutaminianu. Dzięki temu zwiększa się szansa na „zapisanie” wspomnień jako długotrwałych, do których będzie możliwy dostęp w późniejszym czasie (Pereira i Furlan 2010).

Astrocyty pełnią aktywną rolę również w sygnalizacji synaptycznej wspomagając przetwarzanie informacji potrzebne do formowania pamięci. Synapsa w tym przypadku to struktura, w której zachodzi trójstronne połączenie między neuronami a tym astrocytem. Dzięki swojej funkcji moderującej ten typ komórek gwałtownych może działać na transmisję neuronalną hamująco jak i pobudzająco (Fellin 2009). Astrocyty dzięki temu mogą wpływać na uczenie rozumiane jako uczenie Hebb'a, w którym istotne jest nasilenie sygnałów promowanych lub wygaszanie nieistotnych bądź niepotrzebnych. Mogą też spowodować włączenie zachowanych już schematów poznawczych powodowanych świadomymi bodźcami.

Ważnym procesem w przypadku kształtowania się pamięci jest neurogeneza zachodząca w hipokampie najprawdopodobniej nie tylko na wczesnych etapach rozwojowych, ale również przez okres dorosłości. U dorosłych osobników neurogenezę promującą tworzenie pamięci wywołują mogą doświadczenia płynące z kontaktu ze środowiskiem. W trakcie tworzenia się nowych połączeń astrocyty ponadto odpowiadają za rozwinięcie odpowiedniej drogi dla poszczególnych neuronów. Dzieje się to dzięki ekspresji chemotaktycznych oraz chemoodpychających cząstek, które umożliwiają kierowanie trajektorii aksonów na drodze do połączenia z innymi neuronami (Robertson 2014). Jest to kluczowe dla odpowiedniego wbudowania nowych neuronów w istniejącą sieć podczas procesów związanych z uczeniem się. Astrocyty również mogą wpływać na wydajność pamięci, w tym wygaszenia pamięci strachu, jak też zwiększenia alokacji pamięci, a także na jej konsolidację podczas snu (Santello i in. 2019).

Astrocyty jako moderator aktywności sieci komórek nerwowych według niektórych hipotez mogą pośredniczyć również w relacji pomiędzy stymulacją, odpowiedzią wolicjonalną i reakcją psychosomatyczną (Pereira i Furlan 2010). Automatyczne, nieświadome zachowanie tłumaczone jest w tym kontekście przez sekwencyjne aktywowanie neuronów od tych mających rozpoznać bodziec do przygotowujących zachowanie adekwatne do bodźca, a których połączenia zostały już wcześniej wzmacnione. Zachowanie, które ma w sobie aspekt wolitywny angażuje natomiast również neurony należące do systemu wykonawczego (płat czołowy mózgu), wykonującego operacje mające na celu wywołanie adekwatnego zachowania. Dzięki swojej zdolności kontroli przekazywania sygnałów w synapsach astrocyty mają możliwość zatrzymać lub podtrzymać prowadzące do wykonania działania transmisje neuroprzekazników.

Hipotezy uwzględniające bardziej centralną rolę tych komórek gwałtownych wymagają jednak lepszego potwierdzenia w badaniach, w szczególności aspekt dotyczący ich udziału w planowaniu działań. Aczkolwiek ich zdolność moderowania aktywności neuronów stanowi ciekawy temat badawczy sugerujący wpływ astrocytów na plastyczność mózgu.

4. Podsumowanie

Komórki gwałtowne przykuwają coraz większą uwagę badaczy ze względu na ich istotny udział w procesach poznawczych, będąc zarazem częścią ich biologicznych podstaw. Tworzą one zintegrowany system razem z sieciami neuronów, w którym między elementami zachodzą wielostronne oddziaływania, mające wpływ na funkcjonowanie każdego z typów komórek tego kompleksu. Oligodendrocyty, mikroglej oraz astrocyty dają tym samym również podstawę dla poznawczych funkcji, wspierając neurony poprzez dostarczanie substancji odżywczych, ochronę mechaniczną, ingerencję w strukturę sieci i przetwarzania przez nią informacji. Wiedza o komórkach gwałtownych wymaga wciąż jednak poszerzenia. Między innymi nie wiadomo w jaki sposób dochodzi do wyboru przez mikroglej danej synapsy jako celu w procesach przycinania synaptycznego. Podobny problem pojawia się też w przypadku astrocytów - nie wiadomo czym „kierują się” te komórki gwałtowne przy promowaniu kanałów przepływu informacji neuronalnej.

Mimo trudności, jakie sprawiają badania dotyczące gleju (są to komórki o dużym zróżnicowaniu i wielorakich funkcjach, a także zdolne do migracji między obszarami mózgu) konieczne jest lepsze poznanie jego funkcjonowania w kontekście interakcji pomiędzy sobą i neuronami. Pomoże to zrozumieć ich rolę w kształtowaniu procesów poznawczych i osiąść wiedzę

mogącą wytłumaczyć w bardziej precyzyjny sposób ich biologiczne podstawy. Ważne jest również stworzenie odpowiedniego modelu mechanizmów mózgowych konstytuujących działania umysłowe, który integrowałby informacje dotyczące neuronów i komórek glejowych.

5. Literatura

- Bartheld CS, Bahney J, Herculano-Houzel S (2016) The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: a review of 150 years of cell counting. *The Journal of Comparative Neurology* 524(18): 3865-3895.
- Bengtsson, SL, Nagy Z., Skare S i in. (2005) Extensive piano practicing has regionally specific effects on white matter development. *Nature Neuroscience* 8(9): 148–1150.
- Fellin T (2009) Communication between neurons and astrocytes: relevance to the modulation of synaptic and network activity. *Journal of Neurochemistry* 108(3): 533–544.
- Fields RD, Araque A, Johansen-Berg H i in. (2013) Glial biology in learning and cognition. *Neuroscientist* 20(5):1–6.
- Giedd JN (2004) Structural magnetic resonance imaging of the adolescent brain. *Annals of New York Academy of Science* 1021: 77-85.
- Kettenmann H, Frank Kirchhoff F, Verkhratsky A (2013) Microglia: New roles for the synaptic stripper. *Neuron* 77(1): 10-18.
- Linderkamp O, Janus L, Linder R i in. (2009) Time table of normal foetal brain development. *International Journal of Prenatal and Perinatal Psychology and Medicine* 21(1/2): 4–16.
- McKenzie IA, Ohayon D, Li H, i in. (2014) Motor skill learning requires active central myelination. *Science* 346(6207): 318-321.
- Morris, GP, Clark IA, Zinn R i in. (2013) Microglia: A new frontier for synaptic plasticity, learning and memory, and neurodegenerative disease research. *Neurobiology of Learning and Memory* 105: 40–53.
- Nolan MF, Logan SD, Spanswick D (1999) Electrophysiological properties of electrical synapses between rat sympathetic preganglionic neurones in vitro. *Journal of Physiology* 519(3): 753-764.
- Pereira A, Furlan FA (2010) Astrocytes and human cognition: Modeling information integration and modulation of neuronal activity. *Progress in Neurobiology* 92(3): 405–420.
- Pocock JM, Kettenmann H (2007) Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends in Neurosciences* 30(10): 527-535.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D i in. (2004) Increased conduction velocity as a result of myelination. W: Williams, S. M. red., *Neuroscience* (wyd. 3). Sunderland: Sinauer Associates, 63-65.
- Robertson JM, (2002) The Astrocentric Hypothesis: proposed role of astrocytes in consciousness and memory formation. *Journal of Physiology* 96(3-4): 251–255.
- Somjen GG (1988) *Nervenkitz: Notes on the history of the concept of neuroglia.* *GLIA* 1(1):2-9.
- Szeligo F Leblond CP (1977) Response of the three main types of glial cells of cortex and corpus callosum in rats handled during suckling or exposed to enriched, control and impoverished environments following weaning. *The Journal of Comparative Neurology* 172(2) s. 247-63.
- Teicher MH, Dumont NL, Ito Y i in. (2004) Childhood neglect is associated with reduced corpus callosum area. *Biological Psychiatry* 56(2): 80-85.
- Wake H, Lee PR, Fields RD (2011) Control of local protein synthesis and initial events in myelination by action potentials. *Science* 333(6049): 1647-1651.
- Walton NM, Sutter BM, Laywell ED i in. (2006) Microglia instruct subventricular zone neurogenesis. *Glia* 54(8): 815–825.
- Xiao L, Ohayon D, McKenzie IA (2016) Rapid production of new oligodendrocytes is required in the earliest stages of motor-skill learning. *Nature Neuroscience* 19(9): 1210–1217.

5. Starzenie poznawcze a komponenty układu immunologicznego

Cognitive ageing and components of immune system

Glinka Marta

Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, Lublin

Opiekun naukowy: dr Andrzej Zykubek

Glinka Marta: martanna5@gmail.com

Słowa kluczowe: starzenie, procesy poznawcze, neuronauka, immunologia

Streszczenie

Jeden z nurtów badań dotyczących starzenia opiera się na założeniu, że podstawą tego fenomenu jest rozwijający się z wiekiem prozapalny profil środowiska wewnętrznego organizmu. W wyniku tego tkanki bardziej narażone są na autoagresję ze strony układu odpornościowego. Dotyczy to również komórek układu nerwowego, który mimo braku klasycznego drenażowego systemu immunologicznego może komunikować się z nim za pośrednictwem cytokin, neuroprzekazników i innych molekuł, wykorzystując do tego oś podwzgórze-przysadka-nadnercza lub komórki mikrogleju, które odpowiedzialne są za odpowiedź immunologiczną w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN). Zakażenia, zarówno dotyczące OUN jak i pozostałych części organizmu, są potencjalnym zagrożeniem dla funkcji poznawczych, szczególnie u osób starszych, u których stwierdza się podwyższony poziom cytokin prozapalnych jak na przykład IL-6 czy IL-1b, zarówno w krwi obwodowej jak i w niektórych obszarach mózgu (np. w hipokampie). Widoczne są związki między komponentami systemu immunologicznego a takimi funkcjami poznawczymi jak pamięć, uwaga, funkcje wykonawcze, co omawia niniejsza praca.

1. Wstęp

Starzenie to proces, który dotyka nas jako ludzi nie tylko w wymiarze osobistych zmagani z słabnącym organizmem, ale również ze względu na wymiary takie jak demograficzny czy medyczny - jako problem społeczny. Odczuwa się potrzebę większej ilości badań dotyczących „pomyślnego starzenia poznawczego”, co pomogłoby w zapewnieniu odpowiedniej opieki osobom starszym, jak również w konsekwencji stworzenia modeli radzenia sobie ze słabnącymi funkcjami, umożliwiłoby im dłużej być aktywnymi fizycznie i umysłowo, dzięki odpowiednim treningom i zaleceniom zdrowotnym. Badania te dotyczą one między innymi aspektów poznawczych. Dzięki znajomości zarówno patologicznych jak „normalnych” procesów starzenia kognitywnego będziemy mogli lepiej dostosować umysłowe przygotowanie osób starszych do lepszego funkcjonowania społecznego.

2. Opis zagadnienia

Procesy starzenne rozważane są w ramach gerontologii – dziedziny powstałej na początku XX wieku. W ramach tej nauki tworzy się modele starzenia uwzględniające wiele czynników, zarówno biologicznych, medycznych, jak i kulturowych. Teorie rozwijane w gerontologii można podzielić na cztery główne kategorie: ewolucyjne, molekularne, komórkowe oraz dotyczące układów narządów. W ramach pierwszej kategorii zakłada się, że starzenie powodowane jest słabnącą siłą doboru naturalnego u danego osobnika. Teorie molekularne natomiast bazują m.in. na zmianach w ekspresji genów wraz z wiekiem. W przypadku komórkowego poziomu zwraca się natomiast uwagę na zmiany w obrębie struktury np. skracanie telomerów lub też uszkodzenia wynikające z czynników oksydacyjnych. Teorie bazujące na układach narządów to m.in. teoria neuroendokrynną oraz teoria immunologiczną. Według tej ostatniej zwiększenie nasilania procesów autoimmunologicznych prowadzi do starzenia się organizmu (Weinert i Timiras 2013).

W teoriach immunologicznych procesy starzenne tłumaczyć można zjawiskiem „starzenia się stanu zapalnego”, czyli wzrostem procesów zapalnych wraz z wiekiem połączonym ze

zmniejszonym radzeniem z czynnikami stresowymi. Problemy dotyczące odpowiedniej regulacji mogą dotyczyć zarówno wrodzonej jak i nabytej odporności i obejmować takie funkcje jak fagocytoza czy chemotaksja (Fulop i in. 2014). Nagromadzenie zmian w wyniku nieadekwatnej reakcji systemu odpornościowego prowadzić może do wyniszczenia organizmu, a w konsekwencji i śmierci. Starzenie tu można ująć jako procesy skutkujące wyczerpaniem rezerw organizmu na poziomach molekularnym, komórkowym oraz układów narządów (Fulop i in. 2014). Dziedziną łączącą układ immunologiczny oraz funkcje poznawcze jest psychoneuroimmunologia, w ramach której rozwija się też badania dotyczące zmian systemu poznawczego wraz z wiekiem w kontekście procesów immunologicznych. Układ nerwowy występuje w formie pośrednika pomiędzy tymi elementami.

Jako definicję starzenia poznawczego można przyjąć następującą: jest to osłabienie części funkcji poznawczych postępujące wraz z wiekiem (Harada i in. 2013). Istnieją elementy umysłu mogące się rozwijać wraz z wiekiem (poziom wiedzy), jednak wiele jego funkcji słabnie. Do nich zalicza się między innymi szybkość przetwarzania informacji, inteligencja, funkcje wykonawcze, uwaga czy funkcje wzrokowo-przestrzenne (Blazer i in. 2015). Struktura neuronalna również ulega zmianom, dochodzi do zmniejszenia objętości mózgu oraz zmian funkcji istoty białej, co może być kolejnym czynnikiem prowadzącym do osłabienia procesów poznawczych (Harada i in. 2013). To ostatnie zaś przejawiać się może w gorszym radzeniu sobie z codziennymi czynnościami np. rozumieniu informacji czy prowadzeniu samochodu, jak również innym sytuacjom wymagającym szybkiego działania (Blazer i in. 2015). Zbadanie tego w jaki sposób system odpornościowy wpływa na procesy starzenia poznawczego może pomóc stworzyć adekwatną do potrzeb metodę terapeutyczną i prewencyjną.

3. Przegląd literatury

Do obecnie rozwijanych teorii starzenia zalicza się teorię szybkości przetwarzania Timothy'ego Salthouse'a. Sugeruje on, że wraz z wiekiem odnotowuje się zmniejszenie szybkości przetwarzania procesów umysłowych a tym samym spadek dotyczący płynnych funkcji poznawczych. Innym podejściem jest teoria tłumacząca starzenie dotyczące sfery umysłowej trudnościami obejmujących procesy hamowania oraz zmniejszeniem pojemności pamięci roboczej. W obszarach poznania objętych starzeniem poznawczym można wyróżnić następujące domeny: pamięć robocza, uwaga, funkcja hamowania, prędkość przetwarzania, kontrola wykonawcza, język, funkcje sensoryczne, przetwarzanie informacji emocjonalnych oraz społecznych (Park 2000).

Szybkość przetwarzania informacji to jedna z podstawowych funkcji, która ulega zmianie wraz z procesami starzennymi organizmu. Obrazuje ona to jak szybko procesy poznawcze i reakcje zostają wykonane. Ma szczególne znaczenie podczas wykonywania trudnych lub złożonych zadań. W rozwoju maksymalny jej poziom widoczny jest między 20 a 30 rokiem życia, po czym następuje spadek od ok. 35 roku (Salhouse 2010). Odpowiedzialne za to mogą być proces dezintegracji istoty białej. Ponadto zmiany w szybkości przetwarzania mogą również mieć swoje odbicie w innych funkcjach poznawczych – np. w pamięci.

Zmiany pamięci mogą wiązać się również z mniejszym korzystaniem ze strategii uczenia oraz niższą zdolnością ignorowania informacji mało istotnych informacji u osób starszych (Harada i in. 2013). Zachodzą one jednak w różny sposób zależnie od rodzaju pamięci. W przypadku pamięci roboczej i epizodycznej spadek jest stały i rozciąga się na okres całego życia, zaś w obszarze p. semantycznej można odnotować wzrost nawet do 45 roku, a pogorszenie widoczne jest w wieku około 60 lat (Ronnlund i in. 2005). Podobny poziom we wszystkich etapach rozwojowych utrzymują pamięć proceduralna, rozpoznawanie (odtworzenie informacji po zadziałaniu wskazówki) i pamięć czasu zdarzeń (Harada i in. 2013).

Ujemną korelację z wiekiem wykazują natomiast funkcja hamowania oraz uwaga. Zmiany związane z trudnościami w hamowaniu przetwarzania widoczne są m.in. w selektywności uwagi (Anderson i Craik 2016). Skupienie na jednym obiekcie również może u osób, które przekroczyły 50. rok życia stanowić problem. Spadek po 65. roku życia obserwuje się zaś w domenie przeszukiwania wizualnego. Osłabienie tych funkcji uzasadnia się zmniejszeniem gęstości receptora dopaminy

(jednego z neurotransmiterów ważnego dla procesów uwagowych) oraz zmianami w płatach czołowych (Anderson i Craik 2016).

Kontrola poznawcza, jak i zdolność przetwarzania informacji, należące do funkcji wykonawczych, wraz z wiekiem również słabną, powodując problemy między innymi w obszarze pamięci roboczej, prowadząc do zaburzenia kontekstu działań (Anderson i Craik 2016). Wraz z wiekiem wydłuża się też czas potrzebny na przerzucenie uwagi człowieka z jednego zadania na inne. Rosną dla organizmu koszty wykonywania takich operacji – najniższy ich poziom przypada na wiek nastoletni, a następnie stale rośnie do ok 66 roku (Anderson i Craik 2016). Na początku ósmej dekady życia spada poziom myślenia abstrakcyjnego, tworzenia koncepcji oraz elastyczności myślowej. Indukcyjne myślenie ulega natomiast osłabieniu wcześniej – ok. 45 roku życia (Clarys i in. 2009). Jednakże u osób lepiej radzących sobie z zadaniami angażującymi system wykonawczy w starszym wieku od innych zaobserwowano wzmożoną aktywność obszaru przedczołowego mózgu, co sugeruje kompensacyjną strategię organizmu. Zarazem jednak ten obszar podatny jest najwcześniej na zmiany starzenie (Clarys i in. 2009).

Kolejną funkcją podlegającą starzeniu jest język, głównie w jego syntaktycznym wymiarze. Zasób leksykalny w „normalnym” starzeniu utrzymuje się na podobnym poziomie, aczkolwiek wyszukiwanie słów staje się coraz trudniejsze i częściej obserwuje się zjawisko „końca języka”. W przypadku syntaktyki natomiast widoczne jest zmniejszenie zdolności do tworzenia zdań złożonych oraz ich przetwarzania. Można to tłumaczyć mniejszym wystawieniem starszych dorosłych na takie zdania, które w największym natężeniu na etapach szkolnych (Rabaglia i Salthouse 2011).

Emocje również podlegają zmianom w trakcie starzenia, a przykładem może być tzw. „zmiana pozytywności”. Polega ona na tym, że osoby skupiają się głównie na przekazach pozytywnych, natomiast starają się unikać negatywnych. Jako wytłumaczenie podaje się zmiany funkcji ciała migdałowatego wraz z wiekiem – w ekspozycji na bodźce negatywne jest słabiej aktywowane u starszych osób (Kensinger i Leclerc 2009). Zgłaszają też one mniejsze doświadczanie emocji o negatywnym zabarwieniu niż osoby młodsze (np. gniew). U osób w późnych etapach dorosłości zauważa się też częściej bardziej kontrolowany styl przetwarzania emocji angażujący silniej obszar przedczołowy (Kensinger i Leclerc 2009). Stosują też z większą częstotliwością strategie regulacji emocji, polegające na ponownej ocenie, w porównaniu do młodych ludzi, częściej przyjmujących strategię tłumienia.

Zbliżając się do omówienia wpływu systemu odpornościowego na starzenie poznawcze warto zdefiniować jego elementy i nakreślić zarys ich funkcji w celu zrozumienia oddziaływań między tymi sferami. Sam układ immunologiczny można ująć jako system umożliwiający organizmowi rozpoznanie własnych tkanek i komórek oraz elementów obcych, mogący także zainicjować odpowiedź immunologiczną polegającą m.in. na ochronie przed infekcjami oraz nowotworami, ale również patologiczne wywoływanie stanu zapalnego (Abbas i in. 2019). Na odpowiedź immunologiczną składają się głównie dwa mechanizmy. Pierwszy z nich to swoisty, inaczej nabyty – jest on w stanie rozpoznawać konkretne antygeny. Drugi mechanizm to nieswoisty, czyli wrodzony – ten zaś nie różnicuje obcych elementów, jest natomiast aktywowany jako pierwszy i może doprowadzić do wyeliminowania szkodliwego czynnika jeszcze przed uruchomieniem swoistej odpowiedzi.

Kolejny podział odpowiedzi immunologicznej wyróżnia jej dwa typy: humoralny i komórkowy. W humoralnej biorą udział przeciwciała ekspresjonowane przez limfocyty B. Ich zadaniem jest ochrona przed drobnoustrojami uniemożliwiając zaatakowanie przez nie komórek organizmu oraz neutralizując toksyny, które produkują. Natomiast ochrona komórkowa zwalcza dzięki aktywności limfocytów T drobnoustroje, które już przedostały się do komórek organizmu (Abbas i in. 2019). Aktywowane fagocyty pochłaniają szkodliwe obce elementy w celu ich zniszczenia.

Głównymi komórkami układu odpornościowego są wspomniane już limfocyty B, zdolne do rozpoznawania antygenów, oraz limfocyty T, wśród których wyróżnia się następujące podtypy: cytotoksyczny, regulatorowy i pomocniczy. Oba typy limfocytów przemieszczają się w narządach limfatycznych oraz innych tkankach monitorując środowisko w celu wykrycia ewentualnej potrzeby

przeprowadzenia odpowiedzi immunologicznej. Innymi komórkami tego układu są makrofagi, komórki dendrytyczne oraz komórki tuczne. Ich zadaniem jest wykrywanie drobnoustrojów w tkankach oraz inicjowanie odpowiedzi immunologicznej.

Narządy wchodzące w skład układu odpornościowego można podzielić na dwie grupy: centralne, do których zaliczamy grasnicę, kaletkę Fabrycjusza oraz szpik kostny (w nich dojrzewają limfocyty T i B), oraz obwodowe, czyli wyrostek robaczkowy, śledzionę, migdałki, grudki i węzły limfatyczne). Grasica wraz z procesami starzennymi ulega zanikowi (aczkolwiek nie jest on całkowity). Jej funkcją jest m.in. produkcja limfocytów T oraz ich selekcja. Limfocyty B natomiast powstają w szpiku kostnym. Węzły limfatyczne natomiast mają za zadanie filtrowanie limfy podążającej do naczyń limfatycznych o większych wymiarach. Naczynia włosowate dzięki systemowi zastawek doprowadzają limfę do układu żylnego, przez co zachodzi ciągła migracja limfocytów naiwnych, które po wykryciu antygeny mogą przybrać formę efektorową (Abbas i in. 2019).

Centralny układ nerwowy z powodu braku klasycznego połączenia z systemem immunologicznym komunikuje się z nim na dwa sposoby – poprzez oś podwzgórze-przysadka-nadnercza (ang. *hypothalamic–pituitary–adrenal*, HPA) i poprzez autonomiczny układ nerwowy. System immunologiczny może wpływać na układ nerwowy poprzez wytwarzane cytokiny i neuroprzekaźniki, oddziałując pośrednio również na zachowanie. Oś HPA pozwala też na kontrolę mózgową reakcji immunologicznych, w celu zapobiegania jej nadmiernemu nasileniu, mogącemu spowodować zniszczenie tkanek, oraz pośredniczy w komunikacji w przypadku działania czynników stresowych.

Specyficznymi dla centralnego układu nerwowego komórkami pełniącymi funkcję ochrony jest mikroglej, który również odgrywa rolę pośrednika w komunikacji układu odpornościowego z nerwowym. Procesy, za jakie jest odpowiedzialny mikroglej w zdrowym mózgu to w formie „spoczynkowej” przycinanie synaptyczne oraz usuwanie niepotrzebnych elementów. W przypadku aktywowanej formy natomiast przypomina on w działaniu makrofagi, gdyż pod wpływem odpowiednich czynników, np. uszkodzeń lub infekcji, może wytworzyć zarówno swoistą jak i nieswoistą odpowiedź immunologiczną. Zdolny jest też do wpływania na synapsy poprzez ekspresję cytokin oraz innych czynników jak np. Interleukiny 1b oraz 6 czy czynniki troficzne (Patterson 2015). Wraz z wiekiem zwiększa się jednak wytwarzanie przez mikroglej części markerów zapalnych – przykładowo obszarem, który w starszym wieku jest tym zagrożony jest hipokamp, co prowadzić może również do problemów pamięciowych (Patterson 2015). Ponadto reaguje on zbyt silnie na otrzymywane sygnały. Również występuje ryzyko powstania długotrwałego zapalenia i problemów związanych z niepoprawnym funkcjonowaniem mikrogleju m.in. w obszarze moderowania pracy synaps. Wykryte przez organizm zagrożenia powodują aktywację układu odpornościowego, o czym informowany jest następnie mózg w celu dostosowania reakcji fizjologicznych i zachowań. Jeżeli reakcja jest silna na tyle, że powoduje zniszczenie tkanki nerwowej prowadzi to do osłabienia funkcji poznawczych.

„Wiek immunologiczny” wydaje się być lepszym odzwierciedleniem procesów starzenia mózgu niż chronologiczny (Ron-Harel i Schwartz 2009), pozwalając na wyjaśnienie, wraz z odwołaniem się do takich czynników jak odżywianie, cechy dziedziczne, indywidualnego charakteru zmian człowieka. Zmiany w domenie poznawczej można rozważać z perspektywy peryferyjnych względem mózgu działań immunologicznych, jak i tych dotyczących układu ośrodkowego.

W przypadku „normalnego” starzenia nie odnotowuje się kategoriycznych zmian w ilości neuronów, co sugeruje, że starzenie poznawcze wiąże się raczej z utratą plastyczności. Mogą być tego powodem podatność na zapalenie układu nerwowego oraz stres oksydacyjny. Neurozapalenie można zdefiniować jako przewlekłą odpowiedź zapalną gleju mogącą powodować neurodegenerację. Wytwarzane są wówczas cytokiny prozapalne, aktywowane zostają komórki mikrogleju i astrocyty, a limfocyty T przenikają do układu nerwowego.

Mózg starszych osób wykazuje profil zapalny (nawet gdy nie działają na niego czynniki prozapalne), w którym obserwuje się zwiększoną ilość aktywowanych komórek mikrogleju. Wzrasta również produkcja składników dopełniacza, imflamasomów, cytokin prozapalnych i reaktywnych

form tlenu. Liczba cytokin przeciwzapalnych takich jak IL-10 czy TGF- β 1 oraz CD-200 będący czynnikiem hamującym działanie mikrogleju ulegają natomiast zmniejszeniu (Tay i in. 2017). Większa aktywność mikrogleju widoczna jest w obszarach zmniejszonej gęstości kory mózgowej, co może sugerować jego udział już we wczesnych etapach patogenezy (Whalley i in. 2004). Utrzymujący się stan zapalny zwiększa ryzyko uszkodzenia lub zaniku struktur dających podłoże funkcjom poznawczym, co widoczne jest między innymi u osób starszych w hipokampie, gdzie obserwuje się większą ilość IL-1 α (Godbout i Johnson 2009). Jeżeli stan aktywacji komórek mikrogleju utrzymuje się długo może zaburzyć funkcjonowanie tych komórek ze względu na ich uodpornienie na działanie interleukin takich jak IL-10, IL-4, TGF- β 1 oraz neurotransmiterów (Tay i in. 2017).

Hipokamp uszkodzany jest również przez nadekspresję IL-1 β , co powoduje problemy w zakresie pamięci kontekstowej oraz przestrzennej i procesów leżących u podstaw uczenia. Ponadto IL-6 i białko ostrej fazy, CRP również wpływają negatywnie na pamięć, jak też i na funkcje wykonawcze. Zmniejszoną odporność powiązano również z niższym poziomem neurogenezy oraz zdolności poznawczych i stabilności psychicznej, charakteryzujących starczy mózg (Ron-Harel i Schwartz 2009). Niższym wynikiom testów poznawczych towarzyszył też stres oksydacyjny, aktywacja mikrogleju i dopełniacza. Co ciekawe, po zastosowaniu diety redukującej ilość spożywanych kalorii zaobserwowano zmniejszenie zapalnego profilu starzejącego się mózgu w modelu szczurzym (Godbout i Johnson 2009), co może sugerować dietę jako ważny czynnik terapeutyczny również u ludzi.

Ogólnoustrojowa infekcja może powodować również wystąpienie czynników zapalnych w układzie nerwowym, jak na przykład u myszy dotkniętych chorobą prionową w wyniku reakcji na lipopolisacharyd (LPS), u których zaobserwowano zmniejszenie zachowań ruchowych przy jednoczesnym zwiększeniu ilości IL-1b w mózgu (Godbout i Johnson 2009). LPS jako czynnik może też powodować zaburzenia pamięci (co również wiąże się z nadekspresją IL-17a) oraz zredukowanie zachowań społecznych (Tay i in. 2017). Iniekcja bakterii *Escherichia coli* doprowadziła u starych szczurów do zwiększenia ilości IL-1b w hipokampie, wiążąc się jednocześnie z osłabioną pamięcią. Ten sam obszar również wykazuje wyższy poziom IL-1b i TNF- α u starszych myszy względem młodych (Godbout i Johnson 2009). Powyższe badania sugerują, że markery zapalne mogą stanowić materiał pozwalający na przewidywanie zmian funkcji umysłowych wraz z wiekiem.

Po ukończeniu 65 roku życia człowiek staje się bardziej podatny na infekcje oraz przewlekły stan zapalny (Tay i in. 2017) mające negatywne skutki w obszarze funkcji poznawczych. Obecność w krwi obwodowej IL-12 i IL-6 wykazuje powiązanie z gorszymi funkcjami wykonawczymi u osób starszych (Trollor i in. 2011). Gorsze wyniki w testach poznawczych również korelują z większą ilością CRP (Schram i in. 2007). IL-6 i CRP powiązane są dodatnio z mniejszą objętością istoty białej w płacie czołowym i gorszymi funkcjami wykonawczymi (Lim i in. 2013). U osób starszych obwodowe zakażenie bakterią *E. coli* może prowadzić do problemów związanych z pamięcią kontekstową, zaś zakażenie LPS powiązane jest z deficytami pamięci roboczej (Corona i in. 2011). Osłabienie pamięci wiąże się też zmniejszającą się z wiekiem ilości limfocytów T. Możliwe jest poprzez wzmocnienie odporności częściowe odwrócenie procesów zaniku pamięci (Ron-Harel i Schwartz 2009).

Przełączanie uwagi, pamięć robocza i elastyczność poznawcza powiązane są z IL-6, która ponadto może być markerem przewidującym przyspieszenie procesów starzenia poznawczego (Lim i in. 2013). Ta interleukina, jak i również ICAM-1 wskazywać może na przyszły spadek rozumowania niewerbalnego (Rafnsson i in. 2007). Obwodowe infekcje mogą również skutkować zmniejszeniem zachowań społecznych, rezygnacyjnych oraz depresją (Corona i in. 2011; Godbout i in. 2005). Zachodzi również interakcja w kierunku od umysłu do układu immunologicznego – czynnikiem może być tu stres (jak na przykład choroba, śmierć małżonka) prowadzący do rozregulowania systemu odpornościowego (Lim i in. 2013).

4. Podsumowanie

Praca ta prezentuje rolę komponentów układu odpornościowego w starzeniu kognitywnym. Procesy poznawcze takie jak uwaga, pamięć, funkcje wykonawcze oraz zachowania społeczne są

powiązane z aktywnością układu immunologicznego, co wraz z wiekiem może prowadzić do ich osłabienia zarówno pod wpływem czynników takich jak neurozapalenie, jak i infekcje obwodowe. W celu stworzenia odpowiedniej terapii mającej za cel zapobieganie lub spowalnianie tych procesów warto brać pod uwagę markery zapalne, które mogą przewidywać podatność na przedwczesne starzenie. Wśród badań dominują te bazujące na modelu gryzoni, zatem wartościowym byłyby badania kliniczne na ludziach w szerszym kontekście ukazujące zmiany poznawcze, uwzględniając również funkcje poznawcze doprecyzowując zmiany (przeniesienie analizy z ogólnych testów poznawczych na testy dotyczące specyficznych funkcji). Brakuje również badań longitudinalnych, które pozwoliłyby wnioskować o zmianach markerów zapalnych w ciągu życia danych osobników.

5. Literatura

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S (2019) Introduce to the immune system. W: Basic Immunology E-Book: Functions and Disorders of the Immune System. Amsterdam, Elsevier Health Sciences: 1-22.
- Anderson ND, Craik FIM (2016) 50 years of Cognitive Aging Theory. *The Journals of Gerontology Series B: Psychological Sciences and Social Sciences* 72(1): 1–6.
- Blazer DG, Yaffe K, Karlawish J (2015) Cognitive Aging. *JAMA*, 313(21): 2121.
- Clarys D i in. (2009) Ageing, remembering, and executive function. *Memory* 17(2): 158–168.
- Corona AW, Fenn AM, Godbout JP (2011) Cognitive and behavioral consequences of impaired immunoregulation in aging. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* 7(1): 7–23.
- Fulop T i in. (2014) On the Immunological Theory of Aging. *Interdisciplinary Topics in Gerontology* 39: 163–176.
- Godbout JP, Johnson RW (2009) Age and neuroinflammation: a lifetime of psychoneuroimmune consequences. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 29(2): 321–337.
- Harada CN, Natelson Love MC, Triebel KL (2013) Normal cognitive aging. *Clinics in Geriatric Medicine* 29(4): 737–752.
- Kensinger EA, Leclerc CM (2009) Age-related changes in the neural mechanisms supporting emotion processing and emotional memory. *European Journal of Cognitive Psychology* 21(2-3): 192–215.
- Lim A, Krajina K, Marsland AL (2013) Peripheral inflammation and cognitive aging. *Modern Trends in Pharmacopsychiatry* 28: 175–187.
- Park DC (2000) The basic mechanisms accounting for age-related decline in cognitive function. W: DC Park Cognitive aging: A primer: 3–21.
- Patterson SL (2015) Immune dysregulation and cognitive vulnerability in the aging brain: Interactions of microglia, IL-1 β , BDNF and synaptic plasticity. *Neuropharmacology* 96: 11–18.
- Rabaglia CD, Salthouse TA (2011) Natural and constrained language production as a function of age and cognitive abilities. *Language and Cognitive Processes* 26(10): 1505–1531.
- Ron-Harel N, Schwartz M (2009) Immune senescence and brain aging: can rejuvenation of immunity reverse memory loss? *Trends in Neurosciences* 32(7): 367–375.
- Rönnlund M i in. (2005) Stability, growth, and decline in adult life span development of declarative memory: cross-sectional and longitudinal data from a population-based study. *Psychology and Aging* 20(1): 3–18.
- Salthouse TA (2010) Selective review of cognitive aging. *Journal of the International Neuropsychological Society* 16(5): 754–760.
- Schram MT i in. (2007) Systemic markers of inflammation and cognitive decline in old age. *Journal of the American Geriatrics Society* 55(5): 708–716.
- Tay TL i in. (2016) Microglia across the lifespan: from origin to function in brain development, plasticity and cognition. *The Journal of Physiology* 595(6): 1929–1945.
- Trollor i in. (2011) The association between systemic inflammation and cognitive performance in the elderly: the Sydney Memory and Ageing Study. *Age* 34(5): 1295–1308.
- Weinert BT, Timiras PS (2003) Invited Review: Theories of aging. *Journal of Applied Physiology* 95(4): 1706–1716.

6. Zastosowanie endoskopowej terapii próżniowej w leczeniu nieszczelności zespoleń

The application of endoscopic vacuum therapy in the treatment of anastomotic leak

Martyna Janczewska, Emilia Langa, Oliwia Lulko, Joanna Kobak, Norbert Nowak

II Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej, Gastroenterologicznej i Nowotworów Układu Pokarmowego, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Opiekun naukowy: prof. dr hab. n. med. Andrzej Dąbrowski, prof. dr hab. n. med. Grzegorz Wallner

Martyna Janczewska: m.janczewska2002@gmail.com

Słowa kluczowe: chirurgia kolorektalna, zespolenie koloanalne, EndoVac

Streszczenie

Nieszczelność zespolenia (AL, anastomotic leak) jest jednym z najczęstszych powikłań zabiegów kolorektalnych. Pomimo postępu w technice operacyjnej i postępowaniu okołoperacyjnym szacuje się, że w ostatniej dekadzie częstość występowania AL wynosiła do 20%. W przypadku stosowania u pacjentów neoadjuwantowej radioterapii, wystąpienia stanu zapalnego lub niskiego poziomu zespolenia, ryzyko wystąpienia AL wzrasta nawet sześciokrotnie (Lehwald-Tywuschik i in.). Możliwości leczenia AL wpływają bezpośrednio na rokowanie pacjentów, dlatego niezwykle ważne jest wprowadzanie jak najefektywniejszych sposobów terapii.

Wielu autorów wskazuje na zalety endoluminalnej terapii wspomaganą próżniowo (EndoVac) w leczeniu AL, jednakże nie ma konsensusu co do jej przewagi nad klasycznie stosowanymi metodami leczenia.

Szczególne zalety EndoVac to krótszy czas wyleczenia AL oraz uniknięcie ponownej operacji z relaparotomią u pacjentów, u których ją zastosowano w porównaniu do pacjentów leczonych tradycyjnymi metodami. W przypadku pacjentów, u których zastosowano ten system obserwuje się wysokie wskaźniki powodzenia i przywrócenia ciągłości przewodu pokarmowego. Istotnymi czynnikami wpływającymi na powodzenie EVT są wczesna diagnoza AL i jak najszybsze rozpoczęcie terapii.

1. Wstęp

Nieszczelność zespolenia (Anastomotic leak, AL) jest głównym powikłaniem w chirurgii jelita grubego a także główną przyczyną zachorowalności i śmiertelności pooperacyjnej. Może powodować szereg obrazów klinicznych: od zlokalizowanego ogniska ropnia po uogólnione zapalenie otrzewnej lub niewydolność wielonarządową, pojawiającą się często w przebiegu wstrząsu septycznego (Sürek i in. 2020).

Pomimo postępu techniki operacyjnej i postępowania okołoperacyjnego w ostatnim dziesięcioleciu częstość występowania nieszczelności zespoleń jelita grubego i odbytnicy wynosiła od 8 do 20% (McDermott i in. 2015). Jeżeli obecne są czynniki ryzyka, takie jak neoadjuwantowa radioterapia (NR), stan zapalny lub niski stopień zespolenia, prawdopodobieństwo pojawienia się nieszczelności zespolenia jelita grubego jest znacznie zwiększone. W przypadku niskich zespoleń (poniżej 5 cm od krawędzi odbytu) ryzyko wzrasta nawet sześciokrotnie (Popivanov i in. 2019).

Standardowy protokół chirurgiczny postępowania w przypadku nieszczelności zespolenia jelita grubego obejmuje ileostomię, drenaż i antybiotykoterapię, jednak w 49% przypadków przywrócenie ciągłości jelita grubego nie jest możliwe, szczególnie u pacjentów poddanych terapii NR. Zdarza się również, że konieczne jest wykonanie nowego zespolenia czy resekcja zespolenia metodą Hartmanna. Taki zabieg pogarsza jednak znacznie jakość życia pacjentów, dlatego warto starać się ocalić utworzone zespolenie. Niskie zespolenia odbytnicze można wykonać w bezpieczny sposób. Istnieją jednak okoliczności, jak te opisane wyżej, w których ryzyko AL jest zbyt duże.

W takich sytuacjach z pomocą przychodzi endoluminalna terapia wspomagana próżniowo (endoluminal vacuumassisted therapy, EndoVac) (Lehwald – Tywuschik i in. 2020).

Liczba doświadczeń z terapią podciśnieniową wzrasta, przez co poszerzyła ona swoje wskazania. W ostatnich latach zastosowano EndoVac w celu leczenia nieszczelności zespołów po operacji jelita grubego (Arezzo i in. 2010). Po raz pierwszy opisali ją Weidenhagen i inni w 2008 r., którzy zastosowali EndoVac w przypadku AL po resekcji przedniej części odbytnicy i odnieśli sukces w 97% przypadków (Weidenhagen i in. 2008). Od tamtej pory w wielu badaniach retrospektywnych opisano wpływ EndoVac na gojenie się nieszczelności zespołów z szybkością sięgającą 70% (Arezzo i in. 2018).

Celem niniejszego przeglądu literatury jest zaprezentowanie najnowszych wyników badań leczenia nieszczelności zespolenia wysokiego ryzyka w chirurgii jelita grubego za pomocą metody EndoVac.

2. Opis zagadnienia

System terapii EndoVac został opracowany jako jedna z zachowawczych metod leczenia, która ma na celu drenaż ropnia miednicy powstałego w następstwie nieszczelności zespołów jelita grubego oraz obkurczenie jego jamy (Sürek i in. 2020). Zaobserwowano duży wzrost zainteresowania metodą EndoVac, ponieważ daje ona możliwość leczenia AL poprzez zwiększenie przepływu krwi w okolicy rany, przyspieszenie tworzenia się ziarniny i zmniejszenie kontaminacji, co stanowi jej przewagę nad konwencjonalnymi metodami np. interwencją chirurgiczną, które prowadzą do trwałej stomii (Sürek i in. 2020), (Kuehn i in. 2016).

Zasada działania systemu opiera się na ciągłym bądź przerywanym drenażu. Gazy i treść ropna przemieszczają się do obszarów o niskim ciśnieniu, przez co uciekają do okolicy miednicy z niższym ciśnieniem zamiast do odbytu. Powodują powstawanie tam ropnia z tlenowym i beztlenowym skażeniem bakteryjnym, dlatego jego jamę należy skutecznie i stale opróżniać. Dreny w niej umieszczone nie są tak skuteczne, ponieważ większość z nich nie styka się z jamą ropnia, a oprócz tego mogą ulec mechanicznemu zatłkaniu. Ropień jest w sposób ciągły drenowany za pomocą systemu EndoVac, co zapewnia oczyszczenie jego jamy oraz mechaniczne zamknięcie przetoki lub obszaru nieszczelności zespolenia (Kuehn i in. 2016), (Sürek i in. 2020).

EndoVac polega na umieszczeniu gąbki wykonanej z pianki poliuretanowej o otwartych porach w miejscu AL. Zabieg rozpoczyna się od wykonania kolonoskopii, podczas której lokalizowana i mierzona jest jama ropnia. Gąbkę poliuretanową, poprzez przycięcie, dostosowuje się do rozmiaru i średnicy wnęki. W przypadku jamy o dużych rozmiarach możliwe jest umieszczenie więcej niż jednej gąbki. W przypadku bardzo niskich zespołów oceny wielkości jamy ropnia można dokonać za pomocą badania per rectum. Gąbkę umieszcza się wzdłuż palca lub do rurki introduktora, a następnie wprowadza się ją przezodbytniczo. W ostatnim przypadku gąbkę wypycha się następnie z rurki i umieszcza na poziomie zespolenia. Następnie ostrożnie wyjmuje się rurkę wprowadzającą. Prawidłowe ułożenie gąbki w zespoleniu kontrolowane jest przez badanie per rectum lub endoskopowo. Następnie gąbkę podłącza się do pojemnika ze stałym podciśnieniem. Ze względu na napięcie zwieracza odbytu do zabezpieczenia systemu podciśnienia nie jest potrzebny żaden inny opatrunek ani taśma. System należy wymieniać co 2-6 dni - w zależności od badania (Popivanov i in. 2019), aby zapobiec przyleganiu gąbki do błony śluzowej. Zabieg może zostać wykonany w znieczuleniu miejscowym lub ogólnym. Zmiany opatrunków dokonuje się w lekkiej sedacji w razie stresu czy bólu, lub w warunkach ambulatoryjnych (61-86%) (Popivanov i in. 2019). Terapię utrzymuje się do czasu zmniejszenia rany do 10-15mm lub do rozmiaru, w którym nie da się umieścić pianki. Pozostała wnęka może zostać pozostawiona do samoistnego zamknięcia, zamknięta klejem fibrynowym lub zszyta. Opisano także badanie w którym nie czekano na duże zmniejszenie ubytku, ale po oczyszczeniu jamy zostawała ona zaszyta szwem przezodbytniczym (Popivanov i in. 2019).

3. Przegląd literatury

3.1 Wskaźnik sukcesu

Od 2008 roku, kiedy po raz pierwszy opisano wyniki zastosowania EndoVac w leczeniu AL, zainteresowanie tą metodą znacznie wzrosło, a efekty leczenia są przedmiotem nieustannej analizy.

Według przeważającej części piśmiennictwa poziom skuteczności i sukcesu EndoVac oscyluje w okolicach 90%. Najwyższy odnotowany wskaźnik powodzenia aplikacji EndoVac wyniósł 100% w grupie 13 pacjentów i został opisany przez Nerup i in.. Dokonując przeglądu piśmiennictwa z lat od 2019 do 2021 można zaobserwować podobne wyniki prezentowane przez innych autorów. Te obiecujące dane sprawiają, że EndoVac jest coraz częściej wybieraną metodą przez chirurgów.

Sukces EndoVac w leczeniu AL w znaczącym stopniu polega na uniknięciu procedury Hartmana, w wyniku której dochodzi do wyłonienia trwałej stomii, co znacznie obniża jakość życia pacjentów. Średni wskaźnik odtwarzania ciągłości przewodu pokarmowego w badaniach wyniósł 75,9% (Kühn i in. 2020). W rzeczywistości zachowanie zespolenia w 85% uwzględnionych przypadków wyklucza ryzykowne resekcje z ponownym zespoleniem lub zabiegiem Hartmanna. Wmetaanalizie przeprowadzonej przez Popivanov i innych opisano odsetek sukcesu leczenia wahający się od 80% do 90% (średnio 84,5%) a zamknięcie ileostomii osiągnięto w 72,6%. Autorzy stwierdzili, że wyniki te można uznać za sukces terapii (Popivanov i in. 2019). Dzięki temu nowemu podejściu u większości pacjentów można uniknąć ponownej operacji z relaparotomią (Kühn i in. 2020). Metoda ta wydaje się być również korzystna w ochronie niskich zespołów jelita grubego wysokiego ryzyka.

Retrospektywnej ocenie poddano dokumentację medyczną dużej grupy pacjentów, którzy przeszli niską przednią resekcją odbytnicy w latach 2014-2020 oraz leczonych systemem EndoVac ze względu na wykrycie nieszczelności zespolenia. Jama ropnia pacjentów, którym założono system EndoVac, była kontrolowana endoskopowo co 48 do 72 godzin i w razie potrzeby zabieg powtarzano. Średnia liczba aplikacji systemu terapeutycznego EndoVac wyniosła 5,8 (od 1 do 12) dla każdego pacjenta. Trzydziestu pacjentów, z 33 leczonych terapią EndoVac, wyleczono tylko przy użyciu tej metody, bez potrzeby wykonywania drugiej operacji a także uniknięto u nich wyłonienia trwałej stomii. Wskaźnik sukcesu w opisywanym artykule wyniósł 90,1% (Sürek i in. 2020).

3.2 Wczesne rozpoczęcie EndoVac

Badania wskazują również na istotne znaczenie wczesnego rozpoczęcia leczenia. Opisano, że wczesne zastosowanie EndoVac jest niezależnym czynnikiem predykcyjnym szybkości gojenia (Popivanov i in. 2019). Ostatnie publikacje wskazują również na poprawę wskaźnika skuteczności o 72,4% w porównaniu z 27,8%, gdy terapia próżniowa została rozpoczęta w ciągu 15 dni od rozpoznania nieszczelności zespolenia (Abdalla i in. 2020). Dzięki wcześniejszemu wdrożeniu terapii możliwy jest szybszy powrót do zdrowia i większy sukces terapii. Wynika to z tego, iż długi okres obecności ropnia wiąże się z wytworzeniem zrostów, rozwojem przewlekłej bakteriemii oraz powstaniem przewlekłej zatoki przedkrzyżowej (w orginale: chronicpresacral sinus) a w ostateczności kończy się nieskutecznością leczenia. Korzyść wynikająca z wcześniejszego wdrożenia leczenia została potwierdzona w piśmiennictwie. Ciekawe zastosowanie EndoVac zaprezentowali Lehwald- Tywuschik i inni, którzy zamiast stosowania tej terapii dopiero w przypadku wystąpienia AL, postanowili wdrożyć ją profilaktycznie, opierając się na przesłankach o pozytywnej korelacji wcześniejszego rozpoczęcia terapii z wynikami leczenia. W badaniu przeprowadzonym od marca 2017 do września 2019 metoda EndoVac została profilaktycznie zastosowana w celu zabezpieczenia niskiego zespolenia jelita grubego bez jakichkolwiek oznak AL. Wszystkich 14 pacjentów, którzy wzięli udział w badaniu poddano EndoVac z powodu zespolenia odbytnicy wysokiego ryzyka. Do czynników wysokiego ryzyka zaliczono ostre zapalenia narządów miednicy endometriozę, zarośniętą miednicę (w orginale: frozen pelvis), zespół pustej miednicy (w orginale: empty pelvis) oraz zastosowanie Dootrzewnowej Chemioterapii Perfuzyjnej w Hipertermii (Hyperthermic Intra PEritoneal Chemotherapy, HIPEC). Według autorów, gdyby nie profilaktyczne zastosowanie EndoVac, odpowiedzialny chirurg w celu zminimalizowania ryzyka uznałby procedurę Hartmanna za standard opieki u wszystkich tych pacjentów. Sukces w leczeniu osiągnięto u 13 z 14 pacjentów, co stanowi 92%. U jednego pacjenta wystąpiły powikłania podczas leczenia z powodu opóźnionej wymiany gąbki. W tym przypadku zaobserwowano AL, którą leczono systemem EndoVac przez 28 dni, po tym czasie AL została skutecznie wyleczona i zachowana została ciągłość przewodu pokarmowego. U wszystkich pozostałych pacjentów wygojenie zespolenia następowało bez powikłań. Autorzy tego badania stwierdzają, że profilaktyczne zastosowanie EndoVac może

zapobiec AL w zespoleniach wysokiego ryzyka po operacji jelita grubego. Pomimo jednego przypadku komplikacji, wygojenie zespolenia powiodło się u wszystkich pacjentów (Lehwald-Tywuschik i in. 2021).

3.3 EndoVac a konwencjonalne metody leczenia

W celu oceny przydatności nowej metody warto dokonać porównania jej skuteczności w stosunku do konwencjonalnych sposobów leczenia. Pomimo bardzo przekonujących wyników EndoVac w leczeniu nieszczelności zespolen, niewiele jest dowodów na jej wyższość nad jakimkolwiek innym leczeniem pod względem wskaźnika sukcesu, czasu trwania terapii czy przywrócenia ciągłości jelit. Tylko w kilku artykułach dokonano porównania określonych form leczenia nieszczelności zespolen po operacji jelita grubego. Nagell i Holte porównali czterech pacjentów leczonych EndoVac z powodu AL po resekcji odbytnicy z grupą kontrolną dziesięciu pacjentów poddawanych leczeniu zachowawczemu. Mediana czasu wyleczenia pacjentów leczonych EndoVac wyniosła 51 dni (zakres 43–195). W grupie kontrolnej czas gojenia był znacznie dłuższy wynoszący 336 dni (zakres, 52–1434) (Nagell i Holte 2006). Ciekawe wyniki takiego porównania zaprezentowali Kühn i in., którzy wzięli pod uwagę główne (tj. ilość zgonów, powodzenie leczenia, długotrwałe zachowanie ciągłości jelit) i drugorzędowe punkty końcowe (tj. długość pobytu w szpitalu, czas trwania leczenia) i porównali EndoVac oraz metody konwencjonalne. Powodzenie leczenia definiowano jako wyleczenie nieszczelności zespolenia lub niewydolności kikutu odbytnicy. Długotrwałe zachowanie ciągłości jelit zdefiniowano jako brak stomii po 12 miesiącach. W grupie konwencjonalnej AL leczono drenażem, relaparotomią z płukaniem i ileostomią zwrotną, ponownym zespoleniem lub wykonywano procedurę Hartmana. W przypadku głównych punktów końcowych odnotowano znaczą i istotną statystycznie przewagę metody EndoVac nad metodami konwencjonalnymi w powodzeniu leczenia (EndoVac: 95,2% vs. leczenie konwencjonalne: 65,2%) oraz długoterminowym zachowaniu ciągłości jelit (EndoVac: 86,7% vs. leczenie konwencjonalne: 37,5%). Kryterium ilości zgonów nie wykazało istotnej różnicy między dwiema grupami. W kwestii drugorzędowych punktów końcowych różnica została wykazana jedynie w kryterium długości pobytu w szpitalu. W przypadku leczenia konwencjonalnego średni okres pobytu w szpitalu wynosił 31,1 dnia a w terapii EndoVac 42,2, jednakże różnica nie jest istotna statystycznie. Pozostałe punkty końcowe nie różniły się w dwóch grupach, bądź były nieistotne statystycznie (Kühn i in. 2020).

3.4 Czynniki ryzyka a ich wpływ na EndoVac

Ostatnie publikacje wskazują również na wyraźny wpływ czynników ryzyka upośledzonego gojenia na wskaźnik wyleczenia. Większość artykułów opisywała wskaźnik wyleczenia osiągający wartości powyżej 70%. Jednakże w przypadku gdy obecne były czynniki ryzyka upośledzonego gojenia, wskaźnik ten znacznie się zmniejszał. Do głównych czynników ryzyka niepowodzenia leczenia wspomaganego próżniowo zaliczono: późne rozpoczęcie terapii EndoVac, NR, brak stomii ochronnej i wiek powyżej 60 lat (Popivanov i in. 2019), (Weidenhagen i in. 2008), (Borstlap i in. 2018). Spośród wszystkich zmiennych, które mogą mieć wpływ na efekt EndoVac, tylko stomia ochronna była istotnie statystycznie związana z powodzeniem leczenia. W oparciu o analizę meta-regresji pośród efektów losowych, przeprowadzoną przez Popivanov i innych w 2019 roku, na podstawie 19 badań obejmujących 295 przypadków, uzyskano dowód statystyczny na znaczący związek z sukcesem EndoVac tylko dla stomii. U pacjentów, u których wyłoniono stomię ochronną terapia jest skuteczniejsza, a powrót do zdrowia jest szybszy (4 w porównaniu do 9 tygodni). W piśmiennictwie opisano również wpływ NR na wydłużenie EndoVac (31 vs 12 dni), czasu do ostatecznego zamknięcia (30 vs 70 dni) i niższy wskaźnik sukcesu (71% vs 86%) (Arezzo i in. 2015). Autorzy opisują także, że badane czynniki takie jak liczba dni leczenia, liczba gąbek stosowanych podczas terapii i liczba NR nie były istotnie związane z sukcesem EndoVac (Popivanov i in. 2019).

3.5 Powikłania

Do powikłań związanych ze stosowaniem systemu EndoVac opisywanych w literaturze zalicza się zwężenie zespolenia, przetoki, krwotoki oraz nawracające ropnie. Opisywane przypadki powikłań występujących we wczesnym okresie terapii EndoVac obejmują głównie problem krwawienia. Sürek i inni w retrospektywnym badaniu stwierdzili wystąpienie krwawienia z powodu

użycia systemu EndoVac u 2 z 33 (6%) chorych. Jednym z nich był pacjent, u którego wykonano zespolenie jelita grubego. U tego chorego terapię EndoVac przerwano po trzecim zabiegu i zakończono leczenie antybiotykoterapią. Drugi pacjent został zabrany na operację i wykonano zabieg Hartmanna. Leczenie przerwano z powodu rozwijania się objawów wstrząsu septycznego u 2 (6%) pacjentów. Pacjentów tych operowano i wykonano kolostomię Hartmanna. Jako powikłanie odległe stwierdzono zwężenie zespolenia u 2 (6%) chorych, a przetokę u 1 (3%) chorego. Całkowity odsetek powikłań w tym badaniu wyniósł 21,2% (7/33) (Sürek i in. 2020). W zależności od badania wskaźnik komplikacji różni się, jednakże w żadnym z przeanalizowanych badań z okresu lat 2019 do 2021 nie przewyższał 21,1% (Sürek i in. 2020) i wahał się w okolicach 20%. W przypadku metaanalizy przeprowadzonej przez Popivanov i innych w 2019, powikłania obserwowano u 19% pacjentów, najniższy wynik osiągnięty wynosił 13% a najwyższy 25%. Do najczęstszych powikłań w przypadku tego badania należał ropień (11,5% przypadków i 51% powikłań) oraz zwężenie zespolenia (4,4%). Laparotomia była konieczna w 3% wszystkich przypadków i u 15% pacjentów z powikłaniami (Popivanov i in. 2019). Opierając się na opisanych wynikach, można stwierdzić, że terapia jest dobrze tolerowana. Powikłania występują u około jednej piątej pacjentów. Na szczęście większość nie wymaga relaparotomii. Ropnie należą do jednych z najczęstszych powikłań, ale większość z nich może być skutecznie zaopatrzona przez obserwację, antybiotykoterapię lub powtarzane EndoVac.

4. Podsumowanie i wnioski

Wydaje się, iż system terapii EndoVac jest pomocny w leczeniu nieszczelności zespolenia jelita grubego. Szczególną zaletą jest to, że system terapeutyczny EndoVac może być stosowany w dużych nieszczelnościach zespolenia, zwłaszcza w przypadku obecności niewydrenowanych ropni. Z nowych badań wynika, że może to zmniejszyć częstość potrzeby trwałej stomii i śmiertelność w przypadku AL. EndoVac wydaje się być prostą i bezpieczną metodą, która pozwala na szybszy powrót do zdrowia u pacjentów z utrzymaną stomią. Niestety może być ona mniej skuteczna w zespoleniach koloanalnych, ze względu na tendencję do wyslizgiwania się gąbki, a także trudność w utrzymaniu próżni (Lehwal – Tywuschik i in. 2021). Ponadto doświadczenie kliniczne w tej metodzie nadal jest skąpe. Na podstawie przeanalizowanej literatury głównymi czynnikami ryzyka, wpływającymi na możliwość niepowodzenia leczenia, są późne rozpoczęcie EndoVac, NR, brak stomii i wiek powyżej 60 lat. Niemniej metoda ta może stanowić obiecujące podejście, wiążące się z niskim ryzykiem, w trudnych przypadkach chirurgii jelita grubego. W celu ustalenia roli systemu terapeutycznego EndoVac w leczeniu AL konieczne są większe randomizowane badania prospektywne.

5. Literatura

- Abdalla S, Cotte E, Epin A, Karoui M, Lefevre JH, Berger A, Marchal F, Denost Q, Penna C, Benoist S, Brouquet A, on behalf the French Gg (2020) Short-term and long-term outcome of endo- luminal vacuum therapy for colorectal or coloanal anastomotic leakage: results of a nationwide multicenter cohort study from the French GRECCAR group. *Dis Colon Rectum* 63 (3):371–380.
- Arezzo A, Miegge A, Garbarini A, Morino M (2010) Endolu- minal vacuum therapy for anastomotic leaks after rectal surgery. *Tech Coloproctol* 14(3):279–281.
- Arezzo A, Verra M, Passera R, Bullano A, Rapetti L, Morino M (2015) Long-term efficacy of endoscopic vacuum therapy for the treatment of colorectal anastomotic leaks. *Dig Liver Dis* 47(4):342–345.
- Borstlap WAA, Musters GD, Stassen LPS, van Westreenen HL, Hess D, van Dieren S, Festen S, van der Zaag EJ, Tanis PJ, Bemelman WA (2018) Vacuum-assisted early transanal closure of leaking low colorectal anastomoses: the CLEAN study. *Surg Endosc* 32(1):315–327.
- Kuehn F, Janisch F, Schwandner F, Alsfasser G, Schiffmann L, Gock M, Klar E. (2016) Endoscopic Vacuum Therapy in Colorectal Surgery. *J Gastrointest Surg.* Feb;20(2):328-34.

- Kühn F, Janisch F, Schwandner F, et al. (2020) Comparison Between Endoscopic Vacuum Therapy and Conventional Treatment for Leakage After Rectal Resection. *World J Surg*.44(4):1277-1282.
- Lehwald-Tywuschik NC, Alexander A, Alkhanji N, et al. (2021) The “impossible” rectal anastomosis: a novel use for endoluminal vacuum-assisted therapy. *Tech Coloproctol*. 25(1):125-130.
- McDermott FD, Heeney A, Kelly ME, Steele RJ, Carlson GL, Winter DC (2015) Systematic review of preoperative, intraoperative and postoperative risk factors for colorectal anastomotic leaks. *Br J Surg* 102(5):462–479.
- Nagell CF, Holte K (2006) Treatment of anastomotic leakage after rectal resection with transrectal vacuum-assisted drainage (VAC). A method for rapid control of pelvic sepsis and healing. *Int J Colorectal Dis* 21:657–660
- Nerup N, Johansen JL, Alkhefagie GA, et al. (2013) Promising results after endoscopic vacuum treatment of anastomotic leakage following resection of rectal cancer with ileostomy. *Dan Med J*.;60:1–4.
- Popivanov GI, Mutafchiyski VM, Cirocchi R, Chipeva SD, Vasi-lev VV, Kjossev KT, Tabakov MS (2020) Endoluminal negative pressure therapy in colorectal anastomotic leaks. *Color Dis*. 2020;22(3):243-253.
- Weidenhagen R, Gruetzner KU, Wiecken T, Spelsberg F, Jauch KW (2008) Endoluminal vacuum therapy for the treatment of anastomotic leakage after anterior rectal resection. *RozhlChir* 87(8):397–402

7. Czy nowe znaczy lepsze? Porównanie laparoskopowej vs. robotycznej gastrektomii.

Does new mean better? Comparison of laparoscopic vs. robotic gastrectomy.

Martyna Janczewska, Stanisław Dziurda, Joanna Kobak, Emilia Langa, Oliwia Lulko, Norbert Nowak

II Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej, Gastroenterologicznej i Nowotworów Układu Pokarmowego, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Opiekun naukowy: prof. dr hab. n. med. Andrzej Dąbrowski, prof. dr hab. n. med. Grzegorz Wallner

Martyna Janczewska: m.janczewska2002@gmail.com

Słowa kluczowe: rak żołądka, chirurgia minimalnie inwazyjna

Streszczenie

Rak żołądka (gastric cancer, GC) jest jednym z najczęściej występujących nowotworów na świecie, stanowiącym wyzwanie dla chirurgii minimalnie inwazyjnej (MIS). Standardową metodą leczenia jest gastrektomia z limfadenektomią, która może zostać wykonana na różne sposoby (z dostępu otwartego, laparoskopowego lub robotyczna gastrektomia). Pomimo że robot da Vinci został wykorzystany do przeprowadzenia gastrektomii już w 2003 roku, jego użycie nadal nie jest powszechne. Metoda ta pozostaje innowacyjna, a co za tym idzie, konieczne są dalsze badania porównujące jej efekty z laparoskopową gastrektomią (laparoscopic gastrectomy, LG).

Dokonano przeglądu dostępnych metaanaliz z lat 2019-2021 w celu oceny skuteczności robotycznej gastrektomii (robotic gastrectomy, RG). Na jego podstawie wykazano, że wskaźniki takie jak całkowite przeżycie (overall survival, OS), przeżycie wolne od choroby (disease-free survival, DFS) oraz częstość nawrotów nie różnią się znacząco między RG a LG. Podczas robotycznej gastrektomii zaobserwowano mniejszą utratę krwi, krótszy czas do pierwszego wzdęcia i większą bądź podobną liczbą pobranych węzłów chłonnych w porównaniu z laparoskopową gastrektomią. Czas zabiegu przy pomocy robota da Vinci był dłuższy, co nie przełożyło się jednak na wzrost powikłań pooperacyjnych.

1. Wstęp

Rak żołądka (gastric cancer, GC) jest nadal jednym z najczęstszych i najbardziej śmiertelnych nowotworów na świecie, szczególnie wśród starszych mężczyzn. GC stanowi piąty najczęściej występujący nowotwór i jest trzecim najbardziej śmiertelnym rakiem na świecie (Rawla i in. 2018). Pomimo postępów w terapii wielodyscyplinarnej, stosowania chemioterapii czy radioterapii, uważa się, że radykalne wycięcie jest najskuteczniejszą metodą leczenia (Liao i in. 2019). W operacyjnym leczeniu raka żołądka złotym standardem jest gastrektomia z limfadenektomią (Ju i in. 2018). Do niedawna gastrektomia była możliwa tylko z dostępu otwartego lub laparoskopowego. Bezpieczeństwo i skuteczność laparoskopowej gastrektomii (laparoscopic gastrectomy, LG) są potwierdzone

w piśmiennictwie (Wei i in. 2018), jednak ma ona pewne ograniczenia. Na przestrzeni ostatnich lat wprowadzono nową możliwość wykonania gastrektomii za pomocą urządzeń wspomaganych robotami. Metoda robotycznej gastrektomii (robotic gastrectomy, RG), ma na celu poprawę wyników śródoperacyjnych i krótkoterminowych w leczeniu pacjentów z GC. Przez długi czas brakowało wystarczających danych pozwalających na porównanie wyników gastrektomii metodą laparoskopową i robotyczną u pacjentów z GC, jednakże w ostatnich latach (2019-2021) dokonano kilku dużych metaanaliz, które dostarczają krótkoterminowych i długoterminowych wyników badań, pozwalających dokonać porównania.

2. Opis zagadnienia

2.1 Zalety i wady LG

Korzyści płynące z leczenia raka żołądka techniką laparoskopową są dobrze znane. Wiele badań wskazuje, że w porównaniu z chirurgią otwartą, zabiegi laparoskopowe mogą poprawić bezpieczeństwo i skuteczność leczenia raka żołądka (Liao i in. 2019). Zgodnie z medycyną opartą na faktach, wyniki metaanaliz wykazały poza bezpieczeństwem i wykonalnością LG, zmniejszoną inwazyjność, mniejszy ból, wcześniejszy powrót wypróżnień, wcześniejsze wypisanie ze szpitala oraz mniej powikłań płucnych (Bobo i in. 2019). W porównaniu z otwartymi zabiegami chirurgicznymi, LG wiązała się z mniejszą inwazyjnością, lepszymi wynikami kosmetycznymi, mniejszą szacowaną utratą krwi, mniejszym bólem, wcześniejszym powrotem wypróżnień, szybszym powrotem do zdrowia i korzystnymi wynikami onkologicznymi (Bamboat i in. 2013), (Bobo i in. 2019). Ponadto, według piśmiennictwa, LG i operacja otwarta mają porównywalne wskaźniki odległej zachorowalności i śmiertelności we wczesnym raku żołądka (early gastric cancer, EGC) (Kim i in. 2010). Istnieją jednak pewne ograniczenia dotyczące laparoskopowej operacji żołądka. Te wady obejmują słabe obrazowanie w postaci dwuwymiarowej wizualizacji (2D), ograniczoną zręczność ruchową, wzmocnienie drżenia rąk operatora i niewygodną ekspozycję pola operacyjnego. Stanowi to szczególne wyzwanie w przypadku pobrania węzłów chłonnych umiejscowionych w wąskiej przestrzeni. Ponadto słabością laparoskopii jest złożoność techniczna oraz długa krzywa uczenia się (Moon i in. 2015), (Qiu i in. 2020).

2.2 Zalety i wady RG

W celu wyeliminowania wad techniki laparoskopowej i poprawy wyników śródoperacyjnych gastrektomii opracowano systemy chirurgiczne wspomagane robotami, które mogą zapewnić poprawę widoczności i manipulacji podczas operacji. Robot da Vinci został opracowany jako wspomagany robotem system chirurgiczny dla MIS (minimally invasive surgery, MIS), który składa się z trzech komponent: konsoli chirurga, wózka po stronie pacjenta i systemu wizyjnego. Takie systemy zapewniają trójwymiarową wizualizację, filtr drżenia i ulepszoną zręczność. Gastrektomię robotyczną po raz pierwszy opisano w 2003 roku (Hashizume i in. 2003). Została ona wprowadzona jako kolejna minimalnie inwazyjna metoda operacyjna, której przewaga nad LG ma opierać się na zaletach takich jak wizualizacja trójwymiarowa (3D) w wysokiej rozdzielczości, siedem stopni ruchu przypominającego nadgarstek, obraz pola operacyjnego o wysokiej rozdzielczości i mniejsze zmęczenie operatorów (Gutt i in. 2004). Co więcej, krzywa uczenia się, która jest związana z czynnikiem ludzkim, w przypadku metody RG miała być bardziej stroma niż w LG (Kim i in. 2014).

Rzeczywista wyższość RG w porównaniu z LG w leczeniu raka żołądka pozostaje kontrowersyjna. W związku z tym przeprowadziliśmy przegląd literatury, którego celem było porównanie metod LG i RG pod względem ich skuteczności i wykonalności.

3. Przegląd literatury

Podczas analizy literatury w celu porównania LG i RG brano pod uwagę wskaźniki, które rzucają lepsze światło na skuteczność tych metod. Do pierwszorzędowych wskaźników zaliczono całkowite przeżycie (overall survival, OS), przeżycie wolne od choroby (disease-free survival, DFS) oraz częstość nawrotów. Natomiast w drugiej kolejności analizowane zostały wskaźniki takie jak długość pobytu w szpitalu (length of hospital stay, LOS), powikłania pooperacyjne, czas operacji, utrata krwi, krzywa uczenia.

Artykuły zostały wybrane na podstawie wyników wyszukiwania bazy PubMed. Kryteria były następujące: rodzaj badania- metaanaliza, lata 2019-2021, język angielski. Znalaziono pięć artykułów spełniających te kryteria, wszystkie zostały omówione w niniejszym przeglądzie.

3.1 Pierwszorzędowe wskaźniki

We wszystkich przeanalizowanych badaniach brano pod uwagę wskaźnik całkowitego przeżycia (overall survival, OS). Nie wykazano istotnej różnicy między obiema grupami w badaniu

przeprowadzonym przez Liao i in., Bobo i in., oraz Hua Qiu i in. W analizie opisanej przez Solaini i in., pod względem pięcioletniego całkowitego przeżycia (5 year overall survival rate), porównywano RG z otwartą gastrektomią (open gastrectomy, OG). Wskaźnik ten w grupie RG wynosił 55,2% natomiast w grupie otwartej 50,8%. Łączne 5-letnie przeżycie pacjentów z RG wyniosło 60,4% (Solaini i in. 2020). Zatem dane dotyczące przeżycia RG wydają się podobne do danych z otwartej gastrektomii, co sugeruje, że chirurgia robotyczna może być bezpieczna onkologicznie również w przypadku parametrów długoterminowych, ale należy przeprowadzić dalsze prospektywne badania dotyczące wyników odległych, aby potwierdzić te wyniki.

Wyniki przedstawione w piśmiennictwie w przypadku wskaźnika DFS także nie wykazały przewagi żadnej z porównywanych metod (Liao i in. 2019), (Bobo i in. 2019), (Qiu i in. 2019).

Metaanalizy nie wykazały statystycznie istotnej różnicy w odsetku nawrotów choroby między dwiema grupami, z mniejszą częstością w grupie RG (Guerrini i in. 2020), (Liao i in. 2019). Opisywane rodzaje nawrotów, które się rozwinęły to nawroty GC w kikucie żołądka po dystalnej resekcji żołądka, wznowie lokoregionalnej lub układowej lub lokoregionalnej i układowej (Guerrini i in. 2020). Ze względu na brak danych, wskaźnik częstości występowania nawrotów został porównany tylko w dwóch wyżej wymienionych metaanalizach.

Reasumując w żadnym z pierwszorzędowych wskaźników nie wykazano istotnej różnicy między porównywanymi metodami.

3.2 Drugorzędowe wskaźniki

Długość pobytu w szpitalu (LOS)

Analiza wykonana przez Solaini i innych, wykazała, że chirurgia robotyczna ma przewagę nad otwartym podejściem w kwestii długości pobytu w szpitalu. Łączna średnia długość pobytu w szpitalu wyniosła 9,4 dnia (8,3–10,4) w grupie RG w porównaniu z 13,6 (10,5–16,7) w grupie otwartej gastrektomii ($p = 0,006$). Wyniki te są częstym odkryciem we wszystkich rodzajach małoinwazyjnych podejść. Nie wykazano jednak istotnej różnicy w liczbie dni pobytu w szpitalu między grupami RG i LG (Solaini i in. 2020), (Liao i in. 2019), (Bobo i in. 2019), (Qiu i in. 2019), (Guerrini i in. 2020).

Powikłania pooperacyjne

Na podstawie przeanalizowanych danych dostarczonych w metaanalizie przeprowadzonej przez Bobo i innych, nie wykazano istotnej różnicy między RG a LG w zmniejszeniu ogólnych powikłań. Ponadto nie stwierdzono istotnej różnicy w zakresie większych lub mniejszych komplikacji. Zebrane wyniki nie wykazały istotnych różnic między grupami pod względem potrzeby ponownej operacji, otwartej konwersji, proksymalnego marginesu resekcji (PRM) i dystalnego marginesu resekcji (DRM) między dwiema grupami (Bobo i in. 2019). Podobne wyniki zaprezentowali Liao i in. 2019 oraz Guerrini i in. 2020. Według nich wskaźnik ogólnych powikłań był podobny w obydwu grupach. Ciekawe wyniki zaprezentowali Solaini i inni, którzy na podstawie analizy obejmującej 679 zrobotyzowanych i 1355 laparoskopowych gastrektomii z 3 badań określili wskaźnik powikłań w grupie RG wynoszący 19,9% a w grupie LG- 15,6%. Różnica ta jednakże nie była istotna statystycznie. W tej samej metaanalizie całkowity wskaźnik powikłań dla metody RG wyniósł 15%, a śmiertelność 2,5 % (Solaini i in. 2020). Na podstawie zaprezentowanych wyników autorzy badania stwierdzili, że gastrektomia robotyczna jest bezpieczna także w przypadku przeprowadzania jej na grupie zachodnich pacjentów. W wynikach zaprezentowanych przez Hua Qiu nie wykazano istotnych różnic między RG a LG w powikłaniach pooperacyjnych takich jak np. szybkość opóźnionego opróżniania żołądka, niedrożność jelit, zakażenia jamy brzusznej, zakażenia rany, przeciek zespolenia, powikłania trzustkowe (23 badania, 8293 pacjentów) (Qiu i in. 2019).

Czas operacji

W metaanalizie przeprowadzonej przez Bobo i innych czas operacji był brany pod uwagę jako jeden z głównych punktów końcowych. Na podstawie 16 POSs (prospective observational studies) obejmujących 4576 pacjentów, z których 1517 leczonych było RG, a 3059 LG, stwierdzono, że czas operacji był znacznie dłuższy w przypadku RG. Różnica ta była istotna statystycznie. Operacje RG były dłuższe od LG o średnio 57,98 min (Bobo i in. 2019). Przedstawione dowody na

potencjalne wady RG w zakresie czasów operacyjnych wydawały się wiarygodne i rozstrzygające. Podobne stanowisko zaprezentowali Solaini i inni, którzy stwierdzili istotną statystycznie różnicę między czasem operacji w obydwu grupach na niekorzyść RG. Czas operacji był dłuższy w tej grupie o średnio 79 min (327 min (297–358) dla RG i 248 min (222–275) dla LG, $p = 0,001$) (Solaini i in. 2020). Guerrini natomiast w swojej metaanalizie odnotował średni czas operacji 267,34 min w grupie RG i 220,48 min w grupie LG. Na podstawie wyników zaprezentowanych przez Hua Qiu i wsp, można stwierdzić, że RG trwa dłużej niż LG.

Poniżej przedstawiono powody, dla których dłuższy czas pracy wiąże się z RG. Po pierwsze należy wziąć pod uwagę, że procedura zrobotyzowana jest technologią innowacyjną, dlatego wymaga dużo czasu, aby się do niej przyzwyczaić. Średni czas operacji RG był dłuższy, ponieważ operacje były wykonywane bardzo ostrożnie, a chirurdzy nie byli zaznajomieni z procedurą RG. Należy wziąć pod uwagę, że większość chirurgów ma bardzo duże doświadczenie w leczeniu LG, ale żadnego doświadczenia w RG (Bobo i in. 2019). Jak donoszono, czas operacji RG stabilizuje się po ukończeniu co najmniej 15 przypadków, a następnie stopniowo się zmniejsza, a chirurdzy, którzy mają doświadczenie w wykonywaniu LG, mogą z powodzeniem wykonywać RG nawet w pierwszej operacji i osiągnąć plateau w czasie operacji po 20 przypadkach (Qiu i in. 2019). Co więcej, krzywa uczenia się dla RG była krytycznym czynnikiem, który mógł dodatkowo wpłynąć na wydłużenia wskaźnika czasu operacji. Prawdopodobnie, w miarę jak chirurdzy stają się bardziej zręczni w wykonywaniu procedur robotycznych, czas operacji RG może ulec znacznemu skróceniu. Po drugie, zgłaszany dłuższy czas operacji w przypadku procedur zrobotyzowanych może wynikać z czasu dokowania oraz dodatkowej konfiguracji, która sama w sobie zajmuje około 30 min (Qiu i in. 2019), (Solaini i in. 2020). Oiu i in. stwierdził, że całkowity czas operacji i czysto operacyjny czas (odejmowanie czasu potrzebnego na dokowanie i odłączenie) jest dłuższy niż w przypadku laparoskopowego systemu chirurgicznego. Niestety, większość badań uwzględnionych w tym przeglądzie nie zajmowała się oddzieleniem czasu pracy od przygotowania i czasu konfiguracji. Dlatego też dokładniejsza analiza wskaźnika czasu operacji była niemożliwa ze względu na niewystarczające dane. Po trzecie, chirurdzy korzystając jedynie ze zmysłu wzroku podczas wykonywania manualnych czynności mają ograniczoną możliwość oceny siły, jakiej muszą użyć w kontakcie z operowaną tkanką. Ocena ta dokonywana jest jedynie poprzez analizowanie informacji wzrokowych, co może wydłużać czas operacji. Należy zwrócić uwagę na fakt, że wydłużony czas zabiegu nie był związany ze wzrostem liczby otwartych konwersji, powikłań pooperacyjnych ani śmiertelności (Qiu i in. 2019), (Guerrini i in. 2020).

Utrata krwi

Jednym z bardzo istotnych oraz modyfikowalnych wskaźników jakości w chirurgii onkologicznej jest śródoperacyjna utrata krwi. Dowody w piśmiennictwie sugerują, że znaczna operacyjna utrata krwi wraz z towarzyszącą jej potrzebą przetoczenia krwi u pacjenta chirurgicznego w onkologii ma poważne i szkodliwe skutki zarówno w odniesieniu do krótkoterminowych, jak i długoterminowych wyników leczenia. Transfuzje krwi powodują immunosupresję i zwiększoną chorobowość oraz mogą niekorzystnie wpływać na odległe wyniki onkologiczne. Chirurdzy onkolodzy starają się zmienić swoją technikę operacyjną, aby promować bezkrwawą operację, zmniejszyć zmienność zgłaszanej utraty krwi i szybkości transfuzji krwi (Dixon i in. 2009). W swojej metaanalizie Bobo i in. uznali ilość utraty krwi za jeden z głównych punktów końcowych, aby określić czy RG jest dobrą alternatywą dla leczenia laparoskopowego. Autorzy w swojej pracy stwierdzili, że zebrane wyniki wykazały zmniejszenie (23,71 ml) śródoperacyjnej utraty krwi w grupie RG w porównaniu do grupy LG. Solaini i inni dokonali przeglądu systematycznego, który miał na celu połączenie wszystkich badań zachodnich opisujących efektywność RG w celu dostarczenia zbiorczych wyników i dowodów wspierających stosowanie tej metody gastrektomii w leczeniu raka żołądka. Średnia suma utraconej krwi wynosiła 99 ml w przypadku zabiegów z użyciem robota, a 133 w przypadku zabiegów laparoskopowych, co potwierdziło mniejszą utratę krwi podczas RG również na zachodnich szerokościach geograficznych (Solaini i in. 2020). Wyniki kolejnych metaanaliz, że śródoperacyjna utrata krwi była istotnie niższa w przypadku RG w porównaniu z LG (Qiu i in. 2019), (Guerrini i in. 2020). Śródoperacyjna utrata krwi jest jednym z najważniejszych parametrów, których

obawiają się chirurdzy podczas operacji. Przeanalizowane piśmiennictwo ujawniło znacznie mniejszą śródoperacyjną utratę krwi w grupie RG w porównaniu z grupą LG, co można przypisać bardziej stabilnej procedurze robotycznej w rękach chirurga, a tym samym zmniejszeniu zmęczenia mięśniowo-szkieletowego i fizjologicznego drżenia u chirurgów. Ponadto robot zapewnia zwiększoną elastyczność w ograniczonej, wąskiej przestrzeni operacyjnej, a trójwymiarowe pole widzenia o wysokiej rozdzielczości pozwala chirurgom skutecznie minimalizować ryzyko urazów tkanek i naczyń krwionośnych, co może tłumaczyć mniejszą śródoperacyjną utratą krwi (Qiu i in. 2019), (Guerrini i in. 2020).

Krzywa uczenia się

Krzywa uczenia się w chirurgii jest bardzo istotnym wskaźnikiem, który powinien być brany pod uwagę w momencie wdrażania nowych procedur. W niektórych badaniach krzywa uczenia się została opisana w obydwu grupach. LG wykazała płaską krzywą uczenia się, podczas gdy RG wykazała bardziej stromą krzywą uczenia się z lepszymi wynikami już od pierwszego przypadku. Wskazuje to na łatwiejszą adaptację chirurgii wspomaganą robotem (Bobo i in. 2019), (Jin i in. 2007), (Song i in. 2009), (Qiu i in. 2019) (im krzywa uczenia się jest bardziej stroma, tym procedura łatwiejsza (Kurek i in. 2016)). Na podstawie przeanalizowanego piśmiennictwa, można stwierdzić, że zrobotyzowana gastrektomia ma bardziej stromą krzywą uczenia się w porównaniu ze standardową laparoskopią. Ta zaleta może być niezwykle przydatna w Europie i Stanach Zjednoczonych, gdzie ilości przeprowadzanych gastrektomii są znacznie mniejsze niż na Wschodzie. Z tego powodu uważamy, że zrobotyzowana gastrektomia może odgrywać znaczącą rolę w krajach zachodnich, gdzie duże ośrodki przeprowadzają stosunkowo niewiele takich zabiegów w skali roku. Tak więc dla zachodniego ośrodka, który chce rozpocząć minimalnie inwazyjny program chirurgii żołądka, dobry wybór stanowić może podejście robotyczne, minimalizując wpływ interwału krzywej uczenia się na wyniki (Solaini i in. 2020).

Dodatkowe wskaźniki

Ponieważ w piśmiennictwie brano pod uwagę bardzo szeroki zakres wskaźników, zdecydowaliśmy się na przedstawienie wszystkich danych, nawet jeśli nie były to wskaźniki pierwotnie przez nas wybrane. Czas do powrotu perystaltyki i czas do pierwszego przejścia wzdęć są powszechnie określane jako wskaźniki czynności jelit. Ilość dni do pierwszego wzdęcia była jednym z drugorzędowych punktów końcowych w pracy Bobo i in., gdzie RG wykazała nieco krótszy czas trwania niż LG. Jednakże w przypadku analizy 13 badań na grupie 4127 pacjentów, dokonanej przez Qiu i innych, nie wykazano istotnej różnicy (Qiu i in. 2019). Bobo i in. zwrócili uwagę także na wskaźniki takie jak pobrane węzły chłonne (LN), proksymalny margines resekcji (PRM), dystalny margines resekcji (DRM). Nie wykazano różnic w grupach pod względem PRM i DRM. Aspekt liczby pobranych węzłów chłonnych różnił się w piśmiennictwie. Według Bobo i in. RG pobrano więcej węzłów chłonnych niż w LG, jednakże w przypadku wyników zaprezentowanych przez Qiu i innych, ta różnica była nieznaczna. Warto zauważyć, że w żadnym z przeanalizowanych artykułów, LG nie charakteryzowało się większą liczbą pobranych węzłów chłonnych, według większości piśmiennictwa różnica była nieznaczna, lub na korzyść grupy RG. Wielu chirurgów używa harmonicznego skalpela w celu wycięcia węzłów chłonnych i koagulacji naczyń, jednakże skalpel harmoniczny jednakże skalpel harmoniczny nie zapewnia takiej swobody i precyzji ruchów. Z pomocą przychodzą narzędzia robotyczne, dzięki którym maszyny mogą pomóc chirurgom w zakładaniu szwów wewnątrzustrojowych z wykorzystaniem precyzyjnego widoku 3D i instrumentów o siedmiu stopniach swobody. Jest to zgodne z tym, co wykazano w analizie opisanej przez Bobo i in., że TSMB (trial sequential monitoring boundaries) przecina skumulowana krzywa Z, co stanowi mocny dowód na wyższą liczbę pobranych LN i krótszy pobyt w szpitalu w przypadku RG.

4. Podsumowanie i wnioski

Podsumowując, wydaje się, że metoda RG stanowi obiecującą alternatywę dla laparoskopii w małoinwazyjnym leczeniu raka żołądka. Uwzględniając wyniki z przeanalizowanego

piśmiennictwa, pierwszorzędowe wskaźniki (OS, DFS, częstość nawrotów) były porównywalne w grupie RG i LG. Podejście zrobotyzowane wiązało się natomiast z mniejszą utratą krwi, krótszym czasem do pierwszego wzdęcia i większą bądź podobną liczbą pobranych węzłów chłonnych w porównaniu z laparoskopową gastrektomią. Chociaż RG skutkowało wydłużeniem czasu operacji, nie przełożyło się to na wzrost powikłań pooperacyjnych, otwartych konwersji czy śmiertelności.

W niniejszym przeglądzie piśmiennictwa nie dokonano analizy kosztów będących zmienną, której nie można pominąć w chirurgii robotycznej. Nie zostały one uwzględnione, ponieważ żadne badania nie zawierały wystarczających danych dotyczących tych zmiennych.

Niniejszy przegląd wykazał, że RG jest tak samo akceptowalna jak LG pod względem wyników krótko- i długoterminowych. RG to obiecującą metodą leczenia raka żołądka. Dalsze badania dotyczące odległych wyników onkologicznych w przypadku zrobotyzowanej gastrektomii są konieczne, aby osiągnąć ostateczne wnioski.

5. Literatura

- Bamboot ZM, Strong VE (2013) Minimally invasive surgery for gastric cancer. *J Surg Oncol* 107:271-6.
- Bobo Z, Xin W, Jiang L, et al. (2019) Robotic gastrectomy versus laparoscopic gastrectomy for gastric cancer: meta-analysis and trial sequential analysis of prospective observational studies. *Surg Endosc*. 1033-1048.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 68:394–424.
- Dixon E, Datta I, Sutherland FR. (2009) Blood Loss in Surgical Oncology: Neglected Quality Indicator? (September 2008):508-512.
- Guerrini GP, Esposito G, Magistri P, et al. (2020) Robotic versus laparoscopic gastrectomy for gastric cancer: The largest meta-analysis. *Int J Surg [Internet]*. 82(May):210–28.
- Gutt CN, Oniu T, Mehrabi A, et al. (2004) Robot-assisted abdominal surgery. *Br J Surg* 91:1390-7.
- Hashizume M, Sugimachi K. (2003) Robot-assisted gastric surgery. *Surg. Clin. North. Am.* 83:1429-44
- Jin SH, Kim DY, Kim H, Jeong IH, Kim MW (2007) Multidimensional learning curve in laparoscopy-assisted gastrectomy for early gastric cancer. *Surg Endosc* 21:28–33
- Ju Y, Sun S, Jiao S. (2018) Prolonged overall survival in metastatic gastric cancer treated with ipilimumab and lapatinib. *J Cancer Res Ther*. 14:1589-93.
- Kim HI, Park MS, Song KJ, Woo Y, Hyung WJ. (2014) Rapid and safe learning of robotic gastrectomy for gastric cancer: Multidimensional analysis in a comparison with laparoscopic gastrectomy. *Eur J Surg Oncol* 40:1346-54
- Kim HH, Hyung WJ, Cho GS, Kim MC, Han SU (2010) Morbidity and mortality of laparoscopic gastrectomy versus open gastrectomy for gastric cancer: an interim report—a phase III multicenter, prospective, randomized Trial (KLASS Trial). *Ann Surg* 251:417–420
- Kurek A, Król R, Kurek A, Król R. (2016) Praca pogładowa Krzywa uczenia w kontekście praktyki chirurgicznej The learning curve in the context of surgical practice. 16–23.
- Liao G, Zhao Z, Khan M, Yuan Y, Li X. (2019) Comparative analysis of robotic gastrectomy and laparoscopic gastrectomy for gastric cancer in terms of their long-term oncological outcomes: A meta-analysis of 3410 gastric cancer patients. *World J Surg Oncol*. 17(1):1-9. doi:10.1186/s12957-019-1628-2
- Liao G, Chen J, Ren C, et al. (2013) Robotic versus open gastrectomy for gastric cancer: a meta-analysis. *Plos One*. 8:e81946
- Moon JS, Park MS, Kim JH, et al. (2015) Lessons learned from a comparative analysis of surgical outcomes of and learning curves for laparoscopy-assisted distal gastrectomy. *J Gastric Cancer*;15:29-38.
- Rawla P, Barsouk A. (2019) Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention. *Prz Gastroenterol*. 14(1):26-38.

- Solaini L, Avanzolini A, Pacilio CA, et al. (2020) Robotic surgery for gastric cancer in the west: A systematic review and meta-analyses of short-and long-term outcomes. *Int J Surg* [Internet] 83(August):170–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijso.2020.08.055>
- Song J, Kang WH, Oh SJ, Hyung WJ, Choi SH (2009) Role of robotic gastrectomy using da Vinci system compared with lapa- roscopic gastrectomy: initial experience of 20 consecutive cases. *Surg Endosc* 23:1204–1211
- Qiu H, Ai JH, Shi J, Shan RF, Yu DJ. (2019) Effectiveness and safety of robotic versus traditional laparoscopic gastrectomy for gastric cancer: An updated systematic review and meta-analysis. *J Can Res Ther* 15:1450-63
- Wei Y, Yu D, Li Y, et al. (2018) Laparoscopic versus open gastrectomy for advanced gastric cancer: A meta-analysis based on high-quality retrospective studies and clinical randomized trials. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 42:577-90

8. Współczesne modele aktywności komórki nerwowej

Contemporary models of nerve cell activity

Kania Maciej

Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych, Wydział Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

Opiekun naukowy: prof. dr hab. Marian H. Lewandowski

Kania Maciej: mac.kania@student.uj.edu.pl

Słowa kluczowe: model Hodgkina-Huxleya, model solitonu, potencjał czynnościowy

Streszczenie

Zrozumienie działania mózgowia i procesu przetwarzania przez nie informacji sprawia badaczom wiele problemów. Jednym ze sposobów na rozwikłanie tej zagadki jest próba opisanego fizjologii komórek nerwowych i mechanizmów związanych z przyjmowaniem, przetwarzaniem i przewodzeniem bodźców które otrzymują. Aby to uczynić, naukowcy tworzą różne teorie i modele odwzorowujące aktywność neuronów, dopasowując je do istniejących już danych eksperymentalnych. Tak właśnie powstały dwie duże teorie dające różne światło na mechanizm aktywności komórki nerwowej. Pierwsza z nich, teoria elektrochemiczna, opracowana w latach 50. XX wieku przez Hodgkina i Huxleya przypisuje najwyższą rolę w powstawaniu potencjału czynnościowego stężeniom różnych jonów i błonowym kanałom jonowym. Zaś teoria termodynamiczna, stosunkowo młoda, zakłada, że potencjał czynnościowy powinien być traktowany jako zjawisko mechaniczne związane z przejściami fazowymi lipidów błony neuronu. W nauce powstają również modele matematyczne, w dużej mierze bazujące na modelu Hodgkina-Huxleya, które opisują populacje neuronów o charakterystycznych właściwościach np. model Theta czy model Fitzhugh-Nagumo. Jednak, pomimo wielu starań, naukowcy nie dotarli jeszcze do jednego wspólnego modelu ani teorii, która obejmowałaby wszystkie dotychczasowe zebrane obserwacje.

1. Wstęp

Mózgowie wydaje się być najbardziej skomplikowanym organem naszego ciała. Ludzie od starożytności zastanawiali się nad jego rolą, a współczesne badania odkrywają coraz to bardziej niezwykle aspekty jego działania. Cóż więc powoduje jego niezwykłość? Odpowiedź na to pytanie możemy szukać w podstawowym elemencie strukturalnym budującym ten organ, czyli w komórce nerwowej (neuronie). Mózgowie (mózg, mózdzek, pień mózgu) składa się z około 86 miliardów neuronów (Azevedo i in. 2009) połączonych z sobą funkcjonalnie poprzez synapsy chemiczne i elektryczne przy współpracy komórek gładkich, które - kiedyś postrzegane jedynie jako „wsparcie” neuronów – są dzisiaj uważane za element równie ważny w prawidłowej pracy mózgowia. Sama komórka nerwowa pod względem posiadanych organelli nie różni się znacząco od pozostałych typów komórek budujących nasz organizm. Wyróżnia ją jednak specyficzny kształt i obecność wypustek cytoplazmatycznych. W najbardziej ogólnym zarysie komórka nerwowa składa się z ciała komórki (somy), odchodzących od somy dendrytów, często pokrytych kolcami dendrytycznymi, oraz z pojedynczego aksonu wraz z zakończeniem aksonalnym.

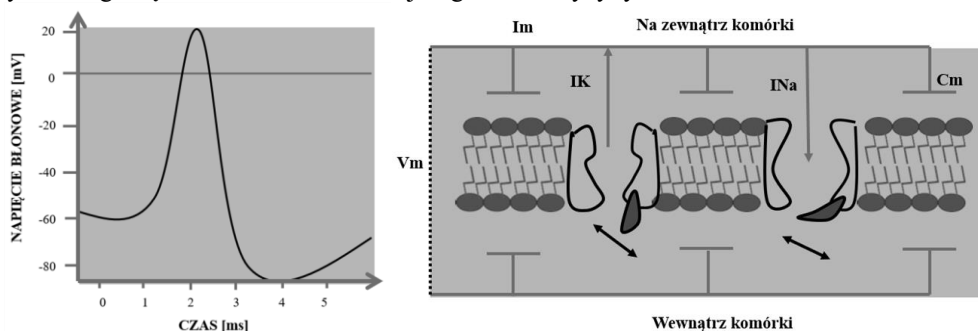
Komórki nerwowe komunikują się z sobą dzięki potencjałom czynnościowym przekazywanym przez synapsy. Z reguły, dendryty przekazują otrzymywane potencjały postsynaptyczne do wzdłużka aksonalnego, gdzie są one sumowane, w wyniku czego (zakładając, że potencjał osiągnął próg pobudliwości neuronu) zostaje wygenerowany potencjał czynnościowy. Potencjał czynnościowy jest przenoszony wzdłuż aksonu do zakończenia aksonalnego, czyli błony presynaptycznej neuronu. W tym miejscu wywołuje on „lawinę” zdarzeń synaptycznych prowadzących do uwolnienia neuroprzekaźnika (synapsa chemiczna) lub błyskawicznej wymiany impulsu elektrycznego między komórkami (synapsa elektryczna), co może powodować pobudzenie lub hamowanie aktywności kolejnego neuronu.

Tak zorganizowana praca neuronów przy ogromnej ich liczbie znacznie komplikuje próby zrozumienia działania mózgowia i całego układu nerwowego. W całym tym systemie znajdziemy przypadki dywergencji i konwergencji neuronów, co stawia kolejne utrudnienie w próbach rozpracowywania mechanizmów zachodzących w mózgowiu. Pomimo, iż wydawać by się mogło, że wiemy bardzo mało o pracy układu nerwowego, to jednak obecne badania na ten temat są bardzo intensywne i każdego dnia dowiadujemy się coraz to nowych informacji. Jednym z najważniejszych elementów w badaniu układu nerwowego jest próba stworzenia modelu, który jak najwierniej przypominać będzie rzeczywistą pracę mózgowia. Celem poniższego artykułu jest przegląd aktualnie istniejących modeli aktywności komórki nerwowej, które opisują ich części składowe, zachodzące modyfikacje i wyjaśniają nowe aspekty fizjologii komórki nerwowej.

2. Opis zagadnienia i przegląd literatury

2.1 Model Hodgkina-Huxleya

Najbardziej znanym i powszechnie wykorzystywanym w wyjaśnieniu zjawisk fizjologicznych zachodzących w komórce nerwowej jest model Hodgkina-Huxleya powstały w roku 1952. Hodgkin i Huxley oparli swoją ideę na podstawie badań przeprowadzonych na kałamarnicy olbrzymiej. Aksony komórki nerwowej tego zwierzęcia mają dużą średnicę (ok. 1 mm), co zdecydowanie ułatwiało badania (Hodgkin i Huxley 1952). W 1963 roku, za wyniki tych badań otrzymali nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii lub medycyny.



Rys. 1. Model Hodgkina-Huxleya. Wykres zmian polaryzacji komórki w czasie – potencjał czynnościowy (po lewej). Przedstawienie komórki nerwowej jako obwodu elektrycznego (po prawej) (Heimburg 2009).

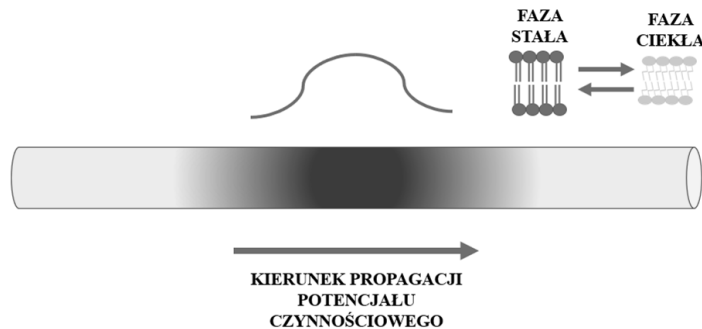
Podstawą modelu Hodgkina-Huxleya jest elektrochemiczny charakter aktywności komórki nerwowej. Według tego modelu neuron przedstawiony jest jako prosty układ elektryczny, w którym opornikami są kanały jonowe umieszczone w błonie, kondensatorem jest podwójna błona białkowo-lipidowa, a źródłem prądu jest gradient elektrochemiczny, powstały na skutek nierównomiernego rozłożenia jonów Na^+ , K^+ , Cl^- po obu stronach błony neuronu (Rys.1). W stanie spoczynku po wewnętrznej stronie błony obserwujemy wyższe stężenie jonów potasu i niższe stężenie jonów sodu i chloru w porównaniu do zewnętrznej strony błony komórkowej. Stąd też po odpowiednim pobudzeniu komórki (przy osiągnięciu odpowiedniego progu jej pobudliwości) otwarciu ulegają napięciowo-zależne kanały sodowe i rejestrowany jest szybki, duży prąd dokomórkowy jonów Na^+ , który powoduje silną depolaryzację komórki. Taki stan wywołuje otwarcie napięciowo-zależnych kanałów potasowych, inaktywację kanałów sodowych oraz silny prąd odkomórkowy jonów potasowych, co prowadzi do repolaryzacji komórki. W tzw. podstrzałce potencjału czynnościowego, czy hyperpolaryzacji następczej, napięcie błony neuronu osiąga wartość poniżej potencjału spoczynkowego. Zabezpiecza to neuron przed zbyt szybkim wygenerowaniem kolejnego potencjału czynnościowego, co mogłoby zakłócić przesyłanie informacji (Rys.1). Wygenerowany na wzgórku aksonalnym potencjał czynnościowy jest przewodzony wzdłuż aksonu do zakończenia presynaptycznego, gdzie zachodzą dalsze procesy przewodnictwa między komórkowego. Ważnym

usprawnieniem szybkości przewodnictwa jest mielinizacja aksonu. Pozwala ona, dzięki skokowemu odnawianiu potencjału czynnościowego, na znaczne przyspieszenie czasu jego przewodnictwa w porównaniu do aksonów niezymielinizowanych, w których potencjał czynnościowy jest odnawiany w każdym jego odcinku. (Huxley i Stampfli 1949).

Jednakże model Hodgkina-Huxleya nie przedstawia idealnej reprezentacji mechanizmu generowania i przewodnictwa potencjału czynnościowego neuronu. Wiele badań wskazuje, że nie uwzględnia on zjawisk nieelektrycznych, szczególnie ważnych z perspektywy termodynamiki komórki, takich jak zmiany mechaniczne włókna nerwowego w trakcie potencjału czynnościowego czy wymiana ciepła z otoczeniem. Model Hodgkina-Huxleya zakłada nieodwracalną dyssypację ciepła do otoczenia (ciepło ma pochodzić z prądów jonowych przepływających przez białkowe kanały w błonie aksonu), co w rzeczywistości kłóci się z wynikami eksperymentalnymi sugerującymi, że energia wydzielona w trakcie potencjału czynnościowego zostaje wtórnie pochłonięta do wnętrza komórki, a do tego jest większa, niż to wynika z modelu Hodgkina-Huxleya (Tasaki i in. 1989; Heimburg i Jackson 2008). Teoria elektrochemiczna nie wyjaśnia również mechanizmu działania leków znieczulających.

2.2 Model solitonu – teoria termodynamiczna

W odpowiedzi na wszystkie wymienione powyżej wątpliwości, naukowcy zaproponowali inny uzupełniający model, opisujący zjawiska zachodzące w trakcie potencjału czynnościowego, zwłaszcza termodynamiczne jego aspekty. Pomysł modelu solitonu powstał najprawdopodobniej na podstawie badań Ichiji Tasakiego z roku 1980. Badacz opublikował wtedy własne obserwacje i hipotezy dotyczące skracania się i puchnięcia włókien nerwowych kraba i kałamarnicy (Tasaki i in. 1980; Tasaki i Iwasa 1982). Jego prace nie zyskały rozgłosu, a do świata nauki wróciły w momencie, kiedy Thomas Heimburg wysnuł hipotezę, że zmiany obserwowane przez Tasakiego są związane z przemianami fazowymi lipidów błony komórkowej neuronu (Heimburg i Jackson 2005).



Rys. 2. Wizualizacja przebiegu potencjału czynnościowego wzdłuż aksonu wg teorii termodynamicznej (Na podstawie: Gonzalez-Perez 2016).

Głównym założeniem modelu solitonu jest postrzeganie potencjału czynnościowego jako fali mechanicznej, porównywanej na przykład do fali dźwiękowej. Podczas przewodzenia impulsu dochodzi do miejscowej przemiany fazowej błony komórkowej – faza ciekła przechodzi w fazę żelu, a błona miejscowo poszerza się (Rys.2). Eksperymentalnie pokazano, że zmiany te pokrywają się czasowo ze zmianą potencjału elektrochemicznego błony, a grubość błony zmienia się porównywalnie z przewidywaną wielkością zmiany fazowej ciec – żel (Gonzalez-Perez 2016). Model solitonu opiera się również na bilansie energetycznym i odwracalnej produkcji ciepła. Podczas pierwszej fazy, odpowiadającej depolaryzacji błony, komórka wydziela pewną ilość ciepła, w kolejnej fazie ciepło to jest zwrotnie pobierane do wnętrza komórki (Heimburg 2020). Zjawisko to sugeruje adiabatyczny charakter całego procesu propagacji potencjału czynnościowego. Model termodynamiczny stara się opisać również działanie leków znieczulających (anestetyki). Leki te należą do różnych grup związków chemicznych, różniących się pod względem swojej struktury

molekularnej i niekoniecznie wszystkie muszą oddziaływać na poziomie aktywności kanałów jonowych. A zatem mechanizm ich działania na układ nerwowy wydaje się być bardziej skomplikowany. Wykazano, że anestetyki obniżają temperaturę topnienia błon komórkowych, a tym samym uniemożliwiają przejście fazowe ciecz – żel błony komórki nerwowej (Heimburg i Jackson 2007). Zjawisko to może być podstawą zahamowania pobudliwości neuronu i wpływać na stanu znieczulenia organizmu. Wyniki pokazują też, że leki znieczulające nie wpływają na prędkość przewodzenia impulsu nerwowego, a jedynie na zdolność jego przewodzenia.

Niestety, model solitonu, jest teorią dopiero rozwijającą się i nadal wymaga wielu eksperymentów, aby jednoznacznie potwierdzić jej założenia. Na dodatek, model ten przedstawia aktywność komórki w perspektywie makroskopowej, w której wciąż brakuje szczegółów na poziomie mikro. Między innymi, nie wyjaśnia dokładnie roli białkowych kanałów jonowych w fizjologii komórki ani mechanizmu działania toksyn na układ nerwowy.

2.3 Inne modele propagacji potencjału czynnościowego

Pomimo zaproponowania dwóch bardzo złożonych i skomplikowanych modeli aktywności komórki nerwowej, w świecie neuronauki wciąż powstają nowe, które mają na celu uproszczenie tych, już istniejących lub stworzenie takich, które starają się opisać neurony pracujące w charakterystyczny sposób.

Jednym z takich modeli jest model Morris-Lecara bazujący na modelu Hodgkina-Huxleya. Jest to dwuwymiarowy system nieliniowych równań różniczkowych, który ma za zadanie opisać oscylacyjne zachowanie neuronów, zwracając szczególną uwagę na prądy wapniowe (depolaryzujące) oraz potasowe (hyperpolaryzujące) (Morris i Lecar 1981). Został stworzony na podstawie badań na układzie nerwowym wąsonogów. Model ten znalazł doskonałe zastosowanie w symulacji komórek piramidowych kory mózgowej (Agmon-Snir i in. 1998). Odpowiednie parametry równań Morris-Lecara pozwalają przedstawić w bardzo dobry sposób udział czasu i częstotliwości generowania potencjałów czynnościowych w kodowaniu informacji.

Kolejnym modelem bazującym na modelu Hodgkina-Huxleya jest model FitzHugh-Nagumo. Jest to zredukowana do dwóch równań różniczkowych forma modelu neuronu opisująca zarówno szybkie zmiany w potencjale błonowym komórki jak i stosunkowo wolniejszą dezaktywację kanałów potasowych i reaktywację kanałów sodowych po przejściu potencjału czynnościowego (FitzHugh 1961). Ze względu na prostotę modelu jest on użytecznym narzędziem w badaniach zachowań neuronów. Jednym z takich przykładów jest badanie synchronizacji neuronów w sieci FitzHugh-Nagumo mających odwzorowywać synchronizację spotykaną w stanach epileptycznych mózgu (Gerster i in. 2020).

Warto również zwrócić uwagę na jedną z ciekawych i za razem stosunkowo młodych koncepcji - model Galvesa-Locherbacha. Przedstawia on nie jeden neuron, a całą populację komórek nerwowych. Główną zasadą modelu jest określanie prawdopodobieństwa generowania potencjału czynnościowego na kolejnych neuronach na podstawie zmian zachodzących w całym systemie od momentu wystąpienia ostatniego potencjału czynnościowego (Galves i Locherbach 2013). Taki model pozwala przewidywać ewolucję i rozwój systemów i sieci biologicznych, a do tego jest bardzo wydajny obliczeniowo.

Model Theta, nazywany też kanonicznym modelem Ermentrouta-Kopell, używany jest do opisu parabolicznie paczkujących neuronów – grup neuronów, których aktywność przypomina rytmiczne erupcje (Ermentrout i Kopell 1986). Takie neurony możemy znaleźć przykładowo w pniu mózgu, gdzie odpowiadają za różne procesy, np. rytm oddychania. Główną zaletą modelu Theta jest jego prostota – składa się on, w przeciwieństwie do bardziej skomplikowanych modeli Hodgkina-Huxleya i Morris-Lecara, tylko z jednego równania, dotyczącego zmian napięcia błony komórki nerwowej. Ten z pozoru prosty system, daje jednak bardzo wiele możliwości w zakresie dynamiki aktywności neuronów i ma wiele funkcjonalnych zastosowań. Wykorzystywany jest w badaniu aktywności kory wzrokowej (Borgers i in. 2008), a także w uczeniu sztucznej inteligencji (McKennoch i in. 2008).

3. Podsumowanie i wnioski

Wszystkie opisane powyżej modele starają się wyjaśnić jedną i tę samą rzecz – „zachowanie” neuronu. Powinniśmy zatem postawić sobie pytanie – jaka jest relacja pomiędzy nimi? Dwie najbardziej rozbudowane idee – teoria elektrochemiczna i termodynamiczna – opisują aktywność komórki nerwowej w kompletnie odmienny sposób. Model Hodgkina-Huxleya skupia się na pracy kanałów jonowych, prądach i tworzącym się napięciu wzdłuż błony komórki. Natomiast model solitonu zwraca większą uwagę na przejścia fazowe lipidów błonowych i mechanikę komórki. Obie teorie są zgodne, co do powstającego impulsu napięciowego. Możemy założyć zatem, że teorie te mogą opisywać to samo zjawisko z dwóch różnych perspektyw i niejako „dopełniać się”. Jednak kwestią sporną jest bilans energetyczny całego procesu. Model elektrochemiczny zakłada nieodwracalną dyssypację ciepła, natomiast model termodynamiczny, bazując na wynikach eksperymentalnych, opowiada się za wtórną absorpcją ciepła po jego wcześniejszym wydaleniu na zewnątrz komórki. Jeśli mielibyśmy łączyć te obie teorie, to ten punkt, należy dopracować. Jeśli chodzi o pozostałe modele to w dużej mierze są one zgodne z modelem Hodgkina-Huxleya, bardzo często są jego uproszczeniem lub dostosowaniem do charakterystycznej pracy grup neuronów np. populacji komórek generujących paczki iglic.

Wszystkie te modele znacząco wpływają na ogólne lepsze zrozumienie aktywności pojedynczych neuronów, jak i pracy całego układu nerwowego. Począwszy od kompleksowej teorii elektrochemicznej i modelu solitonu, które wyjaśniają ogół zachodzących zjawisk w neuronie, skończywszy na takich modelach jak model Theta, który opisuje zachowanie się neuronów w konkretny, ściśle ustalony sposób. Oczywiście, potrzebujemy każdego z tych modeli, aby lepiej rozumieć jak działa mózgowie i móc wykorzystywać to w dalszych badaniach. Pozwalają one również dowolnie modulować te układy i przewidywać zachodzące w nich zmiany.

Przyszłość badań aktywności neuronów przy pomocy tworzonych modeli jest niezwykle obiecująca. Świat naukowy coraz częściej stara się korzystać z metod komputerowych i teoretycznych w badaniach eksperymentalnych, głównie ze względów etycznych (ograniczenie wykorzystania zwierząt), jak również z powodów praktycznych. Komputery o odpowiedniej mocy pozwalają nie tylko na dokładniejsze i szybsze wyniki w porównaniu z klasycznymi badaniami, ale także zakres modulacji jest szerszy. Przyszłość teorii neurofizjologicznych skupia się głównie na rozbudowie już istniejących i ich modyfikacjach, ale także na próbach wyjaśniania różnych, rejestrowanych doświadczalnie aspektów generowania i przewodnictwa potencjału czynnościowego za pomocą nowych modeli.

4. Literatura

- Agmon-Snir H, Carr CE, Rinzel J (1998). The role of dendrites in auditory coincidence detection. *Nature*, 393(6682), 268–272.
- Azevedo FA, Carvalho LR, Grinberg LT i in. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *The Journal of comparative neurology*, 513(5), 532–541.
- Börgers C, Epstein S, Kopell NJ (2008). Gamma oscillations mediate stimulus competition and attentional selection in a cortical network model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(46), 18023–18028.
- Ermentrout G, Kopell N (1986). Parabolic Bursting in an Excitable System Coupled with a Slow Oscillation. *SIAM Journal on Applied Mathematics*, 46(2), 233–253.
- Fitzhugh R. (1961) Impulses and Physiological States in Theoretical Models of Nerve Membrane. *Biophysical Journal*;1(6):445-466.
- Galves A, Löcherbach E (2013). Infinite systems of interacting chains with memory of variable length—a stochastic model for biological neural nets. *Journal of Statistical Physics*, 151(5), 896–921.
- Gerster M, Berner R, Sawicki J i in. (2020) FitzHugh-Nagumo oscillators on complex networks mimic epileptic-seizure-related synchronization phenomena. *Chaos*. 30(12):123130.

- Gonzalez-Perez A, Mosgaard LD, Budvytyte R i in. (2016). Solitary electromechanical pulses in lobster neurons, *Biophysical Chemistry*, Volume 216, Pages 51-59.
- Heimburg T. (2009). The Physics of Nerves. *Physik Journal* 8 (3): 33-39
- Heimburg T (2020). The important consequences of the reversible heat production in nerves and the adiabaticity of the action potential. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*.
- Heimburg T, Jackson AD (2005). On soliton propagation in biomembranes and nerves. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 102(28), 9790-9795.
- Heimburg T, Jackson AD (2007). The thermodynamics of general anesthesia. *Biophysical journal*, 92(9), 3159–3165.
- Heimburg T, Jackson AD (2008). Thermodynamics of the nervous impulse. in: *Structure and Dynamics of Membranous Interfaces*. pp. 317-339.
- Hodgkin AL, Huxley AF (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of physiology*, 117(4), 500–544.
- Huxley AF, Stämpfli R (1949). Evidence for saltatory conduction in peripheral myelinated nerve fibres. *J Physiol*. 108(3):315-339.
- McKeanoch S, Voegtlin T, Bushnell L (2009) Spike-timing error backpropagation in theta neuron networks. *Neural computation*, 21(1), 9–45.
- Morris C, Lecar H (1981). Voltage oscillations in the barnacle giant muscle fiber. *Biophysical journal*, 35(1), 193–213.
- Tasaki I, Iwasa K (1982). Further studies of rapid mechanical changes in squid giant axon associated with action potential production. *The Japanese journal of physiology*, 32(4), 505–518.
- Tasaki I, Kusano K, Byrne PM (1989). Rapid mechanical and thermal changes in the garfish olfactory nerve associated with a propagated impulse. *Biophysical journal*, 55(6), 1033–1040.
- Tasaki I, Iwasa K, Gibbons RC (1980). Mechanical changes in crab nerve fibers during action potentials. *The Japanese journal of physiology*, 30(6), 897–905.

9. Heterogenność brzuszego pola nakrywki śródmózgowia

The heterogeneity of the ventral tegmental area

Kozłowska Katarzyna, Anioł Anna, Kubiak Aleksandra, Jerzemowska Grażyna

Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański

Kozłowska Katarzyna: katkoz6679@gmail.com

Słowa kluczowe: brzuszne pole nakrywki śródmózgowia-VTA, funkcjonalna heterogenność VTA, neuroobrazowanie

Streszczenie

Brzuszne pole nakrywki śródmózgowia (VTA) stanowi obszar somatodendrytyczny układu mezoaktykolimbicznego, który steruje szeregiem reakcji napędowo-emocjonalnych: zarówno naturalnych, koniecznych dla utrzymania przy życiu osobnika i gatunku (np. pobieranie pokarmu), jak i patologicznych (różne formy uzależnień) oraz zaangażowany jest w kontrolę funkcji kognitywnych. Struktura ta po raz pierwszy została opisana przez Tsai'a w 1925 roku, który wyodrębnił ją z istoty czarnej (SN) i przedstawił jako nową strukturę. VTA jest strukturą niejednorodną o niejasnych granicach anatomicznych, która dzięki technikom immunohistochemicznym nadal jest poznawana. VTA ze względu na skład komórkowy wykazuje niejednorodność. W zależności od obszaru poza neuronami dopaminergicznymi (DA) grupy A10, VTA składa się również z neuronów GABA- i glutaminergicznych oraz mieszanych. Zauważono także odmienne projekcje poszczególnych jej obszarów: części przedniej (aVTA), tylnej (pVTA) i ogonowej (tVTA). Neuronalne i neurochemiczne zróżnicowanie poszczególnych subregionów VTA jest podstawą dla heterogenności funkcjonalnej – szczególnie widocznej w jej linii przednio-tylnej. Jednak wciąż istnieje potrzeba szerszych badań w tym zakresie. W tym przeglądzie literatury można znaleźć istotne doniesienia na temat różnic w morfologii i funkcjach poszczególnych obszarów VTA, które mogą rzucać nowe światło na wiele dotychczasowych i przyszłych badań, np. z obszaru leczenia uzależnień i zaburzeń psychicznych.

1. Wstęp

Brzuszne pole nakrywki śródmózgowia (*ventral tegmental area*; VTA) to struktura o heterogenicznej budowie, zlokalizowana w śródmózgowiu, umiejscowiona jest brzusznie w stosunku do jądra czerwonego (*nucleus ruber*; NR) i przyśrodkowo do istoty czarnej (Oades i Halliday 1987). Sąsiaduje również od przodu z tylnym podwzgórzem (*posterior hypothalamus*; PH) i ciałami suteczkowatymi (*mammillary bodies*; MBs), od tyłu natomiast z mostem oraz wstęgą przyśrodkową (*lemniscus medialis*, mLS) (Tsai 1925). System połączeń obejmujący w większości neurony dopaminergiczne (neurony DA) grupy A10 (Dahlstroem i Fuxe 1964) zlokalizowane w okolicy VTA oraz pola projekcyjne tych neuronów stanowią element konstytutywny układu mezoaktykolimbicznego. Neurony DA unerwiają liczne struktury limbiczne związane z reakcjami napędowo-emocjonalnymi. Są to jądro połączone (*nucleus accumbens*; Acb) oraz w mniejszym stopniu: ciało migdałowate (*amygdala*; Amg), hipokamp (*hippocampus*; Hip), opuszka węchowa (*olfactory bulb*; OB) i boczna przegroda (*lateral septum*; LS), które wraz z VTA stanowią drogę mezolimbiczną (Oades i Halliday 1987, Howe i Dombeck 2016), a w połączeniu z korą zakrętu obręczy (*cingulate cortex*; Cg) i korą przedczołową (*prefrontal cortex*; PFC) stanowią drogę mezoaktykalaną, odpowiadającą między innymi za funkcje kognitywne, takie jak osądzenie sytuacji i planowanie reakcji behawioralnej (Cools i D'Esposito 2011). VTA charakteryzuje się heterogenicznością morfologiczną i funkcjonalną (Yang i in. 2018). W budowie anatomicznej VTA wyróżnia się dwa jądra parzyste jak *nucleus parabrachialis pigmentosus* (PBP) i *nucleus paranigralis* (PN) oraz dwa jądra nieparzyste VTA, ułożone w linii pośrodkowej: *nucleus interfascicularis* (IF) oraz *nucleus raphe linearis, pars dorsalis/pars caudalis* (Rli/Cli), które kolejno odkrywano z biegiem lat w miarę postępu technik immunohistochemicznych. Niektórzy autorzy w jądrach bocznych wyróżniają dwie dodatkowe ich części, jak część grzbietową (*ventral tegmental area, pars rostralis*;

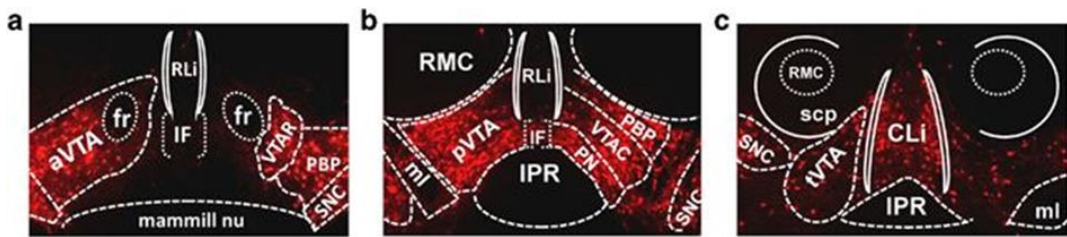
VTAR) i *parainterfascicularis* (PIF) (Dahlstroem i Fuxe 1964, Ikemoto i in. 1997, Ikemoto 2007). Według Ikemoto (2007) funkcjonalnie obszar VTA można podzielić na części przednią (*anterior VTA*; aVTA), tylną (*posterior VTA*; pVTA) i ogonową (*tail of the VTA*; tVTA). Ponadto obserwuje się odmienne reakcje behawioralne w odpowiedzi na aktywację lub hamowanie poszczególnych obszarów VTA w wymiarze przednio-tylnym (Sanchez-Catalan i in. 2014). W zależności od obszaru poza neuronami DA grupy A10, VTA składa się z neuronów GABA-ergicznymi, glutaminergicznymi oraz mieszanych, które wtórnie wraz z sygnałami dostarczonymi do VTA z różnych struktur mózgowia regulują aktywność szlaków dopaminergicznymi biorących początek w VTA. Zaburzenia w sygnalizacji dopaminy towarzyszą chorobom psychicznym i neurologicznym, np. w schizofrenii, w chorobie afektywnej dwubiegunowej (*Bipolar Affective Disorder*; BAD), w ciężkim zaburzeniu depresyjnym (*Major Depressive Disorder*, mDD), zespołom nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (**Attention-Deficit Hyperactivity Disorder**; ADHD), czy też obserwowane są w chorobach neurodegeneracyjnych, jak chociażby choroba Parkinsona (*Parkinson's Disease*; PD), czy też choroba Huntingtona (**Huntington's Disease**; HD) (Baik 2013, Goschke i Bolte 2014, Lebowitz i Khoshbouei 2019). Zatem postęp badań w temacie heterogenności VTA może przyczynić się do wyjaśnienia etiologii wielu chorób, w tym uzależnień, jak również mieć w przyszłości znaczenie dla zastosowania tej wiedzy w klinice.

2. Opis zagadnienia i przegląd literatury

2.1 Zróżnicowanie morfologiczne i strukturalne VTA

Po raz pierwszy termin VTA pojawił się w literaturze za sprawą Tsai w 1925 roku (Tsai 1925). Opisał on w utrwalonym i wybarwionym metodami Nissla i Golgi'ego mózgu oposa (*Philander*) – ssaka z rodziny dydelfowatych (*Didelphidae*) – region położony bocznie od jądra międzykonarowego (*interpeduncular nucleus*, iPN) jako trójkąt międzykonarowy (*trigonum interpeduncular*), w którego skład wchodziło jądro brzuszne nakrywki (*nucleus tegementi ventralis*) – obecne VTA. Na początku lat 60-tych XX wieku, przy użyciu techniki fluorescencji formaldehydowej, Falck i Hillarp odkryli obecność trzech głównych grup neuronów uwalniających dopaminę (DA) w śródmózgowiu, były nimi grupy A8, A9 i A10 (Dahlstroem i Fuxe 1964). Według autorów (Dahlstroem i Fuxe 1964) komórki grupy A8 znajdują się w obrębie pola retrorubralnego (*retrorubral field*; RRF), natomiast komórki grupy A9 zlokalizowane są w obrębie istoty czarnej (*substantia nigra*, SN). Natomiast komórki grupy A10 stanowią neurony zlokalizowane w okolicy VTA. Dahlstroem i Fuxe (1964) stwierdzili, że neurony DA w VTA są niewielkich rozmiarów (wielkość około 6-26 μm), o okrągłych, jajowatych, wrzecionowatych, gwiazdzistych, kanciastych lub nieregularnych ciałach z 3-5 wypustkami dendrytycznymi (Bentivoglio i Morelli 2005). Według tych samych autorów (Dahlstroem i Fuxe 1964), komórki DA grupy A10 dają początek drodze mezolimbicznej i mezokortykanej. Terminy VTA oraz A10 były i są do tej pory często synonimami w literaturze mimo, iż grupa A10 jest tworzona jedynie przez komórki DA w VTA i nie obejmuje pozostałych neuronów tam występujących, jak np. neuronów GABA-ergicznymi, czy też glutaminergicznymi. Obecnie wiadomo, że w VTA prócz komórek DA stanowiących ok. 55% całej populacji neuronalnej tej struktury, występują również komórki GABA-ergiczne, stanowiące ok. 30% populacji neuronów VTA i komórki glutaminergiczne stanowiące ok. 20% tejże populacji (Morales i Margolis 2017). W 1979 roku stwierdzono, że w obszarze „VTA of Tsai”, po uwzględnieniu wielkości komórek, ich kształtu oraz morfologii dendrytów, wyszczególniono pięć jąder. Używając barwienia Golgi'ego zidentyfikowano dwa jądra boczne: PN i PBP, które są bogate w komórki dopaminergiczne. PN jest strefą położoną blisko, tuż nad przednio-boczną częścią jądra międzykonarowego (*intercranial nucleus*; iTC) i jest złożone głównie z wrzecionowatych ciał komórek średnich rozmiarów oraz mniejszych komórek z kilkoma kolczastymi dendrytami. Granice PBP są trudniejsze do zdefiniowania, ponieważ ten subregion VTA jest położony grzbietowo i/lub grzbietowo-bocznie do PN w zależności od poziomu przednio-tylnego. Stanowi również boczną granicę między VTA, a SN. Jeden z typów ciał komórek PBP podobny jest do wrzecionowatych neuronów odnajdywanych w poziomach grzbietowych istoty czarnej części zbitej (*substantia nigra, pars compacta*; SNC). Neurony PBP mają średnich rozmiarów, kuliste ciała z wieloma promienistymi

dendrytami. Zaproponowano również dwa jądra środkowe w VTA: IF oraz jądro szwu ułożone przyśrodkowo (*nucleus raphe linearis*; RLi) z jego częścią grzbietową (RLi) i ogonową (Cli). IF rozciąga się w całym wymiarze przednio-tylnym VTA i składa się z okrągłych i ciasno upakowanych komórek, mniejszych niż w reszcie VTA. Nakładają się na nie również komórki zaliczane do RLi jako całości i zaliczane są do największych komórek w VTA, ich morfologia podobna jest w obu częściach tej struktury (RLi i Cli). Ikemoto (2007) natomiast w oparciu wyłącznie o wymiary cytoarchitektoniczne, zaproponował cztery jądra boczne VTA. Obok klasycznego podziału na PN i PBP, wyodrębnił dwa dodatkowe jądra: VTAR i PIF. W przypadku tego ostatniego opisano tak naprawdę jedynie jedną trzecią głowowej części struktury aktualnie znanej jako ogonowa część brzuszego pola nakrywki (*tail of ventral tegmental area*; tVTA), lub dziobowa część jądra nakrywki (*rostromedial tegmental nucleus*; RMTg). Obszar VTAR jest najbardziej przednią częścią VTA, z niską gęstością komórek dopaminergicznych tworzących ciągłość z komórkami MBs i z komórkami bocznego podwzgórza (*lateral hypothalamus*; LH). VTAR w jednej trzeciej długości VTA rozdziela się na subregiony PN i PBP. Następnie w części ogonowej VTA, dzięki barwieniu Nissla, stwierdzono inną grupę komórek, dotychczas stanowiących końcową część PN. Dane ostatniej dekady dążą do opisania jej jako odrębnego regionu: tVTA lub RMTg. Biorąc pod uwagę rozciągłość przednio-tylną VTA można je podzielić na co najmniej trzy odrębne podregiony: przedni (aVTA) (zawierająca VTAR i PBP), tylny (pVTA) (zawierająca PBP, PN, VTA część tylna) i ogonowy (tVTA) (Ryc. 1). Wielu badaczy podejmuje dyskusję, czy jądra środkowe tego obszaru należy przypisywać do rejonu VTA, czy powinny być przypisane raczej do innych struktur takich jak jądra szwu (*raphe nuclei*; RN) (Zhao-Shea i in. 2011). Pomimo oczywistego istnienia różnych subregionów anatomicznych w VTA, badania ich indywidualnych funkcji nie zostały tak naprawdę rozpoczęte. Stało się tak najprawdopodobniej z powodu trudności w wybiórczym manipulowaniu tymi grupami komórek ze względu na ich relatywnie małe rozmiary, ich bliskość oraz w większości dzielone właściwości neurochemiczne. Poszukiwania specyficznych markerów molekularnych jąder dla struktury VTA powinny zapewnić duży postęp na tym polu, czyniąc możliwym wykonanie selektywnego kontrolowania subregionów VTA poprzez odpowiednie promotory. Rosnąca liczba badań anatomicznych, biochemicznych i elektrofizjologicznych wykazuje heterogeniczność między neuronami uwalniającymi dopaminę i niezwiązanymi z dopaminą w każdym z tych jąder (Sanchez-Catalan i in. 2014).



Rys. 1. Przekroje mózgu szczura na różnych poziomach brzuszego pola nakrywki śródmózgowia (ventral tegmental area; VTA) znakowane za pomocą detekcji enzymu hydroksylazy tyrozynowej (tyrosine hydroxylase; TH) będącej markerem neuronów dopaminergicznych: a) część przednia VTA (anterior part of ventral tegmental area; aVTA) (bregma od -2,92 do -3,28 mm): VTAR (rostral part of ventral tegmental area), PBP (nucleus parabrachialis pigmentosus), IF (nucleus interfascicularis) i RLi (nucleus raphe linearis, pars rostralis); b) część tylna VTA (posterior part of ventral tegmental area; pVTA) (bregma od -3,28 do -3,80 mm): PBP, VTAC (caudal part of ventral tegmental area); c) część ogonowa VTA (bregma od -3,80 do -4,04 mm): tVTA (tail of ventral tegmental area) i Cli (nucleus raphe linearis, pars caudalis) w przebiegu przednio-tylnym. Neurony TH-zależne są oznaczone na czerwono. Granice regionu mózgowego są dodatkowo zaznaczone na biało (wg Zhao-Shea i in. 2011).

2.2 Przegląd różnic funkcjonalnych w wymiarze przednio - tylnym

Zróznicowanie poszczególnych subregionów VTA pod względem unerwienia i neurochemicznym jest podstawą dla heterogeniczności funkcjonalnej tego regionu – widocznej

w wymiarze przednio-tylnym czy środkowo-bocznym. Istnieje jednak wiele dowodów pochodzących z badań behawioralnych i farmakologicznych, które wskazują, że podział VTA na część przednią (aVTA), tylną (pVTA) i ogonową (tVTA) jest zasadny (Rys. 11) i należy go uwzględniać w planowaniu doświadczeń.

Zaobserwowano, że zwierzęta chętniej uzależniają się od substancji narkotycznych i psychostymulujących, takich jak: nikotyna, karbachol, opiaty, kanabinoidy, kokaina, czy też etanol. Co więcej obserwacje wykazały, że efekt samopodawania był częstszy u tych zwierząt, jeżeli pobudzał tylne części VTA w porównaniu do pobudzenia przedniej części tej struktury. W odpowiedzi na te jak i inne substancje podawane do pVTA uzyskiwano reakcje lokomotoryczne, czy też behavior preferencji miejsca. W przypadku aVTA, szczury chętniej podawały sobie do tego regionu jedynie antagonistę receptorów GABAA- pikrotoksynę (Ikemoto i in. 1997). Żadna inna substancja podawana do aVTA nie wywoływała pozytywnego wzmocnienia. Być może jest to związane z charakterem połączeń tego regionu, ponieważ ani przednio-przyśrodkowe, ani przednio-boczne VTA nie wysyłają znaczących projekcji do brzuszno-przyśrodkowego prążkowania będącego strefą wywołującą pozytywne wzmocnienie.

Pojawiło się również wiele doniesień na temat wpływu etanolu i jego pochodnych na neurony DA w aVTA i pVTA. Interesujący jest fakt, że zwierzęta samodzielnie dostarczają sobie etanol również do pVTA, lecz nie do aVTA. Ponadto wprowadzenie etanolu do pVTA również zwiększała aktywność lokomotoryczną tych zwierząt. W skrawkach mózgu *ex vivo* alkohol hamuje neurony dopaminergiczne aVTA, natomiast aktywuje te pochodzące z pVTA. Prawdopodobnie spowodowane jest to redukcją wpływu GABA-ergicznego na neurony DA w pVTA, w ten sposób faworyzując blokowanie hamowania komórek DA. Podobnie, dobrowolne spożycie etanolu zwiększa liczbę aktywnych neuronów DA w pVTA u szczurów preferujących alkohol. Działanie alkoholu wiąże się również ze zmniejszeniem wrażliwości receptorów NMDA w pVTA, tym samym wykluczając aktywację sygnałów pobudzających. Zatem uwolnienie komórek DA spod hamującego wpływu neuronów GABA-ergicznym wydaje się być wysoce prawdopodobnym mechanizmem.

Podobnie, badania behawioralne i neurochemiczne wykazały, że aldehyd octowy i salsolinol mają właściwości stymulujące dla pVTA. Zgodnie z tym zaobserwowano, że zwiększają one aktywność neuronów DA pochodzących z pVTA. Co więcej uważa się, że aldehyd octowy pochodzący z etanolu jest odpowiedzialny za efekt aktywacyjny etanolu na komórki DA.

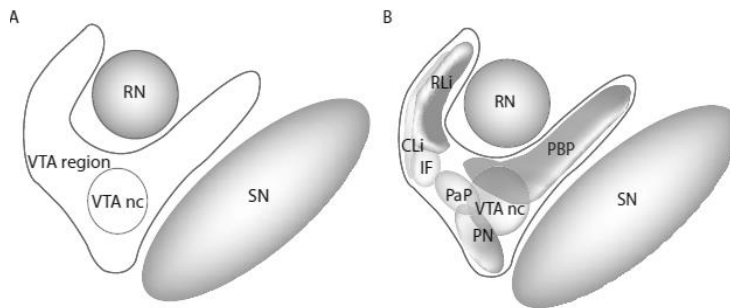
Niektóre dane wskazują także na różnice w kontroli odpowiedzi związanych z bólem wzdłuż przednio-tylnej osi VTA. Nadekspresja PLCY w pVTA u szczurów obniżała próg w *foot-shock* indukujący odpowiedź, podczas gdy w aVTA nadekspresja PLCY nie zmieniała behavioru u badanych szczurów.

Jak już wcześniej wspomniano, część ogonową VTA (tVTA) wyodrębniono znacznie później. Zauważono, że aktywacja białka c-Fos indukowana psychostymulantami takimi jak kokaina czy amfetamina (D-amfetamina, metamfetamina) w łatwy sposób pozwala na wizualizację aktywowanych struktur mózgowych podczas wymienionych wyżej iniekcji (Bourdy i in. 20214). Okazało się, że struktury okalające tVTA są po zażyciu amfetaminy, czy też kokainy nieaktywne, podobnie jak w przypadku aktywacji mózgowej u zwierząt z grupy kontrolnej, gdzie aktywacja białka c-Fos praktycznie nie występuje nie tylko w obrębie struktur okalających tVTA, lecz również w samym tVTA. Stwierdzono również, że indukcja c-Fos w tVTA występuje jedynie selektywnie po ekspozycji na określone narkotyki psychostymulujące. Wynika to z budowy tVTA. tVTA składa się głównie z neuronów GABA-ergicznym. Zatem tVTA może być centrum hamującym dla aktywności komórek DA, co dodatkowo potwierdziły to badania elektrofizjologiczne. Z badań wynika, że stymulacja tVTA hamuje komórki DA śródmózgowia, podczas gdy jego hamowanie zwiększa ich przewodnictwo, co wskazuje na obecność zarówno kontroli fazowej jak i tonicznej (Bourdy i in. 2014). Największa ilość danych behawioralnych dotyczących manipulacji w obrębie tVTA odnosi się do odpowiedzi awersyjnych i związanych z unikaniem. Uszkodzenia tVTA prowadzą do zastygania powodowanego strachem, pasywnej odpowiedzi na zapach drapieżnika oraz do lękopodobnych zachowań w podwyższonym labiryncie krzyżowym. Stymulacja farmakologiczna tVTA przez receptory AMPA jest wystarczająca aby wywołać warunkowaną awersję miejsca. Należy również wziąć pod uwagę fakt, że tVTA kontroluje nie tylko VTA, ale również SNc. W tym kontekście

uszkodzenia tVTA chronicznie stymulują szlak nigrostriatalny i obniżają koordynację motoryczną oraz uczenie lokomotoryczne w teście wymuszającym motorykę u szczurów (test *rotarod*). Te ostatnie dane podkreślają kluczowy wpływ tVTA na funkcjonowanie zwojów podstawy (*basal ganglia*; BG) (Cui i in. 2013, Bourdy i in 2014).

2.3 Neuroobrazowanie VTA

Heterogeniczność w cytoarchitekturze i profilu neurochemicznym VTA jest powodem trudności w definiowaniu jasnych granic w badaniach strukturalnych tego obszaru. Ta heterogenność właśnie określa to, że VTA jest raczej obszarem niż jądrem. Istnieje znaczna niespójność w terminologii VTA. Termin VTA jest stosowany zarówno dla obszaru, w którym znajdują się komórki A10, jak i dla jądra VTA, które uważane jest za jądro składowe tego obszaru. Również liczba jąder VTA różni się między opisami badań różnych autorów. W wyniku tych niespójności nawet neurobiolodzy mają duże problemy w opisywaniu VTA. Jest to jeszcze bardziej utrudnione przez różnice w nomenklaturze VTA w atlasach topologicznych (Rys. 2) (wg Trutti i in. 2019).



Rys. 2. Schematyczne, dwuwymiarowe przedstawienie ludzkiego obszaru brzuszego pola nakrywyki śródmózgowia (ventral tegmental area; VTA) zrekonstruowanego na podstawie atlasów topograficznych i na podstawie prowadzonych badań anatomicznych i patofizjologicznych. A) rekonstrukcja dwóch głównych terminologii obszaru VTA: VTA jako jądra (VTA nc) znajdujące się w obrębie obszaru VTA (VTA region). B) dwuwymiarowe przedstawienie lokalizacji poszczególnych subpopulacji (jąder) VTA. Objaśnienia: VTA nc – jądro VTA; VTA region – obszar VTA, PBP - parabrachial pigmented nucleus; PN – paranigral nucleus; IF - interfascicular nucleus; PaP – parapeduncular nucleus; RLi - rostral linear nucleus; CLi - caudal (or central) linear nucleus; SN - substantia nigra, istota czarna; RN - red nucleus, jądro czerwienne (Trutti i in. 2019, schemat zmodyfikowany).

Historycznie badania funkcji obszaru w obrębie VTA były do niedawna ograniczone do przeprowadzanych eksperymentów wyłącznie na zwierzętach laboratoryjnych (głównie szczurach). W dzisiejszych czasach postęp w neuroobrazowaniu pozwala na testowanie uprzednich odkryć dokonanych na zwierzętach, w sposób nieinwazyjny na ludziach, co przejawia się w ostatnio zwiększającej się ilości badań fMRI skupionych na aktywności VTA. Pomimo tego, wciąż jednak brakuje cyfrowych, anatomicznie precyzyjnych atlasów VTA stworzonych w oparciu o dane z wysoką rozdzielczością, które mogą służyć, jako wzrokowa pomoc w identyfikacji VTA w badaniach MRI. Dostępne atlasy dostarczone dzięki oprogramowaniu do neuroobrazowania (takie jak FMRIB Software Library 5.0 (FSL)) nie zawierają informacji o lokalizacji VTA. W konsekwencji w celu wizualnej identyfikacji VTA autorzy opierają się głównie na szerokiej wiedzy anatomicznej. Zatem uważamy, że potrzebny jest niezbędny dokładny trójwymiarowy opis tej struktury w celu zminimalizowania możliwości popełniania błędów oraz w celu stosowania anatomicznej poprawności jej nazewnictwa w określonych badaniach histologicznych. Obecnie atlasy topologiczne mózgu (np. Ding i in 2016) oparte są na precyzyjnych rekonstrukcjach cytoarchitektonicznych całego mózgu i są wykorzystywane do pozyskania informacji o kształtach i wymiarach różnych struktur, co z kolei może być użyteczne dla identyfikacji jąder na obrazach MRI. Atlasy te jednakże nie zawsze są ze sobą zgodne pod kątem kształtu i organizacji przestrzennej poszczególnych jąder VTA. Różnice

przejawiają się także w używanej przez autorów nomenklaturze (Rys. 2). Innym powodem niezgodności wizualizacji VTA w różnych atlasach jest to, że nie mogą one przedstawiać indywidualnych zmienności w anatomii, ponieważ są oparte tylko na jednym mózgu. W cyfrowych atlasach mózgu opartych na większej liczbie przypadków bierze się już pod uwagę zmienność anatomiczną. Atlasy te, określane jako atlasy probabilistyczne, powstają *in vivo* w cyfrowym zapisie wysokorozdzielczego MRI, takiego jak 7 T MRI, wykorzystując segmentację regionów zainteresowania (ROIs) na wielu obrazach. Tak powstałe mapy probabilistyczne pozwalają na transfer i porównywanie danych z różnych badań eksperymentalnych. Jednakże, w przeciwieństwie do SN, aktualnie nie istnieje żaden probabilistyczny atlas MRI dotyczący VTA.

3. Podsumowanie

Wraz z rosnącymi możliwościami technicznymi należałoby się skupić na opracowaniu dokładnych cyfrowych atlasów neuroanatomicznych mózgu zwierząt modelowych, a także w szczególności dokładnego atlasu ludzkiego, opartego o wyniki obrazowania z całego świata, z uzupełnieniem tak istotnych struktur jak VTA. Tym samym ostatecznie należałoby rozwiązać problem nazewnictwa i podjąć próbę weryfikacji prowadzonych do tej pory badań. Możliwość zrozumienia działania i potencjalnej modulacji układów dopaminergicznych mózgu daje nadzieję na terapię zaburzeń, które do tej pory nie zostały do końca poznane lub nie mają skutecznych metod leczenia. Podział VTA na części w wymiarze przednio-tylnym i przedstawione badania behawioralne z wykorzystaniem substancji uzależniających dają nadzieję na wdrożenie skutecznych metod leczenia uzależnień i kontroli zachowań motywacyjnych. Zatem obecnie dużym wyzwaniem jest poszukiwanie specyficznych markerów molekularnych, które mogłyby pozwolić na zaprojektowanie narzędzi transgenicznych dla pogłębienia zrozumienia fizjologicznych i patofizjologicznych wpływów VTA. Nie można również pomijać innych zmiennych, które wykazują do dziś słabo poznany wpływ na wszystkie struktury mózgowia, w tym regulację projekcji VTA. Ponadto pomijany tutaj astroglij może być „brakującym ogniwem” w przekazywaniu i plastyczności synaps, dlatego niezbędne jest rzetelne i wieloaspektowe podejście do tego tematu i współpraca wielu zespołów badawczych.

4. Literatura

- Baik JH (2013) Dopamine Signaling in Reward-Related Behaviors. *Front Neural Circuits*. 7: 152.
- Bentivoglio M, Morelli M (2005) The organization and circuits of mesencephalic dopaminergic neurons and the distribution of dopamine receptors in the brain, in: *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, Vol. 21: Dopamine, Elsevier, 1–107. Dunnett SB, Bentivoglio M, Björklund A, Hökfelt T (Red.).
- Bourdy R, Sánchez-Catalán MJ, Kaufling J et al. (2014) Control of the Nigrostriatal Dopamine Neuron Activity and Motor Function by the Tail of the Ventral Tegmental Area. *Neuropsychopharmacology* 39 (12): 2788–2798.
- Cools R, D'Esposito M (2011) Inverted-U-Shaped Dopamine Actions on Human Working Memory and Cognitive Control. *Biol Psychiatry*. 69 (12): 113–125.
- Cui G, Jun SB, Jin X et al. (2013) Concurrent Activation of Striatal Direct and Indirect Pathways during Action Initiation. *Nature* 494 (7436): 238–242.
- Dahlstroem A, Fuxe K (1964) Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. 1. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand Suppl*. 232: 1–55.
- Ding SL, Royall JJ, Sunkin SM et al. (2016) Comprehensive Cellular-Resolution Atlas of the Adult Human Brain. *J Comp Neurol*. 524 (16): 3127–3481.
- Goschke T, Bolte A (2014) Emotional Modulation of Control Dilemmas: The Role of Positive Affect, Reward, and Dopamine in Cognitive Stability and Flexibility. *Neuropsychologia* 62: 403–423.
- Howe MW, Dombeck DA (2016) Rapid Signalling in Distinct Dopaminergic Axons during Locomotion and Reward. *Nature* 535 (7613): 505–510.

- Ikemoto S, Murphy JM, McBride WJ (1997) Self-infusion of GABA (A) antagonists directly into the ventral tegmental area and adjacent regions. *Behav Neurosci.* 111: 369–380.
- Ikemoto S (2007) Dopamine Reward Circuitry: Two Projection Systems from the Ventral Midbrain to the Nucleus Accumbens-Olfactory Tubercle Complex. *Brain Res Rev.* 56 (1): 27–78.
- Lebowitz JJ, Khoshbouei H (2019) Neurobiology of Disease Heterogeneity of Dopamine Release Sites in Health and Degeneration. *Neurobiol Dis.* 134: 104633.
- Morales M, Margolis EB (2017) Ventral Tegmental Area: Cellular Heterogeneity, Connectivity and Behaviour. *Nat Rev Neurosci.* 18 (2): 73–85.
- Oades RD, Halliday GM (1987) Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. *Brain Res.* 434(2): 117–165.
- Sanchez-Catalan MJ, Kaufling J, Georges F et al. (2014) The Antero-Posterior Heterogeneity of the Ventral Tegmental Area. *Neuroscience* 282: 198–216.
- Trutti AC, Mulder MJ, Hommel B et al. (2019) Functional Neuroanatomical Review of the Ventral Tegmental Area. *NeuroImage* 191: 258–268.
- Tsai C (1925) The optic tracts and centers of the opossum. *Didelphis virginiana.* *J Comp Neurol.* 39 (2): 173–216.
- Yang H, de Jong JW, Tak Y (2018) Nucleus Accumbens Subnuclei Regulate Motivated Behavior via Direct Inhibition and Disinhibition of VTA Dopamine Subpopulations. *Neuron* 97 (2): 434–449.
- Zhao-Shea R, Liu L, Soll L et al. (2011) Nicotine-Mediated Activation of Dopaminergic Neurons in Distinct Regions of the Ventral Tegmental Area. *Neuropsychopharmacol* 36: 1021–1032.

10. Kombinacja immunoterapii z inhibitorami deacetylaz histonów w leczeniu chorób nowotworowych

Combination of immunotherapy and histone deacetylases inhibitors in cancer treatment

Monika Orzechowska

Katedra Cytobiochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

Opiekun naukowy: Dr hab. Anna Krześlak

Monika Orzechowska: UL0247111@edu.uni.lodz.pl

Słowa kluczowe: deacetylacja, immuno-onkologia, modyfikacje epigenetyczne, nowotwory

Streszczenie

Acetylotransferazy histonów (HAT) i deacetylazy histonów (HDAC) to kluczowe enzymy biorące udział w modelowaniu struktury chromatyny za pomocą przyłączania lub odłączania reszt acetylowych. Rolą tego procesu jest regulacja ekspresji genów. W komórkach nowotworowych często dochodzi do nadekspresji deacetylaz histonów. Zaburzenia te mogą prowadzić do transformacji nowotworowej. Nową nadzieją w terapii przeciwnowotworowej stały się leki, które posiadają zdolność inhibicji deacetylacji histonów. Inhibitory deacetylaz histonów dobrze wpływają na odpowiedź immunologiczną poprzez zwiększenie immunogenności nowotworów, co aktywuje rekrutację elementów układu odpornościowego. Ponadto inhibitory HDAC zwiększają wrażliwość komórek nowotworowych na działanie układu odpornościowego i redukują immunosupresyjne działanie mikrośrodowiska guza. Te właściwości inhibitorów HDAC sprawiły, że mogą przyczynić się one do zwiększenia skuteczności immunoterapii, której celem jest walka z nowotworami poprzez aktywację układu immunologicznego pacjenta. Istnieje wiele badań przedklinicznych oraz klinicznych, które koncentrują się na poszukiwaniu najbardziej korzystnych kombinacji inhibitorów HDAC z czynnikami immunomodulatorowymi w celu uzyskania odpowiedniego efektu synergistycznego

1. Wstęp

Nowotwór to złożona jednostka chorobowa. Na jego powstanie składa się wiele czynników genetycznych, środowiskowych oraz epigenetycznych (Lu i in. 2020). Dotychczasowo stosowana chemioterapia, jako główna strategia leczenia nowotworów nie przynosi satysfakcjonujących wyników. Głównymi wadami tej terapii są lekooporność nowotworów, brak skutecznego leczenia pacjentów z przerzutami, a także ciężkie skutki uboczne. Nadzieją w terapii nowotworów stała się immunoterapia (Park i in. 2015; Eckschlager i in. 2017).

Układ immunologiczny odgrywa ważną rolę w zwalczaniu komórek nowotworowych. Lewis Thomas i Sir Frank MacFarlane Burnet w niezależnych badaniach wysunęli hipotezę nadzoru immunologicznego (Ribatti 2017). Według tej teorii nowo powstałe komórki nowotworowe są pod stałą kontrolą układu odpornościowego, który zapobiega rozwojowi nowotworu. Jednak w pewnym momencie komórki nowotworowe mogą wymknąć spod nadzoru układu immunologicznego i dochodzi do progresji nowotworu (Ribatti 2017). Ucieczka komórek nowotworowych przed działaniem układu odpornościowego jest możliwa dzięki licznym mechanizmom immunosupresyjnym wykształconym przez nowotwór. Przykładem może być mikrośrodowisko guza, które tworzy kamuflaż, dzięki któremu nowotwór staje się niewidoczny dla komórek odpornościowych. Celem immunoterapii jest ulepszenie elementów układu immunologicznego, a także przeciwstawienie się działaniom immunosupresyjnym nowotworu, a co za tym idzie promowanie eliminacji komórek nowotworowych (Banik i in. 2019; Lu i in. 2020).

Badania dotyczące zastosowania immunoterapii w zwalczaniu nowotworów przynoszą satysfakcjonujące wyniki. Jednak stosowanie kombinacji immunoterapii z innymi metodami leczenia nowotworów wykazują dużo lepsze rezultaty. Ostatnie badania skupiają się na połączeniu

immunoterapii z leczeniem, które polega na zmianach modyfikacji epigenetycznych poprzez zastosowanie związków modulujących aktywność enzymów. Przykładem tzw. leków epigenetycznych (*ang. epi-drugs*) są inhibitory deacetylaz histonów (iHDAC, *ang. histone deacetylases inhibitors*) (Mazzone i in. 2017).

W pracy przedstawiono charakterystykę inhibitorów HDAC oraz wyniki badań łączących immunoterapię w połączeniu z inhibitorami deacetylaz histonów.

2. Inhibitory deacetylaz histonów

Acetylotransferazy histonów (HATs, *ang. histone acetyltransferases*) i deacetylazy histonów (HDACs, *ang. histone deacetylases*) to enzymy biorące udział w modelowaniu struktury chromatyny, które odpowiednio przyłączają i odłączają grupy acetylowe. Acetylacja reszt lizynowych histonów umożliwia rozluźnienie chromatyny, czego skutkiem jest łatwiejszy dostęp do sekwencji DNA czynnikom, które są niezbędne do inicjacji transkrypcji. Deacetylacja to odwrotny proces, w którym następuje kondensacja chromatyny oraz zahamowanie transkrypcji (Park i in. 2015; Bezu i in. 2019). Brak równowagi w działaniu acetylotransferaz HAT oraz deacetylaz HDAC może prowadzić do: zmian profilu ekspresji niektórych genów, zmian niektórych szlaków sygnałowych, degradacji niektórych białek przez proteasomy oraz zmian stanu metylacji DNA (Eckschlager i in. 2017). W komórkach nowotworowych często dochodzi do nadekspresji deacetylaz HDAC, co przyczynia się do zaburzenia ekspresji genów zaangażowanych w karcynogenezę (Park i in. 2015; Bezu i in. 2019).

Deacetylazy histonów można podzielić na cztery klasy, które obejmują 18 różnych enzymów. Podział ten opiera się na trzech podstawowych kryteriach: stopniu podobieństwa ludzkich HDAC do ich homologów u drożdży, lokalizacji w komórce oraz stopnia ich ekspresji w zależności od rodzaju komórek. Klasa I (HDAC1, HDAC2, HDAC3 i HDAC8) wykazuje podobieństwo do białka Rdp3 drożdży. Enzymy te są zlokalizowane w jądrze i ulegają ekspresji we wszystkich rodzajach komórek. Białka klasy II są podobne do drożdżowej deacetylazy histonów A1 i obejmują dwie podklasy – IIa oraz IIb. HDAC z klasy IIa (HDAC4, HDAC5, HDAC7 i HDAC9) są zlokalizowane w cytoplazmie, ale mogą być przenoszone do jądra, w przeciwieństwie do białek klasy IIb (HDAC6 i HDAC10), które występują tylko w cytoplazmie. Enzymy znajdujące się w klasie III (SIRT1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) wykazują homologię do białka Sir2 drożdży. W klasie IV znajduje się tylko HDAC11. Białko to nie wykazuje podobieństwa do białek drożdży. Klasa I, II i IV to klasyczne deacetylazy, które są zależne od jonów Zn^{2+} , natomiast klasa III - sirtuiny są zależne od dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (Park i in. 2015; Singh i in. 2018; Saleh i in. 2020; Jenke i in. 2021). Chociaż określenie funkcji poszczególnych deacetylaz wymaga dalszych badań to obecnie wiadomo, że enzymy te odgrywają kluczową rolę w karcynogenezie poprzez deacetylację histonów i białek niehistonowych, które są zaangażowane w: regulację cyklu komórkowego, apoptozę, naprawę uszkodzeń DNA, angiogenezę, czy też powstawanie przerzutów (Li i Seto, 2016).

Blizsze poznanie funkcji HDAC oraz ich roli w onkogenezie, pozwoliło na wdrożenie do leczenia nowych związków o właściwościach przeciwnowotworowych będących inhibitorami deacetylaz histonów (iHDAC, *ang. histone deacetylase inhibitors*). Opracowano wiele inhibitorów, które są ukierunkowane na hamowanie aktywności HDAC klasy I, II i IV (Li i Seto, 2016). Inhibitory klasycznych deacetylaz histonów zbudowane są z trzech części: czapeczki (*ang. cap group*), obszaru ZBG (*ang. zinc binding group*) oraz hydrofobowego łącznika, a mechanizm ich działania polega na łączeniu się inhibitorów HDAC z jonem Zn^{2+} , który znajduje się w miejscu aktywnym HDAC. Skutkiem tego jest zakłócenie oraz zahamowanie aktywności deacetylaz histonów (Bezu i in, 2019; Jenke i in., 2021). Obecnie w badaniach klinicznych testuje się związki wpływające na aktywność sirtuin. Inhibitory HDAC można podzielić na pięć podstawowych grup: pochodne kwasu hydroksamowego (hydroksamiany) np. panabiostat, krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (alifatyczne) np. kwas walproinowy, benzamidy np. entinostat, cykliczne tetrapeptydy np. romidepsin oraz inhibitory SIRT np. sirtinol (Eckschlager i in. 2017). Inhibitory HDAC wywołują działanie przeciwnowotworowe poprzez zatrzymanie proliferacji oraz indukcji apoptozy komórek nowotworowych. Ponadto hamują angiogenezę, a także zdolność nowotworów do tworzenia przerzutów. Inhibitory HDACs wykazują również rolę immunomodulacyjną poprzez kontrolę

wydzielania poziomu cytokin, czy też wpływają na działanie elementów układu odpornościowego np. makrofagów, komórek dendrytycznych. Te ważne właściwości sprawiły, że inhibitory HDAC stały się obiecującą formą leczenia, która może dawać satysfakcjonujące wyniki w połączeniu z immunoterapią, w przypadku terapii przeciwnowotworowej (Eckschlager i in. 2017; Bezu i in. 2019; Saleh i in. 2020).

3. Kombinacja immunoterapii z inhibitorami deacetylaz histonów w leczeniu chorób nowotworowych

Zrozumienie procesu odpowiedzi immunologicznej, a także mechanizmów immunosupresyjnych wykształconych przez komórki nowotworowe, było kluczowym momentem w rozwoju nowej strategii leczenia chorób nowotworowych - immunoterapii. Dotychczas powstały trzy podstawowe rodzaje immunoterapii: szczepionki przeciwnowotworowe, immunoterapia adoptywna, oraz blokada immunologicznych punktów kontrolnych (Mazzone i in. 2017; Christofi i in. 2019). Pierwsza strategia ma na celu pobudzenie limfocytów T specyficznych dla nowotworu, co prowadzi do eliminacji komórek nowotworowych. Immunoterapia adoptywna polega głównie na modyfikacji elementów układu odpornościowego. Te ulepszenia mają nadać komórkom odpornościowym zdolności do specyficznego rozpoznawania komórek nowotworowych, a to z kolei ma doprowadzić do regresji nowotworu (Morrison i in. 2018). W ostatnim czasie największej osiągnięć dotyczy blokady immunologicznego punktu kontrolnego. Celem tej strategii jest zahamowanie wewnętrznych mechanizmów regulacyjnych układu odpornościowego, co prowadzi do skuteczniejszej odpowiedzi immunologicznej na komórki nowotworowe. W tym przypadku wykorzystywane są przeciwciała monoklonalne przeciwko receptorowi programowanej śmierci 1 (PD-1, *ang. programmed cell death receptor 1*) oraz antygenowi – 4 cytotoksycznych limfocytów T (CTLA-4, *ang. cytotoxic T cell antigen 4*). CTLA-4 jest receptorem na limfocytach T, który wiąże się z CD80/CD86 na komórkach prezentujących antygen. Mechanizm ten hamuje działanie limfocytów T. PD-1 ulega ekspresji na powierzchni aktywnych limfocytów T oraz B, komórkach dendrytycznych, czy też komórkach NK. Wiązanie PD-1 z jego ligandem PD-L1 lub PD-L2 powoduje zatrzymanie proliferacji limfocytów T. Blokady przeciwciałami anti-PD-1 oraz anti-CTLA-4 poszczególnych immunologicznych punktów kontrolnych pozwalają na prawidłowe działanie elementów układu immunologicznego oraz eliminację komórek nowotworowych (Mazzone i in. 2017; Christofi i in. 2019).

Inhibitory HDAC zwiększają skuteczność immunoterapii na wiele sposobów. Po pierwsze inhibitory HDAC wzmacniają ekspresję antygenów nowotworowych oraz MHC, co inicjuje intensywną aktywację limfocytów T. Inhibitory HDAC mają również zdolność epigenetycznej modulacji komórek immunosupresyjnych. Właściwość ta pozwala na regulację stanu zapalnego oraz odpowiedzi immunologicznej. Ponadto inhibitory HDAC indukują ekspresję specyficznych chemokina dla komórek T, które są odpowiedzialne za rekrutację większej liczby limfocytów T. Te immunomodelujące właściwości inhibitorów HDAC sprawiają, że są one dobrymi kandydatami do współdziałania z immunoterapią w leczeniu nowotworów (Banik, 2019). Istnieje kilka badań klinicznych w których wykorzystywana jest kombinacja entinostat, czy też vorinostat jako inhibitora HDAC z pembrolizumabem, który należy do grupy inhibitorów PD-L1.

W badaniach *in vitro* z wykorzystaniem ludzkich linii komórkowych raka piersi wykazano, że inhibitory HDAC wpływają na zmianę ekspresji PD-L1 w tych komórkach (Terranova-Barberio i in. 2017). Ponadto w tym samym badaniu w celu określenia działania inhibitorów HDAC w kombinacji z immunoterapią zastosowano model zwierzęcy. Dokonano iniekcji podskórnej myszom komórek mysich raka piersi 4TI, pochodzących z nowotworów opornych na leczenie i charakteryzujących się wysoką proliferacją. Po powstaniu nowotworów myszy podzielono losowo na grupy, które miały otrzymywać: sam vorinostat, same przeciwciała anti-PD-1, obie formy leczenia lub nośnik jako kontrole. Nie zaobserwowano jednak istotnej korzyści połączenia tych dwóch terapii. W drugiej fazie badań do wcześniej wymienionych leków dodano jeszcze inhibitor CTLA-4. Dodanie przeciwciał anti-CTLA-4 przełamało lekooporność mysiego raka piersi z linii komórkowej 4TI i wraz z przeciwciałami anti-PD-1 oraz vorinostatem znacząco zahamowało rozwój nowotworu.

W późniejszych etapach badania stwierdzono również, że pominięcie vorinostatu we wcześniej wspomnianej kombinacji terapeutycznej nie dawało satysfakcjonujących wyników. Inhibitor HDAC był niezbędnym elementem skutecznego działania terapii. Badania te pokazały jak ważne jest współdziałanie inhibitorów HDAC z immunoterapią (Terranova-Barberio i in. 2017). Skuteczność tej kombinacji w leczeniu raka piersi potwierdzono również w badaniach klinicznych (Terranova-Barberio i in. 2020). W badaniu wzięły udział 34 osoby, które chorowały na raka piersi z ekspresją receptora estrogenowego (ER+, ang. *Estrogen Receptor Positive*). Pacjenci zostali podzieleni na dwie grupy. Pierwsza grupa przyjmowała pembrolizumab, vorinostat oraz dodatkowo tamoxifen od pierwszego cyklu badań. Druga grupa brała te same leki, lecz inhibitor PD-1 został im podany dopiero w drugim cyklu badań. Dla obu grup wyliczono wskaźnik obiektywnych odpowiedzi (ORR, ang. objective response rate), czas przeżycia całkowitego (OS, ang. overall survival) oraz czas przeżycia wolny od progresji (PFS, ang. progression-free survival). ORR to łączne występowanie odpowiedzi całkowitych oraz częściowych na leczenie i wynosił on odpowiednio w grupie I – 17% oraz w grupie II – 8%. OS oraz PFS w grupie pierwszej wynosiły odpowiednio 14,3 miesiące i 2,57 miesiąca, a w grupie drugiej 15 miesięcy oraz 2,63 miesiąca. Wyniki badań pokazują, że aż u 17% pacjentów z grupy I oraz 8% pacjentów z grupy II nastąpiła całkowita lub częściowa regresja raka piersi. Ponadto wcześniejszy czas podania pembrolizumabu działa korzystnie na skuteczność kombinacji (Terranova-Barberio i in. 2020).

Badania współdziałania pembrolizumabu oraz vorinostatu w leczeniu pacjentów z innymi nowotworami również dają satysfakcjonujące wyniki (Rodriguez i in. 2020). Badanie kliniczne obejmowało dwie grupy. Pierwszą grupę stanowiło 25 pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi, natomiast druga grupa obejmowała 25 osób z rakiem płaskonabłonkowym ślinianek. Pacjentom podawano pembrolizumab, vorinostat oraz dodatkowo tamoxifen. Dla obu grup wykazano ORR, OS oraz PFS. W pierwszej grupie odsetek obiektywnych odpowiedzi wynosił 32%, natomiast w drugiej – 16%. Ośmiu pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi uzyskało częściową regresję choroby, a poziom stabilizacji choroby został zauważony u pięciu pacjentów. W grupie chorych na raka płaskonabłonkowego szyi cztery osoby uzyskały częściową odpowiedź na leczenie, a stan stabilny wykazało czterech pacjentów. OS oraz PFS wynosił kolejno w grupie I – 12,6 miesiąca oraz 4,5 miesiąca, a w grupie II – 14 miesięcy i 6,9 miesiąca (Rodriguez i in. 2020).

Inne badania kliniczne bazowały na współdziałaniu entinostatu z immunoterapią w różnych formach np. pembrolizumabu (Hellmann i in. 2021), czy też z zastosowaniem wysokiej dawki interleukin-2 (Pili i in. 2017). Badanie entinostatu w połączeniu z pembrolizumabem przeprowadzono z udziałem 71 osób chorych na niedrobnokomórkowego raka płuc (NSCLC). Miarę sukcesu stanowił obiektywny współczynnik odpowiedzi, który w hipotezie zakładał, że $ORR > 20\%$. Wyliczono ORR, OS oraz PFS, które kolejno wynosiły 9,2%, 10,1 miesiąca oraz 2,8 miesiąca. Współczynnik obiektywnej odpowiedzi był dużo mniejszy niż zakładano, jednak 9% badanych osób uzyskało częściową lub całkowitą remisję choroby, co w przypadku NSCLC jest satysfakcjonującym wynikiem (Hellmann i in. 2021). Kolejne badanie kliniczne z wykorzystaniem entinostatu liczyło 47 osób chorych na raka nerkowokomórkowego. W leczeniu zastosowano wcześniej wymieniony inhibitor oraz wysoką dawkę interleukiny-2. Wyliczono ORR, OS oraz PFS, które kolejno wynosiły 37%, 65,3 miesiąca oraz 13,8 miesiąca. Wyniki pokazują, że 37% osób chorych na raka nerkowokomórkowego uzyskało całkowitą lub częściową regresję choroby (Pili i in. 2017).

4. Podsumowanie

Liczne badania dostarczyły ważnych informacji na temat wpływu inhibitorów HDAC na różne elementy układu immunologicznego. Właściwości immunomodelujące deacetylaz histonów umożliwiły im efektywne współdziałanie wraz z immunoterapią w leczeniu chorób nowotworowych. Bardzo ważny z punktu widzenia opracowania nowych kombinacji immunoterapii z inhibitorami HDAC jest rozwój badań *in vitro* oraz *in vivo*. Obecnie jest bardzo mało opublikowanych wyników badań klinicznych połączenia tych dwóch form terapii, jednak ich duży potencjał sprawia, że tego rodzaju badania rozpoczynane są coraz częściej. Niestety na ich wyniki trzeba jeszcze poczekać. Dużą korzyścią kombinacji immunoterapii z inhibitorami HDAC jest rzadsze występowanie poważnych niepożądanych skutków ubocznych niż w innych terapiach np. chemioterapii. Dalsze badania

dotyczące zastosowania kombinacji inhibitorów HDAC z immunoterapią w leczeniu chorób nowotworowych są niezbędne do określenia kolejnych właściwości immunomodelujących tych substancji, odpowiedniej dawki, a także rodzajów nowotworu, w leczeniu których ta metoda może zostać zastosowana (Shen i in. 2016;; Pili i in. 2017; Rodriguez i in. 2020; Saleh i in. 2020; Terranova-Barberio i in. 2020; Hellmann i in. 2021).

5. Literatura

- Banik D, Moufarrij S, Villagra A. (2019) Immunoepigenetics Combination Therapies: An Overview of the Role of HDACs in Cancer Immunotherapy. *Int J Mol Sci.* 20(9):2241
- Bezu L, Chuang AW, Liu P, et. al. (2019) Immunological Effects of Epigenetic Modifiers. *Cancers (Basel).*11(12):1911
- Christofi T, Baritaki S, Falzone L, et al. (2019) Current Perspectives in Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel).* 11(10):1472.
- Eckschlager T, Plch J, Stiborova M, et al. (2017) Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs. *Int J Mol Sci.* 18(7):1414.
- Hellmann MD, Jänne PA, Opyrchal M, et. al. (2021) Entinostat plus Pembrolizumab in Patients with Metastatic NSCLC Previously Treated with Anti-PD-(L)1 Therapy. *Clin Cancer Res.* 27(4):1019-1028.
- Jenke R, Reßing N, Hansen FK, et. al. (2021) Anticancer Therapy with HDAC Inhibitors: Mechanism-Based Combination Strategies and Future Perspectives. *Cancers (Basel).* 13(4):634.
- Li Y, Seto E. (2016) HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 6(10)
- Lu Y, Chan YT, Tan HY, et. al. (2020) Epigenetic regulation in human cancer: the potential role of epi-drug in cancer therapy. *Mol Cancer.* 19(1): 79.
- Mazzone R, Zwergel C, Mai A i et al. (2017) Epi-drugs in combination with immunotherapy: a new avenue to improve anticancer efficacy. *Clin Epigenetics.* 9:59.
- Morrison AH, Byrne KT, Vonderheide RH. (2018) Immunotherapy and Prevention of Pancreatic Cancer. *Trends Cancer.* 4(6):418-428.
- Park J, Thomas S, Munster PN. (2015) Epigenetic modulation with histone deacetylase inhibitors in combination with immunotherapy. *Epigenomics.* 7(4):641-52
- Pili R, Quinn DI, Hammers HJ, et al. (2017) Immunomodulation by Entinostat in Renal Cell Carcinoma Patients Receiving High-Dose Interleukin 2: A Multicenter, Single-Arm, Phase I/II Trial (NCI-CTEP#7870). *Clin Cancer Res.* 23(23):7199-7208.
- Ribatti D. (2017) The concept of immune surveillance against tumors. The first theories. *Oncotarget,* 8(4), 7175–7180.
- Rodriguez CP, Wu QV, Voutsinas J, et al. (2020) A Phase II Trial of Pembrolizumab and Vorinostat in Recurrent Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinomas and Salivary Gland Cancer. *Clin Cancer Res.* 26(4):837-845.
- Saleh R, Toor SM, Sasidharan Nair V. (2020) Role of Epigenetic Modifications in Inhibitory Immune Checkpoints in Cancer Development and Progression. *Front Immunol.* 11:1469.
- Singh AK, Bishayee A, Pandey AK. (2018) Targeting Histone Deacetylases with Natural and Synthetic Agents: An Emerging Anticancer Strategy. *Nutrients.* 10(6):731
- Shen L, Orillion A, Pili R. (2016) Histone deacetylase inhibitors as immunomodulators in cancer therapeutics. *Epigenomics.* 8(3):415-28.
- Terranova-Barberio, M, Pawlowska, N, Dhawan, M, et al. (2020) Exhausted T cell signature predicts immunotherapy response in ER-positive breast cancer. *Nat Commun* 11, 3584.
- Terranova-Barberio M, Thomas S, Ali N. (2017) HDAC inhibition potentiates immunotherapy in triple negative breast cancer. *Oncotarget.* 8(69):114156-114172

11. Wykorzystanie metody RP-TLC i badań *in silico* do oceny parametrów farmakokinetycznych acylowych pochodnych betuliny

The application of the RP-TLC method and *in silico* studies to the evaluation of pharmacokinetic parameters of acylated betulin derivatives

Pęcak Paweł, Chrobak Elwira, Monika Kadela-Tomanek

Katedra i Zakład Chemii Organicznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Opiekun naukowy: dr Elwira Chrobak

Pęcak Paweł: pawel.pecak@med.sum.edu.pl

Słowa kluczowe: lipofilowość, triterpeny pentacykliczne, farmakokinetyka

Streszczenie

Wśród triterpenów pentacyklicznych typu lupanu znajdują się związki o obiecującej aktywności przeciwnowotworowej. Ze względu na niską biodostępność możliwość ich zastosowania jako leków jest ograniczona. Prowadzi to do poszukiwania w tej grupie związków nowych substancji o lepszych właściwościach farmakokinetycznych. Jednym z kierunków modyfikacji cząsteczki betuliny jest synteza pochodnych acylowych. Znajomość parametrów fizykochemicznych w tym również lipofilowości nowych związków umożliwia prognozowanie ich aktywności. Celem niniejszej pracy było wyznaczenie eksperymentalnych wartości parametru lipofilowości betuliny i jej pochodnych metodą chromatografii cienkowarstwowej w odwróconym układzie faz (RP-TLC). Wykonane badania potwierdziły wysoką korelację pomiędzy eksperymentalnymi i teoretycznymi wartościami lipofilowości badanych triterpenów. Wysoką korelację zaobserwowano również pomiędzy aktywnością cytotoksyczną a lipofilowością wyznaczoną eksperymentalnie oraz teoretycznie.

1. Wstęp

Związki pochodzenia naturalnego pozyskiwane z materiału roślinnego odgrywają istotną rolę w badaniach związanych z otrzymywaniem nowych substancji leczniczych (Atanasov i in. 2015). Wyizolowana z kory brzozy betulina **1** (Rys. 1.) posiada szerokie spektrum właściwości farmakologicznych, w tym działanie przeciwnowotworowe, przeciwwirusowe, przeciwzapalne, przeciwbakteryjne oraz hepatoprotekcyjne (Kuznetsova i in. 2014, Pozharitskaya i in. 2017). Możliwość zastosowania betuliny **1** i jej pochodnych w farmakoterapii jest ograniczona ze względu na ich słabą rozpuszczalność w wodzie i związane z tym niekorzystne właściwości farmakokinetyczne, które wpływają na absorpcję, dystrybucję, metabolizm i eliminację potencjalnego środka leczniczego. Poprawę rozpuszczalności i biodostępności pochodnych betuliny uzyskuje się poprzez wprowadzenie do struktury związku **1** polarnych grup funkcyjnych. Wykazano, że obecność takich ugrupowań, w pozycjach C-3 i C-28 zwiększa rozpuszczalność oraz aktywność przeciwnowotworową pochodnych betuliny (Thibeault i in. 2007; Medina-O'Donnell i in. 2016).

Modyfikowanie struktury związków naturalnych poprzez wprowadzenie podstawników alkinylowych (zawierających wiązanie potrójne węgiel-węgiel) umożliwia otrzymanie ich półsyntetycznych analogów o często wyższej aktywności biologicznej. Ze względu na wysoką reaktywność, grupa alkinylowa jest ważnym farmakoforem wykorzystywanym przy tworzeniu nowych substancji leczniczych (Vasilevsky 2012). Ugrupowanie to występuje w wielu już stosowanych farmaceutykach, takich jak doustne środki antykoncepcyjne (17- α -etynyloestradiol), inhibitory odwrotnej transkryptazy HIV-1 (efawirenz), leki przeciwrzybicze (terbinafina) i inhibitory kinazy tyrozynowej (erlotynib) (Zhuo 2015).

Zmiany w strukturze betuliny **1** są również ukierunkowane na syntezę jej alkinylowych pochodnych, które wykazują obiecujące właściwości biologiczne. Obecność tej grupy, nie tylko

wpływa korzystnie na aktywność, ale również umożliwia dalszą funkcjonalizację otrzymanych pochodnych (Boryczka 2013).

Lipofilowość jest istotnym parametrem wykorzystywanym przy projektowaniu nowych substancji biologicznie aktywnych oraz optymalizacji właściwości farmakokinetycznych powszechnie stosowanych leków. Deskryptor ten pozwala scharakteryzować rozpuszczalność leków w płynach biologicznych, przenikanie przez błony biologiczne, szybkość wchłaniania oraz oddziaływanie lek-receptor (Dąbrowska i in. 2011). Najczęściej ze wzrostem lipofilowości wzrasta również aktywność biologiczna związków, co związane jest z ich większym powinowactwem do błon biologicznych i wyższą przenikalnością, a tym samym lepszym dostępem do miejsca docelowego działania. Zbyt wysoka lipofilowość powoduje obniżenie rozpuszczalności związku w wodzie oraz utrudnia transport cząsteczek przez fazę wodną. W konsekwencji zachodzi wybiórcza absorpcja związku w błonach biologicznych. Dąży się zatem do uzyskania substancji o optymalnych właściwościach hydrofobowo-hydrofilowych, czyli o optymalnej lipofilowości. Lipofilowość w znacznym stopniu wpływa na proces doustnego wchłaniania leków, pozwala także określić aktywność leków w organizmie (Dołowy 2009; Rutkowska i in, 2013; Yamamoto K, Ikeda Y 2016). Parametr ten determinuje możliwość transportu biernego przez błony biologiczne (np. bariera krew-mózg), a także stopień wiązania leku z białkami. W konsekwencji deskryptor ten wpływa na reakcję biologiczną oraz na związane z lekami niekorzystne działania uboczne. Jest więc jednym z parametrów, które pozwalają przewidzieć profil ADME (wchłanianie, dystrybucja, metabolizm i wydalanie) danego związku, ale także jego wiązanie z odpowiednim receptorem oraz umożliwia określenie toksyczności (Andrić i in. 2016; Dołowy 2009).

Celem przedstawionych badań było wyznaczenie eksperymentalnych wartości parametru lipofilowości ($\log P_{TLC}$) metodą chromatografii cienkowarstwowej w odwróconym układzie faz (RP-TLC) dla betuliny **1** oraz jej acylowych pochodnych zawierających wiązanie potrójne węgiel-węgiel. Przeprowadzono także analizę zależności pomiędzy eksperymentalnymi ($\log P_{TLC}$) i teoretycznymi (ALOGPs, XLOGP2, miLogP, Clog P) wartościami lipofilowości. Badane związki wykazują aktywność cytotoksyczną wobec komórek ludzkiej białaczki CCRF/CEM, co umożliwiło określenie zależności pomiędzy lipofilowością a działaniem biologicznym.

2. Materiał i Metody

Pochodne acylowe betuliny otrzymano w reakcjach estryfikacji betuliny **1** z kwasami alkinylowymi i chloromrówczanem propargilu (Boryczka i in. 2013). Do wyznaczenia parametrów lipofilowości zsyntezowanych związków wykorzystano metodę chromatografii cienkowarstwowej w odwróconym układzie faz (RP-TLC). Fazę ruchomą stanowiła mieszanina 1,4-dioksanu i 0,2 M buforu octanowego (pH 4,8) o różnym stężeniu 1,4-dioksanu w zakresie 90-60%, z gradacją co 5 %. Jako fazę stacjonarną zastosowano olej silikonowy osadzony na żelu krzemionkowym (płytki aluminiowe RP-18F₂₅₄S, Merck).

2.1 Wyznaczenie eksperymentalnego parametru lipofilowości

Pierwszym etapem badań było sprawdzenie czystości związków **1-7** metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) z zastosowaniem płytek aluminiowych pokrytych żelem krzemionkowym 60F₂₅₄ neutral Typ E (Merck). Fazę ruchomą stanowiła mieszanina chloroform : etanol (40:1 v/v). Wszystkie badane związki były jednoplamkowe.

W celu wyznaczenia eksperymentalnego parametru lipofilowości zastosowano płytki aluminiowe RP-18F₂₅₄S o wymiarach 6 x 10 cm. Na płytkach zaznaczono linię startu w odległości 1 cm od dolnej krawędzi. Następnie na linii startu wyznaczono punkty co 1 cm, pozostawiono 0,5 cm odstępu od prawej i lewej krawędzi płytki. Betulinę **1** oraz jej pochodne **2-7** (Rys.1) odważono w ilości 2 mg, a następnie rozpuszczono je w 1 cm³ chloroformu. Na zaznaczone wcześniej punkty na linii startowej płytki chromatograficznej naniesiono przy pomocy szklanej kapilary, równe ilości roztworów badanych związków. Jako fazę ruchomą wykorzystano mieszaninę eluentu (60 cm³) o różnym stosunku procentowym 1,4-dioksanu i 0,2 M roztworu buforu octanowego (pH 4,8). W badaniach użyto układ 1,4-dioksan : 0,2 M roztwór buforu octanowego w następujących stężeniach: 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65% oraz 60%. Przygotowaną fazę ruchomą wlało do

szklanej komory chromatograficznej wyłożonej bibułą. Komorę pozostawiono w temperaturze pokojowej przez jedną godzinę w celu wysycenia jej przez eluent. Po tym czasie płytki chromatograficzne z naniesionymi związkami umieszczono w szczelnej komorze chromatograficznej. Rozwijanie płytek zakończono w momencie, gdy faza ruchoma osiągnęła wysokość 1 cm poniżej górnej krawędzi płytki. W celu wizualizacji plamek związków płytki chromatograficzne spryskano 10% roztworem stężonego kwasu siarkowego (VI) w etanolu, a następnie ogrzewano przez 5 minut. W celu wyznaczenia wartości współczynnika opóźnienia R_f zmierzono odległość od linii startu do środka plamki (a) oraz odległość, którą pokonał rozpuszczalnik (b). Dla każdego związku i układu wykonano po trzy pomiary, co pozwoliło na wyznaczenie średniej wartości $R_{f\text{sr}}$ ($R_{f\text{sr}} = a/b$). Wartość współczynnika retencji R_M obliczono na podstawie poniższego wzoru:

$$R_M = \log\left(\frac{1}{R_{f\text{sr}}} - 1\right)$$

Ze względu na liniową zależność współczynnika retencji R_M od składu objętościowego fazy ruchomej istnieje możliwość wyznaczenia znormalizowanego chromatograficznego parametru R_{M0} poprzez ekstrapolację do zerowego stężenia 1,4-dioksanu na podstawie wzoru:

$$R_M = R_{M0} + bC$$

b – kąt nachylenia prostej, C – stężenie 1,4-dioksanu.

Eksperymentalny parametr lipofilowości ($\log P_{\text{TLC}}$) związków **1-7** obliczono na podstawie równania krzywej wzorcowej. Jako substancje wzorcowe zastosowano acetanilid, 4-bromoacetofenon, benzofenon, antracen i DDT, których literaturowe wartości lipofilowości ($\log P_{\text{lit}}$) są w zakresie 1,21-6,39 (Bober i in. 2019). Wartości parametrów $R_{f\text{sr}}$, R_M i R_{M0} dla substancji wzorcowych wyznaczono w identycznych warunkach jak dla badanych pochodnych betuliny. Fazą ruchomą była mieszanina 1,4-dioksanu i 0,2 M roztwór buforu octanowego (pH 4,8) o stężeniu 1,4-dioksanu w zakresie 90-60%, z gradacją co 5%. Różnica polegała na sposobie wizualizacji chromatogramów substancji wzorcowych, które analizowano w świetle lampy UV przy długości fali 254 nm. Dla poszczególnych substancji wzorcowych wykonano wykres zależności współczynnika R_{M0} od wartości literaturowej $\log P_{\text{lit}}$ uzyskując krzywą wzorcową opisaną poniższym równaniem (Bober i in. 2019):

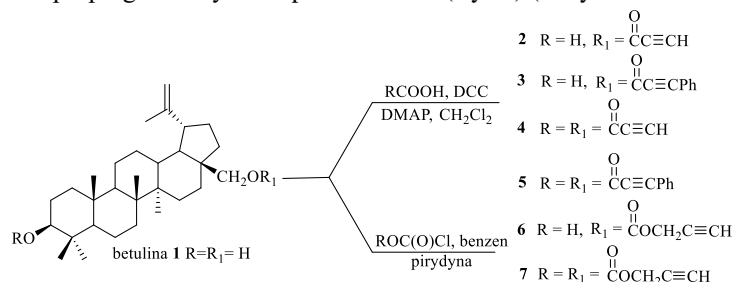
$$\log P_{\text{TLC}} = 1,0715R_{M0} + 0,7311 \quad (r = 0,993; SD = 0,269)$$

2.2 Wyznaczenie teoretycznych wartości parametru lipofilowości

Teoretyczne wartości $\log P$ dla badanych związków zostały obliczone za pomocą dostępnej online platformy (www.vcclab.org) oraz programu ChemDraw. W obliczeniach wykorzystano programy ALOGPs, miLogP, XLOGP2 (www.vcclab.org) oraz Clog P (program ChemDraw).

3. Wyniki i dyskusja

Betulina **1** ze względu na obecność w jej strukturze dwóch grup hydroksylowych znajdujących się przy atomach węgla C-3 i C-28 stanowi dogodny substrat w syntezie pochodnych acylowych. W reakcjach betuliny **1** z kwasem propiolowym i fenylopropiolowym oraz chloromrówczanem propargilu otrzymano pochodne **2-7** (Rys.1) (Boryczka i in. 2013).



Rys. 1. Otrzymywanie alkinyłowych pochodnych betuliny **2-7**.

Pochodne monoalkinylowe **2**, **3** i **6** oraz dialkinylowe **4**, **5** i **7** zbadano pod kątem aktywności cytotoksycznej w stosunku do ludzkiej linii komórek białaczki CCRF/CEM. Jako związek referencyjny w badaniach aktywności cytotoksycznej wykorzystano cisplatynę (Tab.1).

Tab. 1. Aktywność cytotoksyczna betuliny **1**, pochodnych acylowych **2-7** oraz cisplatyny [IC₅₀ (μM)] w stosunku do ludzkiej linii komórek białaczki CCRF/CEM.

Związek	R	R ₁	Linia nowotworowa CCRF/CEM IC ₅₀ [μM]
betulina 1	H	H	89,35
2	H	C≡CH	0,048
3	H	C≡CPh	85,83
4	C≡CH	C≡CH	18,23
5	C≡CPh	C≡CPh	94,42
6	H	OCH ₂ C≡CH	6,02
7	OCH ₂ C≡CH	OCH ₂ C≡CH	NA
Cisplatyna			6,60

NA- brak aktywności w zastosowanym zakresie stężeń

Lipofilowość betuliny **1** oraz jej pochodnych **2-7** oznaczono metodą chromatografii cienkowarstwowej w odwróconym układzie faz (RP-TLC). Otrzymane eksperymentalnie wartości współczynnika opóźnienia R_{fsr} wykorzystano do obliczenia współczynnika retencji R_M . Następnie wykonano wykresy zależności współczynnika R_M od stężenia 1,4-dioksanu w fazie ruchomej dla badanych triterpenów. W oparciu o równania regresji liniowej uzyskano wartości znormalizowanego współczynnika retencji R_{M0} . W celu przeliczenia parametru R_{M0} badanych związków na $\log P$ wyznaczono krzywą wzorcową dla pięciu substancji o znanych wartościach $\log P_{lit}$. Z równania krzywej wzorcowej obliczono wartości $\log P_{TLC}$ dla betuliny **1** oraz pochodnych **2-7**, które przedstawiono w tabeli 2. Eksperymentalne wartości lipofilowości acylowych pochodnych betuliny **2-7** zawierają się w zakresie 6,693-9,499. Na podstawie otrzymanych wartości $\log P_{TLC}$ badane związki można uszeregować według wzrastającego powinowactwa do fazy lipidowej: $1 < 6 < 2 < 7 < 3 < 4 < 5$. Najbardziej hydrofilnym związkiem w badanej grupie jest betulina **1** ($\log P_{TLC} = 4,530$), co najprawdopodobniej wynika z obecności dwóch grup hydroksylowych przy atomach C-3 oraz C-28. Estryfikacja grupy hydroksylowej w pozycji C-28 cząsteczki betuliny **1** wywołuje wzrost lipofilowości, co można zaobserwować w przypadku pochodnych monoacylowych **2**, **3** i **6**. Estryfikacja obu grup hydroksylowych w pozycjach C-3 i C-28 powoduje, że wszystkie pochodne diacylowe **4**, **5** i **7** posiadają wyższe wartości eksperymentalnej lipofilowości w porównaniu z ich analogami monoacylowymi. Największą wartość parametru $\log P_{TLC}$ spośród wszystkich badanych substancji posiada pochodna diacylowa **5**, zawierająca w cząsteczce dwa podstawniki fenylopropyloilowe.

Ważnym elementem badań było wyznaczenie teoretycznych wartości parametru lipofilowości $\log P$ z wykorzystaniem programów obliczeniowych ALOGPs, miLogP, XLOGP2 oraz Clog P. Teoretyczne wartości lipofilowości ($\log P$) badanych związków mieszczą się w szerokim zakresie obejmującym wartości od 5,34 do 14,05 (Tab.3).

Najniższe wartości parametru $\log P$ otrzymano z programu ALOGPs, natomiast najwyższe uzyskano stosując programy XLOGP2 i Clog P (Tab. 3). Wartości teoretyczne $\log P$ związków **1-7** porównano z wartością eksperymentalną $\log P_{TLC}$ (Rys. 2). Największymi wartościami lipofilowości

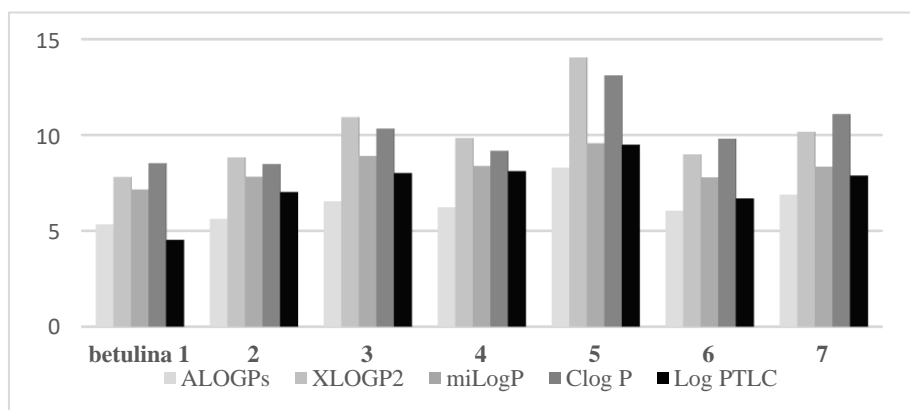
teoretycznej i eksperymentalnej charakteryzuje się pochodna diacylowa 5, natomiast najniższe wartości parametru log P posiada betulina 1.

Tab. 2. Wartości parametrów, b, r, R_{M0} i log P_{TLC} wyznaczone dla betuliny 1 i pochodnych acylowych 2-7 w układzie rozwijającym 1,4-dioksan : 0,2 M bufor octanowy (pH 4,8).

Związek	b	r	R_{M0}	Log P_{TLC}
betulina 1	-0,0431	0,9974	3,5456	4,530
2	-0,0693	0,9863	5,8730	7,024
3	-0,0782	0,9854	6,7987	8,016
4	-0,0793	0,9896	6,8928	8,117
5	-0,0905	0,9999	8,1829	9,499
6	-0,0660	0,9886	5,5638	6,693
7	-0,0777	0,9960	6,6771	7,886

Tab. 3. Teoretyczne wartości parametru log P wyznaczone dla betuliny 1 i pochodnych acylowych 2-7 na podstawie dostępnych programów komputerowych.

Związek	ALOGPs	XLOGP2	miLogP	Clog P
betulina 1	5,34	7,81	7,16	8,53
2	5,62	8,83	7,82	8,49
3	6,54	10,93	8,91	10,34
4	6,23	9,84	8,39	9,18
5	8,30	14,05	9,57	13,11
6	6,05	8,99	7,79	9,81
7	6,89	10,17	8,35	11,10



Rys.2. Porównanie teoretycznych wartości log P dla związków 1-7 obliczonych z wykorzystaniem programów komputerowych z wartością eksperymentalną log P_{TLC} .

Wartości lipofilowości teoretycznej log P uzyskane przy pomocy programów komputerowych porównano między sobą oraz z wartościami lipofilowości eksperymentalnej (log P_{TLC}) (Tab. 4). Najlepszą korelację pomiędzy wartościami lipofilowości teoretycznej uzyskano przy użyciu programów ALOGPs i Clog P ($r = 0,9794$) oraz ALOGPs i XLOGP2 ($r = 0,9706$). Porównanie wyników otrzymanych metodami teoretycznymi z wynikami uzyskanymi metodami

eksperymentalnymi wskazuje, że najwyższą wartość współczynnika korelacji dla zależności pomiędzy $\log P_{TLC}$ a wartością $\log P$ uzyskano dla programu miLogP ($r = 0,9401$).

Tab. 4. Wartości współczynników korelacji (r) wyznaczone pomiędzy metodą RP-TLC a ALOGPs, miLogP, Clog P i XLOGP2.

	ALOGPs	miLogP	Clog P	XLOGP2	$\log P_{TLC}$
ALOGPs	1,0000	0,9158	0,9794	0,9706	0,8540
miLogP		1,0000	0,8509	0,9655	0,9401
Clog P			1,0000	0,9250	0,7616
XLOGP2				1,0000	0,8781
$\log P_{TLC}$					1,0000

Dla betuliny 1 i jej pochodnych 2-7 obliczono również zależność pomiędzy lipofilowością wyznaczoną eksperymentalnie i teoretycznie, a aktywnością cytotoksyczną wobec komórek ludzkiej białaczki CCRF/CEM (Tab. 5). Najlepszą korelację pomiędzy aktywnością cytotoksyczną (IC_{50}) a lipofilowością teoretyczną ($\log P$) otrzymano dla wyników z programu miLogP ($r = 0,8139$). Wartości współczynnika korelacji dla zależności pomiędzy aktywnością cytotoksyczną a lipofilowością wyznaczoną eksperymentalnie ($\log P_{TLC}$) były porównywalne z wartością współczynnika korelacji uzyskanego dla programu miLogP.

Tab.5. Wyznaczenie korelacji pomiędzy aktywnością cytotoksyczną.

Aktywność wobec CCRF/CEM	Współczynnik korelacji (r)				
	ALOGPs	Clog P	XLOGP2	miLogP	Log P_{TLC}
IC_{50} [μM]	0,5578	0,5323	0,6070	0,8139	0,8052

Lipofilowość podobnie jak masa cząsteczkowa (M), ilość miejsc o charakterze donorowym (nHD) i akceptorowym (nHA) dla wiązań wodorowych, liczba wiązań rotacyjnych ($nROT$) oraz topologiczna powierzchnia polarna cząsteczki ($TPSA$) jest określana na wczesnym etapie badań związków będących kandydatami na leki. Parametry fizykochemiczne związane z biodostępnością badanych triterpenów wyznaczono za pomocą platformy Swiss ADME (Tab. 6).

Tab. 6. Parametry fizykochemiczne związków 1-7: masa cząsteczkowa (M), ilość miejsc o charakterze akceptorowym (nHD), ilość miejsc o charakterze donorowym (nHA) dla wiązań wodorowych, liczba wiązań rotacyjnych ($nROT$) oraz topologiczna powierzchnia polarna cząsteczki ($TPSA$).

Związek	M [g/mol]	nHA	nHD	$nROT$	$TPSA$ [\AA^2]
betulina 1	442,72	2	2	2	40,46
2	494,75	3	1	4	46,53
3	570,85	3	1	4	46,53
4	546,79	4	0	6	52,60
5	698,98	4	0	6	52,60
6	524,78	4	1	6	55,76
7	606,84	6	0	10	71,06

Zgodnie z regułami Lipińskiego i Vebera substancja lecznicza łatwiej przenika przez błony biologiczne i jest lepiej wchłaniana jeżeli spełnia następujące kryteria: ma masę cząsteczkową mniejszą od 500, wartość $\log P$ wynosi mniej niż 5, zawiera mniej niż 5 miejsc donorowych dla wiązań wodorowych (wyrażonych zwykle jako suma grup OH i NH), zawiera mniej niż 10 miejsc akceptorowych dla wiązań wodorowych (wyrażonych zwykle jako suma grup O i N) oraz liczba wiązań rotacyjnych jest mniejsza niż 10. Reguły te odnoszą się do związków przenikających przez błonę komórkową na drodze biernej dyfuzji (Lesson 2012). Jednym z ważniejszych wskaźników określających biodostępność związków jest powierzchnia polarna (TPSA). Wartości TPSA wynoszące mniej niż 60 \AA^2 , świadczą o możliwości przenikania cząsteczek przez barierę krew-mózg, jeżeli TPSA jest powyżej 140 \AA^2 to związek nie ulega wchłanianiu na drodze dyfuzji (Grabowski 2008; Veber i in. 2002).

Masa cząsteczkowa pochodnych **3-7** jest wyższa od 500 g/mol, jednakże uzyskane wartości topologicznej powierzchni polarnej mieszczą się w zakresie wartości 40,46-71,06 \AA^2 charakterystycznym dla substancji chemicznych posiadających cechy leków (TPSA <140 \AA^2). Betulina **1** i jej pochodne **2-6** spełniają kryterium (Reguła Lipińskiego) dotyczące liczby miejsc o charakterze donorowym (nHD < 5) i akceptorowym (nHA < 10) dla wiązań wodorowych oraz liczby wiązań rotacyjnych (nROT < 10, Reguła Vebera).

4. Wnioski

Eksperymentalne wartości parametrów lipofilowości są zależne od struktury chemicznej badanych związków. Najbardziej lipofilowym związkiem jest pochodna diacylowa **5** ($\log P_{TLC} = 9,499$), a związkiem najbardziej hydrofilowym betulina **1** ($\log P_{TLC} = 4,530$). Porównując teoretyczne wartości parametrów lipofilowości związków **1-7** z wartościami ekperymentalnymi, najlepszą korelację uzyskano przy użyciu programu miLogP ($r = 0,9401$). Otrzymane wyniki wskazują, że wprowadzenie do układu betuliny **1** ugrupowania acylowego z wiązaniem potrójnym węgiel-węgiel powoduje wzrost lipofilowości uzyskanych pochodnych w porównaniu do substancji wyjściowej.

Związki **1-6** spełniają Regułę Lipińskiego dotyczącą liczby miejsc o charakterze donorowym i akceptorowym dla wiązań wodorowych oraz regułę Vebera określającą liczbę wiązań rotacyjnych. Dla badanych związków zaobserwowano również znaczącą zależność pomiędzy lipofilowością ekperymentalną ($\log P_{TLC}$) a wartościami mas cząsteczkowych. Przeprowadzona analiza zależności aktywności cytotoksycznej (IC_{50}) w stosunku do komórek białaczki CCRF/CEM i parametrów lipofilowości teoretycznej ($\log P$) wykazała najwyższą wartość korelacji dla wyników otrzymanych przez program miLogP.

5. Literatura

- Andrić F, Bajusz D, Rác A i in. (2016) Multivariate assessment of lipophilicity scales – computational and reversed phase thin-layer chromatographic indices. *J Pharm Biomed Anal* 127: 81-93.
- Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM i in. (2015) Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnol Adv* 33: 1582–1614.
- Bober K, Bębenek E, Boryczka S (2019) Application of TLC for evaluation of the lipophilicity of newly synthesized esters: betulin derivatives. *J Anal Methods Chem* 2019: 1-7.
- Boryczka S, Bębenek E, Wietrzyk J i in. (2013) Synthesis, structure and cytotoxic activity of new acetylenic derivatives of betulin. *Molecules* 18: 4526-4543.
- Dąbrowska M, Starek M, Skuciński J (2011) Lipophilicity study of some non-steroidal anti-inflammatory agents and cephalosporin antibiotics: a review. *Talanta* 86: 35-51.
- Dołowy M (2009) Wyznaczanie lipofilowości acidum dehydrocholicum różnymi metodami. *Farm Pol* 65: 689-693.
- Grabowski T, Gumułka SW, Borucka B i in. (2008) Analysis relationships between pharmacokinetic parameters in silico/in vivo of selected antiviral drugs based on structural analysis *Adv Clin Exp Med* 17:285-292.

- Kuznetsova SA, Skvortsova GP, Maliar IuN i in. (2014) Extraction of betulin from birch bark and study of its physico-chemical and pharmacological properties. *Russ J Bioorg Chem* 40, 742-747.
- Lesson P (2012) Drug Discovery: Chemical beauty contest. *Nature* 481: 455-456.
- Medina-O'Donnell M, Rivas F, Reyes-Zurita FJ i in. (2016) Semi-synthesis and antiproliferative evaluation of PEGylated pentacyclic triterpenes. *Eur J Med Chem* 118: 64-78.
- Pozharitskaya ON, Karlina M V, Shikov AN i in. (2017) Pharmacokinetics and tissue disposition of nanosystem-entrapped betulin after endotracheal administration to rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 42: 327-332.
- Rutkowska E, Pająk K, Józwiak K. (2013) Lipophilicity-methods of determination and its role in medicinal chemistry. *Acta Pol Pharm* 70: 3-18.
- Thibeault D, Gauthier Ch, Legault J i in. (2007) Synthesis and structure activity relationship study of cytotoxic germanicane- and lupine-type 3 β -O-monodesmosidic saponins starting from betulin. *Bioorg Med Chem* 15: 6144-6157.
- Vasilevsky S F (2012) Drugs from birch bark. *News of Science* 32: 20-23.
- Veber DF, Johnson SR, Cheng HY i in. (2002) Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem* 45: 2615-2623.
- Yamamoto K, Ikeda Y (2016) Kinetic solubility and lipophilicity evaluation connecting formulation technology strategy perspective. *J Drug Deliv Sci and Tec* 33: 13-18.
- Zhuo X, Huang XS, Degnan AP i in. (2015) Identification of glutathione conjugates of acetylene-containing positive allosteric modulators of metabotropic glutamate receptor subtype 5. *Drug Metab Dispos* 43: 578-589.

12. Analiza wybranych parametrów fizykochemicznych fosforanowych pochodnych betuliny

Analysis of selected physicochemical parameters of betulin phosphate derivatives

Pęcak Paweł, Monika Kadela-Tomanek, Chrobak Elwira

Katedra i Zakład Chemii Organicznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Opiekun naukowy: dr Monika Kadela Tomanek

Pęcak Paweł: pawel.pecak@med.sum.edu.pl

Słowa kluczowe: terpenoidy, potencjał elektrostatyczny, HOMO, LUMO

Streszczenie

Terpenoidy typu lupanu, w tym betulina i kwas betulinowy wykazują aktywność przeciwdrobnoustrojową, przeciwzapalną, przeciwnowotworową, przeciwwirusową i charakteryzują się niską toksycznością. Jednym z możliwych kierunków modyfikacji cząsteczki betuliny jest synteza pochodnych zawierających atom fosforu. Duże zainteresowanie budzą również pochodne betuliny z podstawnikami acetylenowymi. Obecność tych dwóch grup funkcyjnych w cząsteczce związku ma duże znaczenie dla jego aktywności farmakologicznej. Wyznaczenie parametrów fizykochemicznych takich jak energie orbitali HOMO-LUMO, moment dipolowy i ładunek cząstkowy umożliwia wykorzystanie ich jako deskryptorów w dalszych badaniach reaktywności. W przedstawionej pracy wyznaczono mapy potencjału elektrostatycznego oraz stwierdzono zależność pomiędzy wynikami tych obliczeń dla fosforanowych pochodnych betuliny a ich aktywnością cytotoksyczną w stosunku do linii komórkowej ludzkiej białaczki MV-4-11.

1. Wstęp

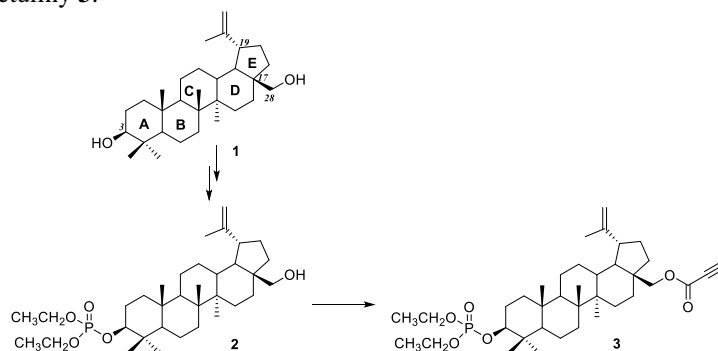
Świat roślin jest bogatym źródłem surowców biologicznie czynnych, które od tysięcy lat są stosowane w celach leczniczych. Współcześnie, wiele substancji pochodzenia roślinnego wykorzystywanych jest jako struktury wiodące w projektowaniu leków. Dużą grupą tego typu substancji charakteryzujących się zróżnicowaną budową są triterpenoidy. Związki te pełnią ważne funkcje w metabolizmie pierwotnym i wtórnym a także wykazują szerokie spektrum działań biologicznych (Fang i Xiao 2021). W grupie terpenoidów typu lupanu wiele badań poświęcono betulinie i produktowi jej utlenienia, którym jest kwas betulinowy. Wykazują one aktywność przeciwdrobnoustrojową, przeciwzapalną, przeciwnowotworową, przeciwwirusową, charakteryzują się niską toksycznością ale niestety także niską biodostępnością (Amiri i in. 2020). Obecność w cząsteczce betuliny reaktywnych grup funkcyjnych takich jak grupy hydroksylowe jest podstawą do poszukiwania nowych substancji, które mogłyby znaleźć zastosowanie w farmakoterapii.

Wśród wielu różnych ścieżek modyfikacji cząsteczki betuliny opisano również badania dotyczące syntezy pochodnych zawierających podstawniki z atomem fosforu. W większości cząsteczek o znaczeniu farmakologicznym, które zawierają fosfor, występuje on w postaci fosfonowych, fosfinowych grup funkcyjnych lub jako grupa fosforanowa. Fosfor występuje w lekach i proleках a także w takich związkach aktywnych biologicznie, jak np. zmodyfikowane nukleotydy (Rodriguez i Gallo-Rodriguez 2019). Do proleków fosforanowych możemy zaliczyć takie preparaty jak fosfentyoina, fosflukonazol, fludarabina, estramustyna czy propofol (Zawilska i in. 2013). Prowadzone są także badania aktywności fosforanowych pochodnych znanych leków, np. dietylowych, dibutyliowych i dipentylowych estrów fosforanu homokamptotecyny (Miao i in. 2010) czy też substancji czynnych znanych dotychczas z innych kierunków działania jak niesterydowe leki przeciwzapalne (Huang i in. 2011).

Badania pochodnych fosforowych betuliny i kwasu betulinowego wykazały ich aktywność przeciwnowotworową i przeciwpasożytniczą (Grymel i in. 2019; Spivak i in. 2014; Melnikowa i in. 2018).

Analizując doniesienia literaturowe, można zauważyć, że obecność wiązania potrójnego węgiel-węgiel w cząsteczce związku ma duże znaczenie dla jego aktywności farmakologicznej (Talele 2020). Wiele substancji czynnych, które zawierają wewnętrzne lub terminalne ugrupowania alkinylowe zostało już zarejestrowanych jako leki. Są w tej grupie pochodne o różnych kierunkach działania np. związki steroidowe o działaniu antykoncepcyjnym, przeciwrzybcza terbinafina, przeciwłuszczykowy tazaroten czy też przeciwnowotworowy erlotynib (<https://go.drugbank.com/>).

Korzystny wpływ wiązania potrójnego węgiel-węgiel na działanie przeciwnowotworowe opisano także dla pochodnych betuliny i kwasu betulinowego (Boryczka i in. 2013; Amiri i in. 2020). W wyniku połączenia w jednej pochodnej betuliny, zarówno grupy fosforanowej jak i grupy estrowej z terminalnym wiązaniem acetylenowym otrzymano związek **3** o obiecującej aktywności cytotoksycznej (Chrobak i in. 2019). Jak przedstawiono na Rysunku 1, w pierwszej kolejności cząsteczkę betuliny **1** przekształcono w pochodną 30-dietylfosforanową (związek **2**), która została poddana reakcji estryfikacji z kwasem propiolowym co pozwoliło na uzyskanie 3-dietylfosforylo-28-propynilobetuliny **3**.



Rys. 1. Schemat syntezy badanych pochodnych: 3-dietylfosforylobetuliny **2**, 3-dietylfosforylo-28-propynilobetuliny **3**.

Pochodna ta charakteryzuje się wysoką aktywnością przeciwnowotworową *in vitro* w stosunku do linii komórkowej ludzkiej białaczki MV-4-11, raka płuc A549, prostaty Du145 i czerniaka Hs 294T (Chrobak i in. 2019).

Celem przedstawionych badań było zbadanie wybranych parametrów fizykochemicznych takich jak energie orbitali HOMO-LUMO, moment dipolowy i ładunek cząstkowy. Podjęto także próbę określenia ich wpływu na działanie biologiczne a także znalezienia korelacji z wynikami oznaczeń cytotoksyczności *in vitro*.

2. Materiał i Metody

Badane w ramach niniejszej pracy pochodne betuliny otrzymano w wyniku przekształcenia betuliny **1** w jej pochodną 28-acetylową a następnie, wykorzystując grupę hydroksylową w pozycji C-3 wprowadzono podstawnik dietylofosforanowy w reakcji z chlorofosforanem dietylu. Po odblokowaniu grupy hydroksylowej w pozycji C-28, uzyskany związek **2** poddano reakcji z kwasem propiolowym otrzymując pochodną **3**. Monokryształy odpowiednie do pomiarów metodą dyfrakcji rentgenowskiej uzyskano w wyniku krystalizacji próbki związku **2** z roztworu aceton/DMF (stosunek objętościowy 10:1), natomiast związku **3** z roztworu heksan/aceton (stosunek objętościowy 3:1) poprzez powolne odparowanie w temperaturze pokojowej (Chrobak i in. 2019).

Obliczenia struktury związków **2** i **3** wykonano metoda DFT (Density Functional Theory) z funkcją optymalizacji B3LYP 6-311(d,p) zaimplementowaną w pakiecie programu Gaussian09 (Frisch i in. 2009). Otrzymane struktury wykorzystano do wyznaczenia konturów orbitali HOMO i LUMO oraz do obliczenia potencjału elektrostatycznego $V(r)$ oraz elektrostatycznych map gęstości,

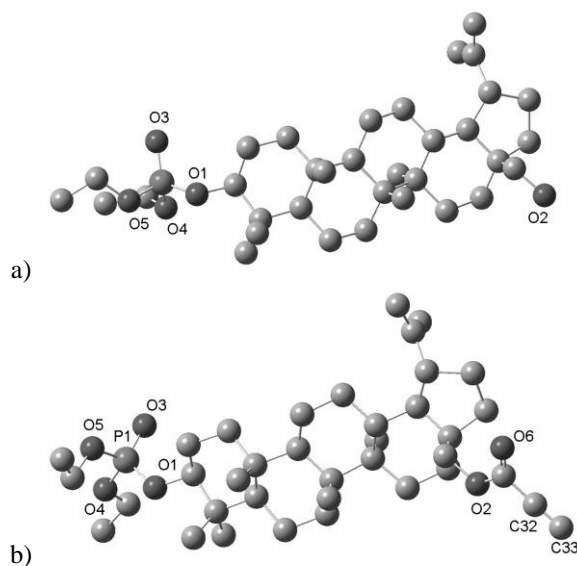
które definiują powierzchnie molekularne (Polizer i in. 1985). Wszystkie uzyskane wyniki zostały zwizualizowane w pakiecie oprogramowania GaussView, wersja 5 (Dennington i in. 2009).

3. Wyniki i dyskusja

3.1 Optymalizacja struktury

Optymalizacja geometrii cząsteczki dla związków **2** i **3** została przeprowadzona za pomocą programu Gaussian09. W obliczeniach wykorzystano struktury krystaliczne X-ray zdeponowane w krystalograficznej bazie danych CSD (Cambridge Structural Database) i oznaczone numerami CCDC: 1853751 (dla związku **2**), 1853752 (dla związku **3**). Zoptymalizowane struktury wraz z numeracją najistotniejszych atomów zamieszczone na Rysunku 2.

Porównanie długości wiązań oraz kątów w strukturach krystalicznych z wartościami obliczonymi wykazało wysoką zgodność. Tak przygotowane związki zostały wykorzystane do wyznaczenia orbitali HOMO i LUMO, momentu dipolowego oraz map potencjału elektrostatycznego.



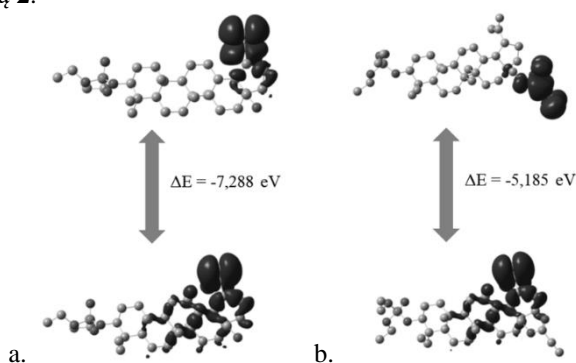
Rys. 2. Zoptymalizowane struktury związków **2** i **3**.

3.2 Wyznaczanie energii orbitali HOMO-LUMO

Reaktywność cząsteczki oraz jej zdolność do wiązania się z układami biologicznymi można określić przez wyznaczenie energii najwyższego obsadzonego orbitalu (HOMO, Highest Occupied Molecular Orbital) i energii najniższego nieobsadzonego orbitalu (LUMO, Lowest Unoccupied Molecular Orbital). Wartości energii orbitali HOMO i LUMO są miarą zdolności cząsteczki do oddawania (E_{HOMO}) i przyjmowania elektronów (E_{LUMO}). Natomiast różnica tych energii (ΔE) umożliwia wyznaczenie stabilności i reaktywności związków (Govindasamy i Gunasekaran 2015; Mihçiokur i Özpozan 2017). Kontury orbitali HOMO i LUMO dla badanych związków zostały przedstawione na Rysunku 3.

Dla obydwu związków orbital HOMO zlokalizowany jest поблизу grupy izopropenyłowej oraz pierścieni A i B układu betuliny **1**. Natomiast lokalizacja orbitalu LUMO zależy od podstawnika w pozycji C-28 ugrupowania betuliny **1**. Dla związku **2** orbital ten zlokalizowany jest w поблизу grupy izopropenyłowej natomiast dla pochodnej **3** w поблизу grupy propynoilowej. Zgodnie z danymi literaturowymi (Govindasamy i Gunasekaran 2015; Mihçiokur i Özpozan 2017), związki charakteryzujące się niską wartością ΔE są stabilne chemicznie, ponieważ możliwy jest wewnątrzcząsteczkowy transfer elektronu pomiędzy HOMO i LUMO. Wysoka wartość ΔE oznacza, że badane pochodne wykazują małą stabilność chemiczną. Wprowadzenie podstawnika

propynoilowego (związek **3**) wpływa na obniżenie wartości ΔE co oznacza zwiększenie stabilności w porównaniu z pochodną **2**.



Rys. 3. Kontury orbitali HOMO i LUMO dla związków **2** i **3**.

Energie orbitali HOMO-LUMO można wykorzystać do wyznaczenia deskryptorów reaktywności, takich jak: potencjał jonizacji (I), powinowactwo elektronowe (A), twardość (η), potencjał chemiczny (μ), elektroujemność (χ) i indeks elektrofilowości (ω). Wartości te zostały obliczone z poniższych wzorów, a ich wartości liczbowe przedstawiono w Tabeli 1.

$\Delta E_{\text{HOMO-LUMO}} = E_{\text{HOMO}} - E_{\text{LUMO}}$; $I = -E_{\text{HOMO}}$; $A = -E_{\text{LUMO}}$; $\eta = (I - A)/2$; $\mu = -(I + A)/2$; $\chi = -\mu$; $\omega = \mu^2/2 \eta$.

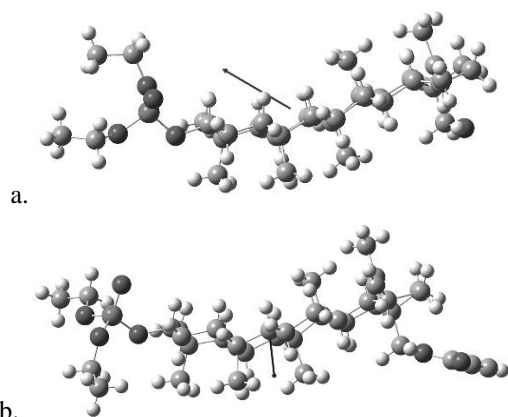
Tab. 1. Energie orbitali HOMO-LUMO oraz deskryptory reaktywności.

	Związek 2	Związek 3
E_{HOMO}	-6,272	-6,356
E_{LUMO}	-1,016	-1,170
ΔE	-7,288	-5,185
I	6,272	6,356
A	1,016	1,170
η	3,644	2,593
μ	-2,628	-3,763
χ	2,628	3,763
ω	0,948	2,731
Moment dipolowy		
μ_x	2,5431	-0,102
μ_y	-0,0194	-4,9802
μ_z	2,1857	0,0716
μ_{tot}	3,3534	4,9818

Zamiana grupy hydroksylowej w pozycji C-28 na podstawnik propynoilowy wpływa na zmniejszenie twardości związku, a także wzrost polarności cząsteczki. Wprowadzenie podstawnika powoduje obniżenie wartości elektroujemności co oznacza, że pochodna **3** będzie łatwiej reagowała z czynnikami nukleofilowymi w porównaniu ze związkiem **2**.

Dla badanych związków wyznaczono moment dipolowy (Rys. 4, Tabela 1). Jest to wielkość wektorowa zależna od geometrii cząsteczki i obecności pierwiastków elektroujemnych, można ją obliczyć dla cząsteczek, w których ładunek nie jest rozłożony równomiernie. Całkowity moment dipolowy cząsteczek **2** i **3** jest równy odpowiednio 3,3534 D i 4,9818 D. Badane struktury różnią się orientacją momentu dipolowego (Rys. 4). Moment dipolowy w związku **2** zorientowany jest w stronę

grupy fosforanowej, natomiast dla związku **3** zorientowany jest pomiędzy grupami w pozycjach C-3 i C-28 betuliny **1**.

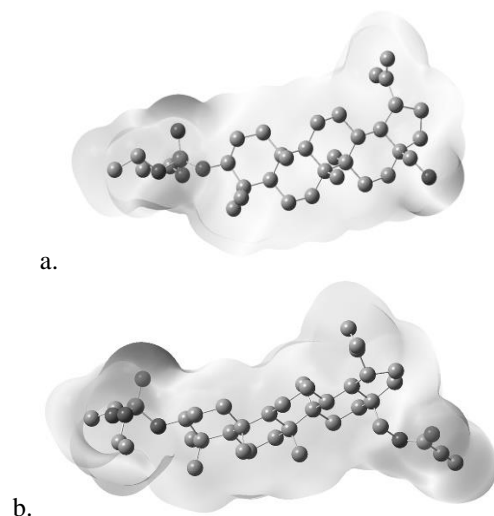


Rys. 4. Moment dipolowy w cząsteczce związku **2** i **3**.

Porównanie składowych momentu dipolowego wykazało, że największa różnica występuje dla składowej μ_x , która jest różnie zorientowana w zależności od pochodnej. Składowy moment dipolowy w tym kierunku dla **2** i **3** jest odpowiednio równy 2,5431 D i -0,102 D.

3.3 Molekularny potencjał elektrostatyczny (MEP)

Oddziaływanie cząsteczki z celem molekularnym zależy od rozmieszczenia ładunku w cząsteczce, które obrazuje się za pomocą map molekularnego potencjału elektrostatycznego (MEP). Mapy potencjału elektrostatycznego zostały wyznaczone za pomocą programu Gaussian09 i przedstawione na Rysunkach 5a i 5b. Na poniższych rysunkach obszary o zwiększonej gęstości zostały zaciemnione.



Rys. 5. Mapy powierzchniowego potencjału elektrostatycznego wyznaczone dla: a) 3-dietylofosforylobetuliny **2**, b) 3-dietylofosforylo-28-propynoilobetuliny **3**.

Na mapie potencjału wyznaczonej dla związku **2** występują trzy obszary zwiększonej gęstości elektronowej, których tworzenie związane jest z obecnością wolnych par elektronowych na atomie tlenu. Pierwszy obszar obejmuje grupy etylowe przy atomach tlenu O5 oraz O1, drugi grupę etylową przy atomie tlenu O4 oraz atomie O3, natomiast trzeci grupę hydroksylową przy atomie węgla C-28 układu betuliny **1**. Dla każdego obszaru wyznaczono lokalne minima (Tabela 2).

W dwóch pierwszych obszarach zlokalizowane są po dwa minima. W pierwszym o wartościach -2,939 eV oraz -1,469 eV, a w drugim o wartościach -1,633 eV i -1,916 eV. W trzecim obszarze zlokalizowane jest jedno lokalne minimum o wartości -1,741 eV.

Tab. 2. Wartości lokalnych minimów oraz ładunki na wybranych atomach.

Min.	O1	O3	O4	O5	O2	O6	-	-	-
2	-1,469	-1,633	-1,916	-2,939	-1,741		-	-	-
3	-1,633	-2,449	-1,633	-3,265	-1,633	-2,177	-	-	-
Ład.	O1	O3	O4	O5	O2	O6	P1	C33	H
2	-0,519	-0,661	-0,649	-0,640	-0,644	-	1,245	-	-
3	-0,489	-0,634	-0,640	-0,633	-0,720	-0,359	1,446	-0,547	0,186

Na mapie MEP związku **3** również występują trzy obszary zwiększonej gęstości elektronowej. Porównując MEP pochodnych **2** i **3** największe zmiany stwierdzono w trzecim obszarze obejmującym atom tlenu w pozycji C-28 ugrupowania betuliny **1**. Dla związku **3** w trzecim obszarze występują dwa lokalne minima o wartościach -1,633 eV oraz -2,177 eV. Ponadto w związku **3** występuje obszar o zmniejszonej gęstości elektronowej wokół atomu wodoru grupy propynoilowej.

W celu stwierdzenia wpływu podstawnika propynoilowego na rozmieszczenie ładunku w cząsteczkach związków wyznaczono jednostkowe ładunki na atomach tlenu oraz fosforu. Różnice w wartościach minimów elektronowych w poszczególnych obszarach stały się przesłanką do wyznaczenia ładunków na odpowiednich atomach tlenu oraz fosforu (Tabela 2). Porównując ładunki atomów tlenu grupy fosforanowej stwierdzono, że wprowadzenie podstawnika w pozycję C-28 nie wpływa istotnie na rozmieszczenie ładunku w grupie fosforanowej. Największą zmianę ładunku cząstkowego stwierdzono, na atomie tlenu O2, zatem wprowadzenie grupy estrowej spowodowało zwiększenie ujemnego ładunku w obszarze obejmującym pierścień cząsteczki betuliny **1**.

Rozmieszczenie ładunku wpływa na możliwość tworzenia wiązań wodorowych. Zgodnie z danymi literaturowymi w związku **2** atomy tlenu O3, O4 i O5 pełnią funkcję akceptorów w tego typu oddziaływaniach. W przypadku związku **3** atomy O3, O4 i O5 pełnią tę samą funkcję natomiast acetylenowy atom węgla wykazuje tendencje do udziału w wiązaniach wodorowych jako donor (Chrobak 2019). Wyznaczone wartości ładunku wykazują zgodność z informacjami uzyskanymi metodą rentgenografii strukturalnej.

W związku **3** ładunek jest przesunięty w kierunku grupy fosforanowej, natomiast reszta cząsteczki jest pozbawiona ładunku. Wprowadzenie w pozycję C-28 betuliny **1** podstawnika propynoilowego powoduje rozłożenie ładunku na dwóch biegunach cząsteczki. Tego typu zmiany wpływają na dopasowanie cząsteczki w miejscu wiążącym celu molekularnego.

Pochodne fosforanowe betuliny **2** i **3** były badane jako potencjalne substancje przeciwnowotworowe wobec ludzkiej linii komórkowej białaczki MV-4-11. Zgodnie z danymi literaturowymi pochodna **3** charakteryzuje się blisko 60-cio krotnie wyższą aktywnością od związku **2**. Oznaczone wartości IC₅₀ wynosiły 0,43 μM dla związku **3** i 25,60 μM dla związku **2** (Chrobak i in. 2019). Zestawiając otrzymane wyniki działania biologicznego z przeprowadzoną analizą strukturalną stwierdzono, że działanie biologiczne związków zależy od rozmieszczenia ładunku w cząsteczce. Symetryczne rozmieszczenie ładunku na dwóch przeciwległych biegunach cząsteczki korzystnie wpływa na działanie biologiczne związku.

4. Wnioski

Przeprowadzone w ramach niniejszej pracy badania potwierdzają zależność pomiędzy potencjałem elektrostatycznym a miejscem powstawania wiązań wodorowych w pochodnych

fosforanowych betuliny 2 i 3. Stwierdzono również zależność pomiędzy wynikami obliczeń potencjału elektrostatycznego badanych związków a ich aktywnością cytotoksyczną w stosunku do linii komórkowej ludzkiej białaczki MV-4-11. Uzyskane wyniki stanowią podstawę do rozszerzenia zakresu tego typu badań na większą grupę pochodnych fosforanowych betuliny zawierających dodatkowo inne zróżnicowane strukturalnie podstawniki.

5. Literatura

- Amiri S, Dastghaib S, Ahmadi M i in. (2020) Betulin and its derivatives as novel compounds with different pharmacological effects. *Biotechnol Adv* 38: 107409.
- Boryczka S, Bębenek E, Wietrzyk J i in. (2013) Synthesis, structure and cytotoxic activity of new acetylenic derivatives of betulin. *Molecules* 18: 4526-4543.
- Chrobak E, Kadela-Tomanek M, Bębenek E i in. (2019) New phosphate derivatives of betulin as anticancer agents: Synthesis, crystal structure, and molecular docking study. *Bioorg Chem* 87: 613-628.
- Dennington R, Keith T, Millam J (2009) GaussView, Version 5, Shawnee Mission, KS: Semichem Inc.
- Fang Y, Xiao H (2021) The transport of triterpenoids. *Biotechnology Notes* 2: 11-17.
- Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB i in. (2009) Gaussian 09, Revision A.02, Gaussian, Inc., Wallingford CT.
- Grymel M, Zawojak M, Adamek J (2019) Triphenylphosphonium analogues of betulin and betulinic acid with biological activity: A comprehensive review. *J Nat Prod* 82: 1719–1730.
- Govindasamy P, Gunasekaran S (2015) Quantum mechanical calculations and spectroscopic (FT IR, FT-Raman and UV) investigations, molecular orbital, NLO, NBO, NLMO and MESP analysis of 4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzene-1-sulfonamide, *J Mol Struct* 1081: 96-109.
- Huang L, Mackenzie GG, Sun Y i in. (2011) Chemotherapeutic properties of phospho-nonsteroidal anti-inflammatory drugs, a new class of anticancer compounds. *Cancer Res* 71: 7617–7627.
- Melnikowa NB, Malygina DS, Klubukowa IN i in. (2018) Betulin-3,38-diphosphate. Physico-chemical properties and in vitro biological activity experiments. *Molecules* 23: 1175.
- Miao Z, Zhang J, You L i in. (2010) Phosphate ester derivatives of homocamptothecin: Synthesis, solution stabilities and antitumor activities. *Bioorg Med Chem* 3140–3146.
- Mihçioğur Ö, Özpozan T (2017) Molecular structure, vibrational spectroscopic analysis (IR & Raman), HOMO-LUMO and NBO analysis of anti-cancer drug sunitinib using DFT method, *J Mol Struct* 1149: 27-41.
- Politzer P, Laurence P, Jayasuriya K i in. (1985) Molecular electrostatic potentials: an effective tool for the elucidation of biochemical phenomena, *Environ Health Perspect* 61: 191-202.
- Rodriguez J B, Gallo-Rodriguez C (2019) The role of the phosphorus atom in drug design. *ChemMedChem* 14: 190–216.
- Spivak AY, Keiser J, Vargas M i in. (2014) Synthesis and activity of new triphenylphosphonium derivatives of betulin and betulinic acid against *Schistosoma mansoni* in vitro and in vivo. *Bioorg Med Chem* 22: 6297-304.
- Talele TT (2020) Acetylene group, friend or foe in medicinal chemistry. *J Med Chem* 63: 5625–5663.
- Zawilska JB, Wojcieszak J, Olejniczak AB (2013) Prodrugs: a challenge for the drug development. *Pharmacol Rep* 65: 1–14.

13. Badania genetyczne w ocenie ryzyka zachorowania na nowotwory dziedziczne

Genetic studies in the assessment of risk of developing hereditary cancers

Karolina Sobczyk⁽¹⁾, Mateusz Grajek⁽²⁾, Łukasz Olszewski⁽²⁾

⁽¹⁾Zakład Ekonomiki i Zarządzania w Ochronie Zdrowia, Wydział Zdrowia Publicznego w Bytomiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁽²⁾Zakład Zdrowia Publicznego, Katedra Polityki Zdrowia Publicznego, Wydział Zdrowia Publicznego w Bytomiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Karolina Sobczyk: ksobczyk@sum.edu.pl

Słowa kluczowe: badania genetyczne, rak piersi, rak jajnika, rak gruczołu krokowego

Streszczenie

Choroby nowotworowe stanowią jedną z głównych przyczyn zgonów zarówno wśród mężczyzn, jak i kobiet. W ostatnich latach ich natężenie znacznie się zwiększyło, w związku z czym stały się nie tylko poważnym problemem zdrowotnym, ale też społecznym i ekonomicznym. Nowotwory złośliwe stanowią poważny globalny problem zdrowotny, są jedną z głównych przyczyn zachorowalności i umieralności. Nowotwory są także drugą przyczyną zgonów w Polsce. Liczba zachorowań na nowotwory złośliwe w Polsce w ciągu ostatnich trzech dekad wzrosła ponad dwukrotnie. Badania genetyczne w kierunku nowotworów nie są obecnie finansowane ze środków publicznych. Ich realizacja mogłaby jednak pozwolić na zwiększenie skuteczności zapobiegania chorobom onkologicznym. Dzięki tego typu działaniom możliwe byłoby przedstawienie populacji docelowej zalecanych działań ochronnych zgodnie z ich własnym ryzykiem zachorowania, co można określić na podstawie danych klinicznych i badań genetycznych. Obecnie zalecane działania profilaktyczne nie uwzględniają osobistej sytuacji konkretnego pacjenta np. obciążenia rodzinnego chorobą nowotworową. Stratyfikacja populacji zgodnie z ryzykiem kliniczno-genetycznym może pozwolić na skuteczniejszą profilaktykę, również dla osób, które dzisiaj umierają przed osiągnięciem wieku, w którym typowo rozpoczynamy profilaktykę.

1. Choroby nowotworowe jako problem zdrowotny

Choroby nowotworowe stanowią jedną z głównych przyczyn zgonów zarówno wśród mężczyzn, jak i kobiet. W ostatnich latach ich natężenie znacznie się zwiększyło, w związku z czym stały się nie tylko poważnym problemem zdrowotnym, ale też społecznym i ekonomicznym. Wśród chorób nowotworowych o lokalizacjach typowo kobiecych istotne znaczenie z punktu widzenia rozpowszechnienia w populacji mają nowotwory piersi oraz jajnika.

Spośród wszystkich wymienionych najczęściej diagnozowanym jest rak piersi, definiowany jako niekontrolowany i niepohamowany rozwój nieprawidłowych komórek gruczołu piersiowego. U zdecydowanej większości chorych rozwój raka wynika ze sporadycznych mutacji w komórkach somatycznych. Wśród czynników ryzyka wymienia się: wiek (ok. 80% zachorowań występuje po 50 r.ż.), wczesny czas pokwitania (przed 12 r.ż.) oraz późną menopauzę (>54 r.ż.), stosowanie hormonalnej antykoncepcji lub długotrwałej hormonalnej terapii zastępczej menopauzy, występowanie niezłośliwych zmian w piersiach, późne rodzenie pierwszego dziecka (>30 r.ż.), dodatni wywiad rodzinny, a także czynniki związane ze stylem życia (niska aktywność fizyczna, nadwaga, spożywanie alkoholu) (Kozłowski i Wilkołaska 2012). Rak piersi w długim okresie może przebiegać bezobjawowo, a jeśli już pojawia się jego pierwszy objaw – jest to zwykle guzek lub zgrubienie w obrębie piersi. Ponadto objawem raka mogą być zmiany na skórze (pogrubienie skóry, zaczerwienienie, owrzodzenie, wciągnięcie brodawki), wyciek z brodawki sutkowej lub dolegliwości bólowe. Pomimo faktu, iż żaden z wymienionych objawów nie przesądza o rozpoznaniu raka, każdy jednak wymaga zgłoszenia się do lekarza i rozpoczęcia diagnostyki, zaczynającej się zwykle od badania palpacyjnego piersi i węzłów chłonnych pachy i nadobojcza. W dalszym postępowaniu wykonuje się zazwyczaj mammografię (podstawowe badanie obrazowe w tym przypadku) oraz

ultrasonografię, uznawaną za badanie uzupełniające oraz wartościowe dopełnienie mammografii, wskazane szczególnie w przypadku piersi o dużej gęstości, typowych dla młodych kobiet. Badanie piersi w szczególnych sytuacjach klinicznych wykonuje się również za pomocą rezonansu magnetycznego. Niezbędnym elementem diagnostyki raka piersi jest rozpoznanie mikroskopowe. Pobranie materiału do badania powinno odbywać się drogą biopsji gruboigłowej, najlepiej wykonanej pod kontrolą mammografii lub ultrasonografii. W przypadku raków przedinwazyjnych podstawowym sposobem leczenia jest chirurgiczne usunięcie guza z marginesem zdrowych tkanek w połączeniu z uzupełniającą radioterapią. Pacjentki z rakiem naciekowym I lub II stopnia poddawane są zwykle leczeniu chirurgicznemu (usunięcie guza pierwotnego), leczeniu pachowych węzłów chłonnych oraz pooperacyjnej radioterapii. W przypadku raka naciekowego III stopnia dodatkowo stosowana jest hormonoterapia oraz chemioterapia. Terapia o charakterze paliatywnym podejmowana jest w odniesieniu do pacjentek z rozsiałym rakiem piersi (stopień IV), będącym zasadniczo chorobą nieuleczalną (Winczura i in. 2013). Wśród metod zapobiegania rakowi piersi najpowszechniej stosowane są te właściwe dla profilaktyki II stopnia, a więc służące wczesnemu wykryciu choroby, w tym cykliczne kontrolne badania ginekologiczno-położnicze u kobiet po 20 r.ż. (badanie przedmiotowe i podmiotowe sutków, nauczanie kobiet samodzielnego, palpacyjnego badania piersi) oraz mammograficzne badania przesiewowe w populacji kobiet >45r.ż. (Rekomendacje PTG 2005). W ramach profilaktyki I stopnia można podejmować działania służące zwiększaniu wiedzy kobiet o czynnikach ryzyka raka piersi, w tym szczególnie modyfikowalnych, celem ich ograniczenia lub eliminowania w tej populacji.

Kolejnym nowotworem narządu płciowego kobiety o częstym rozpowszechnieniu jest rak jajnika. Wyróżnia się ponad 70 typów guzów jajnika, które dzieli się na nowotwory nabłonkowe (95%) i nienabłonkowe. Wśród czynników ryzyka nowotworów złośliwych jajnika wymienia się: nosicielstwo mutacji genów BRCA1 i BRCA2 (13% wszystkich przypadków), dodatni wywiad rodzinny (rak jajnika, endometrium, jelita grubego, górnego odcinka przewodu pokarmowego), bezdzietność oraz nieskuteczne stymulacje owulacji. Ryzyko zachorowania zmniejsza stosowanie antykoncepcji hormonalnej, okluzja jajowodów, wycięcie macicy oraz karmienie piersią. W raku jajnika nie ma objawów patognomicznych, ale u większości chorych ponad rok przed rozpoznaniem nowotworu występują niespecyficzne objawy dyspeptyczne (Kornafel i Mądry 2013). Guzy jajnika rozpoznaje się na podstawie badania ginekologicznego lub/i ultrasonograficznego. Obligatoryjnie przy rozpoznaniu guza jajnika oznaczane jest stężenie antygenu CA 125 i wykonywane jest zdjęcie klatki piersiowej. W terapii nowotworów jajnika stosuje się głównie leczenie operacyjne. Zasadność podejmowania leczenia uzupełniającego (chemioterapia) zależy od rodzaju i wielkości guza oraz stopnia zaawansowania choroby (Rekomendacje PTG 2006). Podobnie jak w przypadku raka endometrium, także tutaj zastosowania nie mają badania przesiewowe, w związku z czym ok. 70% przypadków raka jajnika rozpoznaje się dopiero w III lub IV stopniu zaawansowania. Ze względu na znaczne ryzyko zachorowania na raka jajnika nosicielki mutacji genów BRCA1 i BRCA2 oraz kobiet z zespołem Lyncha w tych grupach zaleca się profilaktyczne obustronne wycięcie przydatków po zakończeniu planów rozrodczych (nie później niż na początku 5. dekady życia) (Kornafel i Mądry 2013). W ramach podejmowanych działań profilaktycznych szczególnie istotne jest wyłanianie oraz obserwacja populacji podwyższonego ryzyka, a także dążenie do zmiany poglądu o braku wczesnych objawów i uświadamianie ogółu kobiet oraz personelu medycznego (lekarze rodzinni, gastroenterolodzy, chirurdzy), że występowanie nawracających uporczywych dolegliwości ze strony przewodu pokarmowego może manifestować raka jajnika i w żadnym wypadku nie powinno być ignorowane.

Rak prostaty jest drugim najczęściej występującym wśród mężczyzn nowotworem złośliwym (po raku płuca) (Krajowy Rejestr Nowotworów 2017). Wśród najważniejszych czynników ryzyka nowotworu o tej lokalizacji wymienia się wiek (rozpoznanie zwykle stawia się po 65 r.ż.) oraz uwarunkowania genetyczne (dodatni wywiad rodzinny). W ponad 95% przypadków nowotworu prostaty diagnozuje się gruczolakoraka, powstającego zwykle w strefie obwodowej stercza. Choroba we wczesnych stadiach rozwoju przebiega zwykle bezobjawowo. U części pacjentów zmianę nowotworową można wykryć na podstawie badania proktologicznego, jednakże badanie to ma ograniczoną wartość diagnostyczną, zależną w dużej mierze od doświadczenia lekarza. Kluczowe

znaczenie w diagnostyce raka prostaty ma określenie stężenia PSA w surowicy, a także wynik badania histopatologicznego materiału uzyskanego podczas biopsji przezodbytnicznej stercza. Leczenie choroby nowotworowej zależy od stopnia zaawansowania oraz rokowań do co oczekiwanej długości życia (choroby współistniejące, wiek). W praktyce klinicznej stosuje się chirurgiczne leczenie radykalne, teleterapię i/lub brachyterapię, radioterapię, hormonoterapię, a także chemioterapię (Borówka i in. 2013). W ramach podejmowanych działań profilaktycznych szczególnie istotne jest wyłanianie oraz obserwacja populacji podwyższonego ryzyka, w tym szczególnie osób z dodatnim wywiadem rodzinnym. W stosunku do populacji mężczyzn z grupy wysokiego ryzyka w wieku 55-69 lat zalecane jest prowadzenie badań przesiewowych.

2. Epidemiologia nowotworów

Nowotwory złośliwe stanowią poważny globalny problem zdrowotny, są jedną z głównych przyczyn zachorowalności i umieralności. W roku 2012 na świecie odnotowano ok. 14mln. nowych przypadków zachorowań, a prognozy wskazują na ok. 70% wzrost ich liczby w ciągu najbliższych 20 lat. Nowotwory są drugą główną przyczyną zgonów – na świecie prawie 1 na 6 zgonów spowodowany był rakiem. Wśród pięciu najważniejszych czynników ryzyka nowotworów wskazuje się: wysoką wartość wskaźnika BMI, niskie spożycie owoców i warzyw, brak aktywności fizycznej, palenie tytoniu oraz spożywanie alkoholu. Ponadto wśród istotnych czynników ryzyka znajdują się zakażenia wirusami HCV i HPV, odpowiadające na 25% przypadków raka w krajach o niskim i średnim PKB (WHO 2018).

Nowotwory są także drugą przyczyną zgonów w Polsce. Liczba zachorowań na nowotwory złośliwe w Polsce w ciągu ostatnich trzech dekad wrosła ponad dwukrotnie, osiągając w 2015 roku ponad 163tys. zachorowań, z czego około 81,7tys. u mężczyzn i 81,6tys. u kobiet. Najczęściej występującymi nowotworami u mężczyzn są nowotwory płuca (ok. 20%), gruczołu krokowego (13%), jelita grubego (12%) oraz pęcherza moczowego (7%). Wśród kobiet najczęstszym nowotworem jest rak piersi (22%), następnie występują: nowotwór jelita grubego (10%), płuca (9%), trzonu macicy (7%), jajnika (5%) oraz szyjki macicy (4%). Większość zachorowań występuje po 60 roku życia. Liczba zgonów na nowotwory złośliwe w Polsce w ciągu ostatnich pięciu dekad wrosła prawie 2,5-krotnie - w 2015 roku stwierdzono ich ponad 100 tys. przy czym prawie 55,7tys. wystąpiło u mężczyzn i ponad 44,9tys. zgonów wystąpiło u kobiet. Najczęstszą nowotworową przyczyną zgonu u mężczyzn jest rak płuca (31%), jelita grubego (12%) oraz gruczołu krokowego (8%). W przypadku kobiet – nowotwór płuca (16%), piersi 14%), jelita grubego (12%) oraz jajnika (6%) (Krajowy Rejestr Nowotworów 2015).

W roku 2015 roku nowotwory sutka oraz jajnika stanowiły łącznie 26,8% ogółu nowych rozpoznań nowotworowych wśród kobiet oraz 20,3% ogółu zgonów z powodu chorób nowotworowych w tej grupie. W przypadku raka gruczołu krokowego w populacji mężczyzn było to odpowiednio 17,4% w przypadku zachorowań oraz 8,8% w przypadku zgonów (Krajowy Rejestr Nowotworów 2015). Szczegóły przedstawiono za pomocą tabel I-II.

Tab. 1. Zachorowania na nowotwory złośliwe sutka, jajnika oraz gruczołu krokowego w Polsce w roku 2015 (na podstawie danych Krajowego Rejestru Nowotworów).

Lokalizacja	Polska		
	Liczba	%	Współczynnik standaryzowany
Ogółem	81 632	100,0	304,2
Rak sutka	18 106	22,2	71,8
Rak jajnika	3 735	4,6	15,0
Ogółem	81 649	100	381,56
Rak gruczołu krokowego	14 211	17,4	65,9

Tab. 2. Zgony z powodu nowotworów złośliwych sutka, jajnika oraz gruczołu krokowego w Polsce w roku 2015 (na podstawie danych Krajowego Rejestru Nowotworów).

Lokalizacja	Polska		
	Liczba	%	Współczynnik standaryzowany
Ogółem	44 938	100	145,6
Rak sutka	6 319	14,1	21,3
Rak jajnika	2 768	6,2	9,93
Ogółem	55 663	100	259,1
Rak gruczołu krokowego	4 876	8,8	22,86

3. Profilaktyka chorób nowotworowych w Polsce

W związku z faktem, iż nowotwory złośliwe są poważnym zagrożeniem dla polskiego społeczeństwa, stwarzają problemy zarówno na poziomie jednostki, jak i państwa i w przyszłości będą narastać od roku 2006 realizowany jest Narodowy Program Zwalczania Chorób Nowotworowych (NPZChN). Celem głównym obecnej edycji (2014-2024) jest dążenie do przybliżenia się do wskaźników europejskich w zakresie 5-letnich przeżyć chorych na nowotwory mające największy udział w strukturze zgonów na nowotwory w Polsce. Według planu finansowego nakłady z budżetu państwa na realizację działań przewidzianych w ramach NPZChN wyniosą rocznie max. 250 000 tys. zł. Program obejmuje następujące priorytety (Uchwała z dnia 3 listopada 2015):

- a) Promocja zdrowia i profilaktyka nowotworów (działania informacyjne, promocyjne i edukacyjne ze szczególnym uwzględnieniem wczesnego wykrywania nowotworów piersi, płuca, jelita grubego i szyjki macicy);
- b) Profilaktyka wtórna, diagnostyka oraz wykrywanie nowotworów (zwiększanie dostępności do metod wczesnego rozpoznawania nowotworów, w tym prowadzenie profilaktyki wtórnej oraz wdrażanie procedur zapewnienia jakości diagnostyki nowotworów);
- c) Wsparcie procesu leczenia nowotworów (podejmowanie kierunków interwencji mających na celu zwiększenie dostępności do metod leczenia nowotworów oraz dążenie do opracowania i wdrożenia procedur zapewnienia jakości w ich terapii);
- d) Edukacja onkologiczna (rozwój i upowszechnianie nauczania onkologii w kształceniu przeddyplomowym i podyplomowym przedstawicieli zawodów medycznych);
- e) Wspomaganie systemu rejestracji nowotworów (podjęcie działań mających na celu poprawę działania systemu zbierania i gromadzenia danych o nowotworach).

Na bazie omówionej wyżej NPZChN w ramach środków publicznych finansowane są badania przesiewowe w kierunku raka piersi. Z badania mammograficznego w ramach programu profilaktyki raka piersi mogą korzystać pacjentki w wieku 50-69 lat, które nie wykonały tego typu diagnostyki w ciągu ostatnich 2 lat. W przypadku kobiet z grupy ryzyka badanie wykonuje się corocznie (Rozporządzenie z dnia 6 listopada 2013). Nie prowadzi się obecnie w Polsce badań przesiewowych w kierunku raka jajnika, natomiast działania podejmowane w tym kierunku w odniesieniu do raka gruczołu krokowego realizowane są wyłącznie na poziomie wybranych samorządów i obejmują screening oportunistyczny skierowany do populacji wysokiego ryzyka.

4. Badania genetyczne w profilaktyce chorób nowotworowych

Badania genetyczne w kierunku nowotworów nie są obecnie finansowane ze środków publicznych. Ich realizacja mogłaby jednak pozwolić na zwiększenie skuteczności zapobiegania chorobom onkologicznym. Dzięki tego typu działaniom możliwe byłoby przedstawienie populacji docelowej zalecanych działań ochronnych zgodnie z ich własnym ryzykiem zachorowania, co można określić na podstawie danych klinicznych i badań genetycznych. Obecnie zalecane działania profilaktyczne nie uwzględniają osobistej sytuacji konkretnego pacjenta np. obciążenia rodzinnego chorobą nowotworową. Stratyfikacja populacji zgodnie z ryzykiem kliniczno-genetycznym może pozwolić na skuteczniejszą profilaktykę, również dla osób, które dzisiaj umierają przed osiągnięciem wieku, w którym typowo rozpoczynamy profilaktykę.

Połączenie badań genetycznych z działaniami edukacyjnymi pozwoliłoby na zwiększenie poziomu wiedzy populacji docelowej na temat najczęściej występujących chorób nowotworowych, ich objawów, metod zapobiegania i wczesnego wykrywania. Tego typu działania przekładają się zwykle na wzrost odsetka osób korzystających z badań przesiewowych w kierunku chorób nowotworowych. Rosnące wskaźniki zapadalności i umieralności z powodu chorób nowotworowych, a także niewystarczająca zgłaszalność na badania przesiewowe stanowią impuls do udoskonalania obecnych oraz poszukiwania nowych rozwiązań podejmowanych w ramach profilaktyki najczęstszych nowotworów. Niska skuteczność programów profilaktyki wynika w dużej mierze z niewystarczającej zgłaszalności osób z populacji docelowej. W związku z powyższym konieczne jest rozszerzanie pola działań edukacyjnych skierowanych do populacji docelowej zagrożonej ryzykiem rozwoju choroby nowotworowej.

Badanie genów oceniające ryzyko zachorowania na nowotwory dziedziczne (w tym szczególnie raka piersi, jajnika i prostaty), realizowane jest poprzez przesłanie materiału pobranego do badań w ramach POZ do Warsaw Genomics Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego – instytucji zajmującej się nowoczesną diagnostyką onkologiczną. Badanie takie odbywa się przy uwzględnieniu analizy 14 genów, których sekwencje zostaną odczytane z wykorzystaniem technologii sekwencjonowania nowej generacji (NGS) oraz wykorzystane przy ocenie ryzyka zachorowania na raka piersi, jajnika i prostaty: ATM, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, NBN, NF1, PALB2, PTEN, RAD51C, RAD51D, STK11, TP53. W przypadku nieprawidłowości w zakresie wyniku badania genów pacjenci kierowani są na konsultacje lekarskie, obejmujące: przekazanie oraz interpretację wyniku, zalecenia co do dalszego postępowania w ramach profilaktyki choroby nowotworowej, oraz w razie konieczności wg wskazań indywidualnych wydanie skierowania na dalszą diagnostykę w ramach NFZ wraz ze wskazaniem adresu najbliższych podmiotów realizujących tego typu świadczenia. Badania diagnostyczne realizowane są w trybie ambulatoryjnym. Materiał jest pobierany do badań przez wykwalifikowany personel z zachowaniem wszelkich zasad zapewnienia bezpieczeństwa pacjentom. Materiał do badań laboratoryjnych może być transportowany z dowolnego miejsca w Polsce do Warsaw Genomics Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego przez upoważnione osoby w zamkniętych próbkach, w zamkniętym opakowaniu zbiorczym, oznakowanym „materiał zakaźny”. Badania są przeprowadzane w laboratorium przez odpowiednio do tego przygotowany personel (Dane Warsaw Genomics 2021).

5. Literatura

- Borówka A, Fijuth J, Potemski P i in (2013) Rak gruczołu krokowego, W: Potemski P. i Polkowski W. (red), Nowotwory układu moczowo-płciowego, W: Stelmach A. i Potemski P. (red), Zalecenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach złośliwych 2013 Tom I, Via Medica.
- Dane Krajowego Rejestru Nowotworów, Nowotwory Złośliwe Ogółem (2015) [onkologia.org.pl; dostęp: 16.01.2021].
- Dane Warsaw Genomics (2021) [https://warsawgenomics.pl/; dostęp: 19.02.2021r.].
- Dane WHO (2018) Cancer factsheets [www.who.int; dostęp: 16.01.2021].
- Kornafel J, Mądry R (2013) Nowotwory kobiecego układu płciowego, Warszawa.
- Kozłowski J, Wilkońska E (2012) Rak piersi to nie wyrok, Materiały edukacyjne dla pacjentów i ich rodzin, Centrum Onkologii Ziemi Lubelskiej im. św. Jana z Dukli, Lublin.
- Rekomendacje Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego dotyczące postępowania w guzach niezłośliwych i raku jajnika (2006) Gin Prakt; 91, 4: 18-19.
- Rekomendacje Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego w sprawie profilaktyki i wczesnej diagnostyki zmian w gruczole sutkowym (2005) Gin Prakt; 84, 3: 14-15.
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 6 listopada 2013 r. w sprawie świadczeń gwarantowanych z zakresu programów zdrowotnych [Dz.U. 2013 poz. 1505].
- Uchwała NR 208 Rady Ministrów z dnia 3 listopada 2015 r. w sprawie ustanowienia programu wieloletniego na lata 2016–2024 pod nazwą „Narodowy Program Zwalczania Chorób Nowotworowych” Warszawa, dnia 1 grudnia 2015 r. (poz. 1165).

Winczura P, Senkus-Konefka E, Jassem J (2013) Polskie i międzynarodowe zalecenia dotyczące leczenia raka piersi, Nowotwory Journal of Oncology, volume 63, number 1, 58–65.

14. Rehabilitacja lecznicza pacjentów z chorobą nowotworową układu pokarmowego

Genetic studies in the assessment of risk of developing hereditary cancers

Karolina Sobczyk⁽¹⁾, Mateusz Grajek⁽²⁾, Łukasz Olszewski⁽²⁾

⁽¹⁾Zakład Ekonomiki i Zarządzania w Ochronie Zdrowia, Wydział Zdrowia Publicznego w Bytomiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁽²⁾Zakład Zdrowia Publicznego, Katedra Polityki Zdrowia Publicznego, Wydział Zdrowia Publicznego w Bytomiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Karolina Sobczyk: ksobczyk@sum.edu.pl

Słowa kluczowe: nowotwory złośliwe, rehabilitacja lecznicza, rehabilitacja onkologiczna, rak jelita grubego

Streszczenie

Nowotwory złośliwe stanowią jeden z najpoważniejszych problemów zdrowotnych, zagrażających życiu Polaków, a ich rosnąca w ciągu ostatnich czterech dekad liczba bezwzględna jest głównie wynikiem procesu starzenia się populacji oraz wzrostu narażenia na czynniki ryzyka związane ze stylem życia (w tym m.in. palenie tytoniu, spożywanie alkoholu, niska aktywność fizyczna, otyłość). W kontekście zapobiegania niepełnosprawności i wykluczeniu z rynku pracy, choroby te należy rozpatrywać przede wszystkim w odniesieniu do ich wpływu na obniżenie sprawności psychofizycznej jednostek, w tym możliwości podejmowania zatrudnienia oraz ograniczeń w wykonywaniu czynności życia codziennego. Według Polskiego Towarzystwa Onkologii Klinicznej (2013) rehabilitacja powinna stanowić standard opieki pacjentów leczonych z powodu chorób nowotworowych, a wśród jej zalecanych kryteriów powinny znaleźć się: powszechność, wczesność, ciągłość oraz kompleksowość. Zasada powszechności odnosi się do objęcia działaniami wszystkich chorych dotkniętych problemem nowotworu złośliwego, natomiast wspomniana wczesność polega na podjęciu rehabilitacji jeszcze przed rozpoczęciem aktywnego leczenia onkologicznego. Zasada ciągłości wskazuje na konieczność kontynuacji działań przez całe życie chorych i objęcie rehabilitacją okresu szpitalnego, poszpitalnego wczesnego oraz późnego. Kompleksowość z kolei polega na uwzględnieniu w rehabilitacji wszystkich obszarów życia człowieka (medycznego, psychospołecznego oraz zawodowego).

1. Choroby nowotworowe układu pokarmowego jako problem zdrowotny

Nowotwory złośliwe stanowią jeden z najpoważniejszych problemów zdrowotnych, zagrażających życiu Polaków, a ich rosnąca w ciągu ostatnich czterech dekad liczba bezwzględna jest głównie wynikiem procesu starzenia się populacji oraz wzrostu narażenia na czynniki ryzyka związane ze stylem życia (w tym m.in. palenie tytoniu, spożywanie alkoholu, niska aktywność fizyczna, otyłość). Ponadto, zgodnie z szacunkami epidemiologicznymi, w ciągu najbliższych dekad trend wzrostowy, zarówno w odniesieniu do zapadalności jak i umieralności, zostanie zachowany (w tym głównie w grupie wiekowej powyżej 65r.ż.) (Uchwała z dnia 3 listopada 2015 r.). W populacji polskiej w roku 2015 odnotowano łącznie ponad 163 tys. nowych zachorowań na nowotwory złośliwe (w tym ok. 12,8% w woj. śląskim) oraz ponad 100 tys. zgonów z ich powodu, w tym ok. 11,7% w woj. śląskim (Dane Krajowego Rejestru Nowotworów 2015).

Choroby nowotworowe układu pokarmowego stanowią rozbudowaną kategorię o złożonej etiologii i zróżnicowanym obrazie klinicznym. Międzynarodowa Klasyfikacja Chorób ICD-10 choroby zaliczane do tej grupy dzieli na 2 główne kategorie obejmujące łącznie 27 jednostek chorobowych. W kontekście zapobiegania niepełnosprawności i wykluczeniu z rynku pracy, choroby te należy rozpatrywać przede wszystkim w odniesieniu do ich wpływu na obniżenie sprawności psychofizycznej jednostek, w tym możliwości podejmowania zatrudnienia oraz ograniczeń w wykonywaniu czynności życia codziennego.

Nowotwory zlokalizowane w obrębie układu pokarmowego są niezwykle istotnym problemem epidemiologicznym, stanowiąc w województwie śląskim 24% zachorowań na nowotwory

ogółem oraz pozostając przyczyną ponad 32% zgonów z przyczyn nowotworowych ogółem (dane za rok 2015) . W związku z faktem, iż jak wskazano powyżej, grupa ta składa się z 27 jednostek chorobowych, w opisie problemu zdrowotnego skupiono się na przedstawieniu tych o największym rozpowszechnieniu w populacji docelowej (C15, C16, C18-C21, C25), tj. stanowiących w roku 2015 ponad 78% przypadków nowych zachorowań oraz ponad 77% przyczyn zgonów w omawianej grupie. Ponadto dokonano skrótego przedstawienia nowotworów jamy ustnej (C01-C06) jako najczęściej występujących nowotworów z podgrupy C00-C14 (Dane Krajowego Rejestru Nowotworów 2015).

2. Rak jelita grubego

Nowotwór jelita grubego to nowotwór występujący w obrębie okrężnicy (C18), zgięcia esiczo-odbytniczego (C19), odbytnicy (C20), a także odbytu i kanału odbytu (C21) (Herman i in. 2013).

Nowotwór złośliwy jelita grubego powstaje zwykle na podłożu polipów gruczolakowatych. Zdecydowaną większość przypadków (65-85%) stanowią nowotwory sporadyczne, pozostałe to te występujące rodzinnie (Herman i in. 2013). Wśród czynników ryzyka zachorowania wymienia się m.in. (NICE 2011):

- a) epidemiologiczne - wiek (ok. 83% przypadków występuje u osób w wieku 60 lat i starszych), rasa biała;
- b) związane ze stylem życia – dieta bogata w nasycone kwasy tłuszczowe i/lub uboga w błonnik i wapń, brak aktywności fizycznej, spożywanie alkoholu, palenie tytoniu, otyłość;
- c) jelitowe (m.in. uwarunkowane genetycznie zespoły chorobowe, rak jelita grubego w wywiadzie rodzinnym wśród krewnych 1 stopnia przy braku ww. zespołów, dziedziczny rak jelita grubego niezwiązany z polipowatością, polipy gruczolakowe lub rak jelita grubego w wywiadzie, stany zapalne jelit w wywiadzie),
- d) mieszane (przebyte radioterapii lub cholecystektomii, obecność ureterosigmoidostomii).

Wśród objawów nowotworu jelita grubego, w zależności od jego lokalizacji i stopnia zaawansowania, mogą pojawiać się: krwawienie utajone, bóle brzucha, zmiana rytmu wypróżnień, krwawienia jawne, spadek masy ciała, niedokrwistość, wyczuwalne guzy, brak łaknienia, gorączka oraz niedrożność jelita. Dodatkowo, w badaniach laboratoryjnych, mogą występować podwyższone stężenia CEA, niedokrwistość mikrocytarna oraz pozytywny wynik testu na obecność krwi utajonej w kale. Podstawę diagnostyki omawianej grupy nowotworów stanowi endoskopia (sigmoidoskopia, rektoskopia, kolonoskopia), umożliwiająca wykrycie guza, pobranie wycinków oraz kontrolę pozostałej części jelita. Dodatkowo, oceniając zaawansowanie zmian, stosuje się m.in. badanie USG, TK jamy brzusznej i miednicy, rentgenogram i/lub TK klatki piersiowej, EUS, RM oraz PET-KT. Klasyfikacja zaawansowania raka jelita grubego, w przypadku okrężnicy lub odbytnicy, opiera się na systemie TNM według UICC (Union for International Cancer Control) (Herman i in. 2013).

3. Rak żołądka

Rak żołądka w ponad 80% przypadków jest nowotworem sporadycznym (rzadziej wrodzonym lub wieku młodego), a na jego rozwój wpływają m.in. czynniki środowiskowe (w tym zakażenie *Helicobacter pylori*, dieta bogata w sól i/lub związki azotowe, palenie tytoniu, spożywanie alkoholu) lub specyficzne zmiany genetyczne w przypadku raka wrodzonego. Zwiększone ryzyko zachorowania na raka żołądka występuje m.in. wśród osób z zanikowym zapaleniem żołądka, niedokrwistością wynikającą z niedoboru witaminy B12, przebytą resekcją żołądka lub usunięciem gruczolaka żołądka w wywiadzie, z zachorowaniami na nowotwór o tej lokalizacji w rodzinie oraz z rodzinną polipowatością gruczolakowatą (Polkowski 2013).

Najczęściej występującym nowotworem żołądka jest gruczolakorak (ok. 95%), rzadziej są to chłoniaki, mięsaki, nowotwory podścieliskowe, czy też neuroendokryne. Choroba we wczesnej postaci może przebiegać bezobjawowo. Wśród objawów zaawansowanego raka żołądka występują: spadek masy ciała, stały ból w nadbrzuszu o niewielkim nasileniu, uczucie sytości po posiłku, nudności, wymioty, dysfagia, smoliste stolce, objawy niedokrwistości, a także wyczuwalny w badaniu przedmiotowym guz, wodobrzusze oraz objawy ewentualnych przerzutów (Bartnik

i Strzeszyński 2016). W postępowaniu diagnostycznym stosuje się gastroscopię, umożliwiającą pobranie materiału histologicznego do badania i tym samym postawienie rozpoznania. W ocenie zaawansowania choroby stosuje się klasyfikację TNM według UICC, a podstawowe znaczenie wśród badań diagnostycznych mają EUS oraz TK, w wybranych przypadkach stosuje się laparoskopię diagnostyczną (m.in. celem wykluczenia przerzutów u chorych z zaawansowanym nowotworem) (Polkowski 2013).

4. Rak trzustki

Rak trzustki znajduje się na 4 miejscu wśród najbardziej rozpowszechnionych nowotworów układu pokarmowego w populacji województwa śląskiego w roku 2015 (402 przypadki). Wśród głównych czynników ryzyka zachorowania na raka o tej lokalizacji wymienia się wiek (97% przypadków po 45 r.ż.), palenie tytoniu, otyłość, brak aktywności fizycznej, cukrzycę, a także obciążony wywiad rodzinny (głównie zachorowanie u krewnego pierwszej linii). Ponadto wyższą zapadalność na nowotwory trzustki obserwuje się u chorych z niektórymi zespołami uwarunkowanymi genetycznie, w tym np. zespołem dziedzicznego przewlekłego zapalenia trzustki, czy też dziedzicznym rakiem jelita grubego niezwiązanym z polipowatością (Łacko i in. 2013).

Zdecydowaną większość (ok. 95%) zewnątrzwydzielniczych złośliwych nowotworów trzustki stanowią gruczolakoraki przewodowe. Około dwóch trzecich przypadków to guzy rozwijające się w głowie trzustki, pozostałe – w trzonie i ogonie. Wczesną postać nowotworu trzustki wykrywa się zwykle przypadkowo, a na jego występowanie mogą wskazywać, m.in. atypowa cukrzyca, nietolerancja glukozy, epizod zapalenia trzustki o niejasnej etiologii lub objawy choroby zatorowo-zakrzepowej. Wśród objawów postaci zaawansowanej pojawia się, m.in. spadek masy ciała, bóle w nadbrzuszu (promieniujące do kręgosłupa, złagodzone w pozycji embrionalnej, nasilające się po posiłkach), żółtaczka oraz biegunka tłuszczowa. Dodatkowo w badaniu przedmiotowym możliwe jest stwierdzenie wyczuwalnego przez powłoki guza lub powiększonego, zastoinowego pęcherzyka żółciowego. Za podstawę diagnostyki w tym typie nowotworu uznaje się TK wykonaną według protokołu trzustkowego, dzięki której możliwa jest ocena stopnia zaawansowania raka oraz kryteriów resekcyjności. W przypadku wątpliwości diagnostycznych rozważa się wykonanie ultrasonografii endoskopowej (EUS), umożliwiającej wykrycie i diagnostykę różnicową małych zmian w trzustce oraz wykonanie biopsji. Alternatywę dla TK stanowią może badanie RM według odpowiedniego protokołu, z podaniem dożylnym kontrastu w sekwencji dynamicznej, umożliwiające lepsze uwidocznienie zmian torbielowatych trzustki. W ocenie zaawansowania nowotworu stosuje się klasyfikację UICC (Lampe 2015).

5. Rak przełyku i jamy ustnej

Rak przełyku znajduje się na 5 miejscu wśród najbardziej rozpowszechnionych nowotworów układu pokarmowego w populacji województwa śląskiego w roku 2015 (701 przypadków). Wśród głównych czynników zachorowania na raka płaskonabłonkowego przełyku znajduje się spożywanie alkoholu i palenie tytoniu, odpowiadające łącznie za ok. 90% przypadków. Ponadto wyższą zapadalność rejestruje się m.in. wśród osób z przebyłym oparzeniem przełyku, zespołem Plummer-Vinson, a także z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi lub płuca w wywiadzie. W przypadku gruczolakoraka dolnej części przełyku za najistotniejsze czynniki ryzyka uważa się chorobę refluksową, przełyk Barretta, otyłość oraz palenie tytoniu (Polkowski 2013).

Nowotwór jamy ustnej trzykrotnie częściej dotyka mężczyzn i w ponad 95% rozwija się jako rak płaskonabłonkowy. Wśród jego najczęstszych lokalizacji znajduje się ruchoma część języka i dno jamy ustnej. Cechą charakterystyczną tego nowotworu jest wysokie ryzyko wystąpienia przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych, co wynika z bogatego unaczynienia chłonnego. W związku z powyższym, istotną rolę w leczeniu nowotworu o tej lokalizacji odgrywa elektywne wycięcie lub napromienianie układu chłonnego szyi. Za podstawę diagnostyki raka jamy ustnej uznaje się biopsję wycinkową ogniska pierwotnego. Ponadto w procesie diagnostycznym zastosowanie mają badania: TK, RM, USG szyi, RTG klatki piersiowej oraz pantogram żuchwy (przy podejrzeniu naciekania żuchwy) (Kawecki i in. 2013).

6. Rehabilitacja pacjentów onkologicznych

Zgodnie z zaleceniami WHO oraz Banku Światowego, rehabilitacja poza aspektem medycznym powinna umożliwić pacjentom, niezależnie od jednostki chorobowej, uczestnictwo w edukacji zdrowotnej, a także rehabilitacji zawodowej i społecznej. Działania prowadzone w tym obszarze w poszczególnych krajach powinny skupiać się na organizacji, wzmacnianiu i rozszerzaniu kompleksowych usług i programów rehabilitacji z założeniem ich jak najwcześniejszego wdrażania, w oparciu o wielodyscyplinarną ocenę indywidualnych potrzeb pacjenta, a także korzyści i ryzyka związanych z podejmowaniem poszczególnych interwencji. Raport porusza m.in. tematykę wybranych sposobów rehabilitacji, potrzeb rehabilitacyjnych pacjentów, a także pojawiających się przeszkód w ich zaspokajaniu oraz sposobów radzenia sobie z tymi problemami. Rehabilitacja powinna obejmować identyfikację problemu i potrzeb pacjenta, powiązanie ich z czynnikami modyfikowalnymi i ograniczającymi, wybór głównych celów oraz sposobów rehabilitacji, określenie mierników efektywności, zaplanowanie i wdrożenie interwencji oraz ocenę efektywności. Interdyscyplinarny proces rehabilitacyjny powinien obejmować medycynę rehabilitacyjną, terapię oraz technologie uzupełniające. Pierwsza z wymienionych ma na celu poprawę funkcjonowania jednostki poprzez diagnostykę i leczenie problemu zdrowotnego, zmniejszenie niepełnosprawności, a także ograniczenie ryzyka powikłań lub ich leczenie. Efektywność medycyny rehabilitacyjnej w dużej mierze zależy od zaangażowania interdyscyplinarnego zespołu specjalistów, w tym m.in. lekarzy rehabilitacji medycznej, fizjoterapeutów, psychiatrów, geriatrów, pediatrów, okulistów, neurochirurgów, czy ortopedów. W ramach terapii dąży się do przywracania i kompensacji utraconych w związku z niepełnosprawnością funkcji, a także zapobiegania pogorszeniu funkcjonowania pacjenta w każdej z dziedzin życia. Świadczeń w tym przypadku dostarczają m.in. terapeuci zajęciowi, fizjoterapeuci, protetycy, czy psycholodzy. Terapia obejmuje m.in. warsztaty, ćwiczenia, naukę strategii kompensacyjnych, edukację zdrowotną, wsparcie i doradztwo, czy też pomoc w modyfikacji stylu życia. Pod pojęciem technologii uzupełniających kryją się natomiast dowolne przedmioty, elementy wyposażenia lub produkty sprzyjające zwiększeniu, utrzymaniu lub poprawie funkcjonalnych możliwości osób niepełnosprawnych (m.in. kule, protezy, ortozy, wózki inwalidzkie, aparaty słuchowe, lupy) (WHO 2011).

Według Polskiego Towarzystwa Onkologii Klinicznej (2013) rehabilitacja powinna stanowić standard opieki pacjentów leczonych z powodu chorób nowotworowych, a wśród jej zalecanych kryteriów powinny znaleźć się: powszechność, wczesność, ciągłość oraz kompleksowość. Zasada powszechności odnosi się do objęcia działaniami wszystkich chorych dotkniętych problemem nowotworu złośliwego, natomiast wspomniana wczesność polega na podjęciu rehabilitacji jeszcze przed rozpoczęciem aktywnego leczenia onkologicznego. Zasada ciągłości wskazuje na konieczność kontynuacji działań przez całe życie chorych i objęcie rehabilitacją okresu szpitalnego, poszpitalnego wczesnego oraz późnego. Kompleksowość z kolei polega na uwzględnieniu w rehabilitacji wszystkich obszarów życia człowieka (medycznego, psychospołecznego oraz zawodowego). Wśród celów rehabilitacji w chorobie nowotworowej wskazać należy przygotowanie psychofizyczne pacjentów do planowanego leczenia przeciwnowotworowego oraz zapobieganie powikłaniom i zaburzeniom czynnościowym z nim związanym, wspomaganie powrotu sprawności psychofizycznej oraz uzyskania maksymalnej samodzielności i niezależności, a także zmniejszanie ryzyka nawrotu choroby i w konsekwencji przedwczesnej śmierci (Woźniwski 2013).

Wśród możliwości rehabilitacji chorych na nowotwory, przy uwzględnieniu indywidualnych wskazań klinicznych, PTOK rekomenduje ćwiczenia fizyczne, fizykoterapię i masaże oraz rehabilitację uzdrowiskową. Ćwiczenia fizyczne stanowią bezpieczną i skuteczną metodę przywracania sprawności psychofizycznej pacjentów. Chorzy onkologiczni mogą i powinni uprawiać wszystkie rodzaje ćwiczeń fizycznych we wszystkich stadiach zaawansowania choroby oraz podczas stosowania różnych metod leczenia, z uwzględnieniem ich możliwości, w tym głównie sprawności i wydolności. Stosowanie fizykoterapii u pacjentów onkologicznych, pomimo braku wiarygodnych dowodów naukowych na temat jej negatywnego wpływu na nowotwory złośliwe, budzi wiele kontrowersji. W związku z powyższym dokonując analizy wskazań do wykonywania zabiegów fizykalnych u tego typu chorych, należy każdorazowo wziąć pod uwagę rodzaj i lokalizację, stopień

zaawansowania i złośliwości nowotworu, a także czas, jaki upłynął od leczenia (za względnie bezpieczny uznaje się okres 5 lat). Masaże w rehabilitacji chorób nowotworowych stosowane są zazwyczaj celem redukcji obrzęku limfatycznego, stanowiącego możliwe powikłanie terapii onkologicznej (Woźniewski 2013).

Za najskuteczniejszą metodę rehabilitacji pacjentów z ww. obrzękami uznaje się kompleksową terapię udrażniającą, obejmującą ręczny drenaż chłonny, kompresjoterapię (stosowanie pończoch lub rękawów uciskowych, bandażowanie), ćwiczenia fizyczne oraz higienę kończyn. Terapia taka jest wykonywana zwykle w 2 fazach: uderzeniowej i podtrzymującej. Pierwsza z wymienionych trwa ok. 4 tygodni i obejmuje codzienny ręczny drenaż chłonny, bandażowanie i ćwiczenia fizyczne. Okres trwania drugiej z wymienionych jest ustalany indywidualnie i obejmuje drenaż chłonny 1-2 razy w tygodniu oraz zastąpienie bandażowania wyrobami uciskowymi. Alternatywnie, poza drenażem ręcznym, stosowane są także pompy do przerywanej kompresji pneumatycznej (tzw. masaż pneumatyczny). W zestawie ćwiczeń fizycznych, podejmowanych w związku z obrzękami limfatycznymi, powinny znaleźć się m.in. ćwiczenia rozluźniające, czynne (szyi, barków, kończyn górnych), izometryczne (mięśni szyi, brzucha, kończyn górnych) oraz oddechowe (torem brzuszny i piersiowy). Ponadto nie należy zapominać o odpowiednim schemacie ich stosowania, pozwalającym na zwiększenie efektywności podejmowanych działań. Jako metody pomocnicze i uzupełniające w przypadku obrzęku chłonnego stosować można elektroterapię, laser biostymulacyjny, ultradźwięki, masaż wirowy oraz kinesiotaping. Niezwykle ważna w postępowaniu z pacjentami z opisywanym problemem jest edukacja zdrowotna w zakresie modyfikacji trybu życia (Woźniewski 2014).

Leczenie nowotworowe może skutkować także zaburzeniami czynności układu oddechowego oraz krążenia. W pierwszym z wymienionych przypadków wśród pacjentów z zaburzeniami zaporowymi podejmowane działania mają na celu zmniejszenie oporów w drogach oddechowych, natomiast w przypadku tych dotkniętych zaburzeniami ograniczającymi – zwiększenie ruchomości klatki piersiowej. W przypadku wtórnych czynnościowych i strukturalnych zmian mięśniowych, nasilających ograniczenie sprawności wysiłkowej i sprawności fizycznej chorych, zaleca się trening zwiększający sprawność mięśni szkieletowych. Wśród powikłań kardiologicznych RTH i/lub CTH może dochodzić m.in. do zaburzeń rytmu serca i przewodzenia, zwłóknienia naczyń krwionośnych serca, a także ostrej niewydolności lewokomorowej w przebiegu kardiomiopatii. W stosowanej w takich przypadkach rehabilitacji kardiologicznej uwzględniane są różne rodzaje treningu fizycznego (interwałowy, ciągły, siłowy), dostosowanego do potrzeb pacjenta (Woźniewski 2014).

Rehabilitacja uzdrowiskowa w przypadku nowotworów układu pokarmowego może być realizowana w okresie po roku od zakończenia leczenia oraz powinna obejmować programy treningu fizycznego. Stosowanie w jej trakcie zabiegów przyrodoleczniczych powinno być rozważane ostrożnie, podobnie jak ma to miejsce w przypadku fizykoterapii. W związku z licznymi zaletami rehabilitacji uzdrowiskowej, w tym jej przewagą nad rehabilitacją ambulatoryjną pod względem obserwowanych efektów długotrwałych, należy to działanie rozważyć.

7. Literatura

- Bartnik W, Strzeszyński Ł (2013) Choroby żołądka i dwunastnicy (Rak żołądka). W: Interna Szczeklika. Podręcznik Chorób Wewnętrznych. Augustynowicz–Kopeć E, Bała M, Baranowska B, Barcikowska M, Bartnik W, Bartuzi Z i in. Medycyna Praktyczna. Kraków; 918–921.
- Herman R, Reguła J, Pałucki J i in. (2013) Rak okrężnicy, W: Potemski P. i Polkowski W. (red), Nowotwory układu pokarmowego, W: Krzakowski M. i Warzocha K. (red), Zalecenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach złośliwych, Tom I, Via Medica.
- Kawecki A, Nawrocki S, Golusiński W i in. (2013) Nowotwory nabłonkowe narządów głowy i szyi, W: Kawecki A. i Nawrocki S. (red), W: Krzakowski M. i Warzocha K. (red), Zalecenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach złośliwych, Tom I, Via Medica.
- Lampe P (2015) Teoria a realia diagnostyki raka trzustki, Postępy Nauk Medycznych, t. XXVIII, nr 8B.

- Łacko A, Polkowski W, Reguła J i in. (2013) Rak trzustki i brodawki Vatera, W: Potemski P. i Polkowski W. (red), Nowotwory układu pokarmowego, W: Krzakowski M. i Warzocha K. (red), Zalecenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach złośliwych, Tom I, Via Medica.
- NICE Clinical Guideline [CG131] (2011) Colorectal cancer: the diagnosis and management, November [nice.org.uk; dostęp: 18.05.2021r.].
- Polkowski W, Guzel Z, Reguła J i in. (2013) Rak przełyku i połączenia przełykowo-żołądkowego, W: Potemski P. i Polkowski W. (red), Nowotwory układu pokarmowego, W: Krzakowski M. i Warzocha K. (red), Zalecenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach złośliwych, Tom I, Via Medica.
- Polkowski W, Łacko A, Guzel Z i in. (2013) Nowotwory żołądka, W: Potemski P. i Polkowski W. (red), Nowotwory układu pokarmowego, W: Krzakowski M. i Warzocha K. (red), Zalecenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach złośliwych, Tom I, Via Medica.
- Raporty Krajowego Rejestru Nowotworów (2015) [onkologia.org.pl; dostęp: 18.05.2021r.]
- Uchwała nr 208 Rady Ministrów z dnia 3 listopada 2015 r. w sprawie ustanowienia programu wieloletniego na lata 2016–2024 pod nazwą „Narodowy Program Zwalczania Chorób Nowotworowych” [poz. 1165].
- World Report on Disability (2011), World Health Organization, The World Bank, WHO.
- Woźniewski M (2014) Moja rehabilitacja – poradnik dla pacjentów z chorobą nowotworową i ich rodzin, AWF we Wrocławiu i Fundacja „Tam i z powrotem”, pod patronatem Polskiego Towarzystwa Onkologicznego, Warszawa.
- Woźniewski M (2013) Rehabilitacja chorych na nowotwory, W: Krzakowski M. i Warzocha K. (red), Zalecenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach złośliwych, Tom I, Via Medica.

15. Cyklosporyna A (CsA) – cykliczny polipeptyd szeroko stosowany w medycynie

Cyclosporine A (CsA) – cyclic polypeptide widely used in medicine

Szafran Klaudia

Katedra Zjawisk Międzyfazowych, Instytut Nauk Chemicznych, Wydział Chemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

Opiekun naukowy: dr hab. Małgorzata Jurak

Szafran Klaudia: klaudia.wozniak@poczta.umcs.lublin.pl

Słowa Kluczowe: peptydy, cyklosporyna A

Streszczenie

Cyklosporyna A (CsA) to cykliczny polipeptyd, który stosowany jest w leczeniu chorób autoimmunologicznych takich, jak: reumatoidalne zapalenie stawów, autoimmunologiczne zapalenie wątroby oraz atopowe zapalenie skóry, łuszczyca lub też choroba suchego oka. CsA występuje w wielu postaciach, w tym w postaci kapsułek doustnych, roztworu doustnego i kropli. Stosowana jest również w celu zapobiegania odrzuceniu narządu przez organizm po przeszczepie. Choroby autoimmunologiczne rozwijają się, gdy układ odpornościowy omyłkowo atakuje zdrowe komórki. Cyklosporyna A działa poprzez hamowanie odpowiedzi układu odpornościowego. W ten sam sposób zapobiega rozpoznaniu przeszczepionego narządu, jako ciała obcego. Cyklosporyna A tymczasowo zmniejsza aktywność komórek układu odpornościowego zwanych limfocytami, takich jak komórki pomocnicze T. Jednak ze względu na swój molekularny mechanizm działania podawanie leku wiąże się z różnymi niekorzystnymi skutkami ubocznymi, takimi jak nefrotoksyczność, kardiotoxyczność oraz hepatotoksyczność.

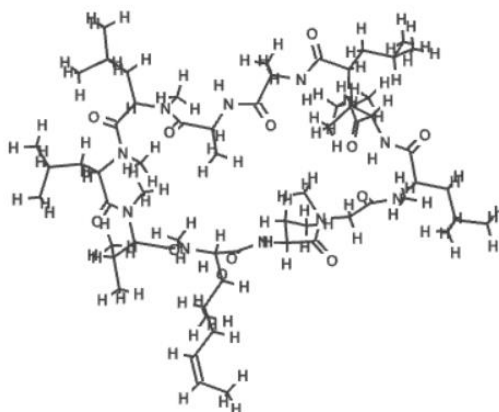
1. Wstęp

Peptydy to poliamidy, które w pojedynczej cząsteczce zawierają reszty aminokwasowe połączone wiązaniami peptydowymi w łańcuchy o dowolnej długości. Synteza peptydów polega na powiązaniu aminokwasów wiązaniem peptydowym, zabezpieczeniu grup funkcyjnych i usunięciu grup osłonowych z produktów pośrednich i końcowych. Jedną z metod otrzymywania peptydów jest **metoda Merrifielda**, która składa się z trzech etapów: przyłączenia aminokwasu do nośnika, reakcji składających się na wzrost łańcucha peptydowego oraz zdejmowania gotowego peptydu z nośnika. Syntezę tę wykonuje się na kolumnach wypełnionych nośnikiem, a kolejne etapy polegają na przemywaniu kolumny roztworami substratów poszczególnych etapów metody.

Peptydy zawierające wiele reszt aminokwasowych i posiadające masę cząsteczkową do 10 000 noszą nazwę polipeptydów (Mastalerz 2000). Jednym z przedstawicieli polipeptydów jest cyklosporyny A, CsA (łac. *Ciclosporinum*) (Rys.1). Jest to związek organiczny (C₆₂H₁₁₁N₁₁O₁₂), a dokładnie cykliczny polipeptyd, na który składa się 11 aminokwasów o strukturze rozgałęzionej. Jej duża masa cząsteczkowa (1202,64 Da) oraz wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe nadające sztywność przyczyniają się do niskiej rozpuszczalności w wodzie, a także wpływają na wywoływanie niepożądanych właściwości biofarmaceutycznych po podaniu doustnym i/lub miejscowym (Italia i in. 2006). Wyizolowana została po raz pierwszy z grzybów *Tolypocladium inflatum*. Ponadto, może być także wyprodukowana poprzez bezpośrednią biosyntezę lub syntezę chemiczną (Czogalla 2009). Już w 1978 roku opisywano, że działanie immunosupresyjne cyklosporyny A jest skuteczne w zapobieganiu odrzuceniu narządów. CsA jest obecnie zatwierdzona do powstrzymania odrzucenia po przeszczepach organów, do których można zaliczyć: serce, płuca i nerki oraz do zapobiegania odrzuceniu szpiku kostnego. Co więcej, jest także stosowana w leczeniu wielu chorób autoimmunologicznych, takich jak reumatoidalne zapalenie stawów, niedokrwistość aplastyczna, autoimmunologiczne zapalenie wątroby, choroba Crohna lub miastenia. Poza tym opisano wiele

dotychczasowych biologicznych działań CsA, w tym działanie przeciwzapalne, przeciwpasożytnicze (przeciw malarii), przeciwgrybicze i przeciwwirusowe.

Działanie cyklosporyny polega na skutecznym hamowaniu reakcji immunologicznych zależnych od limfocytów T. CsA tworzy kompleks z cytoplazmatycznym białkiem receptora obecnym w limfocytach T, który dodatkowo wiąże się z kalcyneuryną i hamuje stymulowaną przez Ca^{2+} defosforylację cytoplazmatycznego składnika czynnika jądrowego aktywowanych limfocytów T (NFAT). W rezultacie, translokacja NFAT z cytoplazmy do jądra aktywowanych komórek T jest zahamowana. Dlatego transkrypcja genów nie jest aktywowana, a limfocyty T nie reagują na stymulację antygenem (Schumacher i Nordheim 1992). Z drugiej strony długotrwałe leczenie CsA wiąże się z niepożądanymi efektami ubocznymi. Nefrotoksyczność jest głównym efektem ubocznym działania cyklosporyny. Chociaż generalnie jest ona odwracalna, u niektórych pacjentów może powodować nieodwracalne zmiany strukturalne, takie jak zwłóknienie śródmiąższowe. Dlatego wymagane jest ścisłe monitorowanie parametrów oceniających czynność nerek. Mechanizmy zaangażowane w nefrotoksyczność wywołaną cyklosporyną obejmują zwiększone uwalnianie czynników zwężających naczynia oraz zmniejszone uwalnianie czynników rozszerzających naczynia, co prowadzi do intensywnego zwężenia naczyń nerkowych. Proces ten często prowadzi do przewlekłych zaburzeń z nieodwracalnym strukturalnym uszkodzeniem nerek. Ponadto, zwiększona produkcja wolnych rodników przez cyklosporynę przyczynia się również do nefrotoksyczności, a także innych skutków toksycznych, takich jak hepatotoksyczność i kardiotoxyczność (Czogalla 2009; Busauschinai in. 2004; Rezzani i in. 2005).



Rys. 1. Wzór strukturalny cyklosporyny A.

2. Fizykochemiczne właściwości cyklosporyny A

Cyklosporyna A to biały proszek (Rys.2) o krystalicznej postaci białych igieł o temperaturze topnienia 148–151°C. W postaci suchego proszku przechowywanego w ciemności w temperaturze 2–8°C zachowuje stabilność, przez co najmniej 2 lata. CsA jest rozpuszczalna w rozpuszczalnikach organicznych, takich jak metanol, etanol, aceton, eter i chloroform oraz słabo rozpuszczalna w węglowodorach nasyconych i w wodzie. Ponieważ rozpuszczalność polipeptydu zależy od krystaliczności substancji rozpuszczonej i jej interakcji z rozpuszczalnikiem, najbardziej skutecznym sposobem uzyskania stabilnego termodynamicznie wzrostu rozpuszczalności jest zmiana charakteru rozpuszczalnika. W rozpuszczalniku niepolarnym dominuje struktura drugorzędowa cyklosporyny stabilizowana wewnątrzcząsteczkowymi wiązaniami wodorowymi. Z kolei w polarnych rozpuszczalnikach struktura związku zmienia się drastycznie, cząsteczka odsłania swoje grupy wiążące wodór i traci strukturę drugorzędową. Pomimo tego, że konformacja w środowisku wodnym jest mniej korzystna energetycznie, może powodować, że CsA zachowuje się jak rodzaj jednocząsteczkowej miceli o wyższym powinowactwie do cząsteczek wody niż można by wywnioskować z jej budowy strukturalnej (Czogalla 2009; Loosli i in. 1985).



Rys.2. Postać fizyczna cyklosporyny A.

3. Konformacje polipeptydu

Określenie konformacji w roztworze jest zadaniem skomplikowanym. Wynika to z elastyczności cząsteczek. Zależność konformacyjna parametrów spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (*ang. Nuclear Magnetic Resonance, NMR*) dostarcza najbardziej wiarygodnych informacji o strukturze w roztworze, pod warunkiem, że możliwe jest jednoznaczne przypisanie sygnału do budowy molekularnej. Stwierdzono, że w zależności od charakteru rozpuszczalnika cyklosporyna A wykazuje odmienne konformacje. Siedem wiązań N–metyloamidowych stwarza możliwość wystąpienia wielu konformerów *cis/trans*. W rozpuszczalnikach niepolarnych, do których można zaliczyć między innymi chloroform, benzen oraz dichlorometan tylko jedna konformacja jest zapełniona w około 95%. Loosli oraz inni naukowcy stwierdzili, że wiązanie peptydowe występujące pomiędzy MeLeu-9 a MeLeu-10 w konformacji *cis* jest najbardziej stabilne w roztworze. W przypadku pozostałych wiązań międzypeptydowych naukowcy zaobserwowali oddziaływanie spinów jąder atomowych (efekt NOE), co potwierdziło konformacje *trans*. Loosli i współprac. Odkryli także, że w wyższych temperaturach wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe są silniejsze i że cząsteczka przyjmuje bardziej konformację wyizolowanej niż solwatowanej cząsteczki. Zmiana konformacji peptydu w roztworze najczęściej związana jest z rotacją wokół wiązań C–C w łańcuchach bocznych (Loosli i in. 1985). Petcher i współpracownicy uzyskali kształt cyklosporyny w niepolarnym rozpuszczalniku i określili go, jako kształt motyla (Petcher i in. 1976), który związany jest ze specyficznym ułożeniem łańcucha bocznego MeBmt odpowiedzialnego za działania immunosupresyjne związku. Ponadto, stosując technikę magnetycznego rezonansu jądrowego oraz rentgenografię krystaliczną naukowcy dowiedli, że konformacja ciała stałego i ta uzyskana z interpretacji widm NMR w rozpuszczalnikach niepolarnych są bardzo podobne.

4. Zastosowanie cyklosporyny A w medycynie

Podawanie cyklosporyny A jest jedną z najskuteczniejszych metod leczenia łuszczycy ze względu na szybkość działania od momentu podania leku. U pacjentów z ciężką łuszczycą, którzy nie reagują na inne metody leczenia, CsA może wywołać szybką remisję i może być stosowana, jako pomost do innych terapii. W leczeniu powyższego schorzenia można zastosować różne rodzaje terapii. Pierwsza z nich to tak zwana terapia krótkotrwała przerywana. Polega na stosowaniu krótkich cykli podawania cyklosporyny do uzyskania znaczącej poprawy, po czym leczenie zostaje wycofane. W przypadku nawrotu, wznawia się terapię lekiem we wcześniej ustalonej skutecznej dawce. Drugim podejściem jest terapia ratunkowa lub pomostowa, która trwa kilka miesięcy i jest najbardziej polecana w leczeniu erythrodermii, poderythrodermii lub uogólnionej łuszczycy krostkowej. Kolejną terapią jest długoterminowa terapia cyklosporyną. W powyższym przypadku podawane dawki są mniejsze, przy czym czas leczenia jest wydłużony. Celem leczenia nie jest koniecznie osiągnięcie całkowitego ustąpienia, ale osiągnięcie znaczącej poprawy klinicznej przy możliwie najniższej skutecznej dawce. Ponadto, leczenie łuszczycy cyklosporyną prowadzone jest także w trybie mieszanym z innymi terapiami, między innymi leczeniem ogólnoustrojowym metotreksatem, co

zapewnia większą efektywność leczenia, jak również zmniejszenie efektów ubocznych wywołanych przez lek. Cyklosporyna jest także wykorzystywana w leczeniu łuszczykowego zapalenia stawów, najczęściej jednak stosuje się ją także w połączeniu z wcześniej wspomnianym metotreksatem (Amor i in. 2010). Polipeptyd stosowany jest również w terapii przeciw wypryskowi dyshydrotycznemu, który stanowi zapalenie skóry oraz towarzyszącemu występowaniu pękających i swędzących pęcherzy na dłoniach oraz stopach. Ponadto, lek stosowany jest także w leczeniu przewlekłej pokrzywki.

Cyklosporyna A zapewnia także dodatkowe opcje leczenia dla pacjentów z chorobą suchego oka (*ang. dry eye disease*, DED) wywołaną chirurgicznie. Podobnie w badaniu pacjentów z zespołem suchego oka wywołanym po operacji zaćmy, objawy chorobowe złagodziły się po 3 miesiącach leczenia. Co więcej, w wielu przypadkach u pacjentów z nawracającymi nadżerkami rogówki i opornymi na leczenie uporczywymi wadami nabłonka leczenie cyklosporyną A poprawiło stabilność filmu łzowego, zmniejszyło pojawiające się regularnie zmiany i całkowicie zagoiło obszary objęte jednostką chorobową (Periman i in. 2020).

5. Drogi podawania cyklosporyny A

Podawanie cyklosporyny A jest skuteczną terapią zapobiegającą odrzuceniu przeszczepu, a także większości immunoregulacyjnych chorób skóry i oczu. Jednakże długotrwałe ogólnoustrojowe podawanie leku wymagane do odpowiedniego opanowania miejscowych chorób autoimmunologicznych często prowadzi do działań niepożądanych. Niemniej jednak większość tych zaburzeń można skutecznie kontrolować poprzez miejscowe podawanie preparatów cyklosporyny, co zmniejsza obciążenie organizmu lekiem i minimalizuje jego toksyczność. Tak więc, można zoptymalizować terapię przeszczepu narządów i chorób regulujących układ odpornościowy. Potrzeba terapeutyczna decyduje o miejscu przeznaczenia, dawce i systemie dostarczania. Miejscowe podawanie CsA najczęściej stosowane jest w leczeniu chorób oka, skóry i płuc. W pierwszym przypadku najczęściej lek podawany jest w postaci mikrosfer lub też biodegradowalnych i/lub niebiodegradowalnych implantów. CsA stosowana w dermatologii aplikowana jest miejscowo w postaci roztworów lub mikroemulsji. Z kolei w pulmonologii dostarczana jest w postaci aerozolu glikolu propylenowego lub też aerozolu liposomalnego.

Cyklosporyna A jest także podawana doustnie. Wiąże się to z tym, że podlega intensywnemu metabolizmowi w ścianie jelita i wątrobie. Powyższy proces, wraz ze słabą rozpuszczalnością i dużą masą cząsteczkową, poważnie ograniczają jej wchłanianie. Ze względu na kliniczne znaczenie cyklosporyny, wiele wysiłku włożono w opracowanie doustnych preparatów o ulepszonej i stałej biodostępności. Najczęściej CsA dostępna jest w postaci miękkiej kapsułki żelatynowej lub roztworu emulsyjnego. Opracowanie nowych mikrosfer umożliwiło poprawienie szybkości rozpuszczania, jak i jej biodostępności (Kovarik i in. 1994; Lee i in. 2001). System doustnego dostarczania leku pierwszej generacji, Sandimmune®, został opracowany w latach osiemdziesiątych XX wieku, jako prosta emulsja typu olej w wodzie. CsA rozprowadzona była w kropelkach oleju. Aby lek mógł zostać wchłonięty, kropelki oleju musiały zostać strawione. Pociągało to za sobą emulgację soli żółciowych, umożliwiając w ten sposób ich trawienie przez enzymy trzustkowe. Preparat pierwszej generacji cechował się wadą, którą stanowiło opóźnione uwalnianie CsA. Ponadto, stan fizjologiczny przewodu pokarmowego pacjenta również w dużym stopniu wpływał na uwalnianie CsA. Biodostępność Sandimmune® waha się od 2 do 89%, przy czym średnia wartość wynosi 30%. Aby rozwiązać problemy występujące w przypadku stosowania systemów dostarczania CsA na bazie emulsji pierwszej generacji, pod koniec XX wieku opracowano mikroemulsję Neoral®. Głównym celem tego systemu dostarczania leku było osiągnięcie szybkiego uwalniania CsA w jelicie cienkim. Preparat musiał być dostępny w postaci roztworu do picia lub kapsułki, zapewniając w ten sposób odpowiednią zgodność u potencjalnego pacjenta, a tym samym większą biodostępność.

CsA występuje także w postaci zastrzyków i jest dostępna pod marką Sandimmune®. Jednak w tym preparacie, w związku z obecnością jednego ze składników pomocniczych możliwe jest występowanie ciężkich reakcji nadwrażliwości, agregacji erytrocytów oraz neuropatii obwodowej. Pożądane jest także zaprojektowanie nośników dostarczania leku, które przy podawaniu ogólnoustrojowym są w stanie nakierować na miejsce przeszczepu allogenicznego, dostarczając tym

samym miejscowo wysokie stężenie CsA. Takie podejście mogłoby zminimalizować powikłania spowodowane ogólnoustrojową immunosupresją, zmniejszając w ten sposób śmiertelność i chorobowość. Dlatego rozważono zastosowanie liposomów do dożylnego dostarczenia CsA. Liposomy są preferencyjnie usuwane przez układ siateczkowo-śródbłonkowy, którego ważnym składnikiem jest wątroba. Ponadto, gromadzą się w miejscach zakażeń i stanów zapalnych. W przypadku braku choroby nie mają tendencji do gromadzenia się w narządach, takich jak serce czy nerki. Stosowanie liposomów może zatem spowodować wczesne usuwanie, zwiększenie wychwytu przez wątrobę i zmniejszenie nefrotoksyczności u pacjentów po zabiegu przeszczepu wątroby.

Zaprojektowano także systemy podawania cyklosporyny w postaci miceli kopolimeru blokowego metoksy(politlenek etylenu)-b-poli(ε-kaprolanu). Główną zaletą tego systemu jest możliwość uzyskania kontrolowanej szybkości uwalniania leku (Beauchesne i in. 2007).

6. Podsumowanie

Cyklosporyna A to lek o silnych właściwościach immunosupresyjnych szeroko stosowany w medycynie, w leczeniu zarówno chorób autoimmunologicznych, jak i chorób skóry lub oka. Ponadto, stosowana jest w celu zapobiegania odrzuceniu przeszczepu narządów. Jednakże, stosowanie polipeptydu wiąże się z występowaniem niepożądanych efektów ubocznych, do których można zaliczyć hepatoksyczość, nefrotoksyczość oraz kardiotoxyczość. W celu zminimalizowania skutków ubocznych naukowcy wciąż opracowują nowoczesne systemy uwalniania leku, do których możemy zaliczyć między innymi emulsje, micelle, kapsułki oraz aerozole.

7. Literatura

- Mastalerz P. *Chemia organiczna*, Wydanie I, Wydawnictwo Chemiczne, Wrocław 2000.
- Italia JL, Bhardwaj V, Ravi Kumar MNV (2006) Disease, destination, dose and delivery aspects of ciclosporin: the state of the art. *Drug Discovery Today* 11: 846–854.
- Czogalla A (2009) Oral cyclosporine A – the current picture of its liposomal and other delivery systems. *Cellular and Molecular Biology Letters* 14: 139–152.
- Schumacher A, Nordheim A (1992) Progress towards a molecular understanding of cyclosporin A-mediated immunosuppression. *Clinical Investigator* 70: 773–779.
- Busauschina A, Schnuelle P, van der Woude FJ (2004) Cyclosporine Nephrotoxicity, *Transplantation Proceedings* 36: 229S–233S.
- Rezzani R, Buffoli B, Rodella L, Stacchiotti A, Bianchi R (2005) Protective role of melatonin in cyclosporine A-induced oxidative stress in rat liver. *International Immunopharmacology* 5: 1397–1405.
- Loosli HF, Kessler H, Oschkinat H, Weber HP, Petcher TJ, Widmer A (1985) The Conformation of Cyclosporin A in the Crystal and in Solution. *Helvetica Chimica Acta* 68: 682–704.
- Petcher TJ, Weber HP, Rügger A (1976) Crystal and Molecular Structure of an lodo-derivative of the Cyclic Undecapeptide Cyclosporin A. *Helvetica Chimica Acta* 59: 1480–1488.
- Amor KT, Ryan C, Menter A (2010) The use of cyclosporine in dermatology: Part I. *Journal of the American Academy of Dermatology* 63: 925–946.
- Periman LM, Mah FS, Karpecki PM (2020) A review of the mechanism of action of cyclosporine A: the role of cyclosporine A in dry eye disease and recent formulation developments. *Clinical Ophthalmology* 14: 4187–4200.
- Kovarik JM, Mueller EA, van Bree JB, Tetzloff W, Kutz K (1994) Reduced inter- and intraindividual variability in cyclosporine pharmacokinetics from a microemulsion formulation. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 83: 444–446.
- Lee EJ, Lee SW, Choi HG, Kim CK (2001) Bioavailability of cyclosporin A dispersed in sodium lauryl sulfate-dextrin based solid microspheres. *International Journal of Pharmaceutics* 218: 125–131.
- Beauchesne PR, Chung NSC, Wasan KM (2007) Cyclosporine A: A review of current oral and intravenous delivery systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 33:211–220.