

Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce

Nauki medyczne i nauki o zdrowiu

Część III



www.mlodzinaukowcy.com

Poznań 2020

Redakcja naukowa

dr Jędrzej Nyckowiak

dr hab. Jacek Leśny, prof. UPWR

Wydawca

Młodzi Naukowcy

www.mlodzinaukowcy.com

wydawnictwo@mlodzinaukowcy.com

ISBN (całość 978-83-66392-59-5)

ISBN (wydanie online 978-83-66743-09-0)

ISBN (wydanie drukowane 978-83-66743-08-3)

Ilość znaków w książce: 444 tys.

Ilość arkuszy wydawniczych: 11,1

Data wydania: wrzesień 2020

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. Rola protokołu MR w diagnostyce perlaka (cholesteatoma)	7
<i>Radosław Bernacki, Witold Zardzewiały, Anna Drelich-Zbroja</i>	
2. Możliwości terapeutyczne i nowe trendy w leczeniu jaskry	13
<i>Bieniek Paulina, Modrzewska Aleksandra, Burat Magdalena, Gibuła-Tarłowska Ewa, Kędzierska Ewa</i>	
3. Nieprawidłowości siatkówki w zaburzeniu afektywnym dwubiegunowym – przegląd badań	20
<i>Adam Domagała</i>	
4. Pionierzy kardiologii w Polsce	26
<i>Gonkowski Ignacy</i>	
5. Czynniki wirulencji oraz leczenie infekcji wywołanych przez drożdżaka <i>Candida albicans</i>	32
<i>Katarzyna Grygorczuk-Płaneta, Jakub Kordaczuk, Patrycja Kaczmarek</i>	
6. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe jako przyszłe terapeutyki	37
<i>Katarzyna Grygorczuk-Płaneta, Jakub Kordaczuk, Patrycja Kaczmarek</i>	
7. Terapia z wykorzystaniem wirusów onkolitycznych - innowacja w leczeniu chorób nowotworowych	43
<i>Kaczyńska Agnieszka, Wieteska Małgorzata, Gorecka Adrianna, Zaremba Bartłomiej</i>	
8. Znaczenie czynnika transkrypcyjnego Foxp3 w regulacji powstawania limfocytów T regulatorowych oraz w procesach rozwoju chorób autoimmunologicznych	49
<i>Sebastian Mertowski, Krzysztof Gosik, Julia Wojnicka</i>	
9. Apoptoza – regulacyjny wpływ mikroRNA na białka z rodziny Bcl-2	56
<i>Miśkiewicz Joanna, Krawczyk Agata, Strzałka-Mrozik Barbara</i>	
10. Białka inhibitorowe apoptozy (IAP) i ich antagoniści w ostrej białaczce szpikowej	63
<i>Miśkiewicz Joanna, Krawczyk Agata, Strzałka-Mrozik Barbara</i>	
11. Związki pochodzenia grzybowego jako potencjalne źródło substancji bioaktywnych stosowanych w przemyśle kosmetycznym	71
<i>Piątek Wiktoria, Sulej Justyna, Osińska-Jaroszuk Monika</i>	
12. Żylaki powrózka nasiennego –diagnostyka i leczenie, z podkreśleniem roli ultrasonografii	77
<i>Monika Rogowska, Ignacy Rożek, Karol Bochyński, Łukasz Światłowski, Krzysztof Pyra</i>	
13. Wyściółczak rdzenia kręgowego - przydatność rezonansu magnetycznego w diagnostyce i monitorowaniu progresji	83
<i>Ignacy Rożek, Karol Bochyński, Weronika Cyranka, Monika Rogowska, Monika Zbroja</i>	
14. Narastający problem występowania otyłości i cukrzycy wśród dzieci i młodzieży	89
<i>Dorota Szałabska, Karolina Jędrzysek, Mateusz Grajek, Karolina Sobczyk, Klaudia Alcer, Eliza Działach</i>	
15. Narażenie zawodowe na stanowiskach pracy w podmiotach leczniczych	96
<i>Dorota Szałabska, Przemysław Suchoń, Karolina Jędrzysek, Karolina Sobczyk, Mateusz Grajek, Klaudia Alcer</i>	
16. Pęcherzyki błonowe bakterii Gram-ujemnych - rola oraz możliwości praktycznego zastosowania w przyszłości	103
<i>Dominika Szczerbiec, Mateusz Kciuk</i>	

- 17. Wpływ temperatury na wiązanie losartanu do glikowanej albuminy surowicy krwi ludzkiej** **109**
Szkudlarek Agnieszka, Gryma-Kowalik Jolanta, Maciążek-Jurczyk Małgorzata
- 18. Albumina surowicy krwi i jej funkcje w organizmie** **116**
Szkudlarek Agnieszka, Kokot Teresa

Przedmowa

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

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 zaczną publikować prace naukowe w prestiżowych czasopiśmie. Przyczyni się to zarówno do rozwoju nauki, jak i każdego autora, budując jego potencjał naukowy i osobisty.

Redakcja

1. Rola protokołu MR w diagnostyce perlaka (cholesteatoma)

Radosław Bernacki⁽¹⁾, Witold Zardzewiały⁽¹⁾, Anna Drelich-Zbroja⁽²⁾

⁽¹⁾ Studenckie Koło Naukowe Przy Zakładzie Radiologii Zabiegowej i Neuroradiologii UM w Lublinie

⁽²⁾ Zakład Radiologii Zabiegowej i Neuroradiologii UM w Lublinie

Radosław Bernacki: rbernacki97@gmail.com

Słowa kluczowe: Rezonans magnetyczny, ucho środkowe

Streszczenie

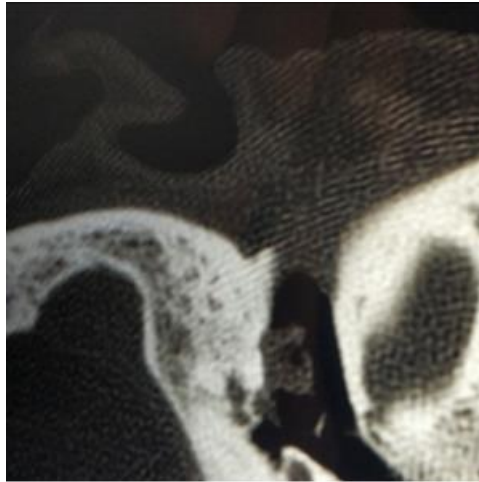
Perlaki są to lokalnie agresywne zmiany lokalizujące się w najczęściej w obrębie ucha środkowego. Można je podzielić ze względu na charakter ich pochodzenia. Występują one zarówno u dorosłych oraz dzieci. Pewne rasy mają predyspozycje do ich występowania. Pewne teorie mówią, że mogą być dziedziczne genetycznie. Istnieje także kilka teorii na temat mechanizmów powstawania perlaków. Perlaki najczęściej diagnozowane są u mężczyzn. Mogą one powodować powstawanie licznych powikłań takich jak np. infekcje. Najlepszą metodą diagnostyczną jest MRI w sekwencji DWI. Istnieje kilka technik operacyjnych takich jak CWD oraz CWU. Istotnym aspektem pooperacyjnego leczenia zmian chorobowych jest wykonywanie rutynowych badań kontrolnych pod względem pojawienia się ewentualnej wznowy, ponieważ mogą się one pojawić nawet po 5 latach od czasu wykonanego zabiegu. W poniższej pracy przedstawiono przydatność badania MR w diagnostyce perlaka, kwalifikacji do leczenia i monitorowaniu potencjalnej wznowy. Praca oparta jest o przegląd aktualnej literatury, w połączeniu z analizą dostępnego autorom przypadku klinicznego.

1. Wstęp

Perlak jest to choroba nienowotworową lokalizująca się w obrębie zewnętrznego kanału słuchowego, wyrostka sutkowego, kości skroniowej bądź ucha środkowego (Rys.1) (Lingam i in. 2018; Vaid i in. 2011). Perlak powoduje powstanie reakcji zapalanej w wyniku, której uwalniane są czynniki lityczne, czynniki wzrostu i cytokiny mogące aktywować osteoklasty w celu zniszczenia kości w obrębie ucha środkowego (Prasad i in. 2014). Zmiana ta charakteryzuje się występowaniem łóżów keratyny produkowanej przez nabłonek płaski oraz pozostałościami po złuszczyjących się komórkach (Vaid i in. 2011). Mają one lokalnie agresywny charakter ze względu na swój ekspansywny potencjał. Zarówno u dzieci jak i u dorosłych nie znaleziono różnic w budowie, histologicznej jednak przebieg kliniczny znacząco między nimi się różni. Zmiany występujące u dzieci mają znacznie bardziej agresywny przebieg w porównaniu do zmian diagnozowanych u osób dorosłych, ponieważ cechuje je znacznie szybsza intensywność wzrostu oraz znacznie większa zdolność do zajmowania przestrzeni znajdujących się w uchu środkowym oraz uszkodzenia nerwu twarzonego. Dodatkowym problemem spotykanym u dzieci jest obecność perlaków wrodzonych, w przebiegu których zachowana jest błona bębenkowa, brak w wywiadzie zapalenia ucha środkowego oraz brak jakichkolwiek informacji na temat przebytych zabiegów obejmujących okolice jak i same struktury obejmujące ucho. Częstość występowania perlaków wrodzonych jest jednak bardzo mała, ponieważ obejmuje ona od 8 do 16% diagnozowanych przypadków perlaka. Najczęściej spotykane perlaki wrodzone, które są diagnozowane można podzielić na pierwotne, wtórne oraz trzeciorzędowe. Pierwszy wymieniony podtyp lokalizuje się w górnej części zachyłka nadbębenkowego zwanej attyką. Wraz z rozwojem pierwotnego perlaka można zaobserwować jego ekspansję dośrodkową jamy bębenkowej. Perlak wtórny rozwija się w wyniku perforacji w obrębie napiętej części błony bębenkowej w następstwie rozrostu komórek budujących nabłonek płaski wyściełający jamę bębenkową. Natomiast najczęstszym pochodzeniem perlaka trzeciorzędowego jest powikłanie pooperacyjne wynikające z przedostania się komórek nabłonka płaskiego rogowaciejącego do miejsca operacyjnego i ich rozrost w obrębie nabłonka znajdującego się w okolicy ucha (Skarzyński i in. 2003).

Ponadto zaobserwowano, iż w przypadku występowania perlaka wrodzonego choroba od 4 do 28% występujących przypadków u dzieci przebiegała bez zapalenia ucha środkowego w historii choroby, co jest zupełnym przeciwieństwem perlaka nabytego, ponieważ w przebiegu perlaka nabytego zawsze obserwuje się zapalenie ucha środkowego (Coman i in. 2015).

Nieleczone perlaki mogą emigrować na twarz oraz szyję. Ponadto mogą powodować powstawanie przetoki mającej często nieprzyjemny zapach (Prasad i in. 2014).



Rys.1. Perlak w obrębie ucha środkowego.

2. Opis przypadku

W pracy przedstawiono przypadek 30 letniego pacjenta, który zgłosił się do szpitala z niedosłuchem lewego ucha. W wywiadzie nie stwierdzono wcześniej u pacjenta opisywanej zmiany. Wykonano u niego badanie MR z zastosowaniem sekwencji DWI z rozpoznaniem perlaka nabytego. W badaniu otoskopowym lekarz specjalista stwierdził także zmianę napierającą na błonę bębenkową powodując jej wypuklenie do światła przewodu słuchowego zewnętrznego. Na podstawie badania MR chorego zakwalifikowano do leczenia operacyjnego metodą CWD. W badaniu kontrolnym nie stwierdzono zmian (Rys.3 przedstawia obraz badania z prawidłowym wynikiem). Badanie MR z opcją DWI jest metodą z wyboru w diagnostyce perlaka oraz w monitorowania po leczeniu pacjenta celem poszukiwania ewentualnej wznowy.

3. Przegląd Literatury

Roczna zapadalność na perlaka waha się w granicach od 9 do 13 przypadków na 100 tys. dorosłych oraz od 3 do 15 przypadków wśród dzieci. Zarówno wśród dzieci jak i dorosłych u których zdiagnozowano obecność perlaka dominuje płeć męska. Zapadalność na nabytego perlaka na przestrzeni ostatnich dekad uległa widocznemu obniżeniu. Prawdopodobnie przyczyną tego pozytywnego zjawiska jest instalowanie wentylacji w domach. Wykazano także powiązania między perlakiem a częstością występowania w zależności od rasy. Najbardziej narażona na wystąpienie perlaka jest rasa kaukaska oraz mieszkańcy kontynentu afrykańskiego. Najmniej narażona jest populacja azjatycka za wyjątkiem Hindusów. Ciekawym przypadkiem wartym odnotowania stanowią Inuici, ponieważ wykazują bardzo małą częstość występowania perlaka w swojej populacji, czego przyczyną może być zmienność anatomiczna w postaci większej objętości nosogardzieli ułatwiającej napowietrzanie ucha środkowego co zapobiegając w ten sposób następstwom spowodowanym rozwojem perlaka w uchu środkowym. Częstość występowania perlaka jest wyższa w krajach rozwijających się niż w krajach rozwiniętych. Odnotowano również skłonności genetyczne do występowania perlaków w rodzinach u których w kilku pokoleniach zdiagnozowano obecność cholesteatomy. W populacji dzieci, u których zdiagnozowano perlaki, spośród 10% przypadków

wykryto obecność przewlekłego zapalenia ucha środkowego. Średni wiek dziecka, u którego zdiagnozowano perlaka nabytego to około 10 lat. Zaobserwowano także, że od 7 do 10% dzieci, u których wykryto perlaka można go obserwować zarówno po lewej jak i po prawej stronie ciała. Ciekawym jest fakt, iż takie przypadki obustronnego występowania perlaka obserwuje się wśród dziewczynek. Ponadto ryzyko rozwoju perlaka jest większe wśród dzieci z zespołami wad wrodzonych twarzoczaszki. Dla przykładu u około 0,9-5,9% dzieci z rozszczepem podniebienia diagnozuje się perlaka nabytego. Dzieci bez rozszczepu podniebienia są o około 100-200 razy mniej narażone na wystąpienie perlaka niż dzieci, u których występuje ta anomalia anatomiczna (Kuo i in. 2015).

W patogenezie perlaka wyróżniamy cztery teorie dotyczące jego rozwoju: teoria wgłobienia, teoria inwazji nabłonkowej lub migracji, płaskonabłonkowej metaplazji oraz teoria przerostu komórek podstawnych. Pierwsza teoria opiera się na założeniu, że prekursorem perlaków są kieszonki retrakcyjne utworzone przez podciśnienie w których następnie gromadzi się keratyna. Kolejna teoria jest sprzeczna z teorią wgłobienia, ponieważ zakłada, że perforacja błony bębenkowej jest prekursorem dla rozwoju perlaka. Nabłonek budujący błonę bębenkową według tej teorii migruje do ucha środkowego, gdzie powoduje powstanie perlaka. Zwolennicy teorii metaplazji nabłonkowej natomiast twierdzą, że nabłonek ten ma zdolność do przekształcenia się w nabłonek rogowaciejący prowadząc do powstania perlaka. Natomiast ostatnia z teorii mówi o rozroście komórek podstawnych, mikrocyst wypełnionych keratyną uformowanych w warstwie podstawnej, atakujących tkankę podnabłonkową w przestrzeni Prussaka przyczyniając się do powstania perlaka (Kuo i in. 2015).

Do powikłań perlaka zaliczamy: przetokę labiryntową na poziomie kanału półkolistego. W wyniku tego powikłania następuje uszkodzenie kosteczki słuchowej, pokrywy jamy bębenkowej oraz powstaje przetoka kanału półkolistego. Ostre zapalenie błędniaka, które można podzielić na trzy stadia: ostre, włókniejące oraz kostniejące zapalenie labiryntu. W ostrym stadium dochodzi do wzmocnienia kontrastu w obrębie błędniaka w obrazie T1-zależnym MRI. Metoda obrazowania MRI pozwala uwidocznąć we włókniejącym stadium niedrożność ślimaka. Porażenie kostniejące zapalenie labiryntu wiąże się z patologicznym kostnieniem w obrębie labiryntu oraz ślimaka. Porażenie twarzy zaczyna się poprzez rozwijającego się perlaka w obrębie kanału słuchowego obejmującego zmiany w obrębie labiryntowego segmentu kanału nerwu twarzowego, który ulega poszerzeniu (Taranilla i in. 2013). Następnymi powikłaniem perlaka są zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, utrata słuchu, przepuklina mózgowa, zawroty głowy (Lingam i in. 2018), ropień mózgu czy zakrzepica zatok (Corrales i in. 2013).

Podstawową metodą leczenia jest całkowite usunięcie perlaka oraz zapobieganie jego nawrotom (Lingam i in. 2018). Średni wiek w jakim dzieci są operowane z powodu perlaka to około 9 rok życia (Skarzyński i in. 2003). Istnieją dwie techniki przeprowadzania operacji chirurgicznych celem usunięcia wszystkich widocznych w badaniu MRI w sekwencji DWI patologicznych zmian w obrębie struktur anatomicznych w których się lokalizują. Są to metody: Canal wall-up (CWU) oraz canal wall-down (CWD). Nienaruszona ściana kanału może utrudniać wizualizację śródoperacyjną zmiany co wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia choroby resztkowej (Hellingman i in. 2018; Lingam i in. 2018). Metoda CWU jest mniej inwazyjną operacją, lecz wiąże się ze zwiększonym ryzykiem rozwoju choroby resztkowej z nieusuniętych zmian. CWD jest skuteczniejszą techniką operacyjną, lecz pozostawia otwartą wnękę po operacji co wiąże się z koniecznością regularnych wizyt ambulatoryjnych w celu jej oczyszczenia. Innymi wadami pooperacyjnym związanymi z ubytkiem to infekcje, trudności w usuwaniu dostającej się w przestrzeń perlaka płynów, trudności w dopasowaniu aparatu słuchowego, jeżeli jest taka konieczność oraz zawroty głowy spowodowane zmianami temperatury powietrza bądź wody (Hellingman i in. 2018). Tympanoplastyka przeprowadzana podczas CWD wiąże się ze znacznie mniejszym ryzykiem nawrotu perlaka z zachowaniem nienaruszonej pierwotnej ściany tylnej przewodu słuchowego. W przebiegu CWU ze względu na usunięcie zachyłka nadbębenkowego i wyrostka sutkowego wykazano, że zmniejsza wyciek z ucha w porównaniu do CWD. W przebiegu leczenia operacyjnego w przewlekłym perlakowym zapaleniu ucha u dzieci szczególną uwagę należy zwrócić na udrożnienie trąbki słuchowej oraz zapewnienie odpowiedniej wentylacji ucha środkowego. Ponadto obserwuje się

o wiele częstsze występowanie wznow w porównaniu do dorosłych u których zastosowano tą metodę leczenia (Skarżyński i in. 2003).

Obrazowanie perlaka w tomografii komputerowej nie sprawdza się w jego diagnostyce mimo dużej rozdzielczości, ponieważ ta metoda obrazowania nie jest w stanie rozróżnić perlaka od ziarniny, zrostów, płynu czy śluzu (Szymański i in. 2012). Perlaka można rozpoznać na podstawie wywiadu, historii choroby oraz badania otoskopowego. Natomiast zasięg czy powikłania jakie mogą powstać nie zawsze są takie oczywiste, dlatego w tym celu stosuje się badanie MRI w sekwencji DWI (Corrales i in. 2013). Wykorzystuje ona dyfuzję cząsteczki wody oraz ograniczenia dyfuzji do generowania kontrastu na obrazie MRI (Lingam i in. 2018). Guzy złośliwe charakteryzują się niską dyfuzją, czyli niskim współczynnikiem ADC, wysoką intensywnością sygnału (IS) na obrazach o wysokiej wartości współczynnika b. Brak ograniczenia dyfuzji cząsteczki wody jest przyjmowany za cechę zmian łagodnych (Rembak-Szynkiewicz i in. (Lingam R. K in. 2018). Zwiększenie współczynnika b powoduje powstanie bardziej dokładnego obrazu, lecz wymaga to dłuższego okresu skanowania co z kolei może przyczynić się do powstania błędów ze względu na możliwość poruszenia się pacjenta podczas wykonywania przez dłuższy czas badania. Perlak na obrazach DWI wykazuje wysoką intensywność sygnału w porównaniu do tkanki mózgowej uzyskaną przy wartościach wynoszących $0s/mm^2$ oraz także przy wyższych wartościach takich jak 800 lub $100s/mm^2$. Istnieją dwa główne typy sekwencji DWI echopolarna i nieechopolarna. Echopolarne DWI służy do obrazowania obszaru ucha natomiast nieechopolarna może służyć do diagnostyki perlaka ze względu na bardzo dużą czułość i swoistość wynoszącą pomiędzy 80 a 100% (Lingam i in. 2018). Dotyczy to szczególnie sytuacji pooperacyjnych w okolicach uszu ze względu na możliwość nawracania zmian (Rys.2) bądź też ujawniania się w obszarach, w których wcześniej ta zmiana nie występowała. Takim przykładem może być przewlekłe zapalenie ucha środkowego w przebiegu, którego szczególną wartość ma badanie MRI używające metodę dyfuzji, ponieważ obserwuje się w nim przede wszystkim obrzęk błony śluzowej co jest kluczowe do rozpoznania zapalenia ucha środkowego. Dodatkowo u 10% pacjentów zapaleniu towarzyszy uszkodzenie nabłonka. Natomiast perlaka lokalizującego się w uchu środkowym cechuje przemieszczenie się kosteczek słuchowych z częstotliwością około 75% wśród diagnozowanych pacjentów. Jednakże w niektórych przypadkach zmętnienie obecne w obrazie wykonywanego badania może sugerować, iż w obrębie jamy ucha środkowego nie zaobserwujemy żadnej zmiany charakterystycznej dla perlaka (Corrales i in. 2013; Taranilla i in. 2013).

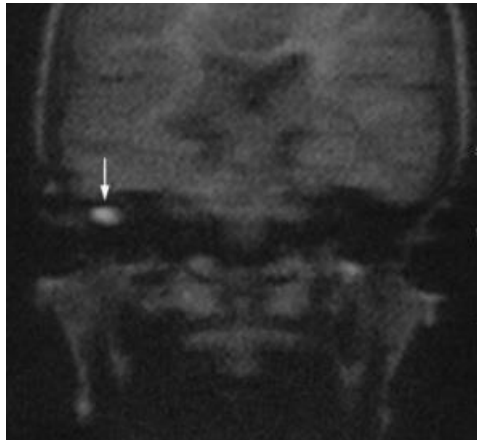
MRI jest także przydatne w kontroli pooperacyjnej, ponieważ jama pooperacyjna jest wypełniona masą tkanek miękkich w których standardowe CT nie może być wiarygodne. Dodatkowo MRI umożliwi wykrycie perlaka, ponieważ tkankę ziarninową można odróżnić od perlaka na podstawie wzmocnienia obrazu po podaniu kontrastu podczas badania MRI. Jest to możliwe ze względu na słabe unaczynienie tkanki w przeciwieństwie do perlaka, który nie posiada swojego unaczynienia (Trojanowska i in. 2007).

Perlaki mają zdolność do nawrotów, które po chirurgicznym usunięciu można wykryć już w 5 roku po przebytej operacji. Niektórzy pacjenci mogą mieć fałszywe poczucie bezpieczeństwa i wierzyć, że zostali całkowicie wyleczeni. Otóż nic bardziej mylnego, ponieważ odnotowano przypadki pacjentów, u których nawrót choroby był obserwowany po 10, 17 a w skrajnym przypadku nawet po 24 latach od momentu przebytego zabiegu operacyjnego. Dlatego w trakcie dalszego trwania leczenia tej choroby po zakończeniu leczenia chirurgicznego bardzo ważne są rutynowo wykonywane badania oraz kontrole pacjenta. Badania kontrolne należy prowadzić pod kątem rozwoju zmian z pozostałych nieusuniętych tkanek w sąsiedztwie, których występowała zmiana oraz możliwości ponownego nawrotu tej samej choroby po bardzo długim okresie utajenia lokalizując się w tym samym bądź innej lokalizacji. Dlatego pacjenta należy badać tak długo na ile pozwoli bądź będzie miał ochotę pacjent. (Kuo i in. 2015).

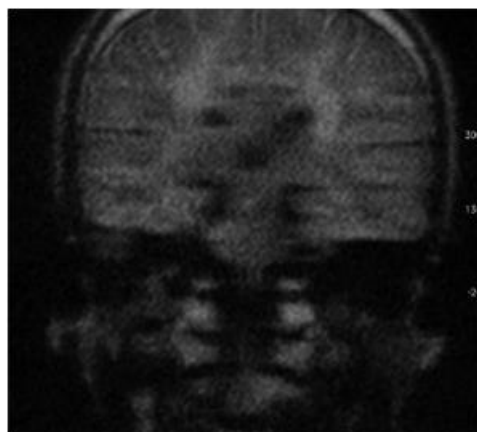
4. Podsumowanie

Perlaki to są to miejscowo złośliwe nienowotworowe zmiany obejmujące przewód słuchowy, wyrostek sutkowy oraz ucho środkowe. Występują zarówno u dzieci oraz dorosłych. Zmiany mogą występować po jednej stronie ciała bądź też obustronnie. Perlaki jednostronne częściej

występują u płci męskiej natomiast obustronna lokalizację zmian obserwuje się szczególnie często u dziewczynek. Jeżeli perlak występuje u dzieci i jest on wrodzony to przebieg choroby jest o wiele bardziej agresywniejszy w porównaniu do obrazu klinicznego obserwowanego u osób dorosłych. Powikłania związane z tą chorobą są zróżnicowane i zależą od grupy wiekowej w jakiej one występują. Do ogólnych powikłań jakie można wymienić to zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych utratę słuchu, zawroty głowy a także porażenie twarzy. Do zdiagnozowania choroby służy wywiad lekarski, badanie otoskopowe oraz kluczowe dla różnicowania perlaka z tkanką ziarninową, śluzem, bliznami bądź przewlekłym zapaleniem ucha środkowego jest MRI w sekwencji DWI, ponieważ w przeciwieństwie do tomografu komputerowego rezonans magnetyczny jest w stanie rozróżnić wyżej wymienione zmiany czy też stany zapalne w obrębie ucha środkowego. Leczenie opiera się na operacji chirurgicznej, która może być wykonywana różnymi technikami z różną skutecznością oraz z różną inwazją na struktury w obrębie ucha. Zarówno jedna jak i druga technika posiada swoje wady oraz zalety. Jedna technika jest mniej estetyczna za to skuteczniejsza od drugiej, która niesie za sobą większe ryzyko wystąpienia nawrotów tej choroby. Ponadto należy wspomnieć o tym, że samo odbycie operacji nie gwarantuje 100% wyleczenia pacjenta, dlatego bardzo ważnym aspektem w prowadzeniu dalszego leczenia pooperacyjnego pacjenta jest rutynowe przeprowadzanie badań pod kątem pojawienia się ewentualnej wznowy w miejscu przebytego zabiegu chirurgicznego mającego na celu usunięcie perlaka. Częste badania kontrolne pacjentów poddanych leczeniu operacyjnemu zaleca się wykonywać jak najdłużej od momentu zakończenia hospitalizacji pacjenta.



Rys. 2 Obraz MRI w sekwencji DW z wyraźnym hiperintensywnym obszarem odpowiadającym perlakowi zaznaczony strzałką (Szymański i in. 2012).



Rys.3. Obraz MRI w sekwencji DW bez patologicznego ognisk hiperintensywnych u chorych z nawrotem (Szymański i in. 2012).

5. Bibliografia

- Coman M, Coman A, Gheorghe DC (2015). All about Imagistic Exploration in Cholesteatoma. *Maedica (Buchar)* 10(2): 178–184.
- Corrales CE, Blevins NH (2013) Imaging for evaluation of cholesteatoma. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery* 21(5): 461-467.
- Hellingman, CA, Geerse S, de Wolf MJF, Ebbens FA, van Spronsen E (2018) Canal wall up surgery with mastoid and epitympanic obliteration in acquired cholesteatoma. *The Laryngoscope* 129(4): 981-985.
- Kuo CL, Shiao AS, Yung M, Sakagami M, Sudhoff H, Wang CH, Lien CF (2015). Updates and Knowledge Gaps in Cholesteatoma Research. *BioMed Research International*: 1–17.
- Lingam RK, Connor SEJ, Casselman JW, Beale T (2018) MRI in otology: applications in cholesteatoma and Ménière's disease. *Clinical Radiology* 73(1): 35–44.
- Prasad SC, La Melia C, Medina M, Vincenti V, Bacciu A, Bacciu S, Pasanisi E (2014) Long-term surgical and functional outcomes of the intact canal wall technique for middle ear cholesteatoma in the paediatric population. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 34(5): 354-61.
- Rembak-Szynkiewicz J, Bobek-Billewicz B, Jarzab M, Jurkowski M, Stobiecka E, Poninkiewska D, Pawlik I (2014) Ocena przydatności obrazowania dyfuzji metodą rezonansu magnetycznego w diagnostyce różnicowej łagodnych i złośliwych zmian ogniskowych w wątrobie. *NOWOTWORZY Journal of Oncology* 64(5): 377–382.
- Skarżyński H, Mrówka M, Młotkowska-Klimek P, Sitarz L, Wysocki J, Skarżyńska B (2003) Przewlekłe perlakowe zapalenie ucha środkowego u dziecka - specyfika przebiegu klinicznego i wyniki leczenia operacyjnego. *Audiofonologia* tom XXIV: 29-35.
- Szymański M, Trojanowska A, Szymańska A, Morshed K (2012) Zastosowanie badania rezonansu magnetycznego w sekwencjach dyfuzyjnych do oceny chorych po operacji zamkniętej z powodu perlaka. *Otolaryngologia Polska* 66(4): 45–48.
- Taranilla MTF, Herrera Herrera I, Moreno de la Presa R, Garcia Benassi JM, Gonzalez Gutiérrez R, Bárcena Ruiz E; Toledo ES (2013) Magnetic Resonance Imaging (MRI) and High Resolution Computed Tomography (HRCT): Can they improve the evaluation of Middle ear cholesteatoma? *ECR 2013 / C-1249*.
- Trojanowska A, Trojanowski P, Olszanski W, Klatka J, Drop A (2007) Differentiation between cholesteatoma and inflammatory process of the middle ear, based on contrast-enhanced computed tomography imaging. *The Journal of Laryngology & Otology* 121(05): 444-448.
- Vaid S, Kamble Y, Vaid N, Bhatti S, Rawat S, Nanivadekar A, Karmarkar S (2011) Role of Magnetic Resonance Imaging in Cholesteatoma: The Indian Experience. *Indian Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery* 65(S3): 485–492.

2. Możliwości terapeutyczne i nowe trendy w leczeniu jaskry

Therapeutic options and new trends in glaucoma treatment

Bieniek Paulina⁽¹⁾, Modrzewska Aleksandra⁽¹⁾, Burat Magdalena⁽¹⁾, Gibuła-Tarłowska Ewa⁽²⁾, Kędzierska Ewa⁽²⁾

⁽¹⁾ Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Farmakologii z Farmakodynamiką, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽²⁾ Katedra i Zakład Farmakologii z Farmakodynamiką, Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Opiekun naukowy: dr hab. n. farm. Ewa Kędzierska

Modrzewska Aleksandra: ola.modrzewska96@gmail.com

Słowa kluczowe: oko, ciśnienie śródgałkowe, kąć przesączania, jaskra pierwotna, jaskra wtórna

Streszczenie

Jaskra, choroba znana od wielu lat nadal stanowi istotny, nie do końca rozwiązany problem w okulistyce. Nieleczona powoduje uszkodzenie nerwu wzrokowego i prowadzi do pogorszenia, a następnie nieodwracalnej utraty wzroku. Rozwija się najczęściej w wolnym tempie i przez długi czas nie daje objawów. Wyróżnia się kilka postaci tego schorzenia, a podwyższone ciśnienie śródgałkowe jest jednym z czynników ryzyka. W farmakoterapii jaskry stosuje się analogi prostaglandyn, leki blokujące receptory β -adrenergiczne, agonistów receptorów $\alpha 2$ -adrenergicznych, inhibitory anhidrazy węglanowej i parasympatykomimetyki. Na rynku ciągle pojawiają się nowe leki, które potencjalnie mogą stanowić rozwiązanie w terapii jaskry.

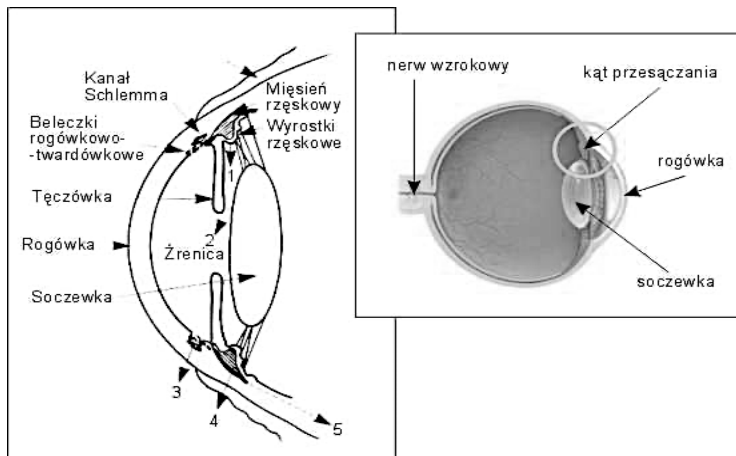
1. Wstęp

Jaskra (glaucoma) jest drugą w kolejności przyczyną ślepoty na świecie (Quigley i Broman 2006). Należy do grupy chorób, które charakteryzują się wspólnymi cechami, jakimi są: zbyt wysokie dla utrzymania prawidłowej czynności oka ciśnienie śródgałkowe, atrofia nerwu wzrokowego i zmiany w polu widzenia (Izdebska i Tesla, 2000). Prawidłowe ciśnienie wewnątrzgałkowe u ludzi wynosi od 11 do 21 mm Hg (Niżankowska 2007). Światowa Organizacja Jaskry na podstawie badań populacyjnych wskazała na istnienie pozytywnej zależności ogólnym ciśnieniem krwi, a ciśnieniem śródgałkowym. Potwierdzono to w trzech badaniach: Barbados Eye Study, Barbados Incidence Study of Eye Disease I i II (Hennis i in. 2003). Mechanizm tej korelacji zakłada, że podwyższone ciśnienie ma wpływ na zwiększenie frakcji filtracyjnej cieczy wodnistej wtórnie do podwyższonego ciśnienia w tętnicy rzęskowej (Bulpitt i in. 1975). Nadciśnienie tętnicze może też nasilać zmiany miażdżycowe i zaburzenia autoregulacji naczyń gałki ocznej (Wong i Mitchell 2007).

Objętość cieczy wodnistej determinuje prawidłowe ciśnienie wewnątrzgałkowe, gdy jest ono zwiększone, powoduje ucisk oraz niedokrwienie tarczy nerwu wzrokowego, co prowadzi do uszkodzenia włókien nerwowych siatkówki, skutkujące zmianami w polu widzenia (Izdebska i Tesla 2000).

2. Prawidłowa budowa i funkcjonowanie oka

Ciecz wodnista produkowana jest fizjologicznie przez wyrostki rzęskowe (1) (Rys.1) i kolejno przedostaje się przez źrenicę do komory przedniej (2). Jej nadmiar jest odprowadzany dwiema drogami. Główną – konwencjonalną drogą jest tzw. kąć tęczówkowo-rogowkowy (kąć przesączania), skąd płyn przechodzi do kanału Schlemma i dalej do żył wodnych (3). Alternatywnie ciecz wodnista przechodzi drogą twardówkowo-naczyniówkową (droga niekonwencjonalna), by opuścić gałkę oczną przez twardówkę (4,5) (Czechowicz-Janicka 2004). W warunkach fizjologicznych tą drogą odpływa do 25% cieczy wodnistej (Górska i in. 2017).



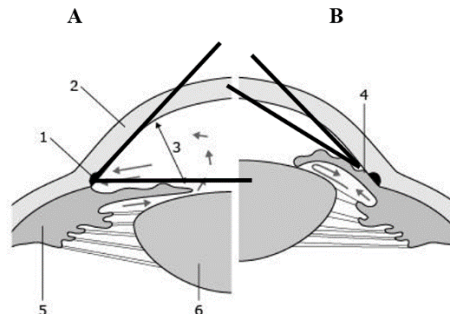
Rys. 1. Schemat krążenia i odpływu cieczy wodnistej z oka (Czechowicz-Janicka 2004).

3. Postaci choroby

Jaskrę najczęściej dzieli się na postać pierwotną i wtórną. Gdy jaskra wystąpi bez wcześniejszej choroby oczu jest klasyfikowana jako jaskra pierwotna. Postać wtórna jest konsekwencją istniejącej lub wcześniej występującej choroby oczu, np. wewnątrzgałkowego stanu zapalnego lub choroby ogólnej, np. cukrzycy. Inna klasyfikacja obejmuje czas pojawienia się choroby, tj.: jaskrę wrodzoną i jaskrę nabytą (Olszewska i in. 2009).

Kolejnym podziałem, który uwzględnia cechy anatomiczne kąta przesączania, jest podział na jaskrę otwartego (JPOK) i zamkniętego kąta przesączania (JPZK) (Rys. 2.). W przypadku jaskry z otwartym kątem przesączania (jaskry prostej), ciecz wodnista poprzez szeroki kąt tęczówkowo-rogówkowy dociera z łatwością do bełeczki. Jednakże z powodu zmian strukturalnych tkanki bełeczkowej trudno przez nie przenika. Kolejną przyczyną utrudnionego odpływu cieczy wodnistej to zwiększony opór w kanale Schlemma oraz wzrost ciśnienia w żyłach, które odpowiadają za odprowadzanie cieczy wodnistej.

Rzadszą postacią jaskry jest ta z wąskim kątem przesączania. W tym przypadku na skutek wzrostu ciśnienia w tylnej komorze tęczówka przesuwana się do przodu, co powoduje zamknięcie przestrzeni pomiędzy nasadą tęczówki i rogówką, czyli dostępu do bełeczki (zamknięcie kąta przesączania), co skutkuje zablokowaniem odpływu cieczy wodnistej. Postać ta rozwija się szybko. Wartości ciśnienia śródgałkowego sięgają 80 mmHg. Pacjentom towarzyszą silne bóle głowy, nudności, wymioty (dotyczy to szczególnie ostrego ataku jaskry). Występuje obrzęk nabłonka rogówki i niewystarczające ukrwienie siatkówki. Dochodzi do pogorszenia widzenia (Mutschler 2010).



Rys. 2. A. JPOK - utrudnienie odpływu wynika z zamykania się otworków bełeczki, (zatkane otworki odpływowe); 2. B. JPZK - zetknięcie się lub wzrost tęczówki z rogówką powoduje zamknięcie dostępu do drożnego bełeczki - (zablokowana droga odpływu), 1 - bełeczki, 2 - rogówka, 3 - otwarty kąt przesączania, 4 - zamknięty kąt przesączania, 5 - ciało rzęskowe, 6 - soczewka; zmodyfikowane za (Pogrzebielski, 2013)

Jaskrę można również sklasyfikować ze względu na wartość ciśnienia śródgałkowego. W jaskrze z normalnym ciśnieniem śródgałkowym mieści się ono w przedziale 10–21 mm Hg, w typie z wysokim ciśnieniem – przekracza 21 mm Hg. Być może u przyczyn jaskry z normalnym ciśnieniem śródgałkowym leży szczególna wrażliwość włókien nerwu wzrokowego na zmiany np. na zaburzenia w mikrokrążeniu, wówczas typowe uszkodzenia tarczy nerwu wzrokowego powstają już przy wartościach niższych niż 20 mm Hg. Do uszkodzenia komórek nerwowych w oku dochodzi z różnych przyczyn: niedoboru czynników wzrostu, syntezy wolnych rodników czy zaburzeń w metabolizmie wapnia, a ich skutkiem jest apoptoza, czyli genetycznie zaprogramowana i kontrolowana śmierć komórki (Cioffi 2005).

4. Epidemiologia

Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) uznała jaskrę za chorobę cywilizacyjną. Badania epidemiologiczne dokumentują, że na jaskrę cierpi około 68 milionów ludzi na całym świecie, z czego 7 milionów uznanych jest za niewidomych. Liczba nowych przypadków stale rośnie. Szacuje się, że do roku 2020 liczba osób chorych wzrośnie do ponad 79,6 milionów, podczas gdy w roku 2010 wynosiła 60,5 miliona (Quigley i Broman 2006). Jaskra dotyka 1–2% ludności w wieku powyżej 40 lat; wraz z wiekiem częstotliwość jej występowania rośnie (Mutschler 2010). Zjawisko to związane jest z jednej strony ze starzeniem się społeczeństwa i wydłużeniem długości życia, ale też z szerszą wiedzą i częstszym zgłaszaniem się na badania skriningowe. Istnieją większe możliwości diagnostyczne umożliwiające wcześniejsze rozpoznanie zmian w obrębie nerwu wzrokowego, jeszcze zanim spowodują one ubytki w polu widzenia (Olszewska i in. 2009). Najczęściej występuje postać choroby nazywana jaskrą z otwartym kątem przesączenia (jaskra pierwotna otwartego kąta – JPOK), która jest również najbardziej niebezpieczna, ponieważ zazwyczaj przez ok. 15 lat rozwija się całkowicie bezobjawowo. Pierwsze symptomy pojawiają się, gdy zmiany w nerwie wzrokowym są już zaawansowane. Początkowo dochodzi do stopniowej utraty pola widzenia, a gdy już nastąpi zanik nerwu, pacjenci nieodwracalnie tracą wzrok (Kraśńska i in. 2003).

5. Czynniki ryzyka

Podwyższone ciśnienie śródgałkowe nie jest jedynym czynnikiem ryzyka rozwoju jaskry. Są to ponadto: wiek powyżej 65 r.ż., występowanie jaskry w rodzinie (predyspozycje genetyczne), pochodzenie (Europejczycy i Afrykańczycy częściej cierpią na jaskrę z otwartym kątem przesączenia, natomiast Azjaci – na jaskrę z zamkniętym kątem przesączenia). Mniejszą rolę odgrywa płeć. Kobiety częściej cierpią na jaskrę kąta zamykającego się, mężczyźni natomiast na jaskrę wtórną. Miażdżyca, cukrzyca, nadciśnienie tętnicze a także przewlekły stres, również mogą odpowiadać za przyspieszenie rozwoju neuropatii jaskrowej.

6. Diagnostyka

Diagnostyka jaskry opiera się na szeregu badań wykonywanych u pacjentów. Badania w kierunku jaskry u chorych bez obciążenia genetycznego powinno wykonywać się pomiędzy 35 a 40 r. życia. U pacjentów z rodzinnym występowaniem jaskry pomiędzy 20 a 30 r. życia (Czechowicz-Janicka 2004). By zbadać struktury gałki ocznej wykorzystuje się funduskamery, biomikroskopy okulistyczne, wzierniki. W związku z rozwijającymi się nowymi teoriami o przyczynach powstawania jaskry, ważne jest zastosowanie technik, które pozwolą na wizualizację tylnego bieguna gałki ocznej. Wykorzystuje się spójne, monochromatyczne promieniowanie laserowe, gdyż umożliwia to pozyskanie dobrej rozdzielczości badanych struktur. Do najnowocześniejszych metod diagnostycznych należą: HRT/HRF – tomograf i przepływomierz siatkówkowy Heidelberg, GDx – analizator włókien nerwowych, OCT – optyczny koherentny tomograf, TopSS – skaningowy oftalmoskop laserowy, RTA – analizator grubości siatkówki (Krajewska 2002).

7. Leczenie

W terapii jaskry bardzo istotne jest jej wczesne rozpoznanie. Pozwala to na jak najdłuższe zachowanie funkcjonalnego pola widzenia i jak najlepszej ostrości wzroku (Kański 2005).

W początkowym postępowaniu w jaskrze korzysta się z farmakoterapii. Celem leczenia jest poprawa odpływu cieczy wodnistej, transportu naczyniówkowo-twardówkowego i zmniejszenie jej produkcji. Grupy leków stosowane w terapii jaskry to: analogi prostaglandyn, leki blokujące receptory β -adrenergiczne, agoniści receptorów α_2 -adrenergicznych, inhibitory anhidrazy węglanowej, parasympatikomimetyki. W sytuacji, gdy farmakoterapia okaże się niewystarczająca by opanować chorobę, wdrażane jest postępowanie chirurgiczne (Mutschler 2010).

Analogi prostaglandyn i prostamidu (trawoprost, tafluprost, latanoprost, bimatoprost) znajdują szerokie zastosowanie w terapii jaskry i stanowią leki pierwszego rzutu w JPOK i innych postaciach z otwartym kątem przesączania. Ich wprowadzenie na rynek w 1996 (pierwszym był latanoprost) zrewolucjonizowało farmakoterapię jaskry. Leki te działają poprzez otwarcie alternatywnej drogi odpływu – drogi naczyniówkowo-twardówkowej, z ominięciem drogi konwencjonalnej, która rozpoczyna się na poziomie beleczkowania. Pochodne prostaglandyn zwiększają odpływ drogą niekonwencjonalną nawet do 50%. Poprzez pobudzenie receptorów prostaglandynowych w ciele rzęskowym powodują przebudowę substancji międzykomórkowej. W ten sposób poszerzają przestrzeń pomiędzy włóknami mięśnia rzęskowego, zwiększając odpływ cieczy wodnistej. Występują doniesienia, iż bimatoprost zwiększa również odpływ cieczy wodnistej drogą konwencjonalną (Górska i in. 2017). Leki z tej grupy osiągają maksimum działania po ok. 8-10 godzinach od podania. Są często stosowane ze względu na wysoką skuteczność hipotensyjną (do 30%), wygodę podawania (aplikacja raz dziennie) i stosunkowo niewielką liczbę efektów niepożądanych. Do działań niepożądanych leków należy wzrost ilości brązowego pigmentu w tęczówce (zmiana barwy tęczówki), uczucie ciała obcego w oku, zmiany rzęs (wydłużenie i ściemnienie), przekrwienie spojówki, obrzęki okołoczołowe oraz obrzęk rogówki (Mutschler 2010). Przeciwskazaniem do stosowania pochodnych prostaglandyn są procesy zapalne oka lub powiek. Z powodu braku wystarczających badań nie jest zalecane stosowanie leków z tej grupy w jaskrze wrodzonej, neowaskularnej i jaskrze z zamkniętym kątem przesączania. Przeciwskazaniem stanowią również stany po przebytych zapaleniach błony naczyniowej, bezsoczewkowość oraz rzekomosoczewkowość. Szczególną uwagę należy zwrócić przy podawaniu leków z tej grupy pacjentom z astmą.

Leki blokujące receptory β -adrenergiczne (β -blokerzy) uważane są za bezpieczne i mają szerokie zastosowanie w terapii jaskry. Najczęściej wykorzystywane są tymolol i betaksolol. Obniżają one ciśnienie wewnątrzgałkowe poprzez hamowanie sekrecji cieczy wodnistej. Maksimum działania osiągają po 2 godzinach od podania. Stosowane są we wszystkich postaciach jaskry. Pomimo stosowania β -blokerów miejscowo, mogą wystąpić typowe dla nich działania niepożądane np. bradykardia, zaburzenia przewodnictwa przedsionkowo-komorowego, dolegliwości astmatyczne (Mutschler 2010). Z tego względu przeciwskazane są przy astmie oskrzelowej, ciężkiej astmie przewlekłej, obturacyjnej chorobie płuc, bloku przedsionkowo-komorowym i bradykardii. Grupę wyłączenia stanowią również pacjenci z niewyrównaną cukrzycą, gdyż istnieje ryzyko maskowania hipoglikemii. Przed wprowadzeniem terapii β -blokerami należy dokładnie zbadać pacjenta i monitorować przebieg leczenia pod kątem wystąpienia ogólnoustrojowych efektów niepożądanych.

W leczeniu jaskry od 1996 r. stosuje się również agonistę receptora α_2 -adrenergicznego – brymonidynę. Jest najbardziej znanym przedstawicielem leków sympatolitycznych. Charakteryzuje się ona większą selektywnością wobec receptorów α_2 -adrenergicznych niż poprzednie leki z tej grupy – klonidyna i apraklonidyna. W związku z tym następuje większa redukcja ciśnienia śródgałkowego, i mniejsza ilość działań ubocznych, które są związane z pobudzeniem receptorów α_1 -adrenergicznych (Górska i in. 2017). Skuteczność hipotensyjna brymonidyny wynosi ok. 25%. Maksimum jej działania występuje po 2 godzinach od podania. Brymonidyna zmniejsza ciśnienie wewnątrzgałkowe poprzez dwa mechanizmy. Na początku zmniejsza wydzielanie cieczy wodnistej, natomiast przy przewlekłym stosowaniu wzmacnia też jej odpływ drogą niekonwencjonalną. Ma słabszy efekt hipotensyjny niż β -blokerzy, ale za to może być stosowana przy towarzyszącej astmie i przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc. Jest to lek dobrze tolerowany i bezpieczny. Miejscowym działaniem niepożądanym może być przekrwienie oraz alergiczne zapalenie spojówek. Ogólne efekty uboczne to: suchość w jamie ustnej, senność i zmęczenie. Warto dodać, że brymonidyna posiada dodatkowo działanie neuroprotektoryjne. W badaniach wykazano, że pobudzając receptory α_2 -adrenergiczne hamuje ekscytotoksyczność

glutaminianu oraz zwiększa syntezę neurotrofin. Przerzywa to kaskadę prowadzącą do apoptozy komórek zwojowych siatkówki (Górska i in. 2017).

Gdy występują przeciwwskazania do stosowania leków z grupy β -blokerów i prostaglandyn, leczenie może być przeprowadzone z użyciem inhibitorów anhidrazy węglanowej. Hamują one proces produkcji cieczy wodnistej w nabłonku ciała rzęskowego i zmniejszają ciśnienie wewnątrzgałkowe o ok. 22% (Misiuk-Hojło i Mulak 2015). W ciągu ostatnich lat pojawiły się nowe preparaty do stosowania miejscowego jako krople oczne – dorzolamid i brinzolamid. Wykazują one mniejszy efekt hipotensyjny niż preparaty stosowane doustnie i dożylnie, ale praktycznie nie mają ogólnoustrojowych działań niepożądanych. Przypuszcza się, że inhibitory anhidrazy węglanowej poprzez wzrost perfuzji w naczyniach tarczy nerwu wzrokowego i siatkówki, mogą wykazywać działanie neuroprotektoryjne. Blokada anhidrazy węglanowej prowadzi bowiem do obniżenia pH, co z kolei powoduje rozszerzenie naczyń krwionośnych (Górska i in. 2017). Ogólnoustrojowo (w postaci iniekcji dożylnych oraz tabletek) stosowany jest acetazolamid. Wskazanie stanowią pacjenci, z ostrym atakiem jaskry, w którym następuje wzrost ciśnienia śródgałkowego spowodowany upośledzonym odpływem cieczy wodnistej z komory tylnej oka, co może spowodować uszkodzenie nerwu wzrokowego, a w konsekwencji utratę widzenia. Inhibitory anhidrazy węglanowej są ogólnie stosowane w atakach jaskry. W przypadku przewlekłego stosowania acetazolamidu mogą wystąpić parestezje w obrębie stóp i dłoni, co jest związane z utratą potasu (który powinien być uzupełniany doustnie). Oprócz tego u pacjentów predysponowanych może wystąpić zespół żołądkowo-jelitowy oraz alergia na sulfonamidy (Niżankowska 2007). W przypadku stosowania dorzolamidu i brynzolamidu wykazano, że najczęstsze działania niepożądane to dyskomfort oczny, który pacjenci definiują jako pieczenie czy klucie. Efekty uboczne obydwu leków są zwykle opisywane jako łagodne i ustępują po zakończeniu terapii. Stwierdzono jednak znacznie lepszą miejscową tolerancję brynzolamidu (Misiuk-Hojło i Mulak 2015).

Do leków stosowanych doraźnie, w stanie ostrym jaskry pierwotnej zamkniętego kąta zalicza się też parasympatykomimetyki, obecnie głównie pilokarpinę. Wywołują one skurcz zwieracza żrenicy i mięśnia rzęskowego. Dzięki temu zwęża się żrenica, rozszerzają przewody odprowadzające ciecz wodnistą i dochodzi do spadku ciśnienia śródgałkowego. Ze względu na liczne działania niepożądane (wzmaganie patomechanizmu choroby, pogorszenie widzenia) wskazanie do doraźnego podania stanowi wyprowadzanie oka ze stanu ostrego ataku jaskry.

Stosowane są również złożone preparaty, zawierające tymolol i jeden z leków należących do powyższych grup (kombinacja β -blokera z analogiem prostaglandyny, blokerem anhidrazy węglanowej czy selektywnym α_2 -agonistą). Ich zaletę stanowi sumowanie efektów obu składników czynnych farmakologicznie i ułatwienie stosowania.

8. Prawidłowa technika dozowania leków

Dotarcie leku do obszaru działania gwarantuje odpowiednia technika podawania substancji. Obszarem działania jest kąt przesączania (położony na obwodzie komory przedniej) lub część wydzielnicza ciała rzęskowego (w komorze tylnej oka). Przy dozowaniu kropli, należy odchylić głowę do tyłu i stworzyć w zewnętrznym kącie oka „kieszonkę”, do której wyciska się jedną kroplę preparatu, zamknąć powieki i unikać mrugania, które uruchamia pompę łzową i zmniejsza ilość substancji na powierzchni gałki ocznej. Palcem wskazującym przytrzymać powiekę i zacisnąć nim woreczek łzowy (na bocznej powierzchni nasady nosa) na 2 minuty. Proces powtórzyć na drugim oku. Jeśli pacjent otrzymuje 2 leki o tej samej porze powinien zastosować 5-minutową przerwę, aby nie wypłukać leku podanego jako pierwszy. Powyższa technika zapobiega również ogólnoustrojowym działaniom niepożądanym leków, które są podawane do oka, co ma szczególne znaczenie w przypadku ich przewlekłego stosowania (Niżankowska 2007).

9. Postępy w terapii jaskry

W 2014 roku został zarejestrowany preparat zawierający brynzolamid i brymonidynę o nazwie Simbrinza. W badaniach nad lekiem, okazało się, że obniża on ciśnienie wewnątrzgałkowe skuteczniej niż oba leki, gdy są podawane osobno. Preparat Simbrinza stanowił odpowiedź na

zapotrzebowanie na lek niezwierający tymololu czy prostaglandyny. Badania kliniczne potwierdziły, że połączenie brynzolamidu oraz brymonidyny było zazwyczaj dobrze tolerowane, a terapia była bezpieczna. Simbrinza stanowi alternatywny lek dla pacjentów z nadciśnieniem ocznym i z jaskrą, którzy potrzebują więcej niż jednego leku, i u których stosowanie tymololu lub prostaglandyn jest niewskazane ze względu na towarzyszące choroby (Misiuk-Hojło i Mulak 2015).

Amerykańska Agencja Żywności i Leków (*Food and Drug Administration*, FDA) w 2017 zaaprobowała dwa leki do leczenia jaskry: netarsulid i latanoprost bunod. Netarsulid jest inhibitorem kinazy Rho i może być stosowany miejscowo w kroplach do oczu. Mechanizm działania leku polega na poprawie odpływu cieczy wodnistej drogą konwencjonalną – poprzez beleczkowanie. Działanie substancji z grupy inhibitorów kinazy Rho jest wysoce zależne od dawki, gdyż w większych stężeniach pojawia się aktywność krzyżowa z innymi szlakami kinazy białkowej, co stanowi efekt niepożądany. Do działań niepożądanych należą najczęściej podrażnienia spojówek.

Latanoprost bunod jest zmodyfikowaną cząsteczką latanoprostu, do której dołączony jest fragment uwalniający tlenek azotu. Indukuje on relaksację cytoszkieletu. Poprzez tą modyfikację, oprócz zwiększania odpływu cieczy wodnistej przez drogę naczyniówkowo-twardówkową, dodatkowo zachodzi poprawa odpływu przez kanał Schlemma i siateczkę beleczkowania.

Dodatkową opcję terapeutyczną jako leczenie uzupełniające stanowi cytykolina. Związek występuje naturalnie w komórkach organizmów żywych, natomiast przemysłowo jest wytwarzana przy użyciu metod biotechnologii. Cytykolina jako prekursor fosfatydylocholino działa neuroprotekcynie, chroni neurony przed toksycznym działaniem glutamianu. Stanowi obiecującą strategię terapeutyczną w jaskrze, gdyż badania dowiodły stabilizację parametrów elektrofizjologicznych i pola widzenia (Szumny 2019). Koncepcja podawania cytykoliny doustnie w postaci tabletki powstała w Klinice Okulistyki Ogólnej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, w zespole kierowanym przez prof. Roberta Rejdaka.

Jako postępowanie uzupełniające u chorych na jaskrę stosuje się przeciwciała o działaniu ukierunkowanym przeciw czynnikowi wzrostu śródbłonna naczyń (*vascular endothelial growth factor*, VEGF). Działanie opiera się na hamowaniu powstawania nowych naczyń i procesu włóknienia. Bewacyzumab to humanizowane przeciwciała monoklonalne klasy IgG1. Ma działanie ukierunkowane przeciw wszystkim izoformom VEGF. Kolejnym lekiem jest ranibizumab, który stanowi fragment wiążący antygen. Bewacyzumab i ranibizumab są stosowane poza wskazaniami rejestracyjnymi u pacjentów cierpiących na jaskrę neowaskularną, aby cofnąć neowaskularyzację tęczówki i kąta tęczówkowo-rogowkowego (Park 2013).

Wśród nowych metod znajduje się też implant trawoprostu – ENV 515, umieszczany w komorze ciała szklatego przy pomocy iniekcji. Próby kliniczne wykazały skuteczną redukcję ciśnienia wewnątrzgałkowego przez okres 6 miesięcy dzięki powolnemu uwalnianiu substancji czynnej (Górska i in. 2017).

10. Podsumowanie

Jaskra jest chorobą spotykaną we wszystkich rejonach świata, a jej podstawowym następstwem, uniemożliwiającym często normalne codzienne życie są ubytki w polu widzenia. Uważa się, że podstawą terapii jaskry są leki prowadzące do obniżenia ciśnienia wewnątrzgałkowego, jak również utrzymywanie go na w miarę stałym poziomie przez całą dobę. Od lat wysiłki naukowców koncentrują się także na poszukiwaniu nowych substancji, które będą skuteczne wobec mniej oczywistych niż ciśnienie śródgałkowe przyczyn jaskry. Nowe leki przeciwjaskrowe powinny charakteryzować się wielokierunkowym mechanizmem działania: obniżać ciśnienie wewnątrzgałkowe, poprawiać przepływ naczyniowy w okolicy głowy nerwu wzrokowego a także wykazywać działanie neuroprotekcyjne, uwzględniając złożoną patofizjologię i potencjalne nowe cele molekularne. Próba odpowiedzi na takie potrzeby są leki, które w ostatnim czasie zostały wprowadzone do lecznictwa: połączenie brynzolamidu oraz brymonidyny, netarsulid, latanoprost bunod, cytykolina, bewacyzumab i ranibizumab.

11. Literatura

- Bulpitt CJ, Hodes C, Everitt MG (1975) Intraocular pressure and systemic blood pressure in the elderly. *Br J Ophthalmol* 59(12): 717–720.
- Cioffi GA (2005) Ischemic model of optic nerve injury. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 103: 592-613.
- Czechowicz-Janicka K (2004) *Medycyna Rodzinna* 7: 61-67.
- Górska M, Terelak-Borys B, Pietruszyńska M i in. (2017) Farmakoterapia jaskry na przełomie XX i XXI wieku – osiągnięcia i nowe możliwości. *Borgis* 30(3): 130-134.
- Hennis A, Wu SY, Nemesure B et al. (2003) Hypertension, diabetes and longitudinal changes in intraocular pressure. *110(5):* 908–914.
- Izdebska J, Tesla P (2000) *Przew. Lek.* 2(10): 88-96.
- Kański J (2005) *Okulistyka Kliniczna*, Wydawnictwo Medyczne Górnicki, 194-228.
- Koc F, Erten Y, Yurdakul NS (2013) Does restoration of binocular vision make any difference in the quality of life in adult strabismus. *Br J Ophthalmol* 97(11): 1425-1430.
- Krajewska M (2002) *Przew. Lek.* 5(1): 88-89.
- Kraśńska B, Kocięcki J, Kraśński Z i in. (2003) Odmienności terapii hipotensyjnej u pacjentów z jaskrą pierwotną otwartego kąta. *Kardiologia polska*, 71(8): 74-869.
- Misiuk-Hojło M, Mulak M (2015) Simbrinza – pierwszy jaskrowy lek złożony bez β -bloker. *2(6):* 110-113
- Mutschler (2010) *Farmakologia i toksykologia*, MedPharm Polska, 195-379.
- Niżankowska MH (2007) *Okulistyka-podstawy kliniczne*. Wydawnictwo lekarskie PZWL, 225–261.
- Olszewska H, Wojciechowska K, Jegier A (2009) Profilaktyka Jaskry. *Medycyna Rodzinna* 2, 29-37.
- Park SC (2013) Anty-VeGF w leczeniu chorych na jaskrę. *Ophthalmology Times Europe* 9(4): 42-45.
- Pogrzebielski A (2013) Badanie kąta przesączania (gonioskopia). https://www.mp.pl/pacjent/badania_zabiegi/68649,badanie-kata-przesaczania-gonioskopia. Dostęp 27.03.2020.
- Quigley HA, Broman AT (2006) The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol* 90(3): 262-267.
- Szumny D (2019) Nowe trendy w farmakoterapii jaskry. *Ophtotherapy* 1(21): 26-29.
- Wong TY, Mitchell P (2007) The eye in hypertension. *Lancet* 369: 425–435.
- Wu SY, Nemesure H, Hennis A (2006) Nine-year changes in intraocular pressure. *124:* 1631–1636.

3. Nieprawidłowości siatkówki w zaburzeniu afektywnym dwubiegunowym – przegląd badań

Bipolar disorder and retinal abnormalities – research review

Adam Domagała

I Klinika Psychiatrii, Psychoterapii i Wczesnej Interwencji, Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Opiekun naukowy: dr hab. n. med. Marcin Olajossy

Adam Domagała: adam.domagala@aol.com

Słowa kluczowe: ChAD, psychiatria, okulistyka, OCT, RNFL

Streszczenie

Zaburzenie afektywne dwubiegunowe zwane również chorobą afektywną dwubiegunową (ChAD), dawniej psychoza maniako-depresyjna czy cyklofrenia, jest przewlekłą chorobą psychiatryczną, która w znaczący sposób zaburza funkcjonowanie i obniża jakość życia. Aktualnie w celu diagnozowania chorób psychicznych stosuje się systemy klasyfikacji zaburzeń psychicznych w postaci DSM lub ICD. Klasyfikacje, mimo że zostały stworzone, aby zapewnić obiektywność i wiarygodność diagnozowania oraz zapewnić możliwość monitorowania przebiegu choroby, w dużym stopniu opierają się na objawach subiektywnych, zgłaszanych przez pacjenta. Z tego powodu cały czas poszukiwane są obiektywne i mierzalne czynniki, które umożliwiłyby obiektywizację diagnozowania i prognozowania chorób psychicznych. Z powodu wspólnego pochodzenia embriologicznego siatkówki i mózgowia, wysnuto przypuszczenie, że zmiany w siatkówce mogą korelować ze zmianami w ośrodkowym układzie nerwowym. Optyczna koherentna tomografia umożliwia zbadanie siatkówki w wysokiej rozdzielczości, dostarczając obiektywnych pomiarów poszczególnych warstw. Poniższa praca prezentuje przegląd uzyskanych wyników, stosując tę metodę u pacjentów cierpiących z powodu ChAD i proponuje możliwe zastosowanie w dalszych badaniach.

1. Wstęp

Zaburzenia psychiczne są aktualnie jedną z głównych, ogólnoswiatowych przyczyn niepełnosprawności, a liczba lat przeżytych w niesprawności (YLD) z tymi schorzeniami jest największa. Biorąc pod uwagę siłę wpływu na populację, liczbę osób dotkniętych problemami psychicznymi można dostrzec jak dużym zagrożeniem dla systemu ochrony zdrowia i zdrowia populacji w ogóle, są zaburzenia psychiczne. Poprawa ogólnej kondycji społeczeństwa będzie możliwa tylko w przypadku, gdy wczesne wykrywanie i leczenie tych schorzeń będzie priorytetem zdrowia publicznego (Whiteford i in. 2013). Problemy psychiczne są powiązane z pogorszeniem jakości życia oraz są istotnie powiązane z wykształceniem innych przewlekłych schorzeń, takimi jak np. cukrzyca czy choroby sercowo-naczyniowe. Aktualnie w celu diagnozowania chorób psychicznych stosuje się systemy klasyfikacji zaburzeń psychicznych w postaci DSM lub ICD. Klasyfikacje, mimo że zostały stworzone, aby zapewnić obiektywność i wiarygodność diagnozowania oraz zapewnić możliwość monitorowania przebiegu choroby, w dużym stopniu opierają się na objawach subiektywnych, zgłaszanych przez pacjenta.

Zaburzenie afektywne dwubiegunowe, zwane również chorobą afektywną dwubiegunową (ChAD), dawniej psychoza maniako-depresyjna czy cyklofrenia, jest przewlekłą chorobą psychiatryczną, która w znaczący sposób zaburza funkcjonowanie i obniża jakość życia. Pacjenci cierpiący z powodu tego schorzenia doświadczają poważnych epizodów zaburzeń nastroju oraz napędu, od wysoce intensywnych (mania) do ekstremalnie niskich (depresja), które potrafią trwać zwykle od kilku tygodni do kilku miesięcy. Chorobowość w populacji ogólnej szacowana jest na około 1% (Merikangas i in. 2011), a od 30% do 50% pacjentów cierpiących z powodu zaburzenia afektywnego dwubiegunowego było nieprawidłowo diagnozowanych w kierunku choroby afektywnej jednobiegunowej inaczej zaburzenia depresyjne nawracające (Akiskal i in. 2000). Wiąże się to z faktem, że często początkowy obraz ChAD rysuje się w postaci epizodu depresyjnego,

a epizody hipomaniakalne, czyli epizody podwyższonego nastroju, które nie zaburzają w znacznym stopniu funkcjonowania jednostki, często nie są przez pacjentów rozpoznawane za objaw patologiczny, lecz okres wyjątkowo dobrego nastroju. Między innymi z tych powodów właściwe rozpoznanie może się opóźnić o wiele lat. Opóźniona diagnoza, zwłaszcza u dzieci i młodzieży, łączy się z gorszym rokowaniem oraz przebiegiem choroby, co skutkuje dłuższymi epizodami chorobowymi oraz większą nawrotowością schorzenia.

(Keshavan i in. 2011) doszli do wniosku, że należy wyznaczyć nowe kierunki w pojmowaniu schizofrenii oraz uaktualnić istotę choroby poprzez uwzględnienie nieznanych wcześniej fenotypów i genotypów. Jednym z zaleceń było wyjaśnienie heterogeniczności schorzeń psychiatrycznych przy pomocy markerów fizjologicznych. To, i reszta zaleceń, również odnoszą się w dużym stopniu do zaburzenia afektywnego dwubiegunowego (Frank i in. 2015). Poza pewnymi istotnymi odkryciami genetycznymi w schizofrenii, niewiele przełomowych prac dotyczących poważnych zaburzeń psychiatrycznych, zostało opublikowanych od czasu stworzenia powyższych zaleceń. Pomimo znaczącej ilości wartościowych badań w zakresie genetyki, farmakologii, neuronauk poznawczych, metod obrazowych, fenomenologii, biologii molekularnej, trzeba przyznać, że dalszy postęp poznawania zwolnił. Jedną z przyczyn spowolnienia postępu może być istotny aspekt nieznanomości dokładnej patofizjologii schorzeń. Tak samo heterogeniczność objawów, przebiegów, rokowań w ChAD, schizofrenii i innych zaburzeniach psychiatrycznych nie zostały dotychczas jasno opisane, usystematyzowane, pomimo powszechnej świadomości, że te choroby we własnych grupach bardzo się różnią.

Faktem jest, że siatkówka rozwija się z tego samego listka zarodkowego, co ośrodkowy układ nerwowy, czyli z ektodermy. Jest to powodem różnych implikacji, takich jak wiele podobieństw w zakresie anatomii, funkcjonowania, odpowiedzi na bodziec. Można powiedzieć, że będąc odseparowaną częścią mózgowia, siatkówka jest „oknem mózgu” (London i in. 2013). Wypustki aksonalne komórek zwojowych siatkówki tworzące warstwę włókien nerwowych siatkówki (RNFL) są dobrym modelem umożliwiającym badanie procesów wpływających na drogi neuronalne w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych. Wspomniane wyżej aksony są niezmielinizowane, co umożliwia obrazowanie tych struktur bez zakłóceń pomiarów spowodowanych obecnością osłonki mielinowej. W ostatnich latach wyżej wymieniona technika była używana w celu badania struktur siatkówki u pacjentów cierpiących z powodu różnych chorób neurodegeneracyjnych, takich jak: choroba Alzheimera, choroba Parkinsona oraz chorób zapalnych, jak stwardnienie rozsiane. Metaanalizy wykazały, u pacjentów cierpiących z powodu wyżej wymienionych chorób istotne zmniejszenie grubości oraz objętości niektórych struktur siatkówki (Kirbas i in. 2013; Petzold i in. 2010).

Optyczna koherentna tomografia (OCT) jest tanią i szybką metodą nieinwazyjnego obrazowania *in vivo* siatkówki, która pozwala uchwycić przekrojowe obrazy siatkówki ze zróżnicowaniem do poszczególnych warstw przy użyciu światła o długości fali bliskiej podczerwonym. Pozwala uzyskać wyniki w dużo wyższej rozdzielczości niż inne metody obrazowania. Jest badaniem łatwym proceduralnie do przeprowadzenia, nie potrzebuje specjalistycznych odczytników, ani specjalnego przygotowania pacjenta. Sama procedura trwa kilka minut i jest całkowicie bezbolesna. W poniższych badaniach autorzy skupiali się głównie na pomiarach poniższych warstw przy pomocy OCT:

Całkowita grubość siatkówki (TR), warstwa włókien nerwowych (RNFL), warstwa komórek zwojowych (GCL), warstwa spłotowata wewnętrzna (IPL), warstwa jądrzasta wewnętrzna (INL), warstwa spłotowata zewnętrzna (OPL), warstwa jądrzasta zewnętrzna (ONL), grubość naczyniówki (CT) oraz kompleks komórek zwojowych (GCC) czyli łączna grubość warstw RNFL, GCL i IPL.

2. Opis zagadnienia

Dokonano przeglądu dostępnych badań, w których wykonywano pomiary przy pomocy metody OCT w populacjach pacjentów cierpiących z powodu zaburzenia afektywnego-dwubiegunowego. Użyto wyrażenia “bipolar disorder” AND “optical coherence tomography OR retinal nerve fiber layer thickness OR macula volume OR ganglion cell layer OR choroidal layer” w wyszukiwarkach portali PubMed i WebofScience. Kryteria, które musiały spełniać artykuły to:

wykorzystanie metody OCT u pacjentów z diagnozą ChAD, język angielski, badania przekrojowe i prospektywne, niezbędne informacje znajdowały się w artykule.

3. Przegląd piśmiennictwa

(Kalenderoglu i in. 2016) Opisano badanie do którego zrekrutowano 43 pacjentów do grupy badanej oraz 43 osoby do grupy kontrolnej. W wynikach zaobserwowano istotną statystycznie grubość RNFL, ale tylko dla wyniku uśrednionego. W poszczególnych sektorach nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic. W pomiarach warstwy komórek zwojowych (GCL) była istotna statystycznie różnica w postaci zmniejszenia grubości tej warstwy ($p=0.000$). Zaobserwowano ujemną korelację pomiędzy czasem trwania choroby a grubością GCL. Dodatkowo stwierdzono korelację pomiędzy stosowaniem kwasu walproinowego a ścieńczeniem RNFL, które było istotnie statystycznie wyraźniejsze w porównaniu do innych leków. Jednakże porównywane grupy były nieliczne (32 VPA: 5 Lit: 6 inne leki). W omówieniu stworzono przypuszczenie, że neurodegeneracja w ChAD zaczyna się GCL.

Badanie (Mehraban i in. 2016) przeprowadzono na 30 pacjentach z rozpoznaniem ChAD oraz porównywalnej wiekowo 30 osobowej grupie kontrolnej. Otrzymane wyniki dla uśrednionego RNFL było istotnie statystycznie obniżone w grupie badanej (99 ± 8 do 106 ± 8 μm ; $p=0.001$). Grubość RNFL w przypadku kwadrantów dolnego, górnego oraz nosowego była istotnie statystycznie mniejsza niż w przypadku grupy kontrolnej (odpowiednio: $p<0.001$; $p=0.040$; $p=0.005$) z tymże pomiary kwadrantu skroniowego nie wykazywały takiej różnicy ($p=0.907$). Poza tym czas trwania choroby wykazywał ujemną korelację z wartością RNFL ($p=0.040$).

W badaniu (Garcia-Martin i in. 2019) zakwalifikowano 30 pacjentów z rozpoznaniem ChAD do grupy badanej oraz 80 zdrowych członków próby kontrolnej. W odniesieniu do parametrów: całkowitej grubości plamki, warstwy włókien nerwu wzrokowego (RNFL), warstwy komórek zwojowych (GCL), warstwy spłotowatej wewnętrznej (IPL) wymiary tych warstw były istotnie statystycznie obniżone w stosunku do wymiarów osób z grupy kontrolnej ($p<0.005$). W przypadku warstwy jądrzastej wewnętrznej (INL) zaobserwowano istotnie statystycznie większą grubość w grupie badanej ($p<0.005$). Ponadto w grupie badanej stwierdzono gorsze widzenie kolorów w porównaniu do grupy kontrolnej (Lanthony's index, $p=0.002$). W tym badaniu autorzy dobrali w ten sposób grupy, aby wyeliminować wpływ nikotynizmu na wyniki badań.

(Polo i in. 2019) Obserwowano 23 pacjentów w grupie badanej oraz 23 osoby w grupie kontrolnej. W grupie badanej stwierdzono istotnie statystycznie mniejszą całkowitą grubość plamki w środku, części wewnętrznej skroniowej, nosowej i dolnej ($p=0.049$; $p=0.045$; $p=0.016$; $p=0.016$). Warstwa komórek zwojowych (GCL) była istotnie statystycznie zredukowana w grupie badanej biorąc pod uwagę poszczególne sektory: górny ($p=0.009$), górno-nosowy ($p=0.009$), dolno-nosowy ($p=0.003$), jak i dolny ($p=0.009$) oraz uśredniony wynik ($p=0.002$). Wykazano również istotne statystycznie zmniejszenie około tarczowej grubości całkowitej siatkówki (średnio $p=<0.001$; górno-skroniowo $p=<0.001$; górno-nosowo $p=0.003$; nosowo $p=0.005$; dolno-skroniowo $p=0.045$) grubości warstwy komórek zwojowych (GCL) (nosowa $p=0.025$) oraz RNFL (średnio $p=0.002$; górno-skroniowa $p<0.001$; górno-nosowa $p=0.045$) w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej. Nie stwierdzono istotnych różnic w grubości naczyńki.

Badanie (Khalil i in. 2017) przeprowadzono na grupie 40 pacjentów grupy badanej oraz 40 członkach grupy kontrolnej. Zaobserwowano istotnie statystycznie mniejszą grubość RNFL dla większości badanych sektorów ($p<0.001$) z wyjątkiem sektorów nosowych. Stwierdzono statystycznie istotnie ścieńczenie warstwy kompleksu komórek zwojowych (GCC) ($p<0.001$). Nie obserwowano istotnych różnic pomiędzy pomiarami OCT a czasem trwania choroby czy wynikami skal YMRS lub HAMD.

(D. H. Khalil i Said 2019) w kolejnym badaniu porównywano 40 pacjentów grupy badanej z rozpoznaniem ChAD do 40 członków grupy kontrolnej. Stwierdzono istotnie statystycznie mniejsze wartości pomiaru GCC uśrednionego oraz lewego górnego sektora ($p<0.001$) w grupie badanej. Wartości RNFL w grupie badanej były istotnie statystycznie niższe w większości sektorów ($p<0.001$) z wyjątkiem sektorów nosowych. Nie wykazano istotnych różnic w wynikach pacjentów

korzystających wcześniej z terapii elektrowstrząsowej. Nie stwierdzono korelacji między czasem trwania choroby, ilością epizodów maniакаlnych, czy depresyjnych a pomiarami OCT.

W badaniu (Bannai i in. 2020) zakwalifikowano 25 pacjentów ze schizofrenią lub zaburzeniem afektywnym dwubiegunowym oraz 15 członków grupy kontrolnej. W badaniu wykorzystano zarówno pomiary OCT oraz rezonans magnetyczny głowy. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic dla wartości RNFL czy GCC czy IPL. Stwierdzono istotnie statystycznie zmniejszenie grubości warstwy jądrazastej zewnętrznej (ONL) (w sektorach prawym skroniowym $p < 0.05$, prawym środkowym $p < 0.05$, lewym górnym) w grupie badanej. Grubość warstwy jądrazastej zewnętrznej (OPL) była istotnie statystycznie większa w grupie badanej ($p < 0.05$). Wykazano korelację pomiędzy ścieńczeniem warstwy ONL, a objętością całkowitą mózgu oraz istoty szarej ($r = -0.53$, $p = 0.008$). Autorzy wskazują na istotną korelację między ostrością wzroku a pomiarami OCT. Badacze proponują hipotezę, iż ścieńczenie ONL, która zawiera czopki i pręciki, może wyjaśniać powiązaną z psychozami utratę fotoreceptorów. Fakt ten pokrywałby się z wynikami badań przeprowadzonymi na podobnych populacjach pacjentów z pomocą ERG. Autorzy sugerują, że dysfunkcje synaptyczne i/lub procesy zapalne powodują zmiany w naczyniach siatkówki i naczyniówki, które to pośrednio wpływają na otrzymywane wyniki w OCT.

W badaniu (Gokcinar i in. 2020) wzięło udział 70 pacjentów z rozpoznaniem ChAD oraz 70 osób z grupy kontrolnej. W grupie badanej zaobserwowano istotne statystycznie ścieńczenie średniego pomiaru około tarczowej RNFL, ($p = 0.033$), średniej całkowitej grubości siatkówki w okolicy około tarczowej ($p = 0.008$) oraz średniej grubości GCC ($p = 0.009$). Zmniejszenie grubości około tarczowej RNFL oraz całkowitej siatkówki było szczególnie zaznaczone w górnych ($p = 0.039$; $p = 0.033$) oraz dolnych kwadrantach ($p = 0.031$; $p = 0.018$). Ścieńczenie GCC było największe w górnej połowie oraz w sektorach nosowych ($p = 0.001$; $p < 0.05$). Mniejsze wartości dla całkowitej plamkowej grubości siatkówki wystąpiły wyłącznie w wewnętrznym, górnym sektorze ($p = 0.014$). Zaobserwowano, że czas trwania choroby był odwrotnie proporcjonalny do wymiarów około tarczowej RNFL, całkowitej grubości siatkówki oraz plamkowego GCC ($p < 0.05$).

4. Podsumowanie i wnioski

Jak wynika z wyżej wymienionych badań u pacjentów z ChAD występuje istotnie ścieńczenie RNFL (Garcia-Martin i in. 2019; Gokcinar i in. 2020; Kalenderoglu i in. 2016; Khalil i Said 2019; Khalil i in. 2017; Mehraban i in. 2016; Polo i in. 2019). Nie udało się uwidocznnić żadnego szczególnego wzorca zależności jeżeli chodzi o konkretne sektory RNFL.

Obserwowano istotne statystycznie zmniejszenie grubości GCL, IPL, i/lub GCC (Garcia-Martin i in. 2019; Gokcinar i in. 2020; Kalenderoglu et al., 2016; Khalil i Said 2019; Khalil i in. 2017; Mehraban i in. 2016; Polo i in. 2019)

W części badań zaobserwowano odwrotną zależność między czasem trwania choroby, a ścieńczeniem poszczególnych warstw, w tym RNFL, GCC, całkowitej grubości siatkówki (Gokcinar i in. 2020; Kalenderoglu i in. 2016; Mehraban i in. 2016), co jednak nie znalazło potwierdzenia we wszystkich badaniach (Khalil i Said 2019; Khalil i in. 2017).

Dostępne badania sugerują, że przebycie terapii elektrowstrząsowej nie powoduje istotnych różnic w pomiarach grupy badanej (Khalil i Said 2019). Również nikotynizm nie tłumaczy różnic pomiędzy grupą badaną a kontrolną (Garcia-Martin i in. 2019). W jednym z badań stwierdzono korelację pomiędzy stosowaniem kwasu walproinowego a ścieńczeniem RNFL, które było istotnie statystycznie wyraźniejsze w porównaniu do innych leków. Jednakże porównywane grupy były niewielkiej liczebności (Kalenderoglu i in. 2016).

Wykazano korelację pomiędzy ścieńczeniem warstwy ONL, a zmniejszeniem objętości całkowitej mózgu oraz istoty szarej. Badacze proponują hipotezę, iż ścieńczenie ONL, która zawiera czopki i pręciki, może wyjaśniać powiązaną z psychozami utratę fotoreceptorów. Fakt ten pokrywałby się z wynikami badań przeprowadzonymi na podobnych populacjach pacjentów z pomocą ERG. Autorzy sugerują, że dysfunkcje synaptyczne i/lub procesy zapalne powodują zmiany w naczyniach siatkówki i naczyniówki, które to pośrednio wpływają na otrzymywane wyniki w OCT (Bannai i in. 2020).

Wyciągając wnioski z powyższych badań należy pamiętać o pewnych ograniczeniach. Aktualnie dostępnych jest niewiele badań poświęconych tej tematyce, zwykle na niewielkich grupach badawczych. Liczebność grup, dobór grupy badawczej, dobieranie adekwatnej grupy kontrolnej, kryteria włączenia i wyłączenia różnią się pomiędzy badaniami. W grupach o niewielkiej liczności, tworzone były liczne podgrupy w celu znalezienia dodatkowych korelacji co tym bardziej zmniejsza siłę statystyczną takich badań.

Sam protokół OCT różni się znacząco pomiędzy różnymi pracami. Podczas gdy mamy dane, że pomiary wykonywane na różnych modelach urządzeń OCT są relatywnie porównywalne (Miller i in. 2020), ciężko dokonać rzetelnej analizy ze względu na bardzo zróżnicowany zakres wykonywanych badań. Wartym byłoby zaproponowanie standardu pomiaru, protokołu badania tak, aby można było dokonywać dokładnych porównań pomiędzy poszczególnymi pracami.

Pamiętając o tym wszystkim, niezaprzeczalnym faktem jest to, że istotnie wynik badania OCT u osób z ChAD świadczy o zmniejszeniu grubości poszczególnych warstw siatkówki. Możliwym jest, że to badanie pomoże zbliżyć nas do wyjaśnienia neurodegeneracyjnej teorii powstania ChAD, lub może znaleźć zastosowanie jako marker prognostyczny, diagnostyczny, czy predykcyjny.

5. Literatura

- Akiskal HS, Bourgeois ML, Angst J i in. (2000) Re-evaluating the prevalence of and diagnostic composition within the broad clinical spectrum of bipolar disorders. *Journal of Affective Disorders*, 59, S5-S30.
- Bannai D, Lizano P, Kasetty M, Lutz O i in. (2020) Retinal layer abnormalities and their association with clinical and brain measures in psychotic disorders: A preliminary study. *Psychiatry Research: Neuroimaging*, 299, 111061.
- Frank E, Nimgaonkar VL, Phillips ML, Kupfer DJ (2015) All the world's a (clinical) stage: rethinking bipolar disorder from a longitudinal perspective. *Molecular Psychiatry*, 20(1), 23-31.
- Garcia-Martin E, Gavin A, Garcia-Campayo J i in. (2019) VISUAL FUNCTION AND RETINAL CHANGES IN PATIENTS WITH BIPOLAR DISORDER. *Retina*, 39(10), 2012-2021.
- Gokcinar NB, Buturak SV, Ozkal F, Ozcicek G i in. (2020) Optical coherence tomography neurodegenerative findings in patients with bipolar disorder. *Asia-Pacific Psychiatry*, EarlyView.
- Kalenderoglu A, Sevgi-Karadag A., Celik M. i in. (2016) Can the retinal ganglion cell layer (GCL) volume be a new marker to detect neurodegeneration in bipolar disorder? *Comprehensive Psychiatry*, 67, 66-72.
- Keshavan MS, Nasrallah HA, Tandon R. (2011) Schizophrenia, "Just the Facts" 6. Moving ahead with the schizophrenia concept: From the elephant to the mouse. *Schizophrenia Research*, 127(1), 3-13.
- Khalil DH, Said MM (2019) Correction: Peripapillary retinal nerve fiber layer and ganglion cell complex degeneration in Egyptian patients with bipolar disorder. *Eye*, 33(12), 1978-1978.
- Khalil MA, Saleh AA, Gohar SM i in. (2017) Optical coherence tomography findings in patients with bipolar disorder. *J Affect Disord*, 218, 115-122.
- Kirbas S, Turkyilmaz K, Tufekci A I in. (2013) Retinal nerve fiber layer thickness in Parkinson disease. *Journal of Neuro-Ophthalmology* 33(1): 62–65
- Kirbas S, Turkyilmaz K, Anlar O i in. (2013) Retinal nerve fiber layer thickness in patients with Alzheimer disease. *Journal of Neuro-Ophthalmology* 33(1): 58–61.
- Mehraban A, Samimi SM, Entezari M i in. (2016) Peripapillary retinal nerve fiber layer thickness in bipolar disorder. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 254(2), 365-371.
- Merikangas KR, Jin R, He JP i in. (2011) Prevalence and correlates of bipolar spectrum disorder in the world mental health survey initiative. *Arch Gen Psychiatry*, 68(3), 241-251.
- Miller M, Zemon V, Nolan-Kenney R. i in. (2020) Optical coherence tomography of the retina in schizophrenia: Inter-device agreement and relations with perceptual function. *Schizophrenia Research*.

- Petzold A, de Boer JF, Schippling S i in. (2010) Optical coherence tomography in multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurology* 9(9): 921–932.
- Polo V, Satue M, Gavin A, i in. (2019) Ability of swept source OCT to detect retinal changes in patients with bipolar disorder. *Eye*, 33(4), 549-556.
- Rodrigo MJ, Vilades E, Orduna E i in. (2019) Neuro-retinal changes and its correlations with visual disturbances in patients with bipolar disorder. *European Neuropsychopharmacology*, 29, S81-S81.
- Whiteford HA, Degenhardt L., Rehm J. i in. (2013) Global burden of disease attributable to mental and substance use disorders: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 382(9904), 1575-1586.

4. Pionierzy kardiologii w Polsce

The pioneers of cardiology in Poland

Gonkowski Ignacy

Katedra Fizjologii i Patofizjologii Collegium Medicum, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Opiekun naukowy: dr hab. Joanna Wojtkiewicz, prof. UWM

Gonkowski Ignacy: gonign@wp.pl

Słowa kluczowe: historia medycyny, kardiologia, biografie

Streszczenie

Współczesna kardiologia jest jedną z ważniejszych dziedzin medycyny obejmującą diagnostykę i leczenie chorób oraz wrodzonych i nabytych wad w obrębie układu sercowo-naczyniowego. Mimo, iż już w starożytności zdawano sobie sprawę z istnienia serca i jego niezmiernie ważnej roli dla utrzymania życia, to jednak narodziny kardiologii w obecnym tego słowa znaczeniu datuje się na II połowę XIX wieku. Celem niniejszego opracowania jest przypomnienie zyciorysów i osiągnięć czterech wybitnych postaci (Józef Struś, Józef Pawiński, Jan Prus i Władysław Janowski), które odegrały znaczącą rolę w rozwoju polskiej kardiologii.

1. Wstęp

Kardiologia to prężny dział medycyny, którego istnienie w obecnych czasach uważane jest za rzecz oczywistą. Termin „kardiologia” pochodzi z języka greckiego, w którym słowo "καρδιά" oznacza serce, a słowo "λόγος" oznacza naukę (Erdman 2010). Jest to dziedzina medycyny zajmująca się diagnostyką oraz leczeniem chorób oraz wad wrodzonych i nabytych występujących na terenie układu krążenia, w tym serca, aorty oraz mniejszych naczyń tętniczych i żylnych. Obecnie kardiologia jest jedną z najważniejszych gałęzi medycyny, która ze względu na coraz częściej występujące schorzenia układu sercowo-naczyniowego wciąż zyskuje na znaczeniu. Obejmuje ona między innymi nie tylko rozpoznawanie i leczenie chorób oraz wrodzonych i nabytych wad układu krążenia, ale także rehabilitację pacjentów z tymi chorobami i wadami, ocenę ich przydatności zawodowej, a także badania układu sercowo naczyniowego przy pomocy całej gamy metod diagnostycznych, takich jak, między innymi, ultrasonografia, elektrokardiografia, echokardiografia czy rezonans magnetyczny (Erdman 2010). Należy zaznaczyć, iż kardiologia jest w obecnych czasach silnie związana z innymi dziedzinami medycznymi, takim jak kardiochirurgia, neurologia, pulmonologia czy angiologia (Erdman 2010). Najważniejsze zagadnienia, którymi obecnie zajmuje się kardiologia to nadciśnienie, choroba niedokrwienna i niewydolność serca, a także zaburzenia rytmu serca (zwłaszcza migotanie przedsionków) oraz choroby zapalne tego narządu (takie jak zapalenie wsierdza, zapalenie mięśnia sercowego) (Erdman 2010). Inne często występujące schorzenia układu sercowo naczyniowego to zmiany w naczyniach tętniczych i żylnych oraz stany chorobowe zastawek serca. Ze względu na to, jak wiele schorzeń wymaga w obecnych czasach opieki kardiologicznej, trudno sobie wyobrazić, iż ta dziedzina medycyny jest stosunkowo młoda i zaczęła się kształtować dopiero w II połowie XIX wieku. Niniejsze opracowanie ma na celu przypomnienie czterech wybitnych postaci (Józefa Strusia, Józefa Pawińskiego, Jana Prusa i Władysława Janowskiego), które miały szczególnie duży wkład w rozwój medycyny kardiologicznej na ziemiach polskich.

2. Opis zagadnienia

Ze znaczenia pracy serca dla utrzymania życia zdawali już sobie sprawę lekarze starożytności. Jednakże ze względu na niski poziom ówczesnej wiedzy dotyczącej budowy i funkcjonowania układu krążenia diagnostyka i leczenie chorób serca i naczyń jako odrębna gałąź medycyny nie istniała (Kuchar i Śródka 1994). Mimo to już 300 lat p.n.e. Herofilos z Chalcedonu skonstruował przyrząd wodny do mierzenia ciśnienia krwi, a Seneka Młodszy (4 p.n.e. - 65 r. n.e.)

opisał objawy zawału serca. Wiele zagadnień w kwestii budowy i czynności układu sercowo-naczyniowego wyjaśnił w swych dziełach Galen, żyjący w latach ok. 130 do 200 n.e. (Kuchar i Śródka 1994). Opisał on między innymi występowanie tętna, fazy cyklu sercowego i podstawy anatomii układu naczyniowego (Kuchar i Śródka 1994). Informacje zawarte w dziełach Galena, które nawiasem mówiąc oparte były głównie na sekcjach wykonywanych na świni domowej i nie zawsze odpowiadały anatomii i fizjologii człowieka, przetrwały do czasów nowożytnych, kiedy to nastąpił znaczny rozwój nauk anatomicznych. Kolejne wielkie odkrycia dotyczące budowy i funkcjonowania układu krążenia, o których należałoby wspomnieć miały miejsce w wiekach XVI, XVII i XVIII. Szczególne zasługi na tym polu położyli Andreas Wesaliusz (1514-1564) – autor znakomitego atlasu anatomicznego, Wiliam Harvey (1578-1657) – autor pierwszego prawidłowego opisu układu krążenia, czy Stefan Hales, który w 1733 roku po raz pierwszy zmierzył ciśnienie krwi metoda inwazyjną (Kuchar i Śródka 1994). Na ziemiach polskich pierwszym autorem, który w swych dziełach wspominał o zagadnieniach kardiologicznych był Tomasz z Wrocławia żyjący w latach 1297-1378. W swym dziele „Practica medicinalis” jeden z rozdziałów poświęcił chorobom serca, w którym opisał słabość tego narządu objawiającą się kołataniem i omdleniem (Kuchar i Śródka 1994). Mimo znacznego rozwoju nauk medycznych i wielu wybitnych naukowców i lekarzy, którzy zajmowali się poprzez wieki diagnostyką i leczeniem chorób serca i naczyń (jak chociażby Józef Struś, którego biografię i osiągnięcia opisuje również to opracowanie), nierzeczywistej kardiologii jako nowoczesnej dziedziny nauk medycznych nastąpiły dopiero w wieku XIX.

3. Przegląd literatury

3.1 Józef Struś

Józef Struś żył w czasach, gdy o pojęciu „kardiologia” nikt jeszcze nie słyszał. Ówczesna medycyna stała na stosunkowo niskim poziomie, opierając się na wywodzącej się jeszcze ze starożytności teorii humoralnej, w której za główną przyczynę choroby uznawano zaburzenie równowagi pomiędzy czterema płynami (czyli humorami) ciała: krwi, żółci, śluzu (flegmy) i czarnej żółci (Brzeziński 1995). Mimo to jednak ten szesnastowieczny humanista i lekarz królewski na dworze Zygmunta Augusta, w pełni zasługuje on na miano pioniera kardiologii ze względu na swoje zainteresowania naukowe. Józef Struś urodził się w 1510 roku w Poznaniu w rodzinie mieszczańskiej (Grzybowski i Sak, 2011). Początkowo uczył się w szkole przy kolegiacie Marii Magdaleny oraz w Akademii Lubrańskiego w swoim rodzinnym mieście (Bugiel 1908a). Następnie podjął studia na Akademii Krakowskiej, otrzymując w roku 1531 tytuł magistra (Grzybowski i Sak 2011). Naukę kontynuował na uniwersytecie w Padwie, gdzie w 1535 roku uzyskał tytuł doktora i profesora nadzwyczajnego medycyny teoretycznej. po ukończonych studiach został wykładowcą padewskiego uniwersytetu (Bugiel 1908b; Grzybowski i Sak 2011). W roku 1537 powrócił do Polski i rozpoczął pracę jako wykładowca medycyny na Akademii krakowskiej. Niedługo jednak powrócił do Poznania i został lekarzem wojewody wielkopolskiego Andrzeja Górki. Następnie został lekarzem na dworze córki króla Zygmunta Starego Izabelli Jagiellonki i jej męża - króla węgierskiego Jana Zapolyi. W 1541 Józef Struś powrócił do Poznania, gdzie dwukrotnie sprawował urząd burmistrza. W 1559 roku został nadwornym lekarzem króla Zygmunta Augusta. W tym czasie uważany nabył za najślawniejszego lekarza w Europie, u którego porad medycznych niejednokrotnie zasięgali władcy europejskich państw (Bugiel 1908c, Bujalowska 1968). Zmarł 27 lipca 1568 w Poznaniu podczas epidemii dżumy zaraziwszy się tą chorobą podczas niesienia pomocy ubogim mieszkańcom miasta (Bugiel 1908 c).

Stałe miejsce w historii kardiologii Józef Struś zawdzięcza swemu dziełu napisanemu po łacinie zatytułowanemu „Sphygmicae artis iam mille ducentos annos perditae et desideratae libri V. (w przekładzie na j. polski tytuł brzmi: „Nauki o tętnie. Książ pięcioro”), a wydanemu w Bazylei w 1555 roku (Grzybowski i Sak 2011; Kuch i Śródka 1994). Jest to pierwsze w dziejach medycyny dzieło w całości poświęcone zagadnieniom związanym z pomiarem tętna jako ważnym czynnikiem diagnostycznym. Co więcej dzieło to jest opracowaniem empirycznym opartym of obserwacje autora poczynione w ciągu długich lat praktyki lekarskiej. Józef Struś wyróżnił pięć podstawowych rodzajów tętna, a mianowicie wielkie, częste, przyspieszone, silne i miękkie, które z kolei dzielił na

wiele odmian (Kuch i Śródka 1994). Ponadto Józef Struś dostrzegł ścisłą zależność pomiędzy istnieniem tętna oraz pracą serca i zakładał (mimo tego, iż nie miał na to dowodów) istnienie nerwów zaopatrujących naczynia i wpływających na napięcie ich ściany (Kuch i Śródka 1994; Grzybowski i Sak 2011). W dziele jego możemy bowiem przeczytać: „Tętno jest właściwą czynnością najpierw serca następnie tętnic, które przez rozkurcz i skurcz znajdują się w ruchu dzięki zdolności witalnej... Przyczyną tętna kurczowego jest kurcz nerwów. Kiedy bowiem kurczą się nerwy, kurczą się tętnice” (Struś 1968). Poza tym autor podejrzewał istnienie aparatu bodźcotwórczego i bodźco-przewodzącego serca w słowach: „W sercu bowiem znajduje się zdolność czyli siła witalna.... W sercu jest ona wrodzona i wszczepiona” (Struś 1968). W swoim dziele Struś podkreśla praktyczne korzyści diagnostyczne, które wynikają z obserwacji tętna, a nawet jako pierwszy przedstawił tętno w formie graficznej (Kuch i Śródka 1994; Grzybowski i Sak 2011). Ponadto można Strusia uważać jako pomysłodawcę wariografu, gdyż jako pierwszy zwraca uwagę na zmiany tętna w zależności od odczuć osoby badanej (Grzybowski i Sak 2011).

Podsumowując, dzieło Strusia miało duże znaczenie dla rozwoju medycyny i można je uważać za pierwsze dzieło w historii polskiej kardiologii. należy zaznaczyć również, iż znalazło ono uznanie wśród współczesnych autorów lekarzy, gdyż pierwsze wydanie dzieła (w liczbie 1000 egzemplarzy) bardzo szybko zostało wyprzedane (Kuch i Śródka 1994).

3.2 Józef Pawiński

Józef Pawiński urodził się 27 stycznia 1851 roku w Zgierzu (Koźmiński 1883; Poradowski 2017). Początkowo uczył się w szkole w Łęczycy, a następnie w gimnazjum w Warszawie. W roku 1869 roku rozpoczął studia na Wydziale medycyny Uniwersytetu warszawskiego Dyplom lekarza otrzymał w roku 1874. po uzyskaniu dyplomu zatrudnił się w Klinice Diagnostycznej Ignacego Baranowskiego – wybitnego diagnostyka i profesora Uniwersytetu Warszawskiego (Koźmiński 1883). W klinice tej najprawdopodobniej zainteresował się zagadnieniami związanymi z diagnostyką i leczeniem chorób serca. W klinice Baranowskiego pracował do roku 1876. W następnych latach w okresie letnim pracował jako lekarz w Zakładzie Przyrodolecznicy Jana Bielińskiego w Nowym Mieście nad Pilicą, a w okresie zimowym wyjeżdżał na staże naukowe za granicę, między innymi do Wiednia, Wurzburga, Berlina i Paryża, gdzie uzupełniał swe umiejętności pod okiem najwybitniejszych lekarzy tego okresu (Biro 1925). W roku 1879 powrócił do Warszawy i podjął pracę w Szpitalu Dzieciątka Jezus. W roku 1883 otrzymał stopień doktora nauk medycznych na podstawie rozprawy zatytułowanej „Badania kliniczne nad arytmia serca w ogóle, a w szczególności przy wadach zastawek” (Kuch i Śródka 1994). Po obronie doktoratu, w 1884 roku Józef Pawiński został ordynatorem oddziału chorób wewnętrznych Szpitala Dzieciątka Jezus, którą to funkcję sprawował do roku 1891. W 1891 roku Józef Pawiński objął stanowisko starszego ordynatora Szpitala Świętego Ducha, a w roku 1923 został mianowany honorowym konsultantem tegoż szpitala (Wagner 1925). Oprócz pełnienia obowiązków zawodowych Józef Pawiński zajmował się badaniami naukowymi, przede wszystkim dotyczącymi nowej dziedziny medycyny jaką wówczas była kardiologia. Przez długie lata prowadził również zajęcia ze studentami medycyny na oddziałach szpitalnych. Wiele czasu poświęcał działalności społecznej i organizacyjnej (Biro 1925). Współredagował i był członkiem komitetów naukowych i redakcyjnych kilku lekarskich czasopism naukowych, takich jak „Gazeta Lekarska”, „Polska Gazeta Lekarska” czy „Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej” (Biro 1925; Wagner 1925). Był członkiem wielu towarzystw lekarskich. Należy tu przede wszystkim wymienić Warszawskie Towarzystwo Naukowe, Towarzystwo Warszawskie Lekarskie, Akademię Nauk Lekarskich w Warszawie, Towarzystwo terapeutyczne w Paryżu, Paryską Akademię Lekarską. Oprócz tego własnymi środkami wspierał rozwój polskiej nauki. W 1912 zadeklarował 10 tysięcy rubli na otwarcie pracowni fizjologicznej i zoologicznej przy Towarzystwie Warszawskim Naukowym. Józef Pawiński zmarł nagle 16 maja 1925 roku w Paryżu podczas konferencji naukowej (Biro 1925).

Jak już wspomniano powyżej pośród wielu zainteresowań zawodowych Józefa Pawińskiego, kardiologia zajmowała miejsce najważniejsze. Spośród 107 jego publikacji naukowych aż 60 dotyczyło zagadnień związanych z chorobami układu sercowo naczyniowego (Biro 1925; Wagner 1925). Józef Pawiński opisał między innymi niemiarywość fizjologiczną serca pojawiającą się

w zależności od ruchów klatki piersiowej, a także porażenie przedsionków występujące przy niemiarowościach (Kuchar i Śródka 1994). Wiele swych publikacji poświęcił „szmerom słyszalnym z odległości”, zaburzeniom rytmu serca oraz wadom układu krążenia, takim jak wady zastawek, połowiczny skurcz serca czy zwężenie naczyń (Kuchar i Śródka 1994). Opisał i udowodnił istnienie szmeru rozkurczowego pojawiającego się w przypadkach zwężenia lewego ujścia żylnego, a będącego wynikiem względnej niedomykalności zastawek półksiężycowatych. Był jednym z pierwszych lekarzy na ziemiach polskich, którzy rejestrowali pracę serca przy pomocy aparatu Antoniego Hołowińskiego, pierścieni świetlnych Newtona oraz mikrofonu (Biro 1925; Kuchar i Śródka 1994). Wiele uwagi Pawiński poświęcał nadciśnieniu tętniczemu oraz działaniu leków na układ krążenia.

3.3 Jan Prus

Jan Prus urodził się 26 stycznia 1859 roku w Wadowicach jako syn kowala Macieja. Po ukończeniu gimnazjum w rodzinnym mieście Jan Prus w roku 1877 rozpoczął studia na Wydziale Medycznym Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Dyplom doktora wszech nauk lekarskich otrzymał 9 maja 1883 roku. Jeszcze podczas studiów medycznych podjął pracę w Katedrze Patologii Ogólnej i Doświadczalnej, którą kontynuował po ukończeniu nauki. Następnie, w 1885, został asystentem w Klinice Chorób Wewnętrznych. Jednocześnie pracował w Zakładzie Anatomopatologicznym oraz Zakładzie Fizjologii, gdzie zetknął się ze światowej sławy naukowcem – pionierem fizjologii w Polsce – prof. Napoleonem Cybulskim. W 1887 Prus otrzymuje stypendium od Wydziału Lekarskiego na dalsze kształcenie. Wyjeżdża do Paryża, gdzie podejmuje pracę w Zakładzie Anatomopatologicznym, a następnie w Klinice Neurologicznej. W tym czasie rozpoczyna też pracę naukową, a wyniki swych badań przedstawia na posiedzeniu Paryskiego Towarzystwa Anatomicznego w czerwcu 1887. W 1889 powraca do polski, gdyż mianowany zostaje adiunktem w Szkole Weterynarii we Lwowie, gdzie prowadzi Katedrę Patologii Ogólnej i Doświadczalnej oraz katedrę anatomii patologicznej. Po pięciu latach pracy, 26 listopada 1894 roku, otrzymuje tytuł profesora Szkoły Weterynarii we Lwowie, a w 1896 zostaje profesorem zwyczajnym patologii ogólnej i doświadczalnej Wydziału Lekarskiego na Uniwersytecie Lwowskim. Na Wydziale Lekarskim pracuje nieprzerwanie do 1918 roku, sprawując w tym czasie funkcje dziekana i prodziekana Wydziału Lekarskiego. W okresie pobytu we Lwowie Jan Prus poświęca się pracy naukowej oraz organizacyjnej. Był między innymi prezesem Galicyjskiego Towarzystwa Weterynarskiego (1895) i Lwowskiego Towarzystwa Lekarskiego (1896). W roku 1918 Jan Prus przeszedł na emeryturę. Na emeryturze prowadził prywatną praktykę neurologiczną. Kontynuował również prace naukowe, utrzymywał liczne kontakty towarzyskie ze znanymi lekarzami (między innymi przyjaźnił się ze sławnym lekarzem Ludwikiem Rydygierem), a także oddawał się swojej pasji – myślistwu. Zmarł nagle na zawał serca 9 listopada 1926 roku podczas polowania w okolicach miasta Dobromil.

Największe znaczenie wśród prac naukowych Jana Prusa miały jego badania dotyczące reanimacji i bezpośredniego masażu serca (Herman 1958; Kuchar i Śródka 1994). Badania te stawiają Jana Prusa w szeregu pionierów kardiologii. W okresie swej pracy w szkole weterynaryjnej we Lwowie Prus wykonywał liczne doświadczenia na zwierzętach, podczas których zaobserwował, iż bezpośredni masaż serca przywraca automatyczną pracę tego narządu (Herman 1958). Ponadto Jan Prus prowadził w tym czasie liczne badania dotyczące prób reanimacji zwierząt poddanych działaniu wielu czynników powodujących zatrzymanie akcji serca, a mianowicie uduszeniu, wykrwawieniu, zatruciu chloroformem czy porażeniu prądem elektrycznym (Herman 1958).

Momentem przełomowym w tych badaniach był dzień 19 stycznia 1900 roku, kiedy to Jan Prus wykonał po raz pierwszy zabieg bezpośredniego masażu odsłoniętego serca z jednoczesnym sztucznym oddychaniem u człowieka zmarłego z powodu uduszenia (Herman 1958; Kuchar i Śródka 1994). Efektem tego zabiegu było uzyskanie śladów miarowych skurczów przedsionków. Jan Prus opisał ten zabieg w artykule „O wskrzeszaniu w przypadkach śmierci z uduszenia, otrucia chloroformem lub rażenia prądem elektrycznym”, który ukazał się w „Przeglądzie Lekarskim” w 1900 roku następującymi słowami: „Przekonawszy się, że odsłonięte serce nie okazuje najłżejszych nawet śladów jakichkolwiek ruchów, ująłem serce w rękę i rozpocząłem mięśnienie serca, podczas gdy

równocześnie zaczęto wtlaczać powietrz do płuc za pomocą mieszka” (Prus 1900). Należy podkreślić, iż Prus był świadomy doniosłości swojego odkrycia gdyż pisał również: „Spostrzeżenie, że serce ludzkie w przypadku śmierci z uduszenia było jeszcze w dwie godziny po śmierci osobnika pobudliwe, jest zdaniem moim, niezwykle doniosłości. Spostrzeżenie to wskazuje, że myśl moja wskrzeszenia zmarłych może się urzeczywistnić” (Prus 1900; Kuchar i Śródka 1994). Metoda bezpośredniego masażu serca wprowadzona przez Prusa zyskała uznanie w Europie. Pierwszy przypadek pomyślnego zastosowania tej metody miał miejsce w roku 1902 i został wykonany przez brytyjskiego lekarza Williama Arbuthnota Lane’a w momencie zatrzymania akcji serca u 65-cio letniego pacjenta podczas operacji zaplenia wyrostka robaczkowego (Prus 1912). Jan Prus w swoim opracowaniu „O pomyślnych wynikach zastosowania mojej metody przywracania życia” wydanym w 1911 roku wymienił 11 przypadków zastosowania bezpośredniego masażu serca zakończonych przywróceniem pacjenta do życia (Prus 1912).

3.4 Władysław Janowski

Władysław Janowski urodził się 31 października 1866 roku w Warszawie (Kryński 1928). W swym rodzinnym mieście ukończył gimnazjum, a w roku 1885 rozpoczął studia na Wydziale Medycyny Uniwersytetu Warszawskiego. Jeszcze podczas studiów rozpoczął pracę naukową w Zakładzie Anatomii Patologicznej pod kierunkiem profesora Brodowskiego, która zaowocowała opracowaniem zatytułowanym „O przyczynach zapaleń ropnych” nagrodzonym medalem Wydziału Medycznego (Kryński 1928). Janowski ukończył studia z wyróżnieniem w roku 1890 i został zatrudniony na stanowisku asystenta w Oddziale Chorób Wewnętrznych. W roku 1893 pełnił obowiązki bakteriologa w urzędzie miasta w Warszawie (Kuch i Śródka 1994), który to urząd delegował go na odbycie stażu zagranicznego w Paryżu i Berlinie (Kryński 1928). Po powrocie do Warszawy na drodze konkursu obejmuje w roku 1899 stanowisko ordynatora oddziału chorób wewnętrznych w Szpitalu Dzieciątka Jezus, na którym to stanowisku pozostaje do końca życia. W czasie pełnienia funkcji ordynatora Janowski łączył pracę zawodową z działalnością naukową i dydaktyczną, a kierowany przez niego oddział staje się jednym z najważniejszych ośrodków wiedzy lekarskiej w Warszawie. Wartościowe prace badawcze sprawiają, że Janowski staje się znanym w całym świecie naukowcem. Otrzymuje liczne propozycje objęcia kierownictwa katedr z ośrodków naukowych, takich jak Uniwersytet Lwowski Uniwersytet Jagielloński, Akademia Weterynarii we Lwowie, a nawet Uniwersytet w Filadelfii (Kryński 1928). Jednakże Janowski nie chce opuszczać swego oddziału. W 1903 roku zostaje doceniony przez Wojskową Akademię Lekarską w Petersburgu, która przyznaje mu tytuł docenta, a w 1923 roku podobny tytuł otrzymuje na Wydziale Medycyny Uniwersytetu Warszawskiego. Wiele czasu poświęcał Janowski pracy organizacyjnej. Był redaktorem i członkiem rady naukowej kilku czasopism lekarskich, takich jak „Pamiętnik Towarzystwa Lekarskiego Warszawskiego”, „Zdrowie” czy „Archiwum Medycyny Wewnętrznej” (Kryński 1928). Był także Janowski jednym z członków – założycieli Towarzystwa Naukowego Warszawskiego. Władysław Janowski zmarł w Warszawie w dniu 11 kwietnia 1928 roku.

Władysław Janowski jest autorem 120 prac naukowych, z których większość dotyczy zagadnień związanych z kardiologią (Kryński 1928). Zajmował się przede wszystkim znaczeniem diagnostycznym badania ciśnienia tętniczego krwi i tętna jednocześnie udoskonalając i upowszechniając tego typu badania (Kuch i Śródka 1994). W kręgu zainteresowań Janowskiego znajdowały się także różne formy niemiarowości serca (Janowski 1911), zagadnienia związane z niedomykalnością zastawek i tętniakami aorty oraz przyczyny twardnienia tętnic (Kuch i Śródka 1994). Opisał także liczne leki stosowane w chorobach kardiologicznych. Zalecał morfinę w niewydolności krążenia z pojawiającymi się dusznościami pochodzenia sercowego, czy salicylany, a dużo uwagi poświęcił także wpływowi salicylanów na układ krążenia (Kuch i Śródka 1994).

4. Podsumowanie

Oczywiście niniejsze opracowanie nie obejmuje opisu wszystkich pionierów polskiej kardiologii. Oprócz wymienionych w niniejszej publikacji, na ziemiach polskich pracowało jeszcze wielu wybitnych medyków, którzy przyczynili się do rozwoju polskiej kardiologii. Między innymi można wymienić tu Jędrzeja śniadeckiego - pioniera reanimacji w Polsce, Józefa Dietla i Ferdynanda

Dworzaczka – propagatorów diagnostyki osłuchowej i opukowej czy Teodora Dunina – autora pionierskich prac o nadciśnieniu (Kuchar i Śródka 1994). Należy pamiętać, że ciężka praca i poświęcenie tych i wielu innych lekarzy sprawiło, że rozwój kardiologii był w ogóle możliwy, a sama kardiologia stała się prężną i jedną z najważniejszych dziedzin medycyny.

5. Literatura

- Biro M (1925) Ś. P. dr Józef Pawiński. Charakterystyka jego działalności. Wraszwskie Czasopismo Lekarskie 8: 362-264.
- Bugiel W (1908a) Nasz najznakomitszy lekarz Odrodzenia Józef Struś (1510-1558) Cz I. Nowiny Lekarskie 20: 455-457.
- Bugiel W (1908b) Nasz najznakomitszy lekarz Odrodzenia Józef Struś (1510-1558). Cz II. Nowiny Lekarskie 20:566-574.
- Bugiel W (1908c) Nasz najznakomitszy lekarz Odrodzenia Józef Struś (1510-1558). Cz III. Nowiny Lekarskie 20:631-638.
- Bugiel W (1908d) Nasz najznakomitszy lekarz Odrodzenia Józef Struś (1510-1558). Cz III. Nowiny Lekarskie 20:686-694.
- Brzeziński T (1995) Historia medycyny. Warszawa, Wydawnictwo Lekarskie PZWL.
- Erdman E (2010) Kardiologia kliniczna tom 1-2. Lublin, Wydawnictwo Czelej.
- Grzybowski A, Sak J. (2011) Józef Struś (1510-1568) jako prekursor współczesnej wiedzy o układzie krążenia w 500. rocznicę jego urodzin Archiwum Historii i Filozofii Medycyny 74: 37-46.
- Herman E (1958) Neurologrzy polscy. Warszawa, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich.
- Janowski W (1911) O różnych postaciach niemiarowości serca z dzisiejszego punktu widzenia. Warszawa, Druk K. Kowalskiego.
- Koźmiński S (1883) Słownik lekarzów polskich obejmujący oprócz krótkich życiorysów lekarzy Polaków oraz cudzoziemców w Polsce osiadłych, dokładną bibliografią lekarską polską od czasów najdawniejszych aż do chwili obecnej. Warszawa, nakładem autora.
- Kryński L. (1928) "Ś. P. Władysław Janowski (ur. 31.X.1866-zm.11.IV.1928)" Rocznik Towarzystwa Naukowego Warszawskiego 21: 168-170.
- Kuch J, Śródka A (1994) Dzieje kardiologii w Polsce. Warszawa. Wydawnictwo Naukowe PWN.
- Bujałowska B. (1968) Józef Struś z Poznania. W czterechsetną rocznicę śmierci lekarza i uczonego epoki Odrodzenia. Poznań, Prezydium Rady Narodowej Miasta Poznania
- Poradowski R (2017) Portrety niepospolitych medyków: Józef Pawiński. <http://panaceum.lodz.pl/portrety-niepospolitych-medykow-jozef-pawinski>. Dostęp: maj 2020.
- Prus J (1900) O wskrzeszaniu w przypadkach śmierci z uduszenia, otrucia chloroformem lub rażenia prądem elektrycznym. Przegląd Lekarski 39: 18-19.
- Prus J (1912) O pomyślnych wynikach zastosowania mojej metody przywracania życia. W: Księga pamiątkowa ku uczczeniu 250-tej rocznicy założenia Uniwersytetu Lwowskiego przez króla Jana Kazimierza r. 1661, T. 2. Lwów, Wydawnictwo Uniwersytetu Lwowskiego
- Wagner K (1925) Ś. P. dr med. Józef Pawiński. Polska Gazeta Lekarska 25:573-574

5. Czynniki wirulencji oraz leczenie infekcji wywołanych przez drożdżaka *Candida albicans*

Virulence factors and treatment of infections caused by the yeast *Candida albicans*

Katarzyna Grygorczuk-Płaneta, Jakub Kordaczuk, Patrycja Kaczmarek

Katedra Immunobiologii, Instytut Nauk Biologicznych, Wydział Biologii i Biotechnologii,
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

Opiekun naukowy: prof. dr hab. Małgorzata Cytryńska

Katarzyna Grygorczuk-Płaneta: grygorczukka@gmail.com

Słowa kluczowe: kandydoza, chorobotwórczość, leczenie.

Streszczenie

W ostatnich latach stale rośnie liczba pacjentów, u których pojawiają się poważne infekcje zwane kandydozami. Czynnikiem etiologicznym są grzyby z rodzaju *Candida*, najczęściej *Candida albicans*. Wzrasta również ilość zakażeń wywołanych przez szczepy lekooporne, które pojawiają się jako skutek uboczny leczenia. Statystyki podają, że ze 150 gatunków grzybów z rodzaju *Candida*, tylko zaledwie 15 uznaje się za chorobotwórcze, występujące u człowieka. Mimo tego, stanowią one istotny problem w leczeniu infekcji, które mogą w znaczny sposób pogorszyć stan chorego, walczącego z innymi schorzeniami. Prozdrowotne bakterie będące częścią prawidłowego mikrobiomu człowieka stanowią czynnik kontrolujący rozwój *C. albicans*, dlatego tak ważna jest suplementacja, dzięki której jest szansa na zachowanie równowagi mikroflory. Jest to jeden z sposobów pośredniej walki z tym oportunistycznym patogenem, a jego złożoność pod kątem wirulencji każe pamiętać o tym, jak ważne jest wielotorowe działanie celem pokonania infekcji.

1. Wstęp

Pierwsze opisy wskazujące na zmiany chorobowe w obrębie jamy ustnej przedstawiające pleśniawki sięgają czasów Hipokratesa. Natomiast dopiero w pierwszej połowie XIX wieku wykazano, że zmiany te mogą być powodowane przez grzyb nazwany wówczas *Oidium albicans*. W 1860 roku został opisany przypadek głębokiej kandydozy, a nazwa *Candida albicans* powstała w 1923 roku. Obecnie wiadomo, że drożdżaki te wchodzą w skład flory fizjologicznej błon śluzowych przewodu pokarmowego, moczowo-płciowego, oddechowego oraz skóry człowieka. Badania pokazują, że u około 50-70% populacji ludzkiej *C. albicans* nie wywołuje żadnych objawów chorobowych. Warunkiem tego stanu jest równowaga na linii patogen-gospodarz, która może zostać zaburzona na skutek długotrwałego przyjmowania antybiotyków o szerokim spektrum przeciwbakteryjnym, radioterapii lub przyjmowania środków antykoncepcji hormonalnej. W grupie ryzyka znajdują się również osoby po zabiegach chirurgicznych, u których doszło do przerwania ciągłości tkanek, a także po innych procedurach medycznych, jak np. cewnikowanie. Wiele czynników fizjologicznych, takich jak ciąża, okres noworodkowy, zaburzenia endokrynologiczne oraz cukrzyca, sprzyja rozwojowi infekcji. Udowodniono także, że dieta bogata w węglowodany stwarza warunki dogodne do rozrostu patogenu w organizmie gospodarza. Osoby w podeszłym wieku są szczególnie narażone na rozwój infekcji tego typu. Czynnikiem, który ma tutaj znaczenie jest tak zwana wielochorobowość – występowanie wielu chorób oraz przyjmowanie w związku z tym różnego rodzaju leków, co ma negatywny wpływ na funkcjonowanie układu odpornościowego. Z tych wszystkich powodów drożdżaki z rodzaju *Candida* są patogenami oportunistycznymi, zaś sam rozwój infekcji może być zapoczątkowany przez wiele czynników (Jopkiewicz 2017; Staniszevska i in. 2014).

2. Opis zagadnienia

2.1 Chorobotwórczość *Candida albicans*

Drożdżaki *Candida* są przyczyną większości kandydoz i stanowią jeden z patogenów najczęściej wykrywanych w próbkach krwi pacjentów. Jako chorobotwórcze dla człowieka opisano

piętnaście gatunków tego rodzaju grzyba. Infekcja przenosi się między pacjentami zazwyczaj drogą kropelkową. Obserwacje prowadzone na przestrzeni ostatnich lat wykazały, że coraz więcej różnych gatunków *Candida* pojawia się w mikroflorze jelitowej, jamy ustnej, czy też pochwy. Są to na przykład *Candida tropicalis* czy *Candida krusei*, ale najczęściej wymieniany jest *C. albicans* (czynnik etiologiczny w 50 – 70% przypadków). Jednoczesną konsekwencją wzrostu naturalnego występowania grzybów *Candida* w organizmie człowieka jest ich przyczynianie się do powstawania kandydoz.

Drożdżycę można podzielić na dwie grupy, ze względu na lokalizację występowania. Pierwszą z nich stanowią kandydozy powierzchniowe. Zlokalizowane są na zewnętrznej stronie owłosionej i nieowłosionej skóry, błonach śluzowych (jama ustna, gardło), paznokciach. Drugim rodzajem są kandydozy układowe, wywołujące szereg reakcji ogólnoustrojowych i obejmujące wiele narządów wewnętrznych. W ciężkich przypadkach może dochodzić do kandydozy uogólnionej, co prowadzi nawet do rozwoju posocznicy (sepsy).

Kandydoza pochwy jest rezultatem działania przede wszystkim *C. albicans*, bowiem w aż ponad 85% wskazywany jest jako patogen odpowiedzialny za zakażenie. Chorobie towarzyszy nienaturalna, biała wydzielina o serowatej konsystencji i nieprzyjemnym zapachu oraz świąd i pieczenie pochwy. Pacjentki uskarżają się także na ból podczas oddawania moczu, ich okolice intymne są zaczerwienione, czemu może towarzyszyć obrzęk. Badania wykazały, że dolegliwość ta może dotyczyć około 25% kobiet w wieku rozrodczym, a u ponad połowy wszystkich kobiet kandydoza pochwy wystąpiła przynajmniej raz w życiu.

Szczególnym rodzajem drożdżycy wywołwanej przez *C. albicans* jest kandydoza jamy ustnej i gardła. U chorych obserwuje się pojawienie miejscowych zaczerwienień z płytkami o białawym zabarwieniu w okolicach błony śluzowej języka i gardła, a choroba może przybierać różną postać. Najczęstszą z nich jest kandydoza rzekomobłoniasta (zwana również wysiękową), ale opisano także przewlekłe i ostre zanikowe zapalenie jamy ustnej, zapalenie kąciaków ust. Ten rodzaj kandydozy może być wczesnym objawem choroby AIDS, bowiem pacjenci z zespołem nabytego niedoboru odporności są w grupie chorych szczególnie zagrożonych.

Zakażenie przełyku spowodowane przez *C. albicans* łatwo rozpoznać, dzięki występującym na błonie śluzowej zaczerwienieniom z biało-żółtawymi płytkami w środkowej i dolnej części przełyku. Nasilenie zmian patologicznych występujących w drożdżycy przełyku opisano dokładniej w klasyfikacji Kodsiego na podstawie badań endoskopowych. W niektórych przypadkach zdarza się, że u zakażonych występują miejscowe owrzodzenia (kandydoza trzeciego i czwartego stopnia). Kandydoza przełyku może być niekiedy rezultatem rozprzestrzeniania się drożdżycy jamy ustnej. Chorzy zgłaszają utrudnione przełykanie pokarmu oraz uczucie bólu podczas przełykania, często obserwuje się u nich podwyższoną temperaturę ciała. Podobnie, jak w przypadku zakażenia jamy ustnej, kandydoza przełyku może być pierwszym sygnałem postępującej choroby AIDS.

Kandydoza żołądka i jelit dotyczy zazwyczaj pacjentów z nowotworami. U pacjentów obserwuje się przede wszystkim owrzodzenia. Znacznie rzadziej odnotowano białawe płytki, czy powierzchowne nadżerki, a w obrębie dwunastnicy pogrubienie fałdów błony śluzowej. W większości przypadków powstają w miejscach zmian patologicznych powstałych przed samym zakażeniem, mają więc charakter wtórny. Pacjenci uskarżają się na dolegliwości, takie jak wymioty i biegunka, wzdęcia i bóle w okolicach brzucha (Paczkowska i in. 2010; Rogalski 2010).

2.2 Czynniki wirulencji *Candida albicans*

Adhezja

Jednym z kluczowych etapów rozwoju drożdżyc jest adhezja komórek *C. albicans* do komórek nabłonkowych. Proces ten rozpoczyna inwazję komórek w głąb tkanki, która podlega zakażeniu. W początkowej fazie adhezji istotną rolę odgrywają siły van der Waalsa, wiązania wodorowe, napięcie powierzchniowe oraz oddziaływania elektrostatyczne. Białkiem, które bezpośrednio przyczynia się do przylegania drożdżaka do komórki gospodarza jest adhezyna. W swojej budowie zawiera ona peptyd sygnałowy zlokalizowany w N-końcowej części cząsteczki, a także region C-końcowy, wiążący kotwiczący w błonie moduł GPI (glikozylofosfatydyloinozytol). N-końcowy odcinek dojrzałego białka, eksponowany do środowiska zewnątrzkomórkowego,

odpowiada za kontaktowanie się z powierzchnią komórki gospodarza. W tym regionie zachodzi modyfikacja poprzez glikozylację.

Do tej pory ustalono, że na proces adhezji ma wpływ wiele czynników środowiskowych, wśród których można wymienić między innymi: temperaturę, pH, rodzaj komórek gospodarza, stężenie cukrów, ilość żelaza oraz dwutlenku węgla. Hydrofobowość grzyba oraz jego łańcuch powierzchniowy również jest istotny przy oddziaływaniu na linii adhezyjna - receptor. Mannan jest jednym ze składowych ściany komórkowej *C. albicans*, natomiast istnieją doniesienia mówiące o tym, że za adhezję do komórki gospodarza odpowiadają także modyfikowane przez mannozylację białka. Badania dowodzą, że zahamowanie procesu mannozytacji wpływa na wzrost hydrofobowości, a co za tym idzie wzrasta również zdolność adhezji komórek *Candida* spp. do tkanek gospodarza. Udowodniono także, że odwrócenie tego procesu - zwiększona mannozylacja białek znacząco zmniejsza adhezję drożdżaka do tkanek nabłonkowych oraz do plastikowych narzędzi medycznych.

Niektóre gatunki *Candida* spp. wchodzą w międzygatunkowe interakcje, które ułatwiają ich bytowanie w mikroflorze bakteryjnej. Bakterie, takie jak *Streptococcus* spp., *Fusobacterium* spp., *Staphylococcus* spp. i *Actinomyces* spp. tworzą z drożdżakami *Candida* wielogatunkowy biofilm, którego złożoność może być dodatkowym czynnikiem utrudniającym leczenie.

Pleomorfizm

Jedną z cech charakterystycznych *C. albicans* jest zdolność do występowania w postaci czterech różnych form morfologicznych: blastokonidiów (komórek pączkujących), pseudostrzępek (łańcuchów wydłużonych komórek), postaci kielkującej (*germtube*), a także strzępek prawdziwych (nitkowate struktury bez widocznej granicy między komórkami). Zjawisko zmienności morfologicznej nazwane zostało pleomorfizmem. Każdy ze wszystkich przedstawionych rodzajów morfologicznych pełni inną rolę w procesie ustanawiania i późniejszego rozwoju infekcji. Blastokonidia są związane z wczesną fazą zakażenia – dzięki nim dochodzi do kolonizacji tkanek gospodarza. Wprowadzone bezpośrednio do krwiobiegu, ze względu na swój niewielki rozmiar, są efektywnie rozsiewane, co daje początek wielu infekcjom układowym. Natomiast aktywna penetracja w głąb tkanek zależna jest od wydłużających się strzępek grzybni. Długość strzępek prawdziwych nie są sprawnie rozprowadzane z prądem krwi, ponadto udowodniono, że formy nitkowate silniej przylegają do komórek nabłonka jamy ustnej niż blastokonidia. Specyficzność szczepowa, morfogeneza, a także wiele czynników środowiskowych ma istotny wpływ na zawartość węglowodanów w ścianie komórkowej grzyba. Dowiedziono, że strzępki charakteryzują się kilkukrotnie wyższą zawartością mannozy w ścianie komórkowej w porównaniu do blastokonidiów. Zaś wśród czynników, które indukują powstawanie strzępek wyróżniamy: niskie stężenie tlenu, temperatura powyżej 35°C, pH poniżej 6,5, a w warunkach laboratoryjnych podłoża wzrostowe dla drożdży zawierające prolinę, alkohol i surowicę (podłoża YEPD, Sabouraud).

Proteazy aspartyłowe

Drożdżaki *Candida* wytwarzają szereg enzymów hydrolitycznych, które pełnią istotną rolę w patogenezie. Ich działanie umożliwia i ułatwia adhezję komórek grzyba do powierzchni tkanek. Dzięki hydrolizowaniu wiązań peptydowych jest możliwa także dalsza kolonizacja błon śluzowych oraz ich głębsza penetracja. Wreszcie, dzięki nim degradacja komórek odpornościowych oraz przeciwciał ułatwia rozprzestrzenianie się zakażenia. Wśród enzymów, które biorą udział w tych procesach wyróżniamy: lipazy, fosfolipazy oraz proteazy aspartyłowe (Sap) – i to one zasługują na największą uwagę. Pełnią one istotną rolę w tworzeniu strzępek prawdziwych, zmienności fenotypowej oraz adhezji. Istnieje kilka rodzajów Sap, są one kodowane przez rodzinę 10 genów (*SAP1-10*). Poszczególne izoenzymy różnią się między sobą budową, preferencjami substratowymi, ładunkiem elektrostatycznym oraz optimum pH. Dane literaturowe donoszą, że hydrolityczne działanie proteaz aspartyłowych jest kolejnym czynnikiem ułatwiającym rozprzestrzenianie się oraz rozwój infekcji. Warto zaznaczyć fakt, że poszczególne proteazy Sap pełnią inną rolę, która jest zależna od rodzaju, a także miejsca infekcji. Izoenzymy kodowane przez geny *SAP1-3* biorą udział w zakażeniach powierzchniowych objawiających się jako kandydoza jamy ustnej lub pochwy. Sama zaś ekspresja genów zachodzi głównie w blastokonidiach. Izoenzymy Sap4-6 biorą udział w zakażeniach systemowych, a także degradują przeciwciała układu odpornościowego, co prowadzi

do uniknięcia odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Dzięki temu infekcja może przez dłuższy czas rozwijać się niezauważona, a jej późniejsze wykrycie następuje z większymi trudnościami w leczeniu. Rola izoenzymów Sap7 i Sap8 nie została jeszcze jednoznacznie określona, natomiast wstępne badania pokazują duży wkład obu izoenzymów w zakażeniach krwi. Ponadto, Sap8 prawdopodobnie bierze udział w tworzeniu biofilmów. Izoenzymy Sap9 oraz Sap10 zlokalizowane są w błonie lub w ścianie komórkowej grzyba za pomocą kotwicy GPI. Są one ściśle związane z utrzymaniem integralności błony i ściany komórkowej. Ponadto, są istotne dla podziałów komórkowych i biorą udział w adhezji (Staniszewska i in. 2012; Petkowicz i in. 2006).

2.3 Leczenie kandydoz powierzchniowych oraz układowych

Infekcje powodowane poprzez rozrost grzybni *C. albicans* są szeroko rozpowszechnione i stanowią poważny problem w medycynie. Pomimo tego faktu, istnieje niewielka ilość terapeutyków, które charakteryzują się wysoką skutecznością w walce z tymi drożdżakami. Wśród nich wyróżniamy: antybiotyki polienowe (w tym amfoterycyna B oraz nystatyna), azole (ketokonazol, flukonazol, rawukonazol), fluorowe pochodne pirymidyny (flucytozyna) oraz echinokandyny (kaspofungina). Najstarszymi i jednocześnie najczęściej stosowanymi lekami są antybiotyki polienowe. Nystatyna ma szerokie spektrum działania, natomiast jest nierozpuszczalna w wodzie. Wobec tego jest stosowana jako miejscowy lek przeciw grzybicom powierzchniowym występującym na skórze oraz w obrębie błony śluzowej przewodu pokarmowego. Amfoterycyna B (AMB) jest częstym lekiem z wyboru w przypadku kandydoz układowych. Charakteryzuje się szerokim spektrum działania, wysokim stopniem rozprzestrzeniania w tkankach. Wykazuje się wysoką cytotoksycznością, a jej okres półtrwania jest dość długi (ok. 20-24h). Ten antymikotyk zaburza integralność błony, co skutkuje ucieczką składników komórkowych na zewnątrz. Dzieje się tak, ponieważ amfoterycyna B łączy się z ergosterolem błony komórkowej grzyba. Z tego powodu lek ten wykazuje wysoką toksyczność, ponieważ łączy się ze sterolami w błonach również innych komórek, powodując śmierć części tkanek zdrowych. Prowadzi to do powstania szeregu działań niepożądanych – u części pacjentów po wykonaniu wlewu obserwuje się spadek ciśnienia tętniczego krwi, dreszcze, gorączkę, a także duszności. Poważnym skutkiem ubocznym jest upośledzenie czynności nerek, które objawia się po dłuższym stosowaniu amfoterycyny u niemalże wszystkich chorych. Mogą także pojawić się zaburzenia metaboliczne na skutek uszkodzenia wątroby oraz głęboka hipokaliemia i hipomagnezemia. Z tych powodów trwają prace badawcze nad stworzeniem alternatywnej formy amfoterycyny B, która będzie charakteryzowała się niższą cytotoksycznością. Obecnie wprowadzono do leczenia preparat lipidowy AMB. Z uwagi na to, że działa on podobnie jak preparat konwencjonalny, można stosować go w większych dawkach lub przez dłuższy czas, nie wywołując przy tym działań niepożądanych, takich jak uszkodzenie nerek. Do lipidowych form amfoterycyny B zaliczamy preparat AmBisome, Amphocil - kompleks z siarczanem cholesterolu, występujący w postaci zawiesiny koloidalnej oraz Abelcet będący kompleksem lipidowym. Spośród wymienionych typów amfoterycyny najmniej działań niepożądanych związanych z nefrotoksycznością, a także infuzją leku przejawia forma liposomalna. W latach 80 XX w. wprowadzono azole jako kolejną metodę walki z kandydozami powierzchniowymi i układowymi. Wykazują się mniejszą toksycznością niż AMB oraz mają działanie grzybobójcze w stosunku do *Candida* spp. Mechanizm ich działania opiera się na hamowaniu syntezy ergosterolu w błonie komórkowej grzybów. Na skutek tego, dochodzi do gromadzenia się wewnątrz komórki prekursorów ergosterolu i w końcu uszkodzenia struktury i funkcji błony. Flukonazol jest jednym z najczęściej stosowanych preparatów z tej grupy. Istnieją dwie drogi jego przyjmowania: pozajelitowa oraz doustna. Działania niepożądane występują stosunkowo rzadko, natomiast jednym z powtarzających się problemów są zaburzenia ze strony układu pokarmowego, wynikające z drogi podania terapeutyku. Może być także obserwowany przejściowy stan podwyższonego stężenia enzymów wątrobowych. Flukonazol jest bardzo często stosowany jako lek w profilaktyce zakażeń *C. albicans* u osób chorych z neutropenią i poddawanych immunosupresji. Echinokandyny są kolejną grupą leków stosowanych w walce z drożdżakami *Candida* spp. Skutki uboczne obserwuje się niezwykle rzadko, a wśród działań niepożądanych można wymienić: bóle głowy, wymioty, nudności, wysypkę, gorączkę, zapalenie żył, hemolizę, wyrzut histaminy oraz toksyczność względem wątroby.

Kaspofungina jest nowym przedstawicielem tej grupy leków, a jej mechanizm działania polega na hamowaniu syntezy β -D-glukanu znajdującego się w ścianie komórkowej grzyba. Skutkuje to utratą integralności komórkowej, co prowadzi do lizy. Kaspofungina podawana jest wyłącznie w postaci dożylniej, ponieważ nie wchłania się z przewodu pokarmowego. Działania niepożądane mogą w tym przypadku objawiać się jako zapalenie żył, gorączka oraz bóle głowy. W związku z tym, że źle penetruje do tkanek i płynu mózgowo-rdzeniowego, nie jest dobrym lekiem przeciw drożdżycom głębokim, w tym obejmujących ośrodkowy układ nerwowy (OUN). Chętnie jest stosowana przy leczeniu infekcji u osób, które wymagają podawania leków immunosupresyjnych po przeszczepie narządów, ponieważ kaspofungina nie wchodzi w interakcje z lekami metabolizowanymi przez wątrobowy cytochrom P450. Flucytozyna, należąca do fluorowych pochodnych pirymidyny, jest lekiem, który ze względu na wąskie spektrum działania oraz fakt, że wiele szczepów nabywa wobec niego oporność, nie jest tak chętnie wybierany w profilaktyce lub leczeniu (Staniszewska i in. 2014; Paczkowska i in. 2010; Biliński i in. 2008).

3. Podsumowanie

Drożdżak *C. albicans* jest oportunistycznym patogenem, który w ostatnich latach coraz częściej jest powodem wielu infekcji. Pomimo intensywnych badań nad mechanizmami powstawania zakażeń, kandydozy są nadal poważnym problemem w medycynie. *Candida* wytwarza wiele czynników wirulencji, które pozwalają na sprawną i efektywną kolonizację, penetrację tkanek oraz rozprzestrzenianie się w organizmie gospodarza, powodując rozwój zakażenia, które początkowo ma niewielkie rozmiary. Kolejnym problemem, który powstaje w związku z infekcjami jest zwiększona oporność szczepów na stosowane antymikotyki. Natomiast leczenie infekcji *Candida* można prowadzić wieloma sposobami, szczególnie u chorych z upośledzeniem odporności – stosuje się wówczas leczenie profilaktyczne, empiryczne, wyprzedzające oraz celowane. Rodzaj stosowanej terapii uzależniony jest od stanu zdrowia chorego, rodzaju patogenu oraz rozległości zmian zapalnych. Leczenie profilaktyczne stosuje się w przypadku chorych z grupy najwyższego ryzyka, aby zminimalizować ryzyko zachorowania, a tym samym pogorszenia stanu zdrowia. Terapia empiryczna wybierana jest u chorych z neutropenią w stanie podwyższonej gorączki, pomimo stosowania antybiotyków o szerokim spektrum działania. Stosuje się ją nawet pomimo braku obrazu klinicznego jednoznacznie wskazującego na kandydozę. Terapia celowana stosowana jest w przypadku potwierdzenia, za pomocą badań dodatkowych, zakażenia grzybiczego. Wszystkie te strategie dają zwiększoną szansę na powodzenie w walce z rozwijającą się infekcją. Trwające badania nad wirulencją oraz patogenezą *Candida* spp. dają nadzieję na znalezienie w przyszłości leku, który będzie precyzyjniej skierowany przeciw konkretnym czynnikom zjadliwości. Dodatkowo, nowo nabyta wiedza da szansę na opracowanie preparatu, który nie będzie powodował wielu skutków ubocznych niekorzystnie działających na osłabiony innymi chorobami organizm.

4. Literatura

- Biliński P, Seferyńska I, Warzocha K (2008) Diagnostyka i leczenie układowych zakażeń grzybiczych w onkohematologii. *Via Medica* 4: 15–24.
- Gow NAR, Hube B (2012) Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Current Opinion in Microbiology* 15:406–412.
- Jopkiewicz S (2017) Suplementacja wspomagająca profilaktykę i leczenie kandydozy. *Hygeia Public Health* 52(2): 126-130.
- Paczkowska I, Wójtowicz A, Malm A (2010) Wybrane aspekty farmakoterapii kandydoz. *Terapia i Lek*, Tom 66, nr 8.
- Petkowicz B, Skiba-Tatarska M, Wysokońska-Miszczuk J (2006) Kandydoza jamy ustnej. *Gerontologia Polska* tom 14, nr 4, 160–164.
- Rogalski P (2010) Kandydoza przewodu pokarmowego – fakty i mity. *Gastroenterologia Kliniczna* tom 2, nr 3, 87–97.
- Staniszewska M, Bondaryk M, Kowalska M i in. (2014) Patogeneza i leczenie zakażeń *Candida* spp. *Postępy Mikrobiologii* 53, 3, 229-240.
- Staniszewska M, Bondaryk M, Piłat J (2012) Czynniki zjadliwości *Candida albicans*. *Przegląd epidemiologiczny*, 66: 629 – 633.

6. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe jako przyszłe terapeutyki

Antimicrobial peptides as future therapeutics

Katarzyna Grygorczuk-Płaneta, Jakub Kordaczuk, Patrycja Kaczmarek

Katedra Immunobiologii, Instytut Nauk Biologicznych, Wydział Biologii i Biotechnologii,
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

Opiekun naukowy: prof. dr hab. Małgorzata Cytryńska

Katarzyna Grygorczuk-Płaneta: grygorczukka@gmail.com

Słowa kluczowe: AMP, terapeutyki bakteriobójcze.

Streszczenie

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMPs - antimicrobial peptides) to cząsteczki, które w ostatnich latach zyskały na popularności. W dobie powszechnej antybiotykoterapii mamy coraz częściej do czynienia ze szczepami opornymi na tradycyjne strategie terapeutyczne. Wiele badań wskazuje, że istnieją związki, które mogą stać się wzorcami do opracowania nowego typu cząsteczek, z myślą o zastąpieniu stosowanych do tej pory preparatów. Naukowcy badają działanie przeciwdrobnoustrojowych peptydów kationowych, które charakteryzują się selektywnością w stosunku do komórek bakteryjnych, a także są w stanie uszkadzać komórki rosnące w formie biofilmu prowadząc do ich śmierci. AMPs działają bakteriobójczo, zarówno wobec bakterii Gram-ujemnych, jak i Gram-dodatnich oraz grzybobójczo. Wykazują działanie antywirusowe, a także neutralizujące toksyny. Charakteryzują się szerokim spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej, a u człowieka stanowią pierwszą linię obrony jako efektory odporności nieswoistej. Wykazują działanie synergistyczne, chronią naturalną mikroflorę przed patogenami oraz pasożytami. Wykazano również ich aktywność chemotaktyczną wobec limfocytów T oraz neutrofilii. Indukują procesy angiogenezy i gojenia ran (Witkowska i in. 2008).

1. Wstęp

AMPs zostały odkryte i po raz pierwszy opisane w latach 80 ubiegłego stulecia u zranionych płazów – żab oraz ropuch. Po uszkodzeniu ich skóry dochodziło do wydzielania substancji, które zabijały drobnoustroje. Nazwano je magaininami, a opisany wówczas mechanizm ich działania polegał na przyłączeniu się do komórek drobnoustrojów, co prowadziło do uszkodzenia ich błon komórkowych. Dalsze badania wykazały funkcjonalne pokrewieństwo pomiędzy magaininami a substancjami wykrytymi u innych gatunków, m.in. defensynami ssaków, tioninami roślin, tachyplezynami skrzypłoczy i cekropinami ciem. Tego typu cząsteczki opisano u bakterii, roślin, bezkręgowców, kręgowców, a wśród nich u człowieka. Umocniło to hipotezę o tym, że peptydy kationowe stanowią element najstarszych mechanizmów obronnych przedstawicieli Prokaryota i Eukaryota (Wiechuła i in. 2006). Obecnie poznano sekwencję 3180 peptydów przeciwdrobnoustrojowych, a informacje na temat aktualnej liczby poznanych peptydów znajdują się na stronie aps.unmc.edu/AP/. Klasyfikacja peptydów jest niezwykle trudna ze względu na zróżnicowanie sekwencji i struktury cząsteczki. Ich wspólne cechy to: niewielkie rozmiary, ładunek dodatni oraz amfipatyczność. Cząsteczki peptydów zazwyczaj zawierają 2-9 ładunków dodatnich. Za dodatni ładunek peptydu odpowiada duża zawartość aminokwasów zasadowych (lizyna, arginina, histydyna) oraz brak lub niewielka ilość aminokwasów o charakterze kwasowym (kwas asparaginowy lub kwas glutaminowy). Wśród peptydów przeciwdrobnoustrojowych są też cząsteczki o charakterze anionowym. Do rodziny peptydów przeciwdrobnoustrojowych zaliczono peptydy, które w swojej cząsteczce zawierają 12-50 aminokwasów i mają masę cząsteczkową 3-10kDa. Do AMPs zaliczane są również cząsteczki, których masa przekracza 20kDa (np. attacyny owadów).

2. Opis zagadnienia

2.1 Klasyfikacja peptydów przeciwdrobnoustrojowych

Ze względu na różnorodność budowy cząsteczek peptydów, ich klasyfikacja jest niezwykle trudna, natomiast najczęściej cytowana w literaturze jest ta przedstawiona przez Brodgena (Brodgen, 2005), który zaproponował podział peptydów na pięć podgrup:

- A. Liniowe kationowe peptydy α -helikalne: zbudowane zazwyczaj z mniej niż 40 reszt aminokwasowych. Silnie oddziałują na bakterie Gram-ujemne oraz Gram-dodatnie. W środowisku wodnym ich cząsteczki wykazują nieuporządkowanie, zaś w obecności liposomów lub błon zbudowanych z fosfolipidów uzyskują strukturę α -helisy.
- B. Peptydy anionowe, bogate w kwas asparaginowy i glutaminowy. Występują w stężeniach milimolowych np. m.in. w surfaktancie płucnym u ssaków.
- C. Peptydy kationowe o dużej zawartości jednego z aminokwasów. Wśród nich wyróżnia się peptydy o dużej zawartości proliny (40—57 % peptydu), argininy (13—33 % peptydu), fenyloalaniny (19 % peptydu), glicyny oraz tryptofanu. Niektóre z tych peptydów mogą mieć strukturę α -helisy.
- D. Peptydy anionowe i kationowe zawierające reszty cysteinowe, o strukturze stabilizowanej mostkami dwusiarczkowymi. Największa grupa AMPs, w której cząsteczki peptydów stabilizowane są mostkami S-S. W cząsteczce peptydu może występować 1-3 lub więcej mostków S-S. Mogą tworzyć struktury β oraz α -helisy.
- E. Peptydy anionowe i kationowe będące fragmentami większych białek (Janiszewska 2014; Wiechuła i in. 2006).

2.2 Przykłady peptydów przeciwdrobnoustrojowych

- A. Cekropiny – należą do α -helikalnych peptydów przeciwdrobnoustrojowych występujących głównie u owadów. Pierwszy raz opisano je u ćmy *Hyalophora cecropia*. Zbudowane są z 29-42 aminokwasów, ale nie zawierają metioniny oraz cysteiny. W obecności fosfolipidów, trifluoroetanolu, lipidu A i dodecylosiarczanu sodu przybierają właściwą im konformację zbudowaną z dwóch α -helis połączonych ruchomym zawieszem. Wykazują aktywność głównie wobec bakterii Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnych. Znanych jest kilka grup cekropin: A, B, D, E oraz P1 różniące się sekwencją aminokwasów. Ich wspólną cechą jest obecność tryptofanu na pierwszym lub drugim miejscu w N-końcowej części cząsteczki, a także grupy amidowej na C-końcu. Cekropiny działają cytolitycznie w stosunku do niektórych linii komórek nowotworowych – te należące do grupy cekropin A i B wykazują toksyczność wobec komórek raka pęcherza moczowego.
- B. Defensyny – rodzina małych (3-5kDa) peptydów kationowych, które w swojej strukturze zawierają 29-42 aminokwasów. W sekwencji mają 6 reszt cysteinowych związanych mostkami dwusiarczkowymi. Wykazują silne działanie przeciw bakteriom, grzybom, a także wirusom osłonkowym. Są istotnym elementem pierwszej linii obrony przeciwzakaźnej u ssaków oraz wielu innych organizmów. Wśród nich wyróżniamy 5 grup: defensyny kręgowców, np. defensyny ssaków: α -, β -, θ -, a także defensyny bezkręgowców i roślin. U człowieka występuje kilka różnych defensyn, które w zależności od sekwencji i struktury cząsteczki zaliczamy do jednej z dwóch grup: α -, β -. Ludzkie defensyny α mają mostki dwusiarczkowe znajdujące się pomiędzy cysteinami w pozycjach 1 i 6, 2 i 4 oraz 3 i 5. Do tej grupy zaliczamy HNP-1,2,3,4 (*human neutrophil peptides*), które wytwarzane są w komórkach neutrofilii, oraz defensyny HD-5,6 (*human defensins*) wytwarzane w komórkach nabłonkowych dróg rozrodczych kobiet oraz komórkach Paneth'a w jelicie cienkim. Są syntetyzowane konstytutywnie i magazynowane. W defensynach β człowieka, mostki dwusiarczkowe formują się pomiędzy cysteinami w pozycjach 1–5, 2–4 i 3–6. Charakteryzuje je większa różnorodność miejsca wytwarzania. HBD-1 (*human beta-defensin*) syntetyzowana jest w komórkach nabłonkowych dróg moczowych, łożyska, płuc, nerkach, trzustce, tchawicy oraz w prostaty. HBD-2 wytwarzane są w komórkach nabłonkowych dróg moczowo-płciowych, płuc oraz skóry. HBD-3

produkowana jest w komórkach nabłonkowych nosa, trzustki, oskrzeli i migdałków. HBD-4 powstaje w jądrach, nerkach, macicy i żołądku. Ten typ defensyn jest wytwarzany po indukcji przez np. LPS lub cytokiny (INF- γ , TNF, IL-1 β).

Defensyny θ wytwarzane są przez monocyty oraz leukocyty niektórych małą, natomiast gen, który koduje ich wytwarzanie odkryto także u człowieka. W jego sekwencji znajduje się jednak przedwczesny kodon „stop” co w konsekwencji powoduje zahamowanie procesu translacji

(Mizerska-Dudka i in. 2011).

- C. Dermicydyna – należy do peptydów anionowych. Występuje w gruczołach potowych u człowieka w stężeniach milimolarnych. Podczas wytwarzania potu prekursor dermicydyny jest w nim rozpuszczany, natomiast jego późniejsza obróbka proteolityczna prowadzi do powstania dojrzałego peptydu o długości 47 aminokwasów. Wydzielana na powierzchnię skóry działa bakteriobójczo, a także grzybobójczo – głównie w kierunku drożdżaka *Candida albicans*.
- D. Laktoferycyna – jest to peptyd powstający w wyniku obróbki proteolitycznej laktoferyny, glikoproteiny o masie 80 kDa, która wiąże cząsteczki Fe⁺. Z tego względu laktoferycyna zaliczana jest do grupy AMPs, które są fragmentami większych białek. Powstaje np. w żołądku na skutek hydrolizy laktoferyny przez kwaśną peptydazę (pepsynę). Laktoferycyna jest obecna w dużych ilościach w neutrofilach, ślinie, mleku, łzach, a także w wydzielinie śluzowo-surowiczej okrężnicy. Ludzka laktoferycyna zbudowana jest z 49 aminokwasów, a jej strukturę stabilizują dwa mostki dwusiarczkowe. Pełni bardzo ważną rolę w odporności wrodzonej będąc jednym ze składowych pierwszej linii obrony przeciwko patogenom wnikającym do wnętrza organizmu przez błony śluzowe. Badania wykazały, że laktoferycyna B, będąca pochodną laktoferyny bydłczej, ma działanie przeciwnowotworowe wobec wielu rodzajów nowotworów, między innymi skutecznie działa w walce z białaczką.
- E. Abecyna (ang. *abaecin*) – przedstawiciel rodziny peptydów z dominującą liczbą określonego aminokwasu. Abecyna występuje w hemolimfie pszczoł i jest bogata w prolinę.

2.3 Mechanizmy działania peptydów przeciwdrobnoustrojowych

Przeciwdrobnoustrojowe działanie peptydów kationowych możliwe jest dzięki oddziaływaniu elektrostatycznemu zachodzącemu między dodatnio naładowanymi peptydami, a ujemnie naładowanymi błonami komórek mikroorganizmów. Przyłączenie AMPs do kwasów tejchojowych i peptydoglikanu w przypadku bakterii Gram-dodatnich lub lipopolisacharydu w przypadku Gram-ujemnych, skutkuje wytworzeniem porów, dezintegracją osłon komórkowych, a w konsekwencji śmiercią komórek bakteryjnych.

Wśród mechanizmów oddziaływania peptydów przeciwdrobnoustrojowych z błonami wyróżnić można cztery podstawowe rodzaje:

- A. Mechanizm „klepek beczki” (barrel stave), w którym α -helikalne cząsteczki peptydów gromadzą się w błonie w kierunku prostopadłym do dwuwarstwy białkowo-lipidowej. AMPs układają się w wiązki, przypominając beczkę zbudowaną z klepek i tworzą w ten sposób kanały, w których hydrofobowe części helisy przylegają do lipidów błonowych, a regiony hydrofilowe skierowane są w stronę światła kanału. Na skutek utworzenia transmembranowych kanałów dochodzi do zaburzenia homeostazy komórki bakteryjnej i wycieku zawartości komórki do otoczenia.
- B. Mechanizm „dywanowy” (carpet mechanism). W tym przypadku peptydy nie przenikają przez błonę, lecz kumulują się równolegle do jej płaszczyzny. AMPs układają się na membranie wykorzystując oddziaływania elektrostatyczne, dzięki czemu powstaje dywan pokrywający jej powierzchnię. Po osiągnięciu wystarczająco dużego stężenia, peptydy doprowadzają do zniszczenia struktury błony przez rozrywanie wiązań lipidowych. W rezultacie z pozostałości dwuwarstwy tworzą się micle (działanie podobne, jak w przypadku detergentów) i zawartość komórki wylewa się na zewnątrz.
- C. Mechanizm „pierścieniowy” (toroidal pore model), zwany jest też mechanizmem „kanałów toroidalnych”. Peptydy kationowe ustawiają się prostopadle do płaszczyzny błony

i przenikają ją, tworząc w błonie komórki bakteryjnej kanały, co przypomina model klepek beczki. Jednak, zamiast ściśle ustawiać się równolegle do cząsteczek fosfolipidowych, AMPs powodują zagięcie jednej z warstw do wewnątrz. Dzieje się tak dzięki amfipatyczności cząsteczki peptydu - hydrofobowa część peptydu oddziałuje z ogonami, hydrofilowa zaś z głowami fosfolipidów. Powstała szczelina utworzona jest zarówno przez cząsteczki peptydu, jak i głowy lipidowe.

- D. Mechanizm „nieuporządkowanych kanałów pierścieniowych” (disordered toroidal pore model) lub „nieuporządkowanych kanałów toroidalnych”, to sposób ułożenia w błonie peptydów przeciwdrobnoustrojowych podobny do pierścieniowego. Różnica polega na tym, że zamiast prostopadłego ustawienia agregatów peptydów w membranie komórkowej, mamy do czynienia z ustawieniem cząsteczek peptydów pod różnym kątem. Fosfolipidowe głowy dwuwarstwy skierowane są ku światłu szczeliny, a konsekwencją powstania porów jest ostatecznie śmierć komórki.

Destrukcyjne możliwości AMPs obejmują jednak nie tylko niszczenie osłon komórkowych i tworzenie kanałów transmembranowych. Kiedy peptydy przeciwdrobnoustrojowe znajdują się we wnętrzu komórki, są w stanie sprawnie zaburzać jej prawidłowe funkcjonowanie. Hamują syntezę białek, kwasów nukleinowych, czy też składników ściany komórkowej. Wszystkie te mechanizmy mają na celu zaburzenie homeostazy i doprowadzenie do śmierci patogenu (Janiszewska 2014, Żyłowska i in. 2011, Mizerska-Dudka i in. 2011).

2.4 Wykorzystanie peptydów przeciwdrobnoustrojowych w profilaktyce, terapii oraz przemyśle

Wiele poznanych do tej pory drobnoustrojów wykształciło szereg mechanizmów obronnych, które pozwalają na uniknięcie ataku. Odkryto jednak, że proces nabywania oporności drobnoustrojów wobec AMPs jest niezwykle powolny. Zmiany w obrębie oddziaływań na linii patogen-peptyd znajdują się po obu stronach. Porównując czas ekspozycji drobnoustrojów na peptydy odpornościowe, który można liczyć od początku powstania organizmów wytwarzających AMPs, do czasu intensywnego oddziaływania z antybiotykami (około 80 lat), a także biorąc pod uwagę częstość tych interakcji, można stwierdzić, że oporność patogenów na peptydy odpornościowe jest stosunkowo niewielka. Skuteczność naturalnych peptydów odpornościowych związana jest z ich lokalizacją – do miejsca infekcji przyciągane są liczne leukocyty, zawierające szereg peptydów, które już w pierwszych momentach walki z patogenami mogą przeciw nim działać. Wiele bodźców zakaźnych stymuluje ekspresję peptydów w komórkach nabłonkowych, przeciwdziałając tym samym przeniknięciu patogenów przez barierę skóry i rozwinięciu zakażenia. Wiele badań podkreśla fakt, iż dożylnie podanie peptydów nie byłoby wystarczająco skuteczne, m.in. ze względu na możliwość degradacji proteolitycznej. Zatem wykorzystanie peptydów przeciwdrobnoustrojowych ogranicza się do stworzenia preparatów o działaniu miejscowym w postaci maści, kremów lub żeli. Obecnie wiele źródeł podaje, że trwają badania kliniczne nad wykorzystaniem peptydów odpornościowych w taki właśnie sposób. Znany jest już preparat o nazwie Pexiganan (Cytalex=MSI-78), który został opracowany w oparciu o magaininę żaby *Xenopus laevis*. Ma wysoką skuteczność w walce z wielobakteryjnym zakażeniem stopy cukrzycowej. Omiganan (MBI-226) jest preparatem zawierającym analog indolicydiny bydlęcej. Daje korzystne efekty przy leczeniu zakażeń związanych ze stosowaniem cewników. MBI 595AN – wytwarzany także w oparciu o bydlęcą indolicydynę, wykorzystywany jest jako preparat na zakażenia trądzikowe. Iseganan (IB-367) produkowany jest na bazie syntetycznej proteogryny (peptyd występujący w leukocytach świń) do wykorzystania w leczeniu przewlekłych infekcji płuc u pacjentów cierpiących na mukowiscydozę. Również w przypadku schorzeń obejmujących śluzówkę jamy ustnej uzyskano obiecujące rezultaty. Preparat o nazwie P113D opracowany na bazie ludzkiej histatyny wspomaga leczenie kandydozy rozwijającej się w jamie ustnej. W ostatnich latach powstała szansa na stworzenie nowoczesnej metody leczenia. Jest nią terapia genu z wykorzystaniem peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Polega ona na wprowadzeniu genu ludzkiej beta-defensyny-2 za pomocą wektora retrowirusowego do hodowli komórkowej. Hodowla ta jest wyprowadzana z kilku mysich i ludzkich linii komórkowych a także komórek pierwotnych (w tym fibroblasty, komórki nabłonka, ślinianki,

komórki T). Dzięki temu uzyskujemy wzrost aktywacji przeciwdrobnoustrojowej. Daje to szansę na stosowanie terapii genowej, której następstwem jest wzmożenie ekspresji peptydów podczas zakażenia. Wirusowy transfer genu jest o wiele efektywniejszy niż jego bezpośrednie umieszczenie w genomie, natomiast rodzi to pewne komplikacje w postaci powstawania potencjalnego stanu zapalnego, który może być powodowany obecnością wirusa. Skutek ten można zmniejszyć podając jednocześnie w diecie przypuszczalny regulator wydzielania peptydów przeciwdrobnoustrojowych, dzięki czemu wzrasta odporność gospodarza. AMPs są często wykorzystywane również w wielu gałęziach przemysłu, między innymi w diagnostyce oraz immunoprofilaktyce weterynaryjnej. Ich syntetyczne odpowiedniki służą między innymi do produkcji szczepionki przeciwko parwowirowi, grypie, polio, HIV, a także zapaleniu wątroby typu C. Peptydy produkowane przez bakterie kwasu mlekowego (LAB, ang. *lactic acid bacteria*) są szeroko rozpowszechnione w procesach obróbki żywności. Z ich użyciem wzrasta trwałość produktów spożywczych a także udowodniono, że związki te mają istotny wpływ na redukcję biozanieczyszczenia. Stwierdzono, że LAB produkowały peptydy, które hamowały wzrost *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* oraz *A. hydrophila*. (Janiszewska 2014; Bagnicka i in. 2011; Mirski i in. 2011).

3. Podsumowanie

Wszystkie żywe organizmy potrzebują sprawnie działających mechanizmów obronnych, by móc skutecznie walczyć z patogenami, na działanie których są stale narażone. Peptydy kationowe działają na pierwszej linii obrony przeciwwakażnej i występują zarówno u Eukaryota, jak i Prokaryota. Dzięki swemu szerokiemu spektrum działania, różnorodności pod względem struktury i mechanizmów destabilizacji homeostazy komórki patogenów, AMPs są godnym uwagi obiektem dalszych badań naukowych, jako związki o wysokim potencjale terapeutycznym. Dają one szansę na opracowanie preparatu, który okaże się być skuteczniejszy wobec mikroorganizmów opornych na część stosowanych już antybiotyków. Należy tu zwrócić uwagę, że w kolejnych latach liczba nowych opracowanych antybiotyków zmniejsza się - w latach 1983—1987 opracowano 16 substancji, w latach 1993—1997 — 10, w latach 1998—2002 — 7, a w latach 2008—2012 opracowano już tylko 2 substancje o działaniu antybiotycznym. W szpitalach pojawiły się wielooporne szczepy drobnoustrojów, między innymi: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*. Odsetek opornych szczepów MRSA (ang. methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) wzrósł z 36% w 1992 roku do 62% przez kolejnych 10 lat. Zaletą peptydów odpornościowych jest ich relatywnie niska cytotoksyczność wobec komórek eukariotycznych, a także niska oporność bakterii na te substancje. Wiele najnowszych badań pokazuje skuteczność klasycznej antybiotykoterapii w połączeniu z AMPs. Tak skonstruowane terapie mogą okazać się skuteczne nie tylko w leczeniu infekcji, które obecnie sprawiają wiele problemów natury medycznej, ale także dzięki nim możliwa będzie bardziej efektywna profilaktyka.

4. Literatura

- Bagnicka E, Strzałkowska N, Józwiak A i in. (2011) Peptydy przeciwdrobnoustrojowe w zwalczaniu patogenów opornych na powszechnie stosowane antybiotyki. *Medycyna Weterynaryjna* 64(8).
- Brodgen KA (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology* 3, 238-250.
- Cytryńska M (2013) Czy peptydy przeciwdrobnoustrojowe zastąpią antybiotyki. *Zakażenia* 2, 12-17.
- Cytryńska M, Zdybicka-Barabas A (2015) Defense peptides: recent development. *BioMolecular Concepts* 6, 4, 237-251.
- Janiszewska J (2014) Naturalne peptydy przeciwdrobnoustrojowe w zastosowaniach biomedycznych. *Polimery* 59, nr. 10.
- Mirski T, Gryko R, Bartoszcze M i in., 2011, Peptydy przeciwdrobnoustrojowe – nowe możliwości zwalczania infekcji u ludzi i zwierząt. *Medycyna Weterynaryjna* 67(8).
- Mizerska-Dudka M, Andrejko M, Kandefer-Szerszeń M (2011) Przeciwwirusowe peptydy kationowe człowieka i owadów. *Postępy Mikrobiologii* 50, 3, 209–216.

- Wiechuła B.E, Tustanowski J.P, Martirosian G (2006) Peptydy antydrobnoustrojowe. *Wiadomości Lekarskie* LIX, 7-8.
- Witkowska D, Bartyś A, Gamian A (2008) Defensyny i katelicyny jako naturalne antybiotyki peptydowe. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 62: 694-707.
- Zdybicka-Barabas A, Stączek S, Cytryńska M (2017) Różnorodność peptydów przeciwdrobnoustrojowych bezkręgowców. *Kosmos* 66, 4, 563-574.
- Żyłowska M, Wyszynska A, Jaguszyn-Krynicka E.K (2011) Defensyny – peptydy o aktywności przeciwbakteryjnej. *Postępy Mikrobiologii* 50, 3, 223–234.

7. Terapia z wykorzystaniem wirusów onkolitycznych - innowacja w leczeniu chorób nowotworowych

Oncolytic virotherapy - an innovation in cancer treatment

Kaczyńska Agnieszka ⁽¹⁾, Wieteska Małgorzata ⁽¹⁾, Gorecka Adrianna ⁽¹⁾, Zaremba Bartłomiej ⁽²⁾

⁽¹⁾ Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Epidemiologii i Metodologii Badań Klinicznych, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽²⁾ Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Psychologii Stosowanej, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Agnieszka Kaczyńska: agaagnieszkakk@gmail.com

Słowa kluczowe: innowacyjne technologie, terapia przeciwnowotworowa, terapia wirusowa

Streszczenie

Wirusy znane są głównie jako cząstki onkogenne. Już na początku XX wieku zainteresowanie naukowców wzbudziły remisje chorób nowotworowych u pacjentów, którzy przebyli infekcje wirusowe lub przyjęli szczepionki. Rozkwit biologii molekularnej oraz inżynierii genetycznej, który nastąpił na początku XXI wieku pozwoliły na lepsze poznanie struktury i działania wirusów. Badania wykazały, że istnieją gatunki mające duże znaczenie w zwalczaniu komórek nowotworowych.

Celem niniejszej pracy jest zwięzłe wyjaśnienie działania wirusów onkolitycznych oraz przedstawienie perspektyw związanych z ich użyciem.

Działanie wirusów bazuje na utraceniu przez komórki nowotworowe mechanizmów przeciwwirusowych. Dzięki temu cząstka z łatwością wnika do docelowych komórek i łączy się z ich materiałem genetycznym. Namnażając się, hamuje ekspresję białek gospodarza i jednocześnie produkuje własne substancje stymulujące układ immunologiczny do odpowiedzi przeciwnowotworowej. Na drodze modyfikacji genetycznych wirusy tracą geny umożliwiające replikację w zdrowych komórkach, dzięki czemu są bezpieczne dla organizmu. Możliwe jest także wyposażenie wirusa w specyficzne sekwencje DNA pozwalające na produkcję substancji toksycznych.

Obecnie prowadzone są badania nad wdrożeniem terapii. W 2015 FDA zatwierdziło pierwszy wirus onkolityczny (T-VEC) stosowany w leczeniu czerniaka nieoperacyjnego z przerzutami.

Podsumowując, terapia wykorzystująca wirusy onkolityczne jest obiecującą metodą leczenia nowotworów. Możliwe, że w ciągu najbliższych lat zostaną zarejestrowane kolejne terapie.

1. Wstęp

Nowotwory są obecnie jedną z najczęstszych przyczyn śmierci zarówno w populacji polskiej jak i światowej. W ciągu ostatnich trzech dekad zachorowalność na wszystkie nowotwory wzrosła ponad trzykrotnie. Najczęstszym nowotworem występującym u mężczyzn jest rak płuca, natomiast u kobiet 1/5 wszystkich nowotworów stanowi rak piersi. U obu płci duże znaczenie przypisuje się rakowi jelita grubego oraz czerniakowi. Zarówno u kobiet jak i u mężczyzn, ryzyko zachorowania na raka zwiększa się wraz z wiekiem, osiągając szczyt w 8 dekadzie życia. Niepokojącym trendem jest wzrost umieralności na nowotwory złośliwe. W ciągu ostatnich 50 lat wzrosła ona ponad 2,4-krotnie.

Opisana sytuacja epidemiologiczna wymaga od naukowców opracowania nowoczesnych metod wczesnej diagnostyki nowotworzenia oraz skutecznych terapii wydłużających przeżycie lub pozwalających na całkowite wyleczenie. Aktualnie stosowane metody leczenia to przede wszystkim chemioterapia z użyciem cytostatyków, chirurgiczne usunięcie zmian nowotworowych, hormonoterapia oraz radioterapia. Te konwencjonalne terapie w wielu przypadkach cechuje niska skuteczność oraz skłonność do nawrotu choroby. W XXI wieku rozkwit inżynierii genetycznej oraz biologii molekularnej pozwolił na lepsze poznanie mechanizmów odpowiadających za kancerogenezę. Jednocześnie coraz bardziej zaawansowane metody badawcze umożliwiły

poznanie budowy i fizjologii wirusów. Stwierdzono, że występują gatunki nie tylko onkogenne, ale także onkolityczne. Dane te stworzyły podstawę do badań nad immunoterapią nowotworów. W prezentowanej pracy zostały omówione zagadnienia dotyczące działania i wykorzystania wirusów onkolitycznych.

2. Opis zagadnienia

Wirusy onkolityczne to zrekombinowane genetycznie lub naturalnie występujące cząstki, które replikują się w komórkach nowotworowych niszcząc je, jednocześnie nie wykazując znaczącego negatywnego oddziaływania na zdrowe tkanki. Pierwsze doświadczenia z użyciem omawianych wirusów przeprowadzono już na początku XX wieku. W 1912 roku przedstawiono interesujący przypadek pacjentki chorej na raka szyjki macicy, u której zaobserwowano regresję nowotworu po podaniu atenuowanej szczepionki na wściekliznę. W 1949 roku podjęto próbę leczenia chłoniaka Hodgkina za pomocą cząstek wirusa zapalenia wątroby (Power et al. 2007). W kolejnych latach podejmowano się wyzwania opracowania nowej metody leczenia wykorzystującej wirusy, jednak badania kliniczne nie przynosiły oczekiwanych rezultatów. W wielu próbach udawało się wykażać remisję nowotworu po zastosowaniu terapii wirusowej, jednak po pewnym czasie obserwowano nawroty choroby lub rozwój chorób wirusowych znacznie pogarszających stan ogólny pacjentów lub prowadzących do zgonu. Dopiero na początku XXI wieku rozkwit biologii molekularnej pozwolił na pogłębienie wiedzy dotyczącej zależności między komórkami nowotworowymi, a cząstkami wirusa.

Wirusy onkolityczne można podzielić na dwie grupy: naturalnie występujące RNA wirusy (VSV, Reowirusy) oraz genetycznie zmodyfikowane DNA wirusy (HSV, Adenowirusy). Inżynieria genetyczna pozwala na stworzenie wirusów dobrze tolerowanych, skoncentrowanych na namnażanie w określonych typach komórek nowotworowych, a także bezpiecznych i dostarczanych do organizmu za pomocą różnorodnych metod.

3. Przegląd literatury

3.1 Działanie wirusów onkolitycznych

Działanie wirusów onkolitycznych polega na wykorzystaniu niedoskonałości komórek nowotworowych. Dzięki utracie przez nie funkcji obronnych wirus z łatwością penetruje do ich wnętrza, a następnie powiela swój materiał genetyczny. Produkując swoiste białka stymuluje reakcję zapalną, a jednocześnie hamując wytwarzanie białek gospodarza prowadzi do śmierci komórek nowotworowych.

Tropizm do komórek nowotworowych i łączenie się z materiałem genetycznym gospodarza

Rekombinacja genetyczna wirusów oraz gatunkowe preferencje niektórych z nich powodują ich wybiórcze łączenie się z komórkami. Specyficzne receptory obecne na błonach komórek nowotworowych służą wirusom onkolitycznym do ich rozpoznawania. Przykładowo wirus Polio rozpoznaje cząsteczki CD155 na komórkach glejaka wielopostaciowego, natomiast wirus świnki został zmodyfikowany genetycznie tak, aby rozpoznawać receptor dla urokinazy obecny na komórkach nowotworów złośliwych (Denniston et al. 2016). Jednocześnie mechanizmy unikania układu odpornościowego wytwarzane podczas procesu nowotworzenia pozwalają na dogodny rozwój wirusa. W prawidłowej komórce istnieje szereg mechanizmów obronnych. Interferony alfa i beta indukują przeciwwirusową odpowiedź, aktywując szlak JAK-STAT. Jednym z genów szlaku jest enzym aktywujący rybonukleazę, która degraduje RNA wirusa, natomiast dsRNA-zależna kinaza białkowa hamuje syntezę białka, blokując replikację cząstki w zakażonej komórce. W komórkach nowotworowych opisany szlak sygnałowy zostaje wyłączony, ponieważ w fizjologicznych warunkach wykazuje on działanie nie tylko przeciwwirusowe, lecz również przeciwnowotworowe (Patel et al. 2019). Teteryny dzięki hydrofilowym końcom łączą się jednocześnie z błoną komórkową i pączkującym wirusem, co prowadzi do zatrzymania jego uwalniania. W komórce nowotworowej wyżej wymienione mechanizmy nie istnieją lub ich działanie jest upośledzone. Dzięki temu materiał genetyczny infekującej cząstki z łatwością łączy się z DNA komórki gospodarza i namnaża się

z większą efektywnością niż w zdrowych tkankach. Ponadto wprowadzenie specyficznych genów do RNA wirusów (w tym przypadku Adenowirusów) hamuje ekspresję onkogenów jednocześnie hamując produkcję białek komórki nowotworowej i wzrost guza.

Aktywacja odpowiedzi immunologicznej

Podstawową metodą aktywowania odpowiedzi immunologicznej przez wirusy onkolityczne jest uruchomienie reakcji odpornościowej w odpowiedzi na obecność samego wirusa w środowisku nowotworu. W następstwie namnażania wirusa w komórkach gospodarza, organizm odczytuje masę guza jako zainfekowaną. Uruchomiona zostaje odpowiedź odpornościowa, miano cytokin prozapalnych rośnie i aktywuje komórki NK, APC oraz limfocyty T. Przebiegająca w otoczeniu masy nowotworowej reakcja zapalna znacząco osłabia tkankę guza i hamuje jej wzrost (Marelli et al. 2018). Należy pamiętać, że jednocześnie podczas zapalenia obniża się poziom namnażania cząstek wirusa, co może prowadzić do paradoksalnego obniżenia skuteczności terapii. Dlatego w trakcie leczenia należy skupić się na wypośrodkowaniu stopnia nasilenia zapalenia. Ponadto badania wykazały, że opisana odpowiedź odpornościowa wytwarza trwałą pamięć immunologiczną, co może chronić organizm gospodarza przed nawrotem nowotworu (Bell et al. 2016). W przypadku wirusów modyfikowanych genetycznie do ich materiału genetycznego zostaje wprowadzony transgen zawierający informacje dotyczące produkcji prozapalnych cytokin lub ligandów stymulujących odpowiedź immunologiczną. Podczas namnażania się wirusów produkowane są białka odpowiedzialne za powstanie procesu zapalnego (ludzki TNF, GM-CSF, IL-7, IL-12, IFN-beta i inne). Przykładowo genetycznie modyfikowany Adenowirus stymuluje TLR9, co skutkuje wzmocnieniem wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej oraz odpowiedzi przeciwnowotworowej. Jednakże badania wykazały, że istnieją także modyfikacje genetyczne negatywnie oddziałujące na organizm chorego. Ekspresja przez cząstkę wirusa IL-12 skutkowała licznymi efektami ubocznymi (Poutou et al. 2015).

Indukcja śmierci komórek nowotworowych

Komórki nowotworowe wykształcają mechanizmy modyfikujące lub hamujące szlaki apoptotyczne. Ponad 50% nowotworów występujących u ludzi wywołuje nadekspresję białek antyapoptotycznych takich jak Bcl-2, Bcl-XL oraz inhibitory kaspaz (Singh et al. 2012). Niektóre wirusy onkolityczne powodują śmierć komórek nowotworowych z użyciem procesów, które nie zostały osłabione przez nowotworzenie. Przykładem jest parwowirus H-1PV, aktualnie będący niedawno w II fazie badań klinicznych nad leczeniem nieoperacyjnego gruczolaka przewodowego trzustki. Wirus kieruje komórki raka na szlak niezależny od kaspaz, w którym istotną rolę odgrywa katepsyna D trawiąca białka struktury guza. Mechanizm ten jest immunogeny i prowadzi do wzrostu poziomu Interferonu-gamma i cytokin prozapalnych co może skutkować wzmocnieniem odpowiedzi przeciwnowotworowej (Angelova et al. 2014.). Istnieją wirusy indukujące apoptozę poprzez wprowadzenie do komórek nowotworowych genów samobójczych (Howells et al. 2017). Przykładowo niektóre adenowirusy zostały zmodyfikowane do ekspresji kinazy tyrozynowej HSV-1. Podczas zainfekowania komórki nowotworowej aktywują analogi tymidyny przekształcając je w monofosforany, które są następnie włączane do DNA replikującej się komórki. Prowadzi to do zakończenia łańcucha, nieukończenia syntezy nici DNA, a następnie śmierci komórki (Sokołowski et al. 2015). Prowadzone badania dążą do uzyskania jak największej swoistości terapii poprzez wykorzystanie specyficznych dla typu nowotworu promotorów. Uzbrajanie wirusów onkolitycznych genami samobójczymi wyposażonymi w promotory zwiększa ich zdolność do bezpośredniego zabijania komórek rakowych bez negatywnego wpływu na zdrowe komórki pacjenta. Istnieją również wirusy promujące powstawanie białek proapoptotycznych (przykładowo TRAIL) (Sosna et al. 2016).

3.2 Zastosowanie terapii wirusowej w leczeniu nowotworów-przykłady

W 2015 FDA zatwierdziło terapię z użyciem wirusa HSV-1 skierowaną przeciwko wzrostowi czerniaka (T-VEC). Modyfikacja genetyczna cząstki polegająca na delecjach γ 34.5 i α 47 sprawia, że wirus posiada tropizm jedynie do komórek nowotworowych, natomiast wprowadzenie sekwencji kodującej GM-CSF wzmacnia odpowiedź immunologiczną organizmu przeciwko masom guza. (Eissa et al. 2017). Istnieją ograniczenia opisanej terapii, polegające na niewystarczającym

rozprzestrzenianiu się wirusa między komórkami nowotworowymi oraz usunięciu cząstek wirusa przez układ odpornościowy chorego.

Wirus COXSACKIE 21 będący w fazie badań klinicznych jest kolejnym obiecującym lekiem w terapii czerniaka. Cząstka po związaniu się z wewnątrzkomórkową cząstką adhezyjną (ICAM-1) łączy się z czynnikiem przyspieszającym rozpad. (DAF) i replikując się prowadzi do lizy komórki nowotworowej. Trwają badania nad zastosowaniem leku w monoterapii oraz terapii skojarzonej z Ipilimumabem będącym przeciwciałem monoklonalnym blokującym CTLA-4 i wzmagającym odpowiedź immunologiczną.

Reowirusy będące RNA-wirusami posiadają zdolność do niszczenia komórek wielu nowotworów złośliwych, wysuwając swoją skuteczność szczególnie w leczeniu szpiczaka plazmocytoowego. Działanie wirusów polega na ingerencji w zmienione ścieżki sygnałowe w komórkach gospodarza oraz namnażaniu się w nich prowadząc do lizy. Faza 3. badań klinicznych wykazała, że reowirusy posiadają synergizm działania z Sunitynibem będącym inhibitorem kinazy tyrozynowej i modulatorem odpowiedzi immunologicznej (Thirukkumaran et al. 2019). Dalsze badania w tym kierunku mogą okazać się znaczącą innowacją w leczeniu szpiczaka plazmocytoowego.

3.3 Bezpieczeństwo terapii wirusowej

Wykorzystanie terapii wirusowych w leczeniu nowotworów jest relatywnie nowym osiągnięciem medycyny. Większość leków znajduje się w fazie badań klinicznych. Sprawia to, że nie jest możliwe poznanie wszystkich działań niepożądanych terapii, które mogą dawać skutki nawet po kilkunastu latach.

Wśród najczęstszych objawów ubocznych występujących podczas stosowania terapii wirusowej wymienia się: zmęczenie, wymioty i biegunki oraz uogólnione objawy infekcji. Tym pierwotnym działaniom niepożądanym można zaradzić podając przed iniekcją paracetamol. Badania wykazały, że każdy z wirusów produkuje charakterystyczne dla siebie produkty uboczne, jednak podczas prób klinicznych udowodniono, iż istnieją leki minimalizujące ich toksyczność (Matsuda et al. 2017).

Stosowane aktualnie strategie zmniejszające toksyczność wirusa to przykładowo wykorzystane w modyfikacji opisanego wyżej HSV-1: wytworzenie warunkowej replikacji tylko w komórkach nowotworowych, uzbrojenie wirusów w geny stymulujące układ odpornościowy do lokalnych reakcji cytotoksycznych oraz ograniczenie transkrypcji jedynie do docelowych komórek. Działania te sprawiły, że wirusy są mniej toksyczne dla organizmu chorego, lecz także łatwiej atenuowane w komórkach nowotworowych, a co za tym idzie mniej toksyczne także dla tkanki guza (Pascal et al. 2015). Rozwój inżynierii genetycznej pozwala na wprowadzanie cząstek coraz bardziej specyficznych. Przykładem jest rQNestin34.5 wykazujący ekspresję genu γ 1-34.5 pod kontrolą promotora nestyny specyficznego dla komórek glejaka, dzięki czemu wirus namnaża się jedynie w ich wnętrzu (Li et al. 2020).

Ważnym aspektem dotyczącym bezpieczeństwa terapii jest podanie cząstek bezpośrednio do komórek guza i zapobieganie ich rozprzestrzenianiu się w organizmie. W przypadku będącej w użyciu terapii T-VEC wykazano, że cząstki wirusa podane bezpośrednio do komórek czerniaka nie przemieszczały się w znacznym stopniu do innych tkanek. Śladowe ilości wirusa HSV były oznaczane w ślinie, jednak nie uznano tych wyników za znaczące ponieważ oznaczany materiał zawierał cząstki typu dzikiego, co mogło być związane z nosicielstwem wirusa u pacjentów. W innych próbach wykazano jednak, że stosowanie terapii u osób w immunosupresji lub u kobiet ciężarnych powinno być przeciwwskazane. W badaniach przedklinicznych na gryzoniach udowodniono, że wirus indukuje reakcje toksyczne w zarodku, zwykle prowadząc do jego śmierci w drugiej połowie ciąży. W badaniach klinicznych wykazano również, że podanie cząstek wirusa w 3 trymestrze prowadziło do procesów osteolitycznych u płodu. Dyskusyjne jest zastosowanie leku u pacjentów po chemioterapii i radioterapii. Wykazują oni niską odporność na infekcje wirusowe co może prowadzić do nasilenia działań niepożądanych opisanych powyżej (Li et al. 2020).

4. Podsumowanie i wnioski

W dobie wzrostu zachorowań i śmiertelności na choroby nowotworowe niezbędne jest opracowanie nowoczesnych metod leczenia, posiadających możliwość łączenia z konwencjonalnymi terapiami. Prowadzone nad wirusami onkolitycznymi badania przynoszą obiecujące wyniki. Opisane w niniejszej pracy terapie są cały czas udoskonalane. Pomimo ogromnego postępu, który nastąpił w ostatnich latach, nie można bezsprzecznie stwierdzić, że terapia wykorzystująca wirusy onkolityczne jest oczekiwanym doskonałym lekiem na raka. Niezbędne jest bardziej szczegółowe poznanie struktury i działania wirusów. Badania donoszą, że wirusy używane w monoterapii nie wykazują jednak wysokiej skuteczności w leczeniu nowotworów. Z tego powodu należy zwrócić szczególną uwagę na łączenie ich z zatwierdzonymi metodami leczenia co może skutkować wynalezieniem terapii radykalnej. Interesujące wydają się również teorie łączenia kilku typów wirusów. To rozwiązanie pozwoliłoby ograniczyć wytworzoną na jeden gatunek odporność, zwiększyć celowanie terapii i oddziaływać na komórki nowotworowe w kilku punktach uchwytu jednocześnie. W badaniach należy także zwrócić szczególną uwagę na redukcję działań niepożądanych, a także opracować dawkowanie i prawidłowe podawanie leku. Wciąż brak wystarczających danych o toksyczności stosowanej terapii. Pojawiają się teorie, iż wirusy stosowane w terapii mogłyby przenosić się na osoby zdrowe i indukować odpowiedź odpornościową. Nadal nie są skonkretyzowane doniesienia dotyczące bezpieczeństwa stosowania wirusów u osób o obniżonej odporności, u dzieci i kobiet w ciąży. Dlatego należy cały czas pracować nad poprawą swoistości terapii.

Ogólnie rzecz biorąc, wirusy onkolityczne wykazują bardzo wysoki potencjał jako skuteczna metoda immunoterapii. Wyróżniającą je właściwością jest nie tylko niszczenie komórek nowotworowych, lecz także uruchamianie odpowiedzi immunologicznej organizmu. Możliwe, że niebawem do użycia zostaną wprowadzone kolejne innowacyjne terapie, które podobnie jak terapia T-VEC wykażą się wysoką skutecznością i znacząco poprawią rokowania pacjentów.

5. Literatura

- Angelova AL, Grekova SP, Heller A .et al. (2014) Complementary induction of immunogenic cell death by oncolytic parvovirus H-1PV and gemcitabine in pancreatic cancer. *J Virol* (2014) 88(10):5263–76.
- Bai Y, Hui P, Du X et al. (2019), Updates to the antitumor mechanism of oncolytic virus. *Thorac Cancer*. 2019;10(5):1031-1035.
- Denniston E, Crewdson H, Rucinsky N, et al. (2016) The Practical Consideration of Poliovirus as an Oncolytic Virotherapy. *Am J Virol*. 2016;5(1):1-7.
- Eissa IR, Naoy Y, Bustos-Villalobos I, et al. (2017), Genomic Signature of the Natural Oncolytic Herpes Simplex Virus HF10 and Its Therapeutic Role in Preclinical and Clinical Trials. *Front Oncol*. 2017;7:149.
- Fukuhara H, Ino Y, Todo T. (2016), Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn. *Cancer Sci*. 2016;107(10):1373-1379.
- Howells A, Marelli G, Lemoine NR et al. (2017), Oncolytic Viruses-Interaction of Virus and Tumor Cells in the Battle to Eliminate Cancer. *Front Oncol*. 2017;7:195.
- Kaufman HL, Kohlhapp FJ, Zloza A. (2016), Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs, *Nat Rev Drug Discov*. 2015;14(9):642-662.
- Kubo, H., Gardner, T. A., Wada, Y., Koeneman et al. (2003), Phase I Dose Escalation Clinical Trial of Adenovirus Vector Carrying Osteocalcin Promoter-Driven Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase in Localized and Metastatic Hormone-Refractory Prostate Cancer. *Human Gene Therapy*, 14(3), 227–241.
- Li L, Liu S, Han D et al. (2020), Delivery and Biosafety of Oncolytic Virotherapy. *Front Oncol*. 2020;10:475.
- Marelli G, Howells A, Lemoine NR et al. (2018), Oncolytic Viral Therapy and the Immune System: A Double-Edged Sword Against Cancer. *Front Immunol*. 2018;9:866.

- Matsuda, T., Karube, H., & Aruga, A. (2017), A Comparative Safety Profile Assessment of Oncolytic Virus Therapy Based on Clinical Trials. *Therapeutic Innovation & Regulatory Science*, 52(4), 430–437.
- Pascal R.A. Buijs, Judith H.E. Verhagen et al. (2015), Oncolytic viruses: From bench to bedside with a focus on safety, *Human Vaccines & Immunotherapeutics*
- Patel MR, Dash A, Jacobson BA, et al. (2019) JAK/STAT inhibition with ruxolitinib enhances oncolytic virotherapy in non-small cell lung cancer models. *Cancer Gene Ther.* 2019;26(11-12):411-418.
- Power AT, Bell JC. (2007) Cell-based delivery of oncolytic viruses: a new strategic alliance for a biological strike against cancer. *Mol Ther* 2007, 15(4): 660-5.
- Raja, J., Ludwig, J.M., Gettinger, S.N. et al. (2018), Oncolytic virus immunotherapy: future prospects for oncology. *j. immunotherapy cancer* 6, 140
- Russell L, Peng KW, Russell SJ et al. (2019), Oncolytic Viruses: Priming Time for Cancer Immunotherapy. *BioDrugs.* 2019;33(5):485-501
- Singh PK, Doley J, Kumar GR et al. (2012) Oncolytic viruses & their specific targeting to tumour cells. *Indian J Med Res.* 2012;136(4):571-584.
- Sokolowski NA, Rizos H, Diefenbach RJ. Oncolytic virotherapy using herpes simplex virus: how far have we come?. *Oncolytic Virother.* 2015;4:207-219.
- Sosna J, Philipp S, Fuchslocher Chico J, et al. (2016) Differences and similarities in TRAIL- and tumor necrosis factor-mediated necroptotic signaling in cancer cells. *Mol Cell Biol* (2016) 36(20):2626–44.
- Thirukkumaran CM, Shi ZQ, Nuovo GJ, et al. (2019) Oncolytic immunotherapy and bortezomib synergy improves survival of refractory multiple myeloma in a preclinical model. *Blood Adv.* 2019;3(5):797-812.

8. Znaczenie czynnika transkrypcyjnego Foxp3 w regulacji powstawania limfocytów T regulatorowych oraz w procesach rozwoju chorób autoimmunologicznych

The importance of Foxp3 transcription factor in the formation of regulatory T cells and in the development of autoimmune diseases

Sebastian Mertowski⁽¹⁾, Krzysztof Gosik⁽¹⁾, Julia Wojnicka⁽²⁾

⁽¹⁾Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽²⁾Katedra Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Biologii i Biotechnologii UMCS w Lublinie

Opiekun naukowy: dr hab. Ewelina Grywalska

Sebastian Mertowski: mertowskisebastian@gmail.com

Słowa kluczowe: Zespół IPEX, NFAT, Runx1/AML1

Streszczenie

Czynniki transkrypcyjne są niezwykle istotną grupą białek, która odpowiada za proces selektywnej aktywacji bądź też dezaktywacji innych białek komórkowych, najczęściej na ostatnim etapie przekazywania sygnału w komórce. Istotną z punktu widzenia regulacji odpowiedzi organizmu rodziną czynników transkrypcyjnych jest rodzina FOX, które odgrywają ważną rolę w regulacji ekspresji genów biorących udział we wzroście komórek, proliferacji, różnicowaniu i długowieczności. Do przedstawicieli tej rodziny zaliczymy wewnątrzkomórkowe białko Foxp3, które reguluje proces różnicowania się subpopulacji limfocytów T, a dokładniej odpowiada za rozwój limfocytów T regulatorowych. Białko to wpływa na szereg procesów komórkowych zarówno w sposób pośredni jak i bezpośredni. W procesie regulacji produkcji cytokin białko Foxp3 prowadzi interakcje z licznymi białkami i czynnikami transkrypcyjnymi takimi jak: NFAT, czynnikiem jądrowym kappa B czy Runx1/AML1 oraz zaangażowany jest w proces acetylacji histonów w skondensowanej chromatynie. Zaburzenia funkcjonowania czynnika transkrypcyjnego Foxp3 wywołane procesem mutagenyzy wpływają na rozwój zaburzeń odpowiedzi immunologicznej oraz chorób autoimmunologicznych. Liczne badania naukowe na temat białka Foxp3 dowiodły, że czynnik ten jest teraz jednym z najbardziej wiarygodnych markerów molekularnych naturalnych limfocytów T regulatorowych.

1. Wprowadzenie

Czynniki transkrypcyjne to grupa białek, która wykazuje zdolności do wiązania się z materiałem genetycznym (DNA). Miejscem przyłączenia się czynników transkrypcyjnych w obszarze DNA może być promotor bądź sekwencji wzmacniającej w specyficznym miejscu lub regionie, która reguluje proces transkrypcji. Działanie czynników transkrypcyjnych może być w komórce selektywnie aktywowane, bądź też dezaktywowane przez inne białka komórkowe, które ma miejsce najczęściej na ostatnim etapie przekazywania sygnału w komórce. Jedną z ważniejszych rodzin czynników transkrypcyjnych jest rodzina FOX, które odgrywają ważną rolę w regulacji ekspresji genów biorących udział we wzroście komórek, proliferacji, różnicowaniu i długowieczności. Do przedstawicieli tej rodziny zaliczymy białko Foxp3 (ang. *Forkhead box protein P3*) będące nie tylko czynnikiem transkrypcyjnym, ale także kluczową cząsteczką zaangażowaną w rozwój regulatorowych komórek T (Treg). Odgrywa ono istotną rolę w utrzymywaniu homeostazy układu odpornościowego, a także umożliwia uzyskanie pełnej stabilności linii Treg oraz bezpośrednio moduluje ekspansję i funkcję konwencjonalnych komórek T. Białko Foxp3 może działać w komórce zarówno jako represor lub aktywator procesu transkrypcji, rodzaj jego aktywności jest zależny od jego interakcji z innymi czynnikami transkrypcyjnymi występującymi w komórce (Roncador i in. 2005).

2. Charakterystyka białka Foxp3

Ludzki gen FOXP3 zlokalizowany jest na chromosomie X, a dokładniej dzięki analizie sekwencji genomowej wykazano, że znajduje się na ramieniu p w pozycji Xp11.23. Gen ten złożony jest z 11 egzonów, których granice egzon-intron są identyczne w regionach kodujących geny u myszy i człowieka. Gen ten odpowiedzialny jest za kodowanie produktu białkowego złożonego z 341 aminokwasów o łącznej masie cząsteczkowej wynoszącej 47,27 kDa i punkcje izoelektrycznym 8,62. Analiza sekwencji białkowej białka Foxp3 wykazała, że posiada ono w swojej strukturze 56,61% aminokwasów hydrofobowych (244 aminokwasów) oraz 43,39% aminokwasów o charakterze hydrofilowym (Baza danych UniProt).

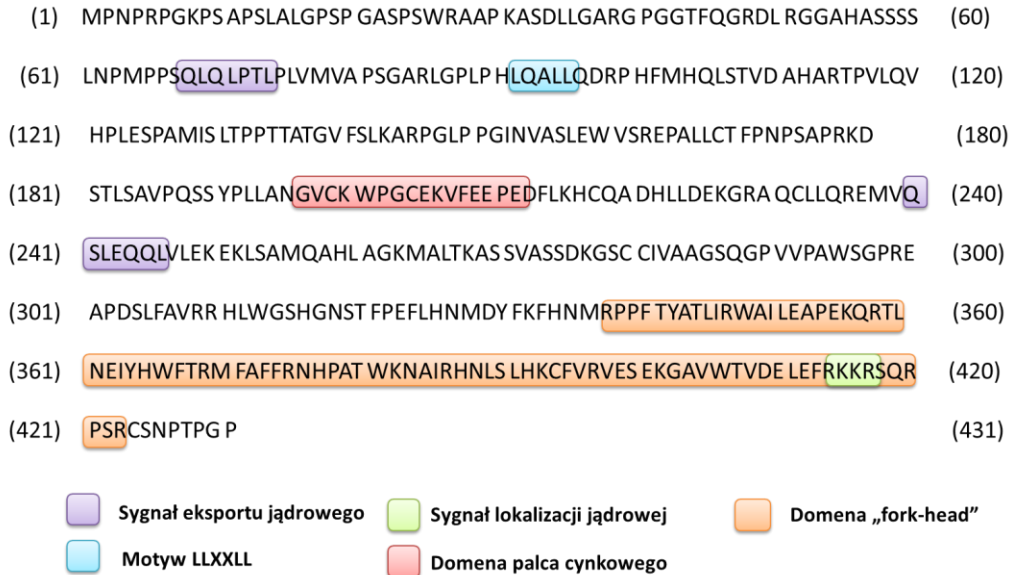
Białko to posiada 4 charakterystyczne motywy. Dwa z nich położone pomiędzy 68-76 oraz 239-248 aminokwasem to sygnały eksportu jądrowego, które są krótkimi peptydami zawierającymi reszty hydrofobowe ukierunkowane na eksport z jądra komórkowego do cytoplazmy przez kompleks porów jądrowych (Rys. 1). Kolejnym przykładem jest motyw LxxLL położony pomiędzy 92-96 aminokwasem, który uczestniczą w wielu interakcjach białko-białko związanych z różnymi aspektami regulacji transkrypcji (Rys. 1). Motywy te są obecne w wielu czynnikach transkrypcyjnych i kofaktorach, pośrednicząc w interakcjach, które mogą aktywować lub tłumić transkrypcję. Kilka niedawno zgłoszonych struktur 3D kompleksów motywów białko-LxxLL zostało związanych z białaczką, co dodatkowo uwypukliło różnorodność i regulacyjne znaczenie tego z pozoru prostego motywu. Ostatnim motywem położonym pomiędzy 414-417 aminokwasem jest sygnał lokalizacji jądrowej, będący sekwencją aminokwasową, która „metkuje” białko w celu zaimportowania do jądra komórkowego na drodze transportu jądrowego (Rys. 1). Zazwyczaj sygnał ten składa się z jednej lub więcej krótkich sekwencji dodatnio naładowanych lizyn lub arginin eksponowanych na powierzchni białka (Baza danych UniProt; Roncador i in. 2005).

Należy również zwrócić uwagę na dwie niezwykle istotne domeny występujące w obrębie sekwencji tego białka. Pierwsza z nich jest domena palca cynkowego złożona z 26 aminokwasów, zlokalizowane w regionie pomiędzy 197 a 222 aminokwasem (Rys. 1). Jest to struktura występującej w białkach wiążących DNA i biorąca bezpośredni udział w związaniu cząsteczki kwasu nukleinowego przez białko. Obecność w domenie jonu cynku (Zn^{2+}) jest kluczowa dla stabilności całej struktury, gdyż jej brak może skutkować zmianami strukturalnymi i funkcjonalnymi. Druga z nich to domena zwana „fork-head”, która często jest opisywana w czynnikach transkrypcyjnych i której celem jest wiązanie DNA. W przypadku białka FoxP3 domena ta złożona jest z 87 aminokwasów i ulokowana jest pomiędzy 337-423 aminokwasem w sekwencji (Rys. 1). Zaangażowana jest ona w proces dimeryzacji białka oraz jego interakcję z czynnikiem jądrowym NFATC2, odpowiedzialnym za aktywowanie komórek T. Białko NFATC2 jest obecne w cytozolu i przemieszcza się tylko do jądra po stymulacji receptora komórek T (TCR), gdzie staje się członkiem czynników jądrowych aktywowanego kompleksu transkrypcyjnego komórek T. Kompleks ten odgrywa kluczową rolę w indukowaniu transkrypcji genów podczas odpowiedzi immunologicznej (Baza danych UniProt; Roncador i in. 2005).

3. Czynniki transkrypcyjne Foxp3 a komórki limfocytów Treg

Komórki Treg należą do subpopulacji limfocytów odpowiedzialna za tłumienie zbyt nasilonej lub autoreaktywnej odpowiedzi immunologicznej, który może przebiegać w sposób swoisty lub nieswoisty dla danego antygeny, nie wywołujący ogólnego upośledzenia odporności. Jest to niezwykle niejednorodna populacja, w której można wyróżnić kilka subpopulacji komórek o różnym poziomie ekspresji białka Foxp3 (Tab. 1). Komórki Treg wykazujące ekspresję Foxp3+ można także podzielić na dwie mniejsze subpopulacje ze względu na pochodzenie komórek. Pierwszą z nich są naturalne limfocyty Treg (nTreg), które powstają w grasicy jako osobna linia rozwojowa, natomiast drugą indukowane (adoptywne) limfocyty Treg (iTreg lub aTreg). Są to komórki Treg powstające w tkankach obwodowych, które początkowo nie wykazujące ekspresji czynnika Foxp3, ale nabywające go wraz z właściwościami supresyjnymi po pobudzeniu odpowiednim antygenem. Naturalne limfocyty nTreg wykazują ekspresję antygeny CTLA-4 (ang. *cytotoxic T cell antigen 4*), GITR (ang. *glucocorticoid-induced TNFR-related protein*), CCR4 (ang. *C-C chemokine receptor type*

4), także CD62L (L-selektyna). Do powstania limfocytów nTreg oraz iTreg niezbędna jest obecność interleukiny 2 (IL-2) oraz transformującego czynnika wzrostu beta 1 (TGF- β , ang. *transforming growth factor β 1*) [Chinen I in. 2016]. Kluczowe jest podobieństwo pełnionych ról obu tych cytokin w utrzymaniu oraz przetrwaniu obu populacji limfocytów Treg. nTreg rozwijają się w odpowiedzi na kontakt z antygenami własnymi w grasicy oraz wymagają wysokiego powinowactwa między tymi antygenami a kompleksami MHC. Prawdopodobnie dzieje się to dlatego, że powstają one z ciągle proliferujących komórek prekursorowych. Wymagają one również kostymulacji przez CD28 (ang. *cluster of differentiation 28*), które pełni również ważną funkcję w procesie wzbudzenia w limfocytach T ekspresji cząsteczki CTLA-4, która ma zdolność do hamowania sygnału CD28, a tym samym odpowiedzialna jest za mechanizm sprzężenia zwrotnego ujemnego (Li i in. 2015).



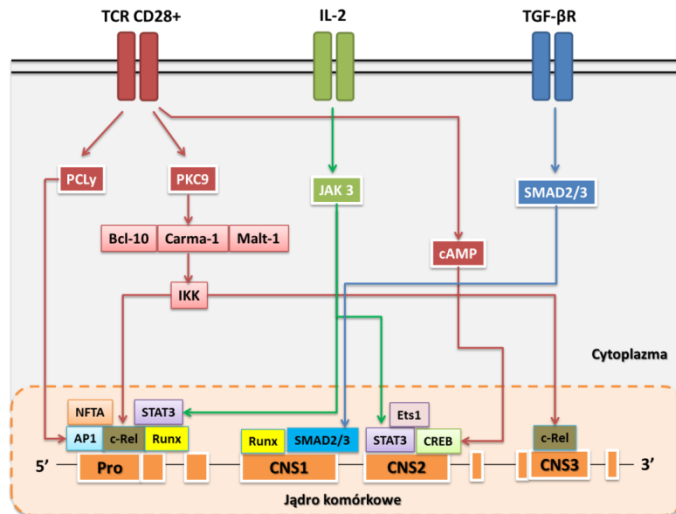
Rys. 1. Sekwencja aminokwasowa białka FoxP3 z uwzględnieniem występujących motywów i domen białkowych (na podstawie bazy danych UniProt).

Tab. 1. Subpopulacje limfocytów Treg (Chien i Chiang 2017).

Nazwa subpopulacji		Charakterystyka
Wykazujące ekspresję Foxp3	Limfocyty T CD4+CD25+Foxp3+	Jest to najszerszej badana i scharakteryzowana subpopulacja komórek regulatorowych, których cechą charakterystyczną jest ekspresja czynnika transkrypcyjnego Foxp3, której towarzyszy wysoka ekspresji cząsteczki powierzchniowej CD25.
	limfocyty T CD8+CD25+Foxp3+	subpopulacja występująca wśród limfocytów T CD8+, która jest znacznie słabiej poznana niż komórki CD4+Foxp3+;
Nie wykazujące ekspresji Foxp3	limfocyty T regulatorowe typu 1 (Tr1)	komórki o fenotypie CD4+Foxp3 ⁻ , które wydzielają znaczne ilości IL-10
	limfocyty Th3	komórki CD4+Foxp3 ⁻ wydzielające znaczne ilości TGF- β
	limfocyty CD8+CD28⁻	utożsamiane z wcześniejszymi limfocytami Ts, które również nie posiadają ekspresji czynnika Foxp3

4. Mechanizmy działania czynnika transkrypcyjnego Foxp3

Aktywacja limfocytów Treg o fenotypie CD4+CD25+ prowadzi do indukcji czynnika transkrypcyjnego NFAT (ang. *Nuclear factor of activated T-cells*). Najbardziej znanymi klasami miejsc wiązania dla NFAT jest tworzenie kompleksu współpracującego z AP-1 (ang. *activator protein 1*) lub innymi białkami bZIP i wiązanie z miejscami dla konwencjonalnych białek z rodziny Rel. Aktywacja NFAT i AP-1 jest zależna od aktywacji receptora dla limfocyty TCR (ang. *T-cell receptor*) i wymagana jest do prawidłowo wykształconej odpowiedzi immunologicznej. Współpraca NFAT z AP-1 (kompleks białkowy, zbudowany z dimerów białek z rodzin Fos, Jun, ATF i Maf, który działa jako czynnik transkrypcyjny) jest wymagana do transkrypcji wielu różnych genów, w tym interleukinę 2 i 3 (IL-2, IL-3), czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów (GM-CSF, ang. *granulocyte colony-stimulating factor*), oraz interferon gamma (IFN- γ , ang. *Interferon gamma*) [Chinen I in.2016, Fan I in. 2018]. W grasicy ekspresja FasL (jest transbłonowym białkiem typu II, które należy do rodziny czynnika martwicy nowotworów (TNF)), która umożliwia potencjalną śmierć komórki, również wymaga współpracy między NFAT i AP-1. Współpraca ta odgrywa ważną rolę w kontrolowaniu przeżycia komórek lub śmierci komórek w rozwoju komórek T (Dechaler 2014; Luo i Li 2013).



Rys. 2. Szlaki sygnalizacyjne i elementy genetyczne przyczyniające się do ekspresji genu FOXP3 (zmienione na podstawie Delacher i in. 2014).

Białko Foxp3 pełni także istotną rolę w procesie regulacji produkcji cytokin poprzez interakcję z licznymi białkami i czynnikami transkrypcyjnymi takimi jak: NFAT, czynnikiem jądrowym kappa B (NF- κ B, ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) czy Runx1/AML1 (ang. *Runt-related transcription factor 1/ acute myeloid leukemia 1 protein*), znane również jako znane również jako białko ostrej białaczki szpikowej 1 (AML1) lub podjednostka czynnika wiążącego rdzeń alfa-2 (CBFA2). Czynniki transkrypcyjne NFAT oraz Runx1/AML1 są niezbędne do produkcji IL-2, która następuje po stymulacji receptora TCR, asocjacja białka Foxp3 z tymi czynnikami wywołuje zahamowanie ekspresji IL-2, IL-4 będących cytokinami prozapalnymi oraz IFN- γ . W warunkach *in vivo* czynniki transkrypcyjny NFAT, który jest wymagany do przyłączenia się do proksymalnego odcinka promotora dla IL-2, uczestniczy w bezpośrednich interakcjach z domeną „fork-head” białka Foxp3. Te interakcje są również niezbędne do stymulacji ekspresji części antygenów limfocytów Treg takich jak CD25 (ang. *cluster of differentiation 25*) czy CTLA-4 (ang. *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) (Walker, 2013; Colman i in. 2013; Fan I in. 2018).

CD25 to łańcuch alfa receptora dla interleukiny 2, który ulega przejściowej ekspresji na aktywowanych limfocytach T i B, natomiast konstytutywnie występuje na limfocytach Treg. obecność tego białka stwierdzono również na komórkach dendrytycznych, fibroblastach oraz komórkach śródbłonna [Colman I in. 2013]. Natomiast CTLA-4 jest receptorem białkowym, który

działa jako punkt kontrolny odpowiedzi immunologiczne. Białko to ulega konstytutywnej ekspresji w limfocytach Treg, ale po aktywacji ulega jedynie dodatniej regulacji w konwencjonalnych limfocytach T - zjawisko to jest szczególnie widoczne w przypadku zaburzeń o charakterze nowotworowym (Walker, 2013). Interakcja białka Foxp3 z czynnikiem Runx1/AML1 (asocjacja pomiędzy domeną „fork-head” a zamkiem leucynowym) polega na przyłączeniu się tego kompleksu do regionu promotorowego IL-2. Należy również zauważyć, że białko Foxp3 uczestniczy również w interakcjach z innymi przedstawicielami białek należących do rodziny FOX, gdzie tworzy kompleksy, zdolne do hamowania ekspresji wybranych genów. Formowanie się kompleksów homodimerycznych białka Foxp3 lub też heterodimerycznych wykorzystywany jest zamek leucynowy, który asocjuje z promotorem IL-2 w warunkach *in vivo*. Badania naukowe wykazały także, że multimeryzacja białka Foxp3 jest niezwykle istotna dla prawidłowego funkcjonowania limfocytów Treg (Dechaler, 2014; Luo i Li 2013)

W limfocytach Treg białko Foxp3 występuje jako jedna z części dużego kompleksu, w skład którego wchodzi także acetylotransferaza histonów (HAT, ang. *Histone acetyltransferases*), a także deacetylaza histonów (HDAC, ang. *Histone deacetylases*). Proces acetylacji i deacetylacji jest jedną z modyfikacji potranslacyjnych histonów, dotyczącą reszt lizyny znajdujących się na N-końcu (wystające z rdzenia nukleosomu), stanowiący epigenetyczny mechanizm kontroli ekspresji genów. Enzymami katalizującymi odwracalną acetylację histonów są enzymy HAT i HDAC. Badania ostatnich lat pozwoliły na ustalenie, że pierwsze z nich pełnią jednocześnie funkcję koaktywatorów transkrypcji, podczas gdy drugie są jej korepresorami. Tym samym udało się udowodnić związek modyfikacji kowalencyjnej białek chromosomowych (acetylacji histonów rdzeniowych) z ekspresją genów. Enzymy HAT oraz HDAC są odpowiedzialne za proces acetylacji białka Foxp3 i tym samym determinują funkcje tego czynnika transkrypcyjnego. Badania wykazały, że acetylacja Foxp3 jest związana z jego funkcją w limfocytach Treg (Xiao i in. 2010; He i in. 2014). Szczegółowe analizy wykazały, że na proces acetylacji tego białka wpływają takie cząsteczki jak: KAT5 (TIP60), p300, HDAC7, HDAC9, a także SIRT1 (Tab. 2).

Tab. 2. Wpływ enzymów na proces acetylacji czynnika transkrypcyjnego Foxp3 (Wang i in. 2015; Xiao i in. 2010; He i in. 2014).

Nazwa enzymu	Funkcje
Acetylotransferaza histonowa KAT5, zwana inaczej TIP60	Przeprowadza acetylowanie histonów w nukleosomie, co zmienia wiązanie z DNA. Acetylacja neutralizuje dodatni ładunek na histonach, zmniejszając powinowactwo wiązania ujemnie naładowanego DNA. To z kolei zmniejsza zawadę przestrzenną DNA i zwiększa interakcję czynników transkrypcyjnych i innych białek. Trzy kluczowe funkcje KAT5 to jego zdolność do regulacji transkrypcji, naprawy DNA i apoptozy.
Acetylotransferaza histonowa p300	Działa jako acetylotransferaza histonowa która reguluje transkrypcję poprzez przebudowę chromatyny i jest ważna w procesach proliferacji i różnicowania komórek. Pośredniczy w regulacji genu cAMP, wiążąc się specyficznie z fosforylowanym białkiem CREB, a także zawiera bromodomenę, która bierze udział w sygnalizacji IL6.
Deacetylaza histonowa 7 (HDAC7)	Wykazano, że HDAC7 ma małą wewnętrzną aktywność deacetylasy, badania wykazały, że HDAC7 może pełnić różne alternatywne funkcje związane z rozwojem, proliferacją i stanem zapalnym.
Deacetylaza histonowa 9 (HDAC9)	Represjonuje aktywność MEF2 poprzez rekrutację wieloskładnikowych kompleksów zawierających CtBP i HDAC. Może odgrywać rolę w procesie hematopoezy.
Deacetylaza sirtuin-1 zależna od NAD	SIRT1 deacetyluje, a tym samym dezaktywuje białko p53. SIRT1 stymuluje również autofagię, zapobiegając acetylacji białek (poprzez deacetylację) wymaganych do autofagii, co wykazano w hodowlanych komórkach oraz tkankach embrionalnych i noworodkowych. Ta funkcja zapewnia powiązanie między ekspresją sirtuiny a odpowiedzią komórkową na ograniczone składniki odżywcze z powodu ograniczenia kalorii.

Badania wykazały, że stabilność białka Foxp3 jest znacznie wyższa w obecności enzymu p300, niż w przypadku obecności KAT5. Po połączeniu z białkiem p300 Foxp3 wykazuje wyższe powinowactwo do chromatyny DNA, natomiast po interakcji z KAT5, znacząco zwiększa się jego powinowactwo do promotora IL-2. Znaczenie i rola HDAC7 oraz HDAC9 w procesie acetylacji białka Foxp3 jest słabo poznane. Związanie jest to z faktem, że klasa II HDAC nie posiada wewnętrznej funkcjonalnej aktywności katalitycznej i prawdopodobnie jak sugerują to naukowcy, działa poprzez rekrutowanie HDAC klasy I do kompleksu. Połączenie KAT5 i HDAC7 jest niezbędnym mechanizmem w procesie hamowania transkrypcji IL-2 przez białko Foxp3. Deacetylaza sirtuin-1 zależna od NAD jest uważany za negatywny regulator procesu acetylacji białka Foxp3 (Xiao i in. 2010; He i in. 2014).

5. Znaczenia czynnika transkrypcyjnego Foxp3 w zaburzeniach autotolerancji oraz chorobach autoimmunologicznych

Liczne badania komórek Tregs które wyrażają Foxp3, prowadzonych na modelach zwierzęcych wykazały, że mają one krytyczne znaczenie w przenoszeniu tolerancji immunologicznej, szczególnie w procesie samoregulacji. Indukcja lub też podawanie komórek T Foxp3+ zwierzętom doprowadziło, do znacznego zmniejszenia się nasilenia objawów chorób autoimmunologicznych takich jak: cukrzyca, stwardnienie rozsiane, astma, także w przebiegu nieswoistych zapaleń jelit, zapalenia tarczycy czy chorób nerek (van der Vliet i Nieuwenhuis 2007).

Dalsze prace badawcze wykazały, że komórki T cechuje niezwykle duża plastyczność, co oznacza, że zastosowanie komórek Treg w terapii może być ryzykowne, ponieważ komórki te przeniesione na pacjenta mogą zmienić się w komórki pomocnicze T 17 (Th17), które identyfikowane są jako komórki prozapalne niż komórki regulatorowe. Komórki Th17 są produkowane w podobnych środowiskach jak aTreg oraz iTregs. Komórki Th17 są wytwarzane pod wpływem TGF- β i IL-6 (w przypadku myszy) lub IL-21 (w przypadku ludzi), podczas gdy a / iTreg są wytwarzane pod wpływem wyłącznie TGF- β , więc różnica między scenariuszem prozapalnym a proregulacyjnym wynosi obecność pojedynczej interleukiny (Van Gool i in. 2019). Badania przeprowadzone na myszach, u których wykazano genetyczny brak TGF- β , CTLA-4 oraz Foxp3, ujawniły, że wśród takich osobników bardzo szybko dochodzi do rozwinięcia się śmiertelnego autoimmunologicznego zespołu limfoproliferacyjnego. U osobników u których zaobserwowano niedobory IL-2 zanotowano wzrost zapadalności na wielonarządową chorobę autoimmunologiczną (van der Vliet i Nieuwenhuis 2007).

6. Podsumowanie

Liczne badania prowadzone na przestrzeni ostatnich lat wykazały, że limfocyty Treg, które wykazują ekspresję Foxp3 pojawiają się w organizmie człowieka, tuż po jego narodzeniu, a rozwój wielu chorób zapalnych oraz autoimmunologicznych następuje, po wyczerpaniu się ich z populacji. Wykazano, że białko Foxp3 jest niezbędne dla limfocytów do różnicowania się w limfocyt regulatorowe, które ma miejsce w grasicy. Wysoka ekspresja tego czynnika transkrypcyjnego gwarantuje także działanie supresyjne. Dzięki analizom i wielu eksperymentom naukowcy wykazały, że podobieństwo w procesie zakłócania funkcjonowania genu FOXP3 u ludzi oraz u myszy, przebiega w sposób bardzo zbliżony, co pozwoliło na wysnucie wniosków, że proces dominującej autotolerancji u tych organizmów jest do siebie podobny. Wytrwałość naukowców w prowadzeniu badań na temat białka Foxp3 zaowocowała, że czynnik ten jest teraz jednym z najbardziej wiarygodnych markerów molekularnych naturalnych limfocytów Treg.

7. Literatura

Baza danych UniProt: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9BZS1>

Chien CH, Chiang BL. (2017) Regulatory T cells induced by B cells: a novel subpopulation of regulatory T cells. *Journal of Biomedical Science* 24, 86.

Chinen T, Kannan AK, Levine AG i in. (2016) An essential role for IL-2 receptor in regulatory T cell function. *Nature Immunology* 17: 1322–1333.

- Coleman MM, Finlay CM, Moran B i in. (2013) The Immunoregulatory Role of CD4⁺ FoxP3⁺ CD25⁻ Regulatory T Cells in Lungs of Mice Infected With Bordetella Pertussis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 64:413-424.
- Delacher M, Schreiber L, Richards DM i in. (2014) Transcriptional Control of Regulatory T Cells. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 381:83-124.
- Fan MY, Low JS, Tanimine, N i in. (2018) Differential Roles of IL-2 Signaling in Developing versus Mature Tregs. *Cell Reports* 25:1204-1213.e4.
- He H, Ni B, Tian Y i in. (2014) Histone Methylation Mediates Plasticity of Human FOXP3(+) Regulatory T Cells by Modulating Signature Gene Expressions. *Comparative Study Immunology* 141:362-376.
- Li Z, Li D, Tsun A. i in. (2015) FOXP3⁺ regulatory T cells and their functional regulation. *Cellular & Molecular Immunology*. 12, 558–565.
- Luo CT, Li MO (2013) Transcriptional Control of Regulatory T Cell Development and Function. *Trends in Immunology* 34: 531-539.
- Roncador G, Brown PJ, , Maestre L i in. (2005) Analysis of FOXP3 Protein Expression in Human CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells at the Single-Cell Level. *The European Journal of Immunology* 6:1681-1691.
- Walker LS (2013) Treg and CTLA-4: Two intertwining pathways to immune tolerance. *Journal of Autoimmunity* 45: 49–57.
- Wang L, Liu Y, Han R i in. (2015) FOXP3⁺ regulatory T cell development and function require histone/protein deacetylase 3. *Journal of Clinical Investigation* 125:1111–1123.
- Xiao Y, Li B, Zhou Z i in. Histone acetyltransferase mediated regulation of FOXP3 acetylation and Treg function. *Current Opinion in Immunology* 22: 583–591.

9. Apoptoza – regulacyjny wpływ mikroRNA na białka z rodziny Bcl-2

Apoptosis – the microRNA regulatory effect on the Bcl-2 family proteins

Miśkiewicz Joanna⁽¹⁾, Krawczyk Agata⁽²⁾, Strzałka-Mrozik Barbara⁽¹⁾

⁽¹⁾ Zakład Biologii Molekularnej Katedry Biologii Molekularnej,
Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁽²⁾ Zakład Nutrigenomiki i Bromatologii Katedry Biologii Molekularnej,
Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
Opiekun naukowy: dr hab. n. farm. Barbara Strzałka-Mrozik

Miśkiewicz Joanna: joannamiskiewicz07@gmail.com

Słowa kluczowe: programowana śmierć komórki, miRNA, białka Bcl-2, szlaki apoptotyczne

Streszczenie

Apoptoza czyli programowana śmierć komórki to złożony proces warunkujący prawidłowe funkcjonowanie organizmu. Proces ten jest niezbędny w czasie rozwoju embrionalnego a w okresie dorosłym umożliwia oprócz zachowania homeostazy, eliminację starych, autoreaktywnych oraz zmutowanych komórek. Apoptoza jest procesem czynnym wymagającym aktywności wielu genów i czynników. W zależności od czynnika indukującego proces ten może przebiegać kilkoma ścieżkami. Najlepiej poznanymi regulatorami programowanej śmierci komórki są białka z rodziny Bcl-2 do których zalicza się zarówno inhibitory jak i czynniki indukujące apoptozę. Ważnym przełomem stało się odkrycie małych, zbudowanych z około 22 nukleotydów, endogennych, niekodujących cząsteczek mikroRNA (miRNA), które służą kontroli ekspresji genów na poziomie potranskrypcyjnym. Mechanizm kontroli jest oparty na całkowitej degradacji docelowego mRNA (pełna komplementacja z mRNA) lub represji translacji (niepełna komplementacja z mRNA). W ostatnich latach wielokrotnie wykazano iż cząsteczki miRNA mogą kontrolować m.in. poszczególne komponenty szlaków apoptozy w tym kluczowe czynniki jakimi są białka z rodziny Bcl-2. Istnieje kilka miRNA mogących kontrolować m.in. białka Bcl-2, Bcl-xL, Bax oraz Bak. Faktem jest, iż białka należące do rodziny Bcl-2 są obiektem intensywnych badań z uwagi na ich ważną rolę w nowotworzeniu. Pełne zrozumienie mechanizmów działania i specyficzności korelacji między białkami Bcl-2 a cząsteczkami miRNA stanowi szansę na opracowanie nowoczesnych środków leczniczych bądź istotne rozszerzenie potencjału terapeutycznego.

1. Apoptoza

Apoptoza czyli programowana śmierć komórki to proces warunkujący prawidłowe funkcjonowanie organizmu. Proces apoptozy rozpoczyna się zmianami na poziomie jądra komórkowego, dochodzi do kondensacji chromatyny i jej umiejscowienia pod błoną komórkową a następnie obkurczeniu jądra i fragmentacji. Kolejne etapy programowanej śmierci obejmują kondensację cytoplazmy, tworzenie pęcherzyków na powierzchni komórki i ciałek apoptotycznych zawierających organelle komórkowe, cytoplazmę oraz chromatynę. Wszystkie etapy apoptozy kończą się fagocytozą utworzonych ciałek apoptotycznych (Stępień i in. 2007). W zależności m.in. od czynnika indukującego proces apoptozy może przebiegać odmiennie, przy czym najlepiej poznanymi ścieżkami współdziałającymi ze sobą są: szlak wewnątrzkomórkowy (mitochondrialny) i zewnątrzkomórkowy (receptorowy). Wśród innych znanych szlaków apoptozy wyróżniamy: szlak pseudoreceptorowy, sfingomielinowo-ceramidowy oraz szlak indukowany stresem.

1.1 Szlak mitochondrialny i receptorowy

Szlak mitochondrialny może zostać aktywowany w chwili: wzrostu stężenia reaktywnych form tlenu (ang. *ROS-reactive oxygen species*), uszkodzeń DNA, wzrostu stężenia jonów wapnia oraz w wyniku stresu oksydacyjnego (Stępień i in. 2007; Daniel 2000). Centrum tego szlaku stanowią usytuowane na styku dwóch błon mitochondrialnych megakanaly, które powstają prawdopodobnie z poriny VDAC (ang. *Voltage Dependent Anion Channel*) i obwodowego receptora dla

benzodiazepiny (ang. *benzodiazepine peripheral receptor*, BRP) zlokalizowanych w błonie zewnętrznej oraz translokazy nukleotydów adeninowych (ang. *Adenine Nucleotide Translocator*, ANT) występującej w błonie wewnętrznej. W przypadku przedstawionego modelu megakanalów, stres jest czynnikiem aktywującym otwarcie kanału, a do cytoplazmy zostaje uwolniony cytochrom c (Apaf2) (Stępień i in. 2007; Grądzka 2000). Odmienna teoria zakłada permeabilizację zewnętrznej błony mitochondrialnej w wyniku oddziaływania białka Bax z poryną VDAC (Stępień i in. 2007). Trzecia hipoteza zakłada przerwanie błony zewnętrznej jedynie w wyniku działania ANT wraz z pęczniejącym matriks. W tym przypadku czynnikami sprzyjającymi apoptozie są m.in. białka Bcl-2, Bax oraz Bak oddziałujące bezpośrednio z ANT oraz jony wapnia (Stępień i in. 2007). Ostatnia teoria zakłada działanie samego białka Bax, autonomicznie tworzącego samodzielny kanał regulowany przez białko Bid oraz tBid (Stępień i in. 2007).

Szlak mitochondrialny niezależnie od teorii powstania i struktury megakanalów, opiera się na uwolnieniu cytochromu c, połączeniu z czynnikiem Apaf1 i nieaktywną kaspazą 9 co prowadzi do powstania apoptosomu aktywującego kaspazę 9. Aktywna kaspaza 9 aktywuje kolejne kaspazy wykonawcze z następującą proteolizą białek i charakterystycznymi dla apoptozy zmianami morfologicznymi. (Stępień i in. 2007; Grądzka 2000). Najliczniejszymi i najlepiej poznanymi regulatorami szlaku wewnętrznego są białka z rodziny Bcl-2, które dzieli się na proapoptotyczne (Bid, Bad, Bak, Bax, Noxa) jak i wykazujące działanie inhibujące proces apoptozy (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1) (Stępień i in. 2007; Borner 2003). Ponadto czynnikami hamującymi działanie kaspaz 3, 7 i 9 są białka z rodziny inhibitora apoptozy IAP (ang. *Inhibitor of apoptosis protein*) a także proapoptotyczne białko p53 będące jednym z ważniejszych białek w szlaku apoptotycznym. Białko p53 wpływa pobudzająco na uwalnianie cytochromu c a także wzrost przepuszczalności błony mitochondrialnej poprzez wzrost ekspresji genów kodujących białka zależne od p53 czyli Puma, Noxa, Bax oraz Apaf-1. p53 może ponadto hamować ekspresję białek wpływających na wyciszenie ekspresji białek antyapoptotycznych (Stępień i in. 2007; Vousden i Lu 2002).

Zewnątrzkomórkowy szlak programowanej śmierci komórki opiera się na głównej roli ligandów oraz receptorów błonowych. Do receptorów zalicza się nadrodziny receptorów TNF (ang. *tumor necrosis factor*) do których należą: Fas/CD95/Apo1, TRAIL/Apo2, TNFR1 oraz TNFR2 zbudowane z domeny cytoplazmatycznej, transbłonowej oraz zewnątrzkomórkowej. Związanie liganda odpowiedniego dla danego receptora m.in. FasL, TRAIL/Apo2L oraz TNF- α wyzwala kaskadę sygnałów przekazywanych najpierw do białka adaptorowego FADD, które dzięki obecności domeny DED łączy się z domenami DED kaspaz 8 lub 10 (Stępień i in. 2007). Wskazane kaspazy zapoczątkowują kaskadę działań kolejnych kaspaz wykonawczych prowadzących ostatecznie do śmierci komórki (Stępień i in. 2007).

1.2 Szlak sfingomielinowo-ceramidowy, pseudoreceptorowy oraz siateczkowy

Szlak sfingomielinowo-ceramidowy wiąże się z połączeniem odpowiedniego liganda z receptorem rodziny TNF, wzrostem ceramidów w komórce i w efekcie z aktywacją obojętnej lub kwaśnej sfingomielinazy tnącej sfingomielinę na ceramid i fosfocholinę (Stępień i in. 2007; Lin i in. 2006). Ceramid, uznany jako wtórny przekaźnik śmierci, może aktywować m.in. kaskady kinaz SAPK/JNK (ang. *stress associated protein kinase/ Jun N-terminal kinase*), MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinases*), kinazy CAPK (ang. *ceramide-activated protein kinases*), fosfolipazę A₂ oraz fosfatazę CAPP (ang. *ceramide-activated protein phosphatase*) (Stępień i in. 2007; Perry 1999). Ceramidy mają również zdolność aktywacji ścieżki mitochondrialnej poprzez znaczący wzrost uwalniania cytochromu c oraz przepuszczalności błony mitochondrialnej (Stępień i in. 2007).

W szlak pseudoreceptorowy zaangażowane są dwa białka – perforyna oraz granzym B wytwarzane przez cytotoksyczne komórki układu immunologicznego (neutrofile, komórki NK oraz limfocyty T cytotoksyczne). Po rozpoznaniu komórki docelowej, z komórki cytotoksycznej dochodzi do przemieszczenia ziarnistości cytotoksycznych i degranulacji. Uwalniane perforyny ulegają wbudowaniu w błonę komórkową i polimeryzacji tworząc kanał umożliwiający swobodny przepływ jonów. Zjawisko to prowadzi do pojawienia się niestabilności komórki, utraty energii, niszczenia materiału genetycznego oraz zaburzenia osmotyczności. Innym elementem szlaku pseudoreceptorowego są granzymy (ang. *granule-associated enzymes*), których rola polega na

indukcji polimeryzacji perforyn, następnie wnikananiu do wnętrza komórki poprzez kanały utworzone przez perforyny i w ostateczności do degradacji organelli komórkowych oraz białek cytosolowych i integralnych struktury. Ponadto granzy my wykazują zdolność degradacji białek chromatyny (Paduch i in. 2015).

Szlak siateczkowy jest aktywowany zaburzeniami równowagi jonowej a także nagromadzeniem nieprawidłowo zmodyfikowanych lub sfałdowanych białek, które w wyniku tego nie są eksportowane z siateczki śródplazmatycznej. Zlokalizowana w błonach retikulum endoplazmatycznego kaspaza 12, odgrywa główną rolę w programowanej śmierci komórki. Kaspaza 12 wykazuje bowiem bezpośrednie działanie indukujące kaspazy wykonawcze, w tym kaspazę 7 i kaspazę 8 prowadząc tym samym do apoptozy komórki (Paduch i in. 2015; Breckeridge i in. 2003).

2. MikroRNA

Cząsteczki mikroRNA (miRNA) to niekodujące cząsteczki tworzące silnie konserwatywną grupę RNA, wykazującą post-transkrypcyjną regulację wyciszającą geny w wyniku bezpośredniej interakcji z docelowymi cząsteczkami matrycowego RNA (mRNA) (Ziaja i Pawliczak 2017). Endogenne cząsteczki miRNA są zbudowane z 22 nukleotydów a proces ich powstawania jest wieloetapowy i zaczyna się w jądrze komórkowym powstaniem pierwotnych transkryptów (pri-miRNA) w wyniku działania polimerazy RNA II. Powstałe poliadenylowane transkrypty ulegają katalitycznemu cięciu pod wpływem endonukleolitycznego kompleksu enzymatycznego Drosha w którego skład wchodzi białko DGCR8 oraz RNaza III. Proces ten skutkuje powstaniem pre-miRNA o długości około 70 nukleotydów (Ziaja i Pawliczak 2017; Du i Zamore 2005). Prekursorowa cząsteczka miRNA jest transportowana do cytoplazmy za pośrednictwem transportera – eksportyny-5 oraz jądrowego białka Ran-GTP (ang. *GTP-binding nuclear protein Ran*) (Ziaja i Pawliczak 2017; Du i Zamore 2005). W kolejnym etapie endorybonukleaza Dicer przeprowadza serię cięć katalitycznych prowadzących do powstania dupleksów miRNA/miRNA*. Jedna z nici ulega degradacji a druga zostaje włączona do kompleksu RISC co poprzedza połączenie miRNA z białkiem AGO2, które również wchodzi w kompleks RISC (Ziaja i Pawliczak 2017; Du i Zamore 2005). Powstały kompleks miRNA-AGO2-RISC jest zdolny do hamowania docelowego genu. Ważna jest obecność tzw. *seed region* o długości 6 nukleotydów, które dzięki komplementarności łączą się z sekwencją docelowego mRNA w pozycji 2-7 od końca 5' miRNA. Dzięki temu iż jest to krótka sekwencja, istnieje możliwość wpływu cząsteczek miRNA na ekspresję więcej niż jednego genu (Ziaja i Pawliczak 2017; Du i Zamore 2005).

Mechanizm działania miRNA opiera się na dwóch szlakach represji genów zależnie od stopnia komplementarności z docelowym mRNA. W sytuacji braku rozległej komplementarności miRNA w stosunku do docelowego mRNA, utworzony kompleks miRNA-AGO2-RISC wykazuje jedynie zdolność inhibicji translacji. W przypadku pełnej komplementarności miRNA z mRNA, kompleks degraduje matrycowe RNA. Ponadto miRNA wykazuje zdolność kontroli wielu procesów komórkowych w tym kontroluje metabolizm, sygnalizację, wzrost i różnicowanie a także uczestniczy w nowotworzeniu i procesach zapalnych (Ziaja i Pawliczak 2017).

MiRNA występuje w wielu płynach ustrojowych takich jak osocze, surowica, ślina i cechuje się znaczną odpornością na temperaturę, pH czy działanie wielu endogennych i egzogennych rybonukleaz. Z punktu widzenia diagnostycznego oraz terapeutycznego cząsteczki miRNA mogą stanowić doskonałe biomarkery. Szczególnie ważne jest znalezienie potencjalnych, nieinwazyjnych biomarkerów umożliwiających wczesną diagnostykę i wdrożenie celowanej terapii we wczesnym stadium chorób nowotworowych. Od chwili odkrycia cząsteczek miRNA, pracuje się nad zrozumieniem mechanizmu ich oddziaływania na ważne punkty kontrolne m.in. procesu apoptozy, będącego kluczowym w rozwoju nowotworów. Jak wykazano miRNA może kontrolować śmierć komórki na wielu etapach, w tym na poziomie szlaku mitochondrialnego ze szczególnym uwzględnieniem białek rodziny Bcl-2.

2.1 Struktura i funkcja białek rodziny Bcl-2

Wspomniane białka z rodziny Bcl-2 to grupa produktów onkogenów nie wpływających na proliferację komórkową ale na proces śmierci komórki. Wszystkie białka należące do tej rodziny

charakteryzują się co najmniej jedną identyczną domeną homologii z Bcl-2: BH1, BH2, BH3 oraz BH4. Domeny te występują tylko w białkach antyapoptotycznych, natomiast w białkach proapoptotycznych takich jak Bid czy Bad występuje tylko domena BH3. Białka z rodziny Bcl-2 mają w swojej strukturze C-kończącą transbłonową sekwencję sygnałno-zakotwiczącą, ułatwiającą przyłączenie do błon takich organelli jak: retikulum endoplazmatyczne, mitochondrium oraz zewnętrzna otoczka jądra komórkowego (Rupniewska i Bojarska-Junak 2004).

Białka należące do omawianej rodziny dzieli się na trzy grupy, w zależności od ich funkcji i struktury (Rupniewska i Bojarska-Junak 2004):

- I. Białka antyapoptotyczne: Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1, mające wszystkie cztery domeny BH oraz sekwencję zakotwiczącą.
- II. Białka proapoptotyczne m.in. Bak, Bax mające sekwencje BH1, BH2, BH3 oraz białko Bcl-x_S mające sekwencje BH1, BH2, BH3, BH4 (tzw. ang. *multidomain proapoptotic proteins*) Wszystkie białka tej grupy zawierają transbłonową sekwencję sygnałno-zakotwiczącą.
- III. Białka proapoptotyczne mające w strukturze tylko domenę BH (ang. *BH3 - only proteins*). Białka grupy trzeciej dzieli się ze względu na brak (Bad, Bid) lub obecność transbłonowej sekwencji sygnałno-zakotwiczącej (Bik, Blk, Bim).

Domena BH3 w strukturze białek proapoptotycznych wykazuje właściwości indukujące śmierć komórki. Ponadto interakcja tej domeny ze szczeliną utworzoną z pozostałych domen (BH1, BH2, BH3) białek blokujących apoptozę powoduje neutralizację białek sprzyjających apoptozie (Opiela i Kątska-Książkiewicz 2006; Borner 2003).

Białka Bcl-2 mają zdolność do heterodimeryzacji co jest kluczowe w kontroli śmierci i życia komórki. Proces apoptozy jest konsekwencją aktywacji kaspaz przy współdziałaniu receptorów śmierci i czynników mitochondrialnych. Indukcja apoptozy często następuje w przypadku wzbudzenia i modyfikacji białek zawierających tylko domenę BH3. Ponadto białka należące do grupy trzeciej ułatwiają tworzenie heterodimerycznych kompleksów z białkami zaklasyfikowanymi do grupy drugiej czyli zawierającymi więcej niż jedną domenę BH (Opiela i Kątska-Książkiewicz 2006; Borner 2003).

Wiadomo, iż białka indukujące apoptozę sprzyjają tworzeniu kanałów jonowych lub porów w błonie mitochondrialnej co skutkuje uwalnianiem do cytozolu kolejnych czynników proapoptotycznych takich jak: endonukleazy G, białko Smac/DIABLO, czynnik AIF oraz jeden z najważniejszych czynników mitochondrialnego szlaku apoptotycznego – cytochrom c (Opiela i Kątska-Książkiewicz 2006). Zahamowanie napływu czynników proapoptotycznych do cytozolu może zostać wstrzymane przez białka antyapoptotyczne a relacja ilościowa tych dwóch rodzajów białek z rodziny BCL-2 decyduje o tym czy komórka ulegnie zniszczeniu czy przeżyciu (Opiela i Kątska-Książkiewicz 2006).

2.2 MikroRNA w regulacji czynności pro- i antyapoptotycznych białek z rodziny Bcl-2

Wiele badań wskazuje na znaczącą rolę mikroRNA w regulacji wewnętrznego szlaku apoptotycznego. Jednym z białek rodziny BCL-2 należącym do grupy proapoptotycznych jest białko Bax. Jak wskazują badania Hamada i wsp. (Hamada i in. 2014) cząsteczki miR-365 mogą wywierać ukierunkowany wpływ na przeżycie komórek inwazyjnego, przewodowego gruczolakoraka trzustki. Stwierdzono istotnie zwiększoną ekspresję cząsteczek miR-365, co może sugerować bezpośrednie celowanie w białko SHC1 (ang. *SHC-transforming protein 1*) oraz białko Bax promujące apoptozę. Autorzy wykazali, że proces ten znacząco wpływa na oporność komórek rakowych na gemcytabinę – organiczny związek chemiczny o właściwościach proapoptotycznych, tym samym dokumentując, iż oś miR-365/SHC1/BAX promuje przeżycie komórek raka trzustki (Hamada i in. 2014).

Kolejne badania wykazały, że inna cząsteczka – miR-125b odgrywa ważną rolę w nowotworzeniu oraz oporności na leki. Zhou i wsp. (Zhou i in. 2010) poddali badaniu komórki rakowe odporne na paklitaksel (taksol) – antymitotyczny związek uniemożliwiający rozdzielenie chromatyd siostrzanych a tym samym blokujący wędrowkę chromatyd do biegunów podczas podziału komórki, co skutkuje zaburzeniem mitozy i śmiercią komórki. W komórkach tych wykazano

zwiększony poziom m.in. cząsteczki miR-125b, która powodowała wyraźne zahamowanie apoptozy i cytotoksyczności indukowanej przez taksol w komórkach rakowych. Najważniejszym odkryciem był fakt, iż bezpośrednim celem miR-125b jest białko Bak1, którego ekspresja była tłumiona a tym samym hamowany był proces apoptozy (Zhou i in. 2010).

Regulacja przez cząsteczki miRNA dotyczy również białka Bcl-2 – pierwszego odkrytego białka z omawianej rodziny, od którego została przyjęta jej nazwa. Wykazano m.in. rolę miR-15a i miR-16-1 w regulacji ekspresji genu kodującego białko Bcl-2 w przewlekłej białaczce limfocytowej (ang. *Chronic lymphocytic leukemia*, CLL). Cimmino i wsp. (Cimmino i in. 2005) wykazali, iż w komórkach B CLL dochodzi do obniżenia poziomu cząsteczek miR-15a oraz miR-16-1 a tym samym nadekspresji genu białka Bcl-2 co promuje złośliwą transformację komórkową. Wnioskowano, że działanie omawianych miRNA poprzez obniżenie poziomu białka Bcl-2 jest wystarczające do normalizacji procesu apoptozy w komórkach nowotworowych (Cimmino i in. 2005). Kolejnym supresorem białka Bcl-2 jest miR-204. Badania przeprowadzone przez Li i wsp. (Li N. i in 2019) na komórkach raka szyjki macicy wykazały, iż ekspresja miR-204 była znacząco obniżona, a w wyniku transfekcji miR-204 doszło do indukcji apoptozy. Nadekspresja miR-204 zmniejszyła ekspresję białka Bcl-2 a także zwiększyła ekspresję proapoptotycznego białka Bax. Wnioskowano więc, że miR-204 może hamować proliferację a także indukować apoptozę w komórkach raka szyjki macicy (Li N. i in 2019). MiR-148a to kolejna cząsteczka której celem jest antyapoptotyczne białko Bcl-2. Wykazano, iż miR-148a może być nie tylko supresorem komórek raka trzustki ale również znacząco promować apoptozę komórek poprzez celowanie w białko Bcl-2 (Zhang H. i in. 2011). Zaobserwowano ponadto, że Bcl-2 jest celem dla miR-24-2, którego nadekspresja powoduje, iż komórki są nadwrażliwe na leki wpływające uszkadzająco na DNA, promując apoptozę. Sugeruje to, że skojarzenie terapii lekami przeciwnowotworowymi z miR-24-2 może zapewnić nową ścieżkę w walce z nowotworami (Srivastava i in. 2011). Kolejnym miRNA celującym w omawianą antyapoptotyczną cząsteczkę jest miR-497 będącą przedmiotem badań Wei i wsp. (Wei i in. 2015). Autorzy badając potencjalny cel miR-497 na podstawie poziomu jego ekspresji w komórkach raka piersi wykazali znaczące zmniejszenie ekspresji tej cząsteczki w próbkach poddanych analizie. Ponadto jej nadekspresja tłumiała proliferację a także indukowała apoptozę. Wykazano także odwrotną korelację z ekspresją Bcl-2 co tłumaczy, że miR-497 negatywnie reguluje to białko na poziomie potranskrypcyjnym (Wei i in. 2015).

W szeregu białek antyapoptotycznych występuje również białko Bcl-xl – kolejny cel cząsteczek mikroRNA badany m.in. w glejaku wielopostaciowym gdzie dwa dojrzałe produkty miR-491 (miR-491-5p, miR-491-3p) wykazały ujemną regulację (Li X i in. 2015). Na podstawie przeprowadzonych badań wnioskuje się, iż oba produkty hamują proliferację linii komórek glejaka oraz upośledzają namnażanie komórek macierzystych glejaka, natomiast tylko miR-491-5p celuje bezpośrednio w ekspresję mRNA białka Bcl-xl (Li X. i in. 2015). Białko to jest również pod ścisłą kontrolą miR-133, którego obniżony poziom wykazano w komórkach raka żołądka. Ważne jest, iż przywrócenie ekspresji miR-133, hamuje proliferację komórek nowotworowych. Ponadto ta cząsteczka miRNA celuje również w inną antyapoptotyczną cząsteczkę należącą do tej samej rodziny – Mcl-1. Tym samym ujawniono szczególną rolę kolejnego supresora mogącego odegrać rolę w mechanizmie terapeutycznym (Liu i in. 2015). Dodatkowo wskazuje się miR-608 jako supresor rzadkiego nowotworu złośliwego – struniaka (ang. *chordoma*), którego cel stanowi m.in. Bcl-xl (Zhang Y. i in. 2014).

3. Podsumowanie

Apoptoza jest jednym z najważniejszych zjawisk zapewniających prawidłowe funkcjonowanie komórek oraz przebieg wielu procesów fizjologicznych w tym: funkcjonowanie systemu immunologicznego, utrzymanie homeostazy czy rozwój embrionalny. Zależnie od czynnika indukującego proces apoptozy może przebiegać różnymi ścieżkami, z czego najważniejszymi są szlaki mitochondrialny i receptorowy. Jednymi z ważniejszych czynników regulujących są białka należące do dużej rodziny o nazwie Bcl-2 w skład której wchodzi zarówno czynniki proapoptotyczne (m.in. Bid, Bak, Bax, NOXA, PUMA) jak i antyapoptotyczne (m.in. Bcl-2, Bcl-xl, mcl-2, Bcl-w). Same białka są jednakże celami dla innych czynników kontrolnych. W ostatnich latach zwrócono

szczególą uwagę na małe, niekodujące, endogenne cząsteczki mikroRNA regulujące postranskrypcyjne wyciszenie genów dzięki interakcji miRNA z cząsteczkami matrycowego RNA. Okazuje się, iż celem dla miRNA są również białka z rodziny Bcl-2. Biologia cząsteczek miRNA nie jest wciąż poznana jednakże nie ulega wątpliwości, że cząsteczki te wykazują ogromny wpływ nie tylko na procesy fizjologiczne, ale również na procesy patologiczne. Ważnym elementem jest obecność i stabilność miRNA we krwi, który stanowi szansę na uzyskanie potencjalnych nieinwazyjnych biomarkerów wielu schorzeń. Przeprowadzane od kilku lat badania pozwalają przypuszczać, iż określenie molekularnych mechanizmów współdziałania cząsteczek mikroRNA i białek Bcl-2 oraz określenie ich specyficzności stanowi perspektywę do wykazania ich przydatności terapeutycznej. Zrozumienie zachodzących procesów oraz opracowanie środków celowanych może stać się istotne dla rozszerzenia potencjału terapeutycznego.

4. Bibliografia

- Borner C. (2003) The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Molecular Immunology*, 39(11): 615–647.
- Breckeridge DG, Germain M, Mathai JP, et al. (2003) Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene*. 22 (53), 8608–8618.
- Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. (2005) miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(39):13944-12949.
- Daniel PT. (2000) Dissecting the pathways to death. *Leukemia*, 14: 2035–2044.
- Du T, Zamore PD. (2005) microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development*, 132(21):4645–4652.
- Grądzka I. (2000) Apoptoza: decyzja należy do mitochondrium. *Postępy Biochemii*, 46(1): 2–16.
- Hamada S, Masamune A, Miura S, et al. (2014) MiR-365 induces gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells by targeting the adaptor protein SHC1 and pro-apoptotic regulator BAX. *Cellular Signaling*. 26(2):179–185.
- Li N, Guo X, Liu L, et al. (2019) Molecular mechanism of miR-204 regulates proliferation, apoptosis and autophagy of cervical cancer cells by targeting ATF2. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*. 47(1):2529-2535.
- Li X, Liu Y, Granberg KJ, et al. (2015) Two mature products of MIR-491 coordinate to suppress key cancer hallmarks in glioblastoma. *Oncogene*. 34(13):1619–1628.
- Lin CF, Chen CL, Lin YS. (2006) Ceramide in apoptotic signaling and anticancer therapy. *Current Medicinal Chemistry*, 13(14): 1609–1616.
- Liu Y, Zhang X, Zhang Y, et al. (2015) Identification of miRNomes in human stomach and gastric carcinoma reveals miR-133b/a-3p as therapeutic target for gastric cancer. *Cancer Letters*. 369(1):58-66.
- Opiela J, Kątska-Książkiewicz L. (2006) Rola białek rodziny BCL-2 w kontroli apoptozy w pęcherzykach jajnikowych. *Biotechnologia*. 1(72):90-96.
- Paduch R, Klatka M, Klatka J. (2015) Rodzaje śmierci komórki. *Pomeranian Journal of Life Sciences*, 61(4):411-418.
- Perry DK. (1999) Ceramide and apoptosis. *Biochemical Society Transactions*, 27(4):399–404.
- Rupniewska Z, Bojarska-Junak A. (2004) Apoptoza: Przepuszczalność błony mitochondrialnej i rola pełniona przez białka z rodziny Bcl-2. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 58: 538-547.
- Srivastava N, Manvati S, Srivastava A, et al. (2011) miR-24-2 controls H2AFX expression regardless of gene copy number alteration and induces apoptosis by targeting antiapoptotic gene BCL-2: a potential for therapeutic intervention. *Breast Cancer Research*, 13(2):R39.
- Stępień A, Izdebska M, Grzanka A. (2007) Rodzaje śmierci komórki. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 61:420-428.
- Vousden KH, Lu X. (2002) Live or let die: the cell's response to p53. *Nature Reviews. Cancer*, 2(8): 594–604.

- Wei C, Luo Q, Sun X, et al. (2015) MicroRNA-497 induces cell apoptosis by negatively regulating Bcl-2 protein expression at the posttranscriptional level in human breast cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(7):7729–7739.
- Zhang H, Li Y, Huang Q, et al. (2011) MiR-148a promotes apoptosis by targeting Bcl-2 in colorectal cancer. *Cell Death and Differentiation*, 18(11):1702-1710.
- Zhang Y, Schiff D, Park D, Abounader R. (2014) MicroRNA-608 and microRNA-34a regulate chordoma malignancy by targeting EGFR, Bcl-xL and MET. *PLoS One*. 9(3):e91546.
- Zhou M, Liu Z, Zhao Y, et al. (2010) MicroRNA-125b confers the resistance of breast cancer cells to paclitaxel through suppression of pro-apoptotic Bcl-2 antagonist killer 1 (Bak1) expression. *The Journal of biological chemistry*, 285(28): 21496–21507.
- Ziaja M, Pawliczak R. (2017) MiRNA – rola i znaczenie w astmie oskrzelowej. *Alergologia Polska – Polish Journal of Allergology*. 4(3):93-102.

10. Białka inhibitorowe apoptozy (IAP) i ich antagoniści w ostrej białaczce szpikowej

Inhibitor of apoptosis proteins (IAP) and their antagonists in acute myeloid leukemia

Miśkiewicz Joanna⁽¹⁾, Krawczyk Agata⁽²⁾, Strzałka-Mrozik Barbara⁽¹⁾

⁽¹⁾Zakład Biologii Molekularnej Katedry Biologii Molekularnej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁽²⁾Zakład Nutrigenomiki i Bromatologii Katedry Biologii Molekularnej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
Opiekun naukowy: dr hab. n. farm. Barbara Strzałka-Mrozik

Miśkiewicz Joanna: joannamiskiewicz07@gmail.com

Słowa kluczowe: inhibitory, apoptoza, białaczka

Streszczenie

Białka inhibitorowe apoptozy (ang. inhibitor of apoptosis protein, IAP) są polipeptydami należącymi do grupy związków antyapoptotycznych, które tworząc związki z innymi składowymi programowanej śmierci komórki, zaburzają ich funkcjonowanie. Rodzina białek IAP obejmuje białka podzielone na trzy klasy: klasa I - XIAP, cIAP-1, cIAP-2, liwina, ILP-2, klasa II - białko NAIP oraz klasa III obejmująca surwiwinę oraz BRUCE/Apollon. Ważnym krokiem okazało się zidentyfikowanie grupy antagonistów IAP do których należą: Smac/DIABLO, HtrA2/Omi oraz XAF1. Ze względu na ważną rolę jaką odgrywa ta grupa białek w apoptozie, uznaje się, iż mogą być kluczowym elementem w rozwoju chorób nowotworowych w tym w jednej z chorób rozrostowych układu krwiotwórczego – ostrej białaczce szpikowej (ang. acute myeloid leukemia, AML). Przeprowadzone dotychczas badania wskazują na istotny udział IAP w procesie transformacji nowotworowej komórek białaczkowych. W niniejszej pracy zwrócono szczególną uwagę na udział białek XIAP, cIAP-1, cIAP-2, liwiny oraz surwiwiny a także rolę antagonistów IAP- białka Smac/DIABLO oraz HtrA2 w rozwoju AML. Biorąc pod uwagę zaburzenia ekspresji wszystkich wspomnianych białek, uzasadnionym wydaje się prowadzenie kompleksowych badań mających na celu dokładne poznanie mechanizmów działania IAP oraz zależności pomiędzy ich ekspresją u chorych na AML celem udoskonalenia schematów terapeutycznych.

1. Białka inhibitorowe apoptozy

Białka inhibitorowe apoptozy (ang. *inhibitor of apoptosis protein*, IAP) to polipeptydy zaliczane do grupy inhibitorów programowanej śmierci komórki tworzące kompleksy z innymi białkami biorącymi udział w procesach apoptotycznych m.in. antagonistami IAP, czynnikami transkrypcyjnymi, kaspazami czy białkami adaptorowymi. W wyniku interakcji z innymi białkami, IAP zakłócają sygnały apoptotyczne przekazywane przez te czynniki (Grzybowska-Izydorczyk i Smolewski 2009).

1.1 Struktura białek inhibitorowych apoptozy

Białka inhibitorowe apoptozy są zbudowane z łańcuchów liczących od 150 do 1500 aminokwasów. Cechą wyróżniającą tę grupę białek jest obecność dwóch motywów sekwencyjnych: domeny RING (ang. *really interesting new gene*) na C-końcu oraz domeny BIR (ang. *baculoviral IAP-like repeats*) na N-końcu cząsteczki. Domena BIR jest zbudowana z około 70 reszt aminokwasowych a wśród nich występują sekwencje CysX6His oraz CysX2Cys, co świadczy o możliwości wiązania jonów cynkowych (Grzybowska-Izydorczyk i Smolewski 2009). Domena RING ma strukturę palca cynkowego (ang. *RING zinc finger*, RZF) i wykazuje aktywność ligazy E3 ubikwityna-białko wykazując zdolność ubikwitynacji białek docelowych oraz autoubikwitynacji. Ubikwitynacja to proces modyfikacji białek docelowych poprzez przyłączenie jednej ubikwityny,

bądź kilku cząsteczek co prowadzi do degradacji ubikwitynowanego białka w proteasomie 26S. Monoubikwitynacja prowadzi zazwyczaj do wyciszenia genu, naprawy DNA lub przenoszenia sygnału. W opisanym procesie biorą udział enzymy zawierające domenę UBC (ang. *Ubiquitin-conjugating domain*) z resztami cysteinowymi. Ponadto, proces ubikwitynacji wymaga obecności ATP (adenozyno-5'-trifosforan) (Grzybowska-Izydorczyk i Smolewski 2009; Jesenberger i Jentsch 2002).

1.2 Podział białek IAP

Do rodziny białek inhibitorowych apoptozy należy osiem białek podzielonych na trzy klasy w zależności od obecności lub braku domeny RZF oraz homologii domeny BIR (Grzybowska-Izydorczyk i Smolewski 2009).

Klasa I białek IAP

Do pierwszej klasy należy pięć białek: (XIAP, cIAP1, cIAP2, ILP2, liwina), których cechą charakterystyczną jest obecność domeny RZF. W białkach cIAP1, cIAP2 oraz XIAP występują ponadto, trzy domeny BIR, a w białkach ILP2 oraz liwinie występuje jedna domena BIR o znacznej homologii do domeny BIR3 pozostałych białek z tej grupy (Grzybowska-Izydorczyk i Smolewski 2009).

Białka XIAP są to najefektywniejsze poznane inhibitory apoptozy, w których strukturze występują trzy domeny BIR, a ponadto mają możliwość inicjacji kaspaz wykonawczych oraz kaspazy 9. Wiadomo, iż domena BIR-2 wykazuje aktywność hamowania kaspaz 3 oraz 7 a region łącznikowy pomiędzy domenami BIR1 a BIR2 stanowi przestrzenną przeszkodę zakrywającą miejsca aktywne kaspaz 3 oraz 7 przed substratami (Grzybowska-Izydorczyk i Smolewski 2009; Huang i in. 2001). Białko XIAP może również hamować apoptozę poprzez tworzenie kompleksów z kinazą TAK1 (ang. *Transforming growth factor beta-activated kinase 1*) oraz jej kofaktorem TAB1 (ang. *TGF-beta activated kinase 1 (MAP3K7) binding protein 1*) prowadząc do aktywacji kinazy JNK (ang. *Jun-N-terminal kinase*), która z kolei aktywuje fosforylację kinazy MAP (ang. *mitogen-activated protein kinase*) z ostateczną aktywacją czynnika NF- κ B (Grzybowska-Izydorczyk i Smolewski 2009; Sanna i in. 2002). Ponadto, białko to ma zdolność hamowania apoptozy indukowanej: czynnikiem martwicy nowotworu (ang. *tumor necrosis factor*, TNF), antygenem powierzchniowym związanym z FS-7 (ang. *FS-7 associated surface antigen*, Fas), lekami oraz promieniowaniem radioaktywnym (Grzybowska-Izydorczyk i Smolewski 2009).

Białka cIAP1 oraz cIAP2, wśród pozostałych białek klasy I wyróżnia obecność domeny CARD (ang. *caspase recruitment domain*), która występuje między domenami BIR oraz RZF. Omawiane białka również wykazują zdolność hamowania kaspaz 3 i 7 a także wiązania i hamowania kaspaz 1, 6 oraz 8. Ponadto, wykazują one działanie na receptorowej ścieżce apoptozy poprzez białka adaptorowe wiążące się z TNF-R: TRAF1 oraz TRAF2 (ang. *TNF receptor-associated factors 1 i 2*), czego wynikiem jest zniesienie proteolizy prokaspazy 8. Białko cIAP1 może interferować z czynnością surwiwiny. Regulacja cIAP2 odbywa się również za pośrednictwem czynnika NF κ B (Grzybowska-Izydorczyk i Smolewski 2009).

Liwina oraz ILP-2 to białka wyróżniające się obecnością tylko jednej domeny BIR. Liwina występuje w postaci dwóch izoform α i β . Jej obecność u dorosłego człowieka fizjologicznie wykazano tylko w łożysku, natomiast patologicznie w kilku nowotworowych liniach komórkowych. Liwina występuje także w rozwijających się tkankach. Białko hamuje apoptozę zarówno poprzez wpływ na ścieżkę mitochondrialną, jak i receptorową poprzez blokowanie kaspazy 3, 7 a także kaspazy 9 (Grzybowska-Izydorczyk i Smolewski 2009; Kasof i Gomes 2001).

Klasa II białek IAP

Do II klasy IAP należy tylko białko NAIP, które pod względem strukturalnym charakteryzuje się obecnością tylko trzech domen BIR i brakiem domeny RZF. Szczególną strukturą w NAIP jest obecna na

C-końcu domena NOD (ang. *nucleotide-binding oligomerization domain*) z obecnym skupiskiem 14 powtórzeń bogatych w leucynę (ang. *leucine rich repeats*, LRRs) występujących po NOD. NAIP ze względu na obecność LRRs wiążącego lipopolisacharydy wewnątrzkomórkowe

wydzielane przez bakterie, uczestniczą w odpowiedzi gospodarza na wewnątrzkomórkowe zakażenia bakteryjne związane z wytwarzaniem cytokin i aktywacją NFκB (Grzybowska-Izydorczyk i Smolewski 2009).

Klasa III białek IAP

Białka zakwalifikowane do III klasy to surwiwina oraz BRUCE (Apollon), które posiadają w swojej strukturze tylko jedną domenę BIR i brak domeny RZF. Sugeruje się, iż białka te bardziej niż w apoptozie, uczestniczą w regulacji podziałów komórkowych (Grzybowska-Izydorczyk i Smolewski 2009).

Ekspresja surwiwiny jest ściśle związana z cyklem komórkowym a głównie z fazą G₂/M. Struktura tego białka ściśle odpowiada jego zdolnościom antyapoptotycznym. Wykazuje ono podobieństwo do białka XIAP, jednakże posiada tylko jedną domenę BIR na N-końcu podobną strukturą do domeny BIR3 białka XIAP. Prawdopodobnie, dzięki temu hamuje kaspazę 9. Sugeruje się, iż może hamować również pośrednio aktywność kaspazy 3 poprzez ścieżkę cyklino-zależnego inhibitora kinazy p21^{WAF1/Cip1}, jednakże wciąż trwają badania nad innym możliwym mechanizmem inhibującego działania surwiwiny na kaspazę 3 (Grzybowska-Izydorczyk i Smolewski 2009; Fukuda i in. 2004). Przeciwnie do pozostałych białek IAP, surwiwina nie posiada domeny RING o strukturze palca cynkowego na C-końcu, a charakterystyczną cechą jest występujący w tym regionie motyw alfa-helikalny (ang. *alfa-helical coiled-coil*) wchodzący w interakcję z mikrotubuliną (Grzybowska-Izydorczyk i Smolewski 2009; Li F. i in. 1998). Innym antyapoptotycznym mechanizmem działania surwiwiny jest translokacja jądrowa czynnika indukcji apoptozy (ang. *apoptosis inducing factor*, AIF), który wpływa na fragmentację DNA niezależnie od kaspaz. Surwiwina może również hamować apoptozę poprzez zniesienie fazy G1 i S cyklu komórkowego (Grzybowska-Izydorczyk i Smolewski 2009; Suzuki A. i in. 2000). Na uwagę zasługuje fakt, iż nadekspresję surwiwiny stwierdzono w większości ludzkich nowotworów, natomiast w zróżnicowanych komórkach białko to jest nie wykrywane (Grzybowska-Izydorczyk i Smolewski 2009).

Drugim białkiem zaliczanym do klasy III jest BRUCE, będące dużym białkiem błonowym o strukturze podobnej do surwiwiny, jednak na C-końcu posiada domenę UBC wiążącą ubikwitynę. Można więc sugerować, iż BRUCE działa jako ligaza ubikwitynowa E3 (Grzybowska-Izydorczyk i Smolewski 2009). Omawiane antyapoptotyczne białko poprzez domenę BIR znosi proces apoptozy. Głównie sugeruje się, iż BRUCE działa jako chimeryczny enzym E2/E3 na białka Smac/DIABLO (ang. *second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP – binding protein with low pI*), kaspazy 9 oraz proteazy serynowe HtrA2/Omi (ang. *high temperature requirement A2*) powodując jego ubikwitynację oraz degradację w proteasomie (Grzybowska-Izydorczyk i Smolewski 2009; Qiu i Goldberg 2005; Sekine i in. 2005).

1.3 Antagoniści białek inhibitorowych apoptozy

Zidentyfikowano również grupę białek wykazujących działanie antagonistyczne wobec białek IAP. Obecnie są znane trzy białka, które mogą bezpośrednio oddziaływać z omawianą grupą białek antyapoptotycznych: Smac/DIABLO, HtrA2/Omi oraz XAF1 (Grzybowska-Izydorczyk i Smolewski 2009).

Smac/DIABLO, dotychczas najlepiej poznane białko antagonistyczne wobec IAP, syntetyzowane w postaci cytozolowych cząsteczek prekursorowych w mitochondrium, które ulegają proteolitycznej modyfikacji w dojrzałe białka. Dojrzałe białko wraz z cytochromem c zostaje uwolnione do cytozolu, gdzie oddziałuje z białkami IAP – XIAP, cIAP-1, cIAP-2 i surwiwiną. Charakterystyczną strukturą tego białka jest obecność motywu wiążącego IAP (ang. *IAP binding motif*, IBM) na N-końcu. Motyw IBM umożliwia wiązanie Smac/DIABLO z domeną BIR, co prowadzi do stymulacji autoubikwitynacji i degradacji IAP bądź aktywacji kaspaz (Grzybowska-Izydorczyk i Smolewski 2009; Srinivasula i in. 2001).

Białko HtrA2/Omi to proteaza serynowa, syntetyzowana z prekursora zwierającego N-końcowy sygnał lokalizacji mitochondrialnej (ang. *mitochondrial localization signal*, MLS). Czynniki apoptotyczne stymulują transport HtrA2/Omi do cytozolu. Z wykorzystaniem domeny IBM wchodzi ono w interakcję z białkiem XIAP a dokładniej z domeną BIR3, podobnie jak Smac/DIABLO. W tej interakcji ważną rolę odgrywa alanina, która jako część motywu Ala-Val-Pro-

Ser. HtrA2/Omi może być odpowiedzialna za degradację proteolityczną nie tylko białka XIAP ale również cIAP-1 oraz cIAP-2 (Grzybowska-Izydorczyk i Smolewski 2009; Suzuki Y. i in. 2004).

XAF1 to kolejne białko zakwalifikowane do grupy antagonistów IAP, zdolne do przyłączania i bezpośredniej interakcji z XIAP, a także z cIAP-1, cIAP-2, NAIP oraz liwiną. XAF1 to białko jądrowe zbudowane z 301 aminokwasów, którego struktura charakteryzuje się obecnością motywu RZF, czyli struktury palca cynkowego w odcinku N-końcowym, umożliwiającym interakcję z innymi białkami. Natomiast kluczowy dla funkcji proapoptotycznej jest fragment C-końcowy. Obecnie znane są trzy transkrypty omawianego białka – XAF1A, XAF1B oraz XAF1C. Wiadomo, iż XAF1 może znosić hamowanie przez XIAP kaspazy 3 (Grzybowska-Izydorczyk i Smolewski 2009; Straszewski-Chavez i in. 2007).

2. Ostra białaczka szpikowa

Ostra białaczka szpikowa (ang. *acute myeloid leukemia*, AML) to choroba rozrostowa układu krwiotwórczego charakteryzująca się klonalną proliferacją i gromadzeniem się morfologicznie i czynnościowo niedojrzałych blastów. Niedojrzałe komórki wywodzą się z transformowanej, prekursorowej nowotworowej komórki hematopoetycznej. Nieprawidłowe komórki wypierają prawidłowe linie komórkowe powodując wystąpienie małopłytkowości, niedokrwistości i obniżenie liczby neutrofilii (Kata i Kyrz-Krzemień 2011). W 2008 roku Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO) zaproponowała podział AML ze względu na modyfikacje morfologiczne, immunofenotypowe i kliniczne oraz nieprawidłowości cytogenetyczne i molekularne (Vardiman i in. 2009; Kata i Kyrz-Krzemień 2011). Podział AML przedstawiono w Tabeli 1.

Tab.1. Ostre białaczki szpikowe (AML) według klasyfikacji WHO z 2008 roku (źródło: Vardiman i in. 2009; Kata i Kyrz-Krzemień 2011).

OSTRE BIAŁACZKI SZPIKOWE	
➤	AML z powtarzalnymi zmianami cytogenetycznymi
	<ul style="list-style-type: none"> • AML z t(8;21) (q22;q22); RUNX1-RUNX1T1 • AML z inv(16) (p13.1q22) lub t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11 • Ostra białaczka promielocytowa z t(15;17)(q22;q12); PML-RARA • AML z t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL • AML z t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214 • AML z inv(3)(q21;q26.2) lub t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1 • AML megakarioblastyczna z t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1 • AML mutacją NMP1 (jednostka prowizoryczna) • AMLz mutacją CEBPA (jednostka prowizoryczna)
➤	AML związane ze zmianami mielodysplastycznymi
➤	Nowotwory mieloidalne zależne od terapii
➤	AML bez specyfikacji innej niż morfologiczna – NOS (ang. <i>not otherwise specified</i>)
	<ul style="list-style-type: none"> • Ostra białaczka szpikowa z minimalnym różnicowaniem • Ostra białaczka szpikowa bez cech dojrzewania • Ostra białaczka szpikowa z dojrzewaniem • Ostra białaczka mielomonocytowa • Ostra białaczka monoblastyczna i monocytowa • Ostra białaczka erytroblastyczna <ul style="list-style-type: none"> ○ Czysta białaczka erytroidalna ○ Erytroleukemia • Ostra białaczka megakarioblastyczna • Ostra białaczka bazofilowa • Ostra panmieloza z mielofibrozą

OSTRE BIAŁACZKI SZPIKOWE	
➤	Mięsak mieloidalny
➤	Proliferacje mieloidalne związane z zespołem Downa <ul style="list-style-type: none"> • Przemijająca nieprawidłowa mielopoeza • Białaczka szpikowa związana z zespołem Downa
➤	Nowotwór z blastycznych plazmocytoidalnych komórek dendrytycznych
➤	Ostre białaczki o niejednoznacznym liniowym pochodzeniu <ul style="list-style-type: none"> • Ostra białaczka niezróżnicowana • Ostra białaczka o mieszanym fenotypie z t(9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL1 • Ostra białaczka o mieszanym fenotypie z t(v;11q23); rearanżacje MLL • Ostra białaczka o mieszanym fenotypie linii B-mieloidalnym, NOS • Ostra białaczka o mieszanym fenotypie linii T-mieloidalnym, NOS • <i>Białaczka limfoblastyczna/chłoniak z komórek NK</i>

2.1 Patogeneza ostrej białaczki szpikowej

W patogenezie ostrej białaczki szpikowej ważną rolę odgrywają nabyte zaburzenia genetyczne oraz epigenetyczne komórek krwiotwórczych, prowadząc do zaburzeń w zakresie ich różnicowania i proliferacji. Zgodnie z zasadą „dwóch uderzeń” sugeruje się, iż transformacja białaczkowa powstaje wskutek aberracji genetycznych wpływających na czynniki transkrypcyjne lub koaktywatory hamujące dojrzewanie komórek oraz wskutek mutacji aktywujących szlaki przekazujące sygnały pobudzające proliferację i/lub promujące przeżycie komórki (Kata i Kyrzcz-Krzemień 2011; Gilliland i in. 2004).

Wśród mutacji wpływających na leukemogenezę wyróżnia się mutacje oddziałujące na proces transkrypcji, mutacje aktywujące proliferację oraz mutacje oddziałujące na apoptozę i cykl komórek białaczkowych (Kata i Kyrzcz-Krzemień 2011).

Pierwsza grupa mutacji obejmuje zmiany biomolekularne wpływające na proces transkrypcji, w wyniku następujących aberracji chromosomowych: t(8;21), t(15,17), inv(16)/t(16;16), a także nieprawidłowości 11q23. Zmiany molekularne są związane z modyfikacją genów kodujących podjednostki α bądź β czynnika transkrypcyjnego CBF (ang. *core binding factor*) (Kata i Kyrzcz-Krzemień 2011).

Do mutacji pobudzających proliferację należy mutacja genu FLT3 (ang. *FMS-like tyrosine kinase*) kodującego białko wykazujące aktywność kinazy tyrozynowej (Kata i Kyrzcz-Krzemień 2011). Wspomniane mutacje obejmują wewnętrzną tandemową duplikację (ang. *FLT3 - internal tandem duplication*, FLT-3 ITD), a także duplikację domeny kinazy tyrozynowej FLT3 (ang. *tyrosine kinase domain*, FLT3-TKD) (Kata i Kyrzcz-Krzemień 2011). Zmiany w obrębie domeny kinazy, spowodowane duplikacją, skutkują autofosforylacją oraz aktywacją receptora bez konieczności udziału liganda, co powoduje nieustanną aktywację FLT3 oraz ciągłą stymulację kaskady kinaz PI-3/AKT/RAS/MAPK i STAT5. Ciągła aktywacja wspomnianych czynników nasila sygnały antyapoptotyczne oraz proliferację komórek (Kata i Kyrzcz-Krzemień 2011). Ponadto, dochodzi do mutacji genu *RAS* (ang. *Ras viral oncogene homolog gene*) kodującego białka RAS, wpływające na cykl i różnicowanie komórek. Mutacje obejmują izoformy HRAS, KRAS oraz NRAS (Kata i Kyrzcz-Krzemień 2011).

Trzecia grupa wspomnianych mutacji dotyczy tych zachodzących w genach związanych z kontrolą apoptozy i cykli komórkowych. Mutacja dotyczy m.in. nukleoplazminy 1 (NPM1) będącej zlokalizowanym w jąderku, nukleoplazmatycznym białkiem, przemieszczającym się między jądrem a cytoplazmą. Gen kodujący białko NPM1, w zależności od poziomu ekspresji, działa jako gen supresorowy bądź onkogen. Omawiane białko wpływa na białko p53, kontrolując apoptozę oraz proliferację komórek wpływając jednocześnie na biogenezę rybosomów, naprawę DNA oraz duplikację centromerów w mitozie. Do mutacji trzeciej grupy należą również delecje genu kodującego białko p53 (TP53), który jest zlokalizowany we fragmencie 17p (Kata i Kyrzcz-Krzemień 2011).

2.2 Białka IAP w ostrej białaczce szpikowej

Na podstawie dotychczas przeprowadzonych badań ustalono zwiększoną ekspresję IAP w wielu rodzajach komórek nowotworowych, w tym w komórkach ostrej białaczki szpikowej. Wydają się więc prawdopodobne konkretne konsekwencje kliniczne spowodowane zaobserwowaną nadekspresją IAP (Grzybowska-Izydorczyk i Smolewski 2009).

Jednym z białek rodziny IAP, którego znacząco zwiększoną ekspresję wykazano w AML jest białko XIAP (Tamm i in. 2000). Wraz z obniżaniem poziomu tego białka, chorzy na AML wykazywali dłuższy czas przeżycia oraz tendencję do dłuższego czasu remisji w porównaniu z pacjentami ze zwiększoną ekspresją XIAP (Tamm i in. 2000). Aby lepiej zrozumieć rolę XIAP w ostrej białaczce szpikowej Carter i wsp. (Carter i in. 2013) przeprowadzili badania mające na celu tłumienie ekspresji XIAP poprzez oligonukleotydy antysensowne (ang. *anti-sense oligonucleotides*, ASO). Autorzy wykazali, iż hamowanie ekspresji XIAP powoduje zwiększenie aktywności proteasomu – wieloenzymatycznego kompleksu odgrywającego kluczową rolę w degradacji m.in. nieodpowiednio uformowanych bądź zużytych i nieprawidłowych białek (Carter i in. 2013).

Surwiwina jest kolejnym białkiem należącym do rodziny IAP, którego nadmierną ekspresję wykryto w komórkach osób chorych na AML. Adnan-Awad i wsp. (Adnan-Award i in. 2019) wykazali nadekspresję surwiwiny w komórkach białaczkowych, co było związane z gorszym wskaźnikiem całkowitej remisji a także wskaźnikiem przeżycia (Adnan-Award i in. 2019). Zareifar i wsp. (Zareifar i in. 2018) wykazali, iż u 81,4% badanych (dzieci poniżej 18 roku życia) z AML występuje nadekspresja surwiwiny i liwiny oraz stwierdzili dodatnią korelację ekspresji surwiwiny z ryzykiem nawrotu choroby a także wysokim poziomem liczby leukocytów (ang. *white blood cells*, WBC). Omawiane badania wykazały również istotny związek między poziomem ekspresji surwiwiny a krótszym czasem całkowitego przeżycia niezależnie od podtypów AML, w tym ostrej białaczki promielocytowej (ang. *acute promyelocytic leukemia*, APL) oraz nieostrej białaczki promielocytowej (ang. *nonacute promyelocytic leukemia*, non-APL). Ponadto, stwierdzono istotny związek ekspresji liwiny z krótszym czasem całkowitego przeżycia chorych, jednak tylko w grupie pacjentów z APL (Zareifar i in. 2018). Wiadomo, iż surwiwina wiąże się z opornością na leki powodując poważny problem kliniczny poprzez zdecydowanie słabszą odpowiedź na zastosowaną terapię. Oporność na chemioterapię przyspiesza nawrót choroby oraz obniża wskaźnik przeżycia. Przeprowadzono m.in. badania polegające na wyciszeniu surwiwiny za pośrednictwem etopozydu (pochodna podofilotoksyny, półsyntetyczna substancja wykazująca działanie cytostatyczne) oraz małego interferującego RNA (ang. *small interfering RNA*, siRNA) – dwuniciowej cząsteczki RNA, powodującej wyciszenie ekspresji docelowych genów o sekwencji homologicznej. Określono łączny wpływ na komórki AML linii U-937. Wykazano, iż siRNA surwiwiny skutecznie obniżyło poziomy zarówno mRNA oraz białka surwiwiny prowadząc do zwiększonej apoptozy oraz obniżenia proliferacji komórkowej. Synergistycznie działanie siRNA surwiwiny oraz etopozydu zwiększało działanie substancji o działaniu cytostatycznym oraz indukowanie apoptozy (Jafarlou i in. 2016).

Kolejnym białkiem z rodziny IAP, które poddano intensywnym badaniom jest białko BRUCE/Apollon. Sung i wsp. (Sung i in. 2007) objęli badaniem 55 pacjentów (dzieci i młodzież) z AML *de novo* u których wykazano wyższą ekspresję genu kodującego białko Apollon. Ponadto, nadekspresja tego genu była związana z niekorzystną odpowiedzią na zastosowaną chemioterapię oraz korelowała z gorszym 3-letnim wskaźnikiem przeżycia bez nawrotów choroby (Sung i in. 2007).

Badania przeprowadzone przez Pluta i wsp. (Pluta i in. 2015) to jedne z głównych badań oceniających jednocześnie cztery białka z rodziny IAP wraz z korelacją odpowiedzi na leczenie i przeżycie. Autorzy ocenili ekspresję białek należących do rodziny IAP (XIAP, cIAP-1, cIAP-2, surwiwina) oraz białek działających do nich antagonistycznie w odniesieniu do odpowiedzi na leczenie i przeżycie. Badaniu zostało poddanych 56 nowo zdiagnozowanych dorosłych pacjentów z AML. Wykazano ekspresję XIAP, cIAP-1, cIAP-2, surwiwiny oraz Smac/DIABLO. Ponadto, stwierdzono silną korelację między ekspresją XIAP i cIAP-1, XIAP i cIAP-2 a także cIAP-1 oraz cIAP-2. Natomiast nie stwierdzono korelacji między surwiwiną a pozostałymi badanymi białkami. Zaobserwowano również ujemną zależność między ekspresją proapoptotycznego czynnika Smac/DIABLO oraz ekspresją białek XIAP, cIAP-1 oraz cIAP-2 i brak tej zależności między Smac/DIABLO a surwiwiną. W badaniu u 70% pacjentów zastosowano intensywną terapię

indukcyjną. Stwierdzono, że indywidualna ekspresja surwiwiny, XIAP, cIAP-1 bądź cIAP-2 nie ma wpływu na prawdopodobieństwo osiągnięcia pełnej odpowiedzi, natomiast jednoczesny brak ekspresji czterech wspomnianych białek był związany z wyższym prawdopodobieństwem osiągnięcia 100% odpowiedzi. Ponadto, niska ekspresja surwiwiny wpływała na całkowity czas przeżycia (Pluta i in. 2015). Rolę białka Smac/DIABLO, jako antagonisty IAP, wykazali również Suliman i wsp. (Suliman i in. 2013) u 70 nowo zdiagnozowanych pacjentów z AML. Gen ten ulegał ekspresji u 88,5% chorych z AML, gdzie u 32 pacjentów z dodatnią ekspresją stwierdzono odpowiedź na leczenie. Ekspresja genu kodującego proapoptotyczne białko Smac/DIABLO była związana z wydłużeniem czasu wolnego od choroby a także wzrostem wskaźnika przeżycia (Suliman i in. 2013).

Kolejnym białkiem, którego zmienioną ekspresję wykazano u chorych na AML jest białko HtrA2 (Omi) – antagonistą IAP. Li i wsp. (Li XY. i in. 2012) badając 104 nowo zdiagnozowanych pacjentów z AML, wykazali znacząco obniżoną ekspresję genu kodującego HtrA2 u pacjentów z AML w porównaniu do grupy kontrolnej. Wnioskuje się więc, iż HtrA2 może stać się kolejnym celem terapeutycznym u chorych z AML (Li XY. i in. 2012).

3. Podsumowanie

Zaburzenie procesów śmierci komórki jest fundamentem rozwoju nowotworów a rola białek inhibitorowych apoptozy, a także ich antagonistów w regulacji mechanizmów przeżycia i śmierci komórek jest niepodważalna. Defekt genetyczny związany z nadekspresją białek IAP, a także obniżona ekspresja ich antagonistów prowadzi do powstania antyapoptotycznego profilu komórki oraz indukcji proliferacji klonów komórek nowotworowych (Grzybowska-Izydorczyk i Smolewski 2009). Sugeruje się ich rolę w rozwoju chorób rozrostowych układu krwiotwórczego, w tym ostrej białaczki szpikowej. Niezwykle istotne jest więc dokładne określenie specyficznych zmian oraz zależności w poziomie ekspresji wśród omawianej rodziny protein, które mogą stać się celem dla rozwoju nowych strategii terapeutycznych. Podejmuje się próby stosowania w leczeniu m.in. antysensownego oligonukleotydu (ASO) skierowanego przeciwko XIAP oraz niskocząsteczkowych inhibitorów IAP. Uzyskane dotychczas wyniki badań potwierdzają ponadto istotne znaczenie prognostyczne tych białek zarówno w ocenie odpowiedzi na zastosowaną terapię jak i przeżycie chorych. Uzasadnione jest więc prowadzenie dalszych kompleksowych badań w celu lepszego poznania mechanizmów działania białek IAP oraz ich inhibitorów.

4. Bibliografia

- Adnan-Awad S, Meligui YME, Salem SE, et al. (2019) Prognostic Impact of WT-1 and Survivin Gene Expression in Acute Myeloid Leukemia Patients. *Clinical Laboratory*, 65(4).
- Carter BZ, Mak DH, Wang Z (2013) XIAP Downregulation Promotes Caspase-dependent Inhibition of Proteasome Activity in AML Cells. *Leukemia research*. 37(8): 974-979.
- Fukuda S, Mantel CR, Pelus LM. (2004) Survivin regulates hematopoietic progenitor cell proliferation through p21WAF1/Cip1-dependent and -independent pathways. *Blood*. 103(1): 120-127.
- Gilliland DG, Craig TJ, Felix CA. (2004) The molecular basis of leukemia. *Hematology*. American Society of Hematology. Education Program. 2004 (1): 80-97.
- Grzybowska-Izydorczyk O, Smolewski P. (2009) Białka inhibitorowe apoptozy z rodziny inhibitorów apoptozy (IAP) i ich antagoniści: rola biologiczna oraz potencjalne znaczenie w karcinogenezie i celowanej terapii przeciwnowotworowej. *Acta Haematologica Polonica*, 40(3): 593-612.
- Huang Y, Park YC, Rich RL, et al. (2001) Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell*. 104(5): 781-790.
- Jafarlou M, Baradaran B, Shanehbandi D, et al. (2016) siRNA-mediated inhibition of survivin gene enhances the anti-cancer effect of etoposide in U-937 acute myeloid leukemia cells. *Cellular and molecular biology*. 62(6): 44-49.
- Jessenberger V, Jentsch S. (2002) Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 3(2): 112-121.

- Kasof GM, Gomes BC. (2001) Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *The Journal of Biological Chemistry*. 276: 3238-3246.
- Kata D, Kyrzcz-Krzemiń S. (2011) Ostra białaczka szpikowa – współczesne poglądy na patogenезę, postępowanie diagnostyczne, klasyfikację, stratyfikację prognostyczną i leczenie. *Postępy Nauk Medycznych*, 24(7): 601-609.
- Li F, Ambrosini G, Chu EY, et al. (1998) Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature*. 396(6711): 580-584.
- Li XY, Zhang Q, Li Y, et al. (2012) Expression of HtrA2 and WT1 genes in acute myeloid leukemia. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 20(1):1-6.
- Pluta A, Wierzbowska A, Cebula-Obrzut B, et al. (2015) Prognostic value of inhibitor of apoptosis protein family expression in patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia and lymphoma*. 56(9): 2529-2535.
- Qiu XB, Goldberg AL. (2005) The membrane-associated inhibitor of apoptosis protein, BRUCE/Apollon, antagonizes both the precursor and mature forms of Smac and caspase-9. *The Journal of Biological Chemistry*. 280: 174-182.
- Sanna MG, da Silva Correia J, Ducrey O, et al. (2002) IAP suppression of apoptosis involves distinct mechanisms: the TAK1/JNK1 signaling cascade and caspase inhibition. *Molecular and Cellular Biology*. 22(6): 1754-1766.
- Sekine K, Hao Y, Suzuki Y, et al. (2005) HtrA2 cleaves Apollon and induces cell death by IAP-binding motif in Apollon-deficient cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 330(1): 279-285.
- Srinivasula SM, Hegde R, Saleh A, et al. (2001) A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature*. 410(6824): 112-116.
- Suliman GA, Mabrouk MM, Rabee ES, Gawaly A. (2013) Smac/DIABLO gene expression in acute myeloid leukemia patients. *Egyptian Journal of Haematology*. 38(2): 80-83.
- Sung KW, Choi J, Hwang YK, et al. (2007) Overexpression of Apollon, an antiapoptotic protein, is associated with poor prognosis in childhood de novo acute myeloid leukemia. *Clinical Cancer Research*. 13(17):5109-5114.
- Suzuki A, Hayashida M, Ito T, et al. (2000) Survivin initiates cell cycle entry by the competitive interaction with Cdk4/p16(INK4a) and Cdk2/cyclin E complex activation. *Oncogene*. 19(29): 3225-3234.
- Suzuki Y, Takahashi-Niki K, Akagi T, et al. (2004) Mitochondrial protease Omi/HtrA2 enhances caspase activation through multiple pathways. *Cell Death and Differentiation*. 11(2): 208- 216.
- Straszewski-Chavez SL, Visintin IP, Karassina N, et al. (2007) XAF1 mediates tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis and X-linked inhibitor of apoptosis cleavage by acting through the mitochondrial pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. 282(17): 13059-13072.
- Tamm I, Kornblau SM, Segall H, et al. (2000) Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias. *Clinical Cancer Research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 6(5): 1796-1803.
- Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. (2009) The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 114(5):937-951.
- Zareifar S, Ghorbani S, Monabbati A, et al. (2018) Expression of antiapoptotic proteins livin and survivin in pediatric AML patients, as prognostic markers. *Pediatric hematology and oncology*. 35(4): 250-256.

11. Związki pochodzenia grzybowego jako potencjalne źródło substancji bioaktywnych stosowanych w przemyśle kosmetycznym

Fungi-derived compounds as a potential source of bioactive substances used in the cosmetics industry

Piątek Wiktoria ⁽¹⁾, Sulej Justyna ⁽¹⁾, Osińska-Jaroszuk Monika ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Katedra Biochemii i Biotechnologii, Instytut Nauk Biologicznych, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin.

Opiekun naukowy: dr hab. Monika Osińska-Jaroszuk

Wiktoria Piątek: wiktoria.piatek-97@wp.pl

Słowa kluczowe: grzyby, związki biologicznie czynne, kosmetyki

Streszczenie

We współczesnym świecie troska o wygląd jest bardzo ważną częścią naszego stylu życia. Przemysł kosmetyczny to dynamicznie rozwijająca się branża, która ciągle poszukuje skuteczniejszych i bezpieczniejszych rozwiązań, często zastępując związki chemiczne substancjami pochodzenia naturalnego. Biokosmetyki cieszą się coraz większą popularnością ze względu na niższą toksyczność, w porównaniu z chemicznymi odpowiednikami, oraz potencjalne właściwości prozdrowotne. Obecnie głównym zasobem składników naturalnych są rośliny, jednak to mikroorganizmy, a wśród nich grzyby, stanowią unikalne źródło substancji bioaktywnych, o szerokiej gamie zastosowań w przemyśle kosmetycznym. Ekstrakty z grzybów, jak również ich metabolity, wykazują silne działanie przeciwzapalne, antyoksydacyjne, przeciwdrobnoustrojowe, nawilżające czy opóźniające starzenie.

1. Wstęp

Grzyby od wieków cenione były za walory smakowe, zapachowe jak również właściwości prozdrowotne. W Azji od tysięcy lat uznawano je za produkty o działaniu leczniczym, natomiast w Chinach i Japonii ich wartość odżywcza została tak bardzo doceniona, że zarezerwowano je tylko dla członków rodzin królewskich (Hyde i in. 2010). W dzisiejszych czasach powszechne występowanie grzybów w lasach oraz ich produkcja przemysłowa sprawia, że przywykliśmy do stosowania tych dobrodziejstw natury jako żywności funkcjonalnej. Wraz z rozwojem biotechnologii pojawiało się coraz więcej możliwości wykorzystania grzybów w różnych gałęziach przemysłu. Świadomość społeczeństwa dotycząca możliwości zastosowania tych organizmów, nie tylko do celów konsumpcyjnych, nadal jest znikoma, jednak popularyzacja zdrowego stylu życia sprawia, że z roku na rok coraz więcej osób poszerza swoją wiedzę w tym aspekcie.

Grzyby to drugie największe królestwo organizmów, które jest przedmiotem badań naukowców z różnych dyscyplin. Dzieje się tak ze względu na ich fascynującą naturę oraz niesamowitą zdolność przetrwania w niesprzyjających warunkach środowiska. Organizmy te są rezerwuarem wielu cennych substancji takich jak białka, sacharydy, kwasy tłuszczowe, witaminy oraz makro- i mikroelementy, które charakteryzują się niezwyklejmi właściwościami prozdrowotnymi czy regenerującymi (Goyal i in. 2016). Związki te wykazują unikalne właściwości biologiczne, w tym przeciwutleniające, przeciwzapalne, przeciwbakteryjne, przeciwmarszczkowe, rewitalizujące i ujędrniające czy nawilżające (Hyde i in. 2010). Dzięki obecności substancji bioaktywnych, grzyby znajdują zastosowanie między innymi w medycynie oraz kosmetyce.

Światowy przemysł kosmetyczny nieustannie poszukuje nowych, ekologicznych produktów pozbawionych dodatków chemicznych. Producenci kosmetyków dążą do całkowitego zastąpienia związków chemicznych ich naturalnymi zamiennikami, a grzyby, dzięki szerokiej gamie związków bioaktywnych, umożliwiają realizację tych planów.

2. Opis zagadnienia

Praca ma charakter przeglądowy a jej celem jest charakterystyka substancji bioaktywnych pochodzenia grzybowego oraz ich potencjalnych zastosowań w przemyśle kosmetycznym.

3. Przegląd literatury

3.1 Kosmetyki, kosmeceutyki i nutrikosmetyki

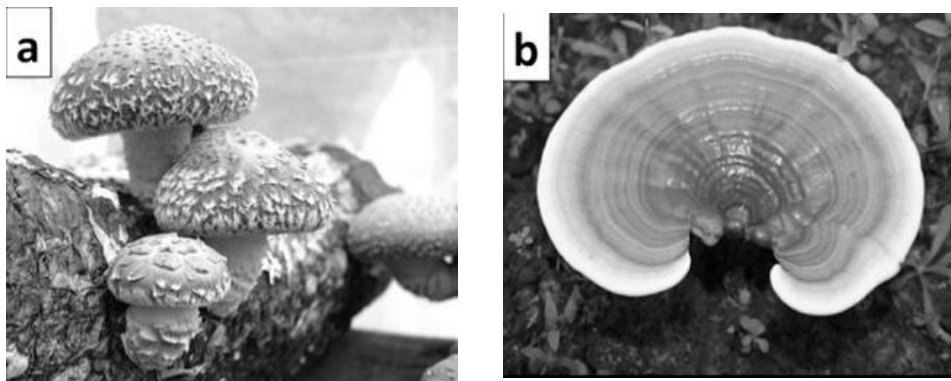
Zgodnie z Rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego z 2009 roku produktem kosmetycznym nazywamy każdą substancję lub mieszaninę substancji o delikatnym działaniu, która służy do mycia, pielęgnacji, ochrony czy upiększania ciała. Kosmetyki muszą spełniać wiele wymagań, ale co najważniejsze, powinny być bezpieczne w użyciu, mieć pozytywny wpływ na skórę i nie wywoływać skutków ubocznych. Wśród produktów do pielęgnacji ciała oprócz klasycznych kosmetyków możemy wyróżnić dwie dodatkowe kategorie: kosmeceutyki i nutrikosmetyki.

Kosmeceutyki to połączenie kosmetyków i farmaceutyków o zastosowaniu miejscowym. Produkty te zawierają składniki, które wpływają na funkcję biologiczną skóry, dostarczając jej niezbędnych składników odżywczych, jednocześnie poprawiając wygląd i promiennosc oraz działając przeciwstarzeniowo i przeciwzmarszczkowo (Hyde i in. 2010).

Nutrikosmetyki są najnowszym trendem w pielęgnacji skóry, który stanowi połączenie żywności, kosmetyków i farmaceutyków. Substancje te działają jak suplementy diety, które odżywiająca organizm od wewnątrz przynoszą korzyści w wyglądzie zewnętrznym. Głównymi obszarami działania tych produktów są skóra, paznokcie i włosy. Nutrikosmetyki zawierają w składzie głównie karotenoidy, polifenole, witaminy, aminokwasy i inne metabolity, a także ekstrakty grzybów (Wu i in. 2016).

3.2 Związki biologicznie aktywne występujące w grzybach

Przeprowadzono wiele badań dotyczących grzybów oraz ich metabolitów w kontekście wykorzystania w przemyśle kosmetycznym. Do najbardziej cenionych gatunków grzybów stosowanych jako dodatek do kosmetyków należą m.in. trzęsak morszczynowaty (*Tremella fuciformis*), trufla biała (*Tuber magnatum*), lakownica żółtawa (*Ganoderma lucidum*) czy twardziak jadalny (*Lentinula edodes*) (Rys. 1). Stwierdzono, że organizmy te zawierają wiele bioaktywnych metabolitów, takich jak polisacharydy, fenole i polifenole czy terpenoidy (Hyde i in. 2010; Goyal i in. 2016; Kalač 2013). Ze względu na swoje właściwości związki te mogą być z powodzeniem stosowane jako dodatek do kosmetyków. Pierwsza na świecie linia kosmetyków grzybowych została opracowana w Centrum Naukowym w Kolcowie w Rosji (Hyde i in. 2010).



Rys. 1. *Lentinula edodes* (a) i *Ganoderma lucidum* (b) (McCleary i Draga 2016).

Polisacharydy obecne w grzybach mają wiele unikalnych właściwości. Działają nawilżająco, przeciwzmarszczkowo, odżywczo i rewitalizująco (Hyde i in. 2010; Taofiq i in. 2016; Kalač 2013). Większość polisacharydów grzybowych to homogliki lub heterogliki. Związki te są w stanie

łączyć się z białkami, tworząc peptydoglikany czy kompleksy polisacharyd-białko. Ze względu na swoje właściwości, polisacharydy są dodawane do takich kosmetyków jak kremy czy maski do twarzy (Hyde i in. 2010; Kalač 2013). W 2005 roku grupa badaczy wyizolowała zewnątrzkomórkowy polisacharyd (EPS) z grzybni *Grifola frondosa*. Związek ten analizowano pod kątem jego zdolności do hamowania ekspresji metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP-1) w fibroblastach skórnych po ekspozycji na promieniowanie UVA. Wyniki badań wykazały, że EPS może być ważnym składnikiem opóźniającym proces fotostarzenia skóry (Bae i in. 2005). W roku 2007 zespół badawczy Kim i wsp. wykazał, że zewnątrzkomórkowe polisacharydy z *G. frondosa* wpływają pozytywnie na wszystkie procesy starzenia się skóry a także redukcję przebarwień (Kim i in. 2007). Poza tym ekstrakty z owocników tego grzyba traktowane są jako nutrikosmetyki, mające korzystny wpływ na skórę (Wu i in 2016).

Fenole i polifenole są hydroksylowanymi związkami aromatycznymi powszechnie występującymi w wielu gatunkach grzybów (Ferreira i in. 2009). Substancje te mają zdolność eliminowania wolnych rodników, opóźniają procesy fotostarzenia, jak również charakteryzują się aktywnością przeciwutleniającą (Bentley 2006; Hyde i in. 2010). Związki fenolowe, pochodzące z różnych organizmów (np. kwas elagowy, kwas kojowy, betulina czy kwas p-kumarowy) i ich pochodne wykazują aktywność anty-tyrozinazy, dzięki czemu rozjaśniają skórę skutecznie redukując ilość przebarwień (Soto i in. 2015).

Terpenoidy to kolejna zróżnicowana grupa związków organicznych podobnych do terpenów. *Ganoderma* spp. jest najbardziej znanym źródłem terpenoidów grzybowych takich jak kwasy ganodermowe, ganodermanontriol, ganoderole czy lanostan. Związki te wykazują działanie immunomodulujące i przeciwzapalne (Jeong i in. 2008). Natomiast karotenoidy, jako powszechnie znana grupa tetraterpenów, są szeroko stosowane w kosmetykach, zwłaszcza w balsamach do opalania. Pochłaniają one nadmiar promieniowania UV oraz wiążą wolne rodniki, jak również nadają skórze ładną, brązową barwę (Jin i in. 2010). *G. lucidum* i *Phellinus linteus* dzięki obecności karotenoidów, polisacharydów, polifenoli oraz innych substancji o działaniu antyoksydacyjnym traktowane są też jako nutriceutyki i nutrikosmetyki (Wu i in. 2016).

3.3 Właściwości substancji bioaktywnych z grzybów używanych w przemyśle kosmetycznym

Grzyby jako naturalne źródło substancji bioaktywnych, mogą być z powodzeniem wykorzystywane w przemyśle kosmetycznym. Produkty kosmetyczne, zawierające w swoim składzie ekstrakty grzybowe lub ich metabolity, wykazują właściwości nawilżające, napinające, ujędrniające, przeciwmarszczkowe, jak również przeciwdrobnoustrojowe czy rozjaśniające (Tab.1) (Hyde i in. 2010). Ze względu na te unikalne cechy coraz więcej światowych marek kosmetycznych decyduje się na dodatek ekstraktów oraz substancji bioaktywnych pozyskanych z grzybów do oferowanych przez siebie produktów.

Właściwości nawilżające

Zawartość wody w warstwie rogowej naskórki i lipidach powierzchniowych skóry wpływa na wygląd i prawidłowe jej funkcjonowanie. Substancje o działaniu nawilżającym spowalniają utratę wilgoci i minimalizują drobne zmarszczki, czyniąc skórę nawodnioną, gładką i miękką (Saranraj i Naidu 2013). Powszechnie występującą, zarówno w komórkach prokariotycznych jak i eukariotycznych, substancją o działaniu nawilżającym jest kwas hialuronowy. Związek ten jest naturalnym polimerem na bazie glukozy, który odgrywa ważną rolę jako środek odmładzający skórę, zatrzymujący wilgoć i zmniejszający przepuszczalność płynu pozakomórkowego (Saranraj i Naidu 2013). Ekstrakty z *Pleurotus citrinopileatus* i *Pleurotus tuber-regium* posiadają aktywność antyhialuronidazy, która chroni przed degradacją kwasu hialuronowego poprzez hamowanie działania enzymu hialuronidazy (Taofiq i in. 2016). Polisacharydy pozyskane z innych grzybów także wykazują silne działanie nawilżające (Hyde i in. 2010). Badania prowadzone przez Lai i wsp. dowiodły, że polisacharyd (TFP) z trzęsaka morszczynowatego (*T. fuciformis*) wykazuje doskonałe działanie nawilżające (Lai i in. 2010). Dzięki tym właściwościom grzyby są powszechnie stosowane w przemyśle kosmetycznym na całym świecie. Japońska firma „Kose” wykorzystuje *Cordyceps sinensis* jako jeden ze składników swoich produktów, koreańska „Sulwhasoo” w składzie swoich

kosmetyków ma ekstrakt z *Schizophyllum commune*, natomiast szwajcarska „La Prairie” dodaje *T. fuciformis* do kremów (Hyde i in 2010)

Tab.1. Właściwości substancji bioaktywnych grzybów (Hyde i in. 2010; Kalač 2013; Taofiq i in. 2016; Kim i in. 2007; Bentley 2006; Goyal i in. 2016)

Właściwości Związek chemiczny	Przeciwdrobnoustrojowe	Przeciwzapalne	Przeciwutleniające	Przeciwzmarszczkowe	Wybielające	Nawilżające
Polisacharydy				+		+
Fenole i polifenole	+	+	+	+		
Glikozydy		+	+			
Triterpenoidy	+	+				
Saponiny			+			
Garbniki	+		+			
Węglowodany	+					
Alkaloidy	+	+	+			
Aminokwasy i białka	+	+		+		
Flawonoidy	+	+	+			
Kwasy					+	+

Właściwości przeciwstarzeniowe i rewitalizujące

Starzenie się skóry jest naturalnym procesem, polegającym na zmniejszeniu produktywności biologicznej fibroblastów czyli komórek odpowiedzialnych za produkcję kolagenu, elastyny i kwasu hialuronowego. Główną przyczyną powstawania drobnych zmarszczek jest utrata białka strukturalnego (kolagenu typu I) oraz elastyny, jak również zmniejszona produkcja kwasu hialuronowego objawiająca się przesuszoną, wiotką skórą (Lupo i Cole 2007). Przebieg i tempo starzenia w dużej mierze zależą od interakcji między czynnikami biologicznymi (wewnętrznymi), psychologicznymi (wewnętrznymi i zewnętrznymi) oraz środowiskowymi.

Kosmetyki o właściwościach przeciwstarzeniowych działają przede wszystkim odżywczo i rewitalizująco (Hyde i in. 2010). Badania pokazują, że dodatek grzybów do kosmetyków ma pozytywny wpływ na opóźnianie procesów starzenia (Hyde i in. 2010; Kim i in. 2014; Ferreira i in. 2009). Także suplementy diety, traktowane jako nutrikosmetyki mogą działać regenerująco i opóźnić procesy starzenia. Przykładem takiego grzyba jest *Sparassis crispa* wykazujący efekt regeneracyjny w przypadku ran cukrzycowych, nabłonka oraz syntezy kolagenu typu I (Wu i in. 2016).

Ekstrakt z gąski sosnowej (*Tricholoma matsutake*) istotnie zmniejsza aktywność elastazy – enzymu, który posiada zdolność do degradacji elastyny, będącej białkiem zapewniającym gładkość i jędrność skórze (Kim i in. 2014). Twardziak jadalny (*L. edodes*) jest induktorem dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) – enzymu przeciwutleniającego, wpływającego na ochronę skóry przed uszkodzeniem oksydacyjnym (Hyde i in. 2010). Lakownica żółtawa zawiera polisacharydy i polipeptydy, które charakteryzują się właściwościami opóźniającymi procesy starzenia (Taofiq i in. 2016). Ze względu na obecność tych bioaktywnych związków jest to grzyb cieszący się dużą popularnością wśród wiodących marek kosmetycznych na rynku. Francuska firmy „Menard” oraz

„Yves Saint Laurent”, brytyjska firma „Kat Burki” czy koreańska „Hankook Sansim” stosują ekstrakt z *G. lucidum* jako dodatek do swoich produktów (Hyde i in. 2010).

Właściwości wybielające skórę

Problemy z pigmentacją skóry są związane ze zbyt dużą lub zbyt małą produkcją melaniny. Komórki melanocytów produkują melaninę i są stymulowane przez tyrozinazę, będącą enzymem uczestniczącym w procesie melanogenezy. Białko to katalizuje reakcję utleniania, w wyniku której DOPACHINON jest przekształcany w eumelaninę (brązowo-czarny pigment) lub fenomelaninę (żółto-czerwony pigment) (Pillaiyar i in. 2017). Hamowanie tyrozinazy jest najczęściej wykorzystywaną reakcją, dzięki której możliwe jest wybielenie skóry, a tym samym pozbycie się przebarwień. Kwas azelainowy jest inhibitorem tyrozinazy przez co nie tylko rozjaśnia istniejące przebarwienia, ale również blokuje powstawanie nowych.

Wiele grzybów, takich jak *Agaricus bisporus*, *Agaricus hortensis* czy *Ganoderma* spp. wykazuje właściwości wybielające, dzięki produkcji inhibitorów tyrozinazy (*Ganoderma*) czy L-ergotioneiny (*Agaricus*). W porównaniu z innymi grzybami należącymi do Basidiomycota najwyższy poziom aktywności anty-tyrozinazowej wykazuje *G. lucidum*. Także kwas kojowy od dawna stosowany jest jako substancja rozjaśniająca skórę. Brytyjska firma PharmaClinix pozyskuje ten związek z japońskich grzybów i wykorzystuje do produkcji kremów (Hyde i in. 2010).

Właściwości przeciwdrobnoustrojowe

Wiele ekstraktów pozyskiwanych z grzybów wykazuje właściwości przeciwdrobnoustrojowe, przez co z powodzeniem mogą one być stosowane w przemyśle kosmetycznym (Hyde i in. 2010; Goyal i in. 2016). Boczniki (*Pleurotus*) należą do najczęściej uprawianych grzybów jadalnych na świecie ze względu na wysoką wartość odżywczą. Według najnowszych badań, ekstrakty pozyskiwane z grzybów należących do rodzaju *Pleurotus* wykazują silne właściwości przeciwdrobnoustrojowe (Hyde i in. 2010; Taofiq i in. 2016).

Dużą popularnością w przemyśle kosmetycznym cieszą się także drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, powszechnie stosowane w piekarnictwie. Ze względu na zawartość siarki wykazują one działanie antybakteryjne. Redukują także ilość wydzielanego łoju, tym samym ograniczając proces powstawania zaskórników. Drożdże znajdują swoje zastosowanie głównie w kremach i maskach, ale także jako składnik suplementów diety przeznaczonych do pielęgnacji cery trądzikowej. Nutrikosmetyki zawierające w składzie te grzyby wpływają regenerująco na skórę, włosy i paznokcie (Muszyńska i in. 2013).

3.4 Kosmetyki do pielęgnacji włosów

Grzyby są źródłem przeciwutleniaczy, witaminy D i minerałów, takich jak żelazo, selen czy miedź. Dzięki zawartości tych składników są one wykorzystywane zarówno do pielęgnacji zdrowych i mocnych włosów, ale również pomagają w zapobieganiu ich wypadaniu i powstawaniu łupieżu.

Grzyby z rodzaju *Tremella* wytwarzają polisacharyd (glukuronoksylomannan) o właściwościach przeciwzapalnych, dzięki czemu stosowane są jako dodatek do szamponów leczniczych (Lai i in. 2010; De Baets i Vandamme 2001). Natomiast ze względu na właściwości wygładzające włosy, ekstrakt z *L. edodes* został opatentowany jako dodatek do odżywek. Także amerykańska firma „Aveeno” stosuje gatunek pieczarki – *Agaricus subrufescens* jako składnik szamponów o silnym działaniu nawilżającym (Hyde i in. 2010).

4. Podsumowanie

Fungi to królestwo bogate w organizmy będące źródłem cennych związków biologicznie aktywnych (Taofiq i in. 2016). Metabolity i ekstrakty grzybów wykazują działanie przeciwutleniające, przeciwzmarszczkowe, przeciwbakteryjne, wybielające skórę i nawilżające dzięki czemu mogłyby być powszechnie stosowane jako naturalne dodatki do produktów kosmetycznych. Substancje te posiadają ogromny, ale nie do końca wykorzystany potencjał pielęgnacyjny. Rosnące zapotrzebowanie na kosmetyki naturalne oraz prowadzone w tym kierunku prace wielu zespołów badawczych w krótkim czasie mogą doprowadzić do rozwoju branży związanej

z produkcją biokosmetyków oraz wzrost świadomości społecznej w aspekcie wykorzystania w tym kontekście grzybów.

5. Literatura

- Bae JT, Sim GS, Lee DH i in. (2005) Production of exopolysacchaide from mycelial culture of *Grifola frondosa* and its inhibitory effect on matrix metalloproteinase-1 expression in UV-irradiated human dermal fibroblasts. *FEMS Microbiology Letters* 251(2): 347-354.
- Bentley R (2006) From miso, sake and shoyu to cosmetics: a century of science for kojic acid. *Natural Product Reports* 23(6): 1046-1062.
- De Baets S, Vandamme EJ (2001) Extracellular *Tremella* polysaccharides: structure, properties and applications. *Biotechnology Letters* 23(17): 1361-1366.
- Ferreira IC, Barro L, Abreu R (2009) Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry* 16(12): 1543-1560.
- Goyal S, Ramawat KG, Mérillon JM (2016) Different shades of fungal metabolites: an overview. In: *Fungal metabolites. Reference Series in Phytochemistry*. Ed. Mérillon JM, Ramawat KG. Springer, Cham, pp. 1-29.
- Hyde KD, Bahkali AH, Moslem MA (2010) Fungi - an unusual source for cosmetics. *Fungal Diversity* 43(1): 1-9.
- Jeong YT, Yang BK, Jeong SC i in. (2008) *Ganoderma applanatum*: a promising mushroom for antitumor and immunomodulating activity. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives* 22(5): 614-619.
- Jin JM, Lee J, Lee YW (2010) Characterization of carotenoid biosynthetic genes in the ascomycete *Gibberella zeae*. *FEMS Microbiology Letters* 302(2): 197-202.
- Kalač P (2013) A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93(2): 209-218.
- Kim SW, Hwang HJ, Lee BC i in. (2007) Submerged production and characterization of *Grifola frondosa* polysaccharides—a new application to cosmeceuticals. *Food Technology and Biotechnology* 45(3): 295-305.
- Kim SY, Go KC, Song YS i in. (2014) Extract of the mycelium of *T. matsutake* inhibits elastase activity and TPA-induced MMP-1 expression in human fibroblasts. *International Journal of Molecular Medicine* 34(6): 1613-1621.
- Lai JX, He CF, Zhao J i in. (2010) Optimization of extraction technology of polysaccharides from *Tremella fuciformis* on commercialized basis and its function in skin care cosmetics. *China Surfactant Detergent & Cosmetics* 40(4): 259-262.
- Lupo MP, Cole AL (2007) Cosmeceutical peptides. *Dermatologic Therapy* 20(5): 343-349.
- McCleary BV, Draga A (2016). Measurement of β -glucan in mushrooms and mycelial products. *Journal of AOAC International* 99(2): 364-373.
- Muszyńska B, Malec M, Sułkowska-Ziaja K (2013) Właściwości lecznicze i kosmetyczne drożdży piekarniczych (*Saccharomyces cerevisiae*). *Postępy Fitoterapii* 1: 54-62.
- Pillaiyar T, Manickam M, Namasivayam V (2017) Skin whitening agents: Medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 32(1): 403-425.
- Saranraj P, Naidu MA (2013) Hyaluronic Acid Production and its Applications A Review. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archive* 4(5): 853-59.
- Soto ML, Falqué E, Domínguez H (2015) Relevance of natural phenolics from grape and derivative products in the formulation of cosmetics. *Cosmetics* 2(3) 259-276.
- Taofiq O, González-Paramás AM, Martins A i in. (2016) Mushrooms extracts and compounds in cosmetics, cosmeceuticals and nutricosmetics - A review. *Industrial Crops and Products* 90, 38-48.
- Wu Y, Choi MH, Li J i in. (2016) Mushroom cosmetics: the present and future. *Cosmetics* 3(3), 22.

12. Żyłki powrózka nasiennego –diagnostyka i leczenie, z podkreśleniem roli ultrasonografii

Varicocele - diagnosis and treatment, with emphasis on the role of ultrasonography

Monika Rogowska⁽¹⁾, Ignacy Rożek⁽¹⁾, Karol Bochyński⁽¹⁾ Łukasz Światłowski⁽²⁾, Krzysztof Pyra⁽²⁾

⁽¹⁾Studenckie Koło Naukowe Przy Zakładzie Radiologii Zabiegowej i Neuroradiologii UM w Lublinie

⁽²⁾ Zakład Radiologii Zabiegowej i Neuroradiologii UM w Lublinie

Opiekun naukowy: dr hab. n. med. Anna Drelich-Zbroja

Rogowska Monika: m.rogowska98@gmail.com

Słowa kluczowe: splot wiciowaty, diagnostyka obrazowa, embolizacja

Streszczenie

Poszerzenie żył splotu wiciowatego jest w terminologii medycznej określane jako żyłki powrózka nasiennego. Ze względu na objawy kliniczne takie jak ból i obrzęk worka mosznowego oraz powikłania do których zalicza się m.in. zaburzenie reprodukcji u mężczyzn istotne jest przeprowadzenie dokładnej i zarazem szybkiej diagnostyki, a następnie wdrożenie odpowiednio dobranego leczenia.

Na podstawie dostępnej literatury dokonano przeglądu aktualnych metod diagnostycznych, w tym badania przedmiotowego i technik diagnostyki obrazowej. Podkreślono również korelację między obecnością żyłaków powrózka nasiennego a problemem bezpłodności u mężczyzn. Poniższą pracę oparto o aktualne doniesienia naukowe zamieszczone w ogólnodostępnych bazach naukowych (PubMed, Google Scholar).

Spośród dostępnych metod diagnostyki obrazowej warto podkreślić rolę badania ultrasonograficznego. USG jest metodą z wyboru, szeroko stosowaną w diagnostyce żyłaków powrózka nasiennego. Stanowi również alternatywę dla powszechnie wykorzystywanych technik takich jak badanie palpacyjne, które w dużym stopniu uzależnione jest od umiejętności klinicysty.

1. Wstęp

Żyłki powrózka nasiennego to powszechnie spotykana patologia dotycząca męskiego układu rozrodczego. Aby lepiej zrozumieć jej patogenezę, istotna jest znajomość anatomii prawidłowej człowieka. Mianem powrózka nasiennego określamy wszystkie elementy, które zarówno wchodzą jak i wychodzą z moszny, symetrycznie, po obu jej stronach. Twory te biegną dalej w kanale pachwinowym, stąd wyróżniony w literaturze podział powrózka nasiennego na dwie części: mosznową i pachwinową. W skład powrózka nasiennego wchodzi m.in. nasieniowód oraz naczynia i nerwy zaopatrujące narządy męskiego układu rozrodczego, w tym niezwykle istotne dla męskiej reprodukcji jądra i najądrze. Wśród naczyń krwionośnych warto zwrócić uwagę na oplatający tętnice, bogaty splot żylny, określane jako splot wiciowaty. W dalszym przebiegu naczynia żyłne formują żyły jądrowe: prawą i lewą. (Bochenek i Richter 2016; Walocha i in. 2006)

Poniższa praca oparta jest o przegląd aktualnej literatury, w połączeniu z analizą dostępnego autorom przypadku klinicznego. Dane dotyczące diagnostyki i leczenia pacjenta pozwolą porównać informacje uzyskane z najnowszych publikacji z praktyką lekarską. Niezbędną literaturę wyszukano głównie za pośrednictwem witryn „PubMed” i „Google Scholar”. Imponująca ilość doniesień naukowych związanych z problematyką żyłaków powrózka nasiennego podkreśla, że jest to nadal aktualny temat, choć studiowany szeroko od kilkadziesiąt lat. Postępujący rozwój metod diagnostyki obrazowej pozwala zauważyć, że niegdyś stosowane techniki obrazowania ustępują coraz dokładniejszym, szybszym i bezpieczniejszym metodom. Celem poniższej pracy jest ocena aktualnie wykorzystywanych metod diagnostycznych oraz ich wpływu na wybór leczenia u pacjentów ze stwierdzonymi żyłakami powrózka nasiennego.

2. Opis zagadnienia

Żylaki powrózka nasiennego (ang. varicocele) to często spotykana patologia, polegająca na nieprawidłowym poszerzeniu żył splotu wiciowatego. Zgodnie z historią medycyny żylaki powrózka nasiennego towarzyszą człowiekowi prawdopodobnie od momentu, gdy zdecydował się on porzucić chód czworonożny na rzecz wyprostowanej pozycji ciała. Miłośnicy sztuki mogą zauważyć, że pewne greckie starożytne rzeźby, pochodzące z V wieku p.n.e, przedstawiają postacie ze zmianami sugerującymi żylaki powrózka nasiennego. Według Hotchkissa, historia operacyjnego leczenia żylaków sięga aż I stulecia n.e, a przez wieki leczenie służyło wyłącznie złagodzeniu bólu i dyskomfortu. Przypatrując się historycznym doniesieniom, można śmiało stwierdzić, że leczenie żylaków wkroczyło w erę nowoczesnej medycyny a chirurgia żylaków nie służy wyłącznie uśmierzaniu dolegliwości. (Marte 2018). Zgodnie z badaniami, częstość występowania żylaków uzależniona jest od specyfiki badanej populacji. Analizując doniesienia epidemiologiczne należy zwrócić uwagę m.in. na:

- Płodność badanych mężczyzn (jeżeli badania dotyczą mężczyzn bezpłodnych czy przyczyna bezpłodności jest pierwotna czy wtórna)
- Wiek osób badanych
- Wybraną metodę diagnostyczną do oceny żył (badanie fizykalne/obserwacja/usg).

(Cannarella et al. 2019)

Analiza porównawcza danych dotyczących grupy mężczyzn z pierwotną (35%) i wtórną(80%) niepłodnością, wykazuje że różnica jest znacząca. (Lorenc i in. 2016). Częstość występowania żylaków powrózka nasiennego w ogólnej populacji dorosłych mężczyzn wynosi ok. 15%. (Alsaikhan et al. 2016) oraz 9–22.6% w grupie młodych dorosłych (Onozawa et al. 2002). Doniesienia naukowe podkreślają, że etiologia żylaków powrózka nasiennego jest prawdopodobnie wieloczynnikowa. (Alsaikhan et al. 2016) Warto podkreślić, że między przebiegiem prawej a lewej żyły jądrowej, da się zauważyć pewne różnice, które mogą mieć istotny wpływ na częstsze formowanie żylaków po stronie lewej. Krew prowadzona żyłą jądrową prawą wlewa się bezpośrednio do żyły głównej dolnej, natomiast w przypadku strony lewej, żyła jądrowa uchodzi najpierw do żyły nerkowej lewej, w dodatku pod kątem prostym. Korzystniejsze warunki odpływu ma krew po stronie prawej. Fakt, że żyły jądrowe nie posiadają zastawek zwiększa ryzyko zastoju krwi w naczyniach, co w połączeniu z wymienionymi różnicami anatomicznymi może tłumaczyć zjawisko częstszego występowania żylaków w lewym powrózku nasiennym. (80-97%). Doniesienia naukowe podkreślają również, że po stronie prawej żylaki są zazwyczaj mniejsze, a przypadki w których stwierdza się jednostronne poszerzenie żył prawego splotu wiciowatego są bardzo rzadkie. (Geatti et al. 1991; Bochenek i Richter, 2016; Leslie et al. 2020) . Znane są również przypadki obustronnego występowania żylaków. (Poluha, i in. 2012). Zdecydowana większość pacjentów nie odnotowuje znaczących objawów świadczących o obecności żylaków powrózka nasiennego. Według materiałów źródłowych dolegliwości bólowe zgłasza od 2 do 10% chorych, opisując ból jako tępy, pulsujący, rzadko ostry lub kłujący, zlokalizowany w okolicach jądra, moszny lub pachwiny. (Paick i Choi 2019)

W praktyce, rozpoznanie żylaków powrózka nasiennego opiera się na metodach takich jak badanie przedmiotowe i wywiad lekarski. W trakcie badania fizykalnego lekarz obserwuje worek mosznowy pacjenta w spoczynku i podczas próby Valsalvy. Oprócz obserwacji, wykonuje się również badanie palpacyjne, a stopień nasilenia żylaków powrózka nasiennego można ocenić wykorzystując klasyfikację opracowaną przez Dubina i Amelara lub Światową Organizację Zdrowia (WHO).

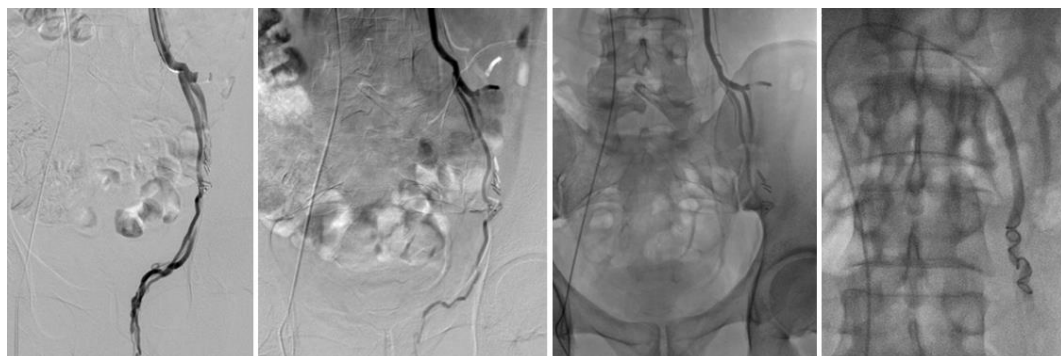
Jeżeli obecność żylaków powrózka nasiennego nie wpłynęła negatywnie na jakość nasienia, a chory nie zgłasza dolegliwości bólowych to leczenie oparte jest zazwyczaj na metodach alternatywnych do leczenia operacyjnego. (Lorenc i in. 2016) Mając na uwadze, że powszechnie stosowane metody takie jak badanie przedmiotowe, są wysoce subiektywne, poszukuje się alternatywnych technik o zadowalającym stopniu dokładności i bezpieczeństwa. Często wymienianą w literaturze metodą obrazowania jest ultrasonografia (USG). Doniesienia naukowe podkreślają rolę USG w diagnostyce żylaków powrózka nasiennego u pacjentów pediatrycznych, zwłaszcza w kontekście czułości

i swoistości tej metody. (Macey et al. 2018). Uzyskany obraz pozwala na ocenę m.in. przybliżonej objętości jąder, ich struktury i przepływu krwi w naczyniach. (Piechowska i in. 2015). Badanie przeprowadza się w pozycji leżącej, a następnie stojącej. Jako główne zalety USG wymienia się nieinwazyjność oraz wysoką rozdzielczość uzyskanego obrazu (co zawdzięcza się głównie sondom o wysokiej częstotliwości i technice Dopplerowskiej). (Belay et al. 2016). Przed przystąpieniem do wykonania USG, worek mosznowy badany jest manualnie, co pozytywnie wpływa na właściwą interpretację uzyskanego obrazu. Oprócz ultrasonografii, dostępnymi technikami obrazowania w diagnostyce żyłaków powrózka nasiennego, są termografia i medycyna nuklearna. Są to jednak techniki o mniejszym znaczeniu, ze względu na rosnącą popularyzację i szereg zalet ultrasonografii. (Lorenc i in. 2016)

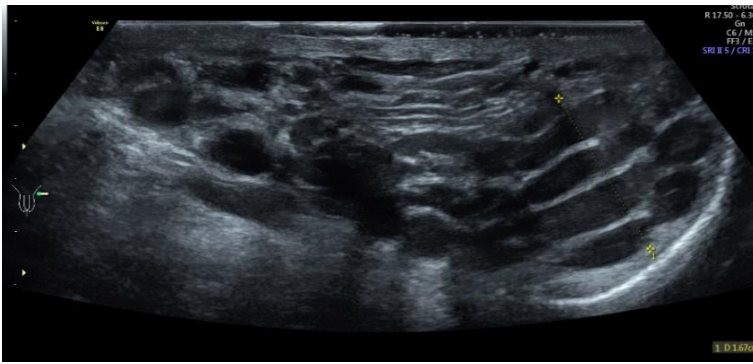
Obecność żyłaków powrózka nasiennego jest w znacznym stopniu związana z bezpłodnością u mężczyzn. Według literatury, u mężczyzn badanych pod kątem niepłodności, to właśnie chorobowe poszerzenie żył splotu wiciowatego jest najczęściej stwierdzaną patologią. Istnieje kilka teorii opracowanych w celu objaśnienia zależności między męską bezpłodnością a występowaniem żyłaków powrózka nasiennego, choć dokładny patomechanizm nie został ostatecznie określony. Jedną z hipotez skupia się na roli zastój krwi w naczyniach. Spermatogeneza jest procesem wrażliwym na temperaturę, a jej wahania mogą zaburzyć czynność jąder. U pacjentów z żyłakami, zastój ciepłej krwi podnosi temperaturę moszny, co prawdopodobnie niekorzystnie wpływa na spermatogenezę i jądra. Dostępne badania opisują przypadki pacjentów, u których leczenie żyłaków powrózka nasiennego wyraźnie wpłynęło na poprawę płodności. I choć podkreślono negatywny wpływ żyłaków na spermatogenezę, objętość jąder czy jakość nasienia, to prawidłowe leczenie patologii naczyń nie będzie jednoznaczne z usunięciem problemu bezpłodności. (Hassanin et al. 2018) Do innych powikłań związanych z obecnością żyłaków powrózka nasiennego zalicza się zanik jąder bądź hipogonadyzm. (Sönmez i Haliloğlu 2018).

Leczenie żyłaków powrózka nasiennego oparte jest na kilku metodach zabiegowych, stosowanych zarówno u młodzieży jak i dorosłych. Warto podkreślić, że temat sposobu oraz kwalifikacji do leczenia jest wciąż otwarty wśród klinicystów, a konkretne metody leczenia mają zarówno zwolenników jak i przeciwników. Do wykorzystywanych obecnie technik należą m.in. metoda Palomo (zaotrzewnowe podwiązanie żyły jądrowej metodą otwartą), wariant metody Palomo wykonywany laparoskopowo oraz przezskórna wewnątrznaczyniowa embolizacja. (Poluha i in. 2012; Kowalczyk i in. 2006). Badania podkreślają liczne zalety embolizacji, w tym niskie ryzyko nawrotów czy zadowalający koszt zabiegu. (Yavetz et al. 1992). Na wybór metody leczenia wpływa również prawdopodobieństwo występowania powikłań.

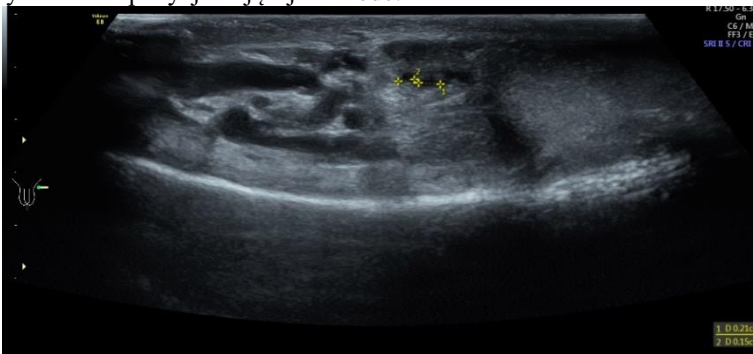
Jednym z najczęstszych powikłań są żyłaki nawrotowe. Zgodnie z literaturą, leczenie nawrotów jest uzasadnione w przypadku pacjentów bezpłodnych lub dotkniętych innymi objawami klinicznymi. Badania podkreślają, że USG jest przydatną metodą także na etapie diagnostyki żyłaków nawrotowych. Mimo szerokiego rozpowszechnienia ultrasonografii i nadania jej miana „złotego standardu” w diagnostyce żyłaków nawrotowych, niektóre doniesienia sugerują, że nie należy polegać wyłącznie na rozpoznaniu na podstawie USG. (Rotker i Sigman 2016)



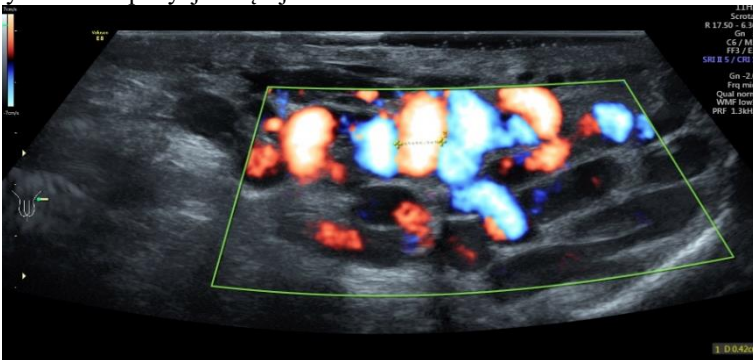
Rys. 1-4. Chory I. 30, po nieskutecznym „klipsowaniu” laparoskopowym, typowy spływ dwóch żył jądrowych, zabieg embolizacji.



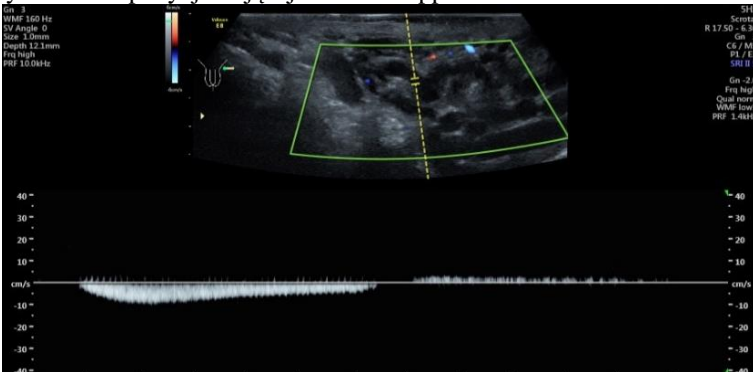
Rys. 5. USG wykonane w pozycji stojącej- B mode.



Rys. 6. USG wykonane w pozycji leżącej- B mode.



Rys. 7. USG wykonane w pozycji stojącej – kolor Doppler.



Rys. 8. USG wykonane w pozycji stojącej z uwidocznionym przepływem przez patologicznie poszerzone naczynia – dodatnia próba Valsalvy.

Przykładem zastosowania nowoczesnych metod diagnostyki obrazowej jest przypadek trzydziestoletniego pacjenta, cierpiącego na bezpłodność. W przeszłości u mężczyzny wykryto żylaki powrózka nasiennego, które usunięto laparoskopowo. Po zakończeniu leczenia, pacjenta skierowano na badania, w celu wykluczenia lub potwierdzenia żylaków nawrotowych. Wybraną metodą diagnostyki obrazowej w tym przypadku było USG. Badanie wykonano przy użyciu sondy 6-12 MHz. Wykorzystano następujące opcje: B-mode, kolorowy oraz power Doppler. Podczas badania pacjent wykonywał próbę Valsalvy, a badanie odbyło się zarówno w pozycji leżącej jak i stojącej. Na podstawie otrzymanych wyników, u mężczyzny zdiagnozowano żylaki nawrotowe po stronie lewej. W kolejnym kroku zdecydowano się na wyłączenie poszerzonych naczyń z krążenia drogą embolizacji. Aby potwierdzić skuteczność zabiegu dwukrotnie zastosowano badanie USG: w pierwszej dobie oraz w 3 miesiącu po zabiegu. Na podstawie uzyskanego obrazu potwierdzono skuteczny wynik zabiegu embolizacji.

3. Podsumowanie i wnioski

Mając na uwadze skalę problemu, jakim jest występowanie żylaków powrózka nasiennego, warto podkreślić rolę nowoczesnych metod diagnostyki obrazowej. Widoczny w literaturze, stały rozwój technik diagnostycznych dostarcza klinicystom nowe możliwości pracy. Ze względu na subiektywny charakter powszechnie stosowanego badania przedmiotowego, często preferowaną opcją diagnostyczną jest ultrasonografia. Szybsze i dokładniejsze wykrywanie patologii spłotu wiciowatego pozwala na podjęcie odpowiedniego leczenia i zminimalizowanie ryzyka poważnych powikłań, w tym bezpłodności. Analizując dostępny przypadek kliniczny można zauważyć dominującą rolę badania USG. Zastosowanie wybranej techniki obrazowania okazało się optymalnym wyborem, zarówno na etapie wykrywania żylaków nawrotowych jak i w trakcie monitorowania stanu pacjenta po zabiegu. I choć dostępne informacje podkreślają, że ocena ultrasonografii w diagnostyce żylaków powrózka nasiennego jest wciąż sprawą kontrowersyjną, to przytoczony przypadek obrazuje szereg korzyści wynikających z zastosowania USG. Z pewnością wieloletnie wykorzystanie USG pozwoli na szerszą ocenę użyteczności tej metody. W ostatnich latach nastąpił też znaczący postęp w technikach chirurgicznych, służących do korygowania zmian w powrózku nasienny. Ponadto, badania prowadzone w celu pełnego zrozumienia mechanizmu prowadzącego do niepłodności powodowanej przez żylaki przysłużą się powszechnej walce z problemem męskiej bezpłodności.

4. Literatura

- Alsaikhan B, Alrabeeah K, Delouya G, et al. (2016) Epidemiology of varicocele. *Asian J Androl.*;18(2):179-181
- Belay RE, Huang GO, Shen JK, et al. (2016) Diagnosis of clinical and subclinical varicocele: how has it evolved?. *Asian J Androl* ;18(2):182-185
- Bochenek A i Reicher M. (2016) *Anatomia człowieka, tom II*, 580-582
- Cannarella R, Calogero AE, Condorelli RA, et al. (2019) Management and Treatment of Varicocele in Children and Adolescents: An Endocrinologic Perspective. *J Clin Med.* 2019;8(9):1410
- Geatti O, Gasparini D, Shapiro B (1991) A comparison of scintigraphy, thermography, ultrasound and phlebography in grading of clinical varicocele. *J Nucl Med.* 1991;32(11):2092-2097.
- Hassanin AM, Ahmed HH, Kaddah AN (2018) A global view of the pathophysiology of varicocele. *Andrology* ;6(5):654-661
- Kowalczyk K, Gastoł P, Baka-Ostrowska M i in. (2006) Ocena metod leczenia w przypadkach żylaków powrózka nasiennego u młodzieży, *Urologia Polska* 59/3.
- Leslie SW, Sajjad H, Siref LE (2020) Varicocele. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls
- Lorenc T, Krupniewski L, Palczewski P i in. (2016) The value of ultrasonography in the diagnosis of varicocele. *J Ultrason*; 16: 359–370.
- Macey MR, Owen RC, Ross SS, et al. (2018) Best practice in the diagnosis and treatment of varicocele in children and adolescents. *Ther Adv Urol.* 10(9):273-282

- Marte A (2018) The history of varicocele: from antiquity to the modern ERA. *Int Braz J Urol.* 44(3):563-576
- Onozawa M, Endo F, Suetomi T, et al. (2002) Clinical study of varicocele: statistical analysis and the results of long-term follow-up. *Int J Urol.* 9(8):455-461
- Paick S, Choi WS (2019) Varicocele and Testicular Pain: A Review. *World J Mens Health.* 37(1):4-11
- Poluha P, Jargiełło T, Szajner M, i in. (2012) Leczenie żyłaków powrózka nasiennego metodą wewnątrznaczyniową, *Borgis - Postępy Nauk Medycznych* 5/2012, s. 455-458
- Rotker K, Sigman M (2016) Recurrent varicocele. *Asian J Androl.* 18(2):229-233.
- Sönmez MG, Haliloğlu AH (2018) Role of varicocele treatment in assisted reproductive technologies. *Arab J Urol.* 16(1):188-196
- Walocha J, Skawina A, Gorczyca J (2006) *Anatomia prawidłowa człowieka* pod redakcją Andrzeja Skawiny, Miednica, 54-58
- Yavetz H, Levy R, Papo J, et al. (1992) Efficacy of varicocele embolization versus ligation of the left internal spermatic vein for improvement of sperm quality. *Int J Androl.* 15(4):338-344

13. Wyściółczak rdzenia kręgowego - przydatność rezonansu magnetycznego w diagnostyce i monitorowaniu progresji

Spinal cord ependymoma - usefulness of magnetic resonance imaging in diagnosis and progression monitoring

Ignacy Rożek⁽¹⁾, Karol Bochyński⁽¹⁾, Weronika Cyranka⁽¹⁾, Monika Rogowska⁽¹⁾, Monika Zbroja⁽¹⁾

⁽¹⁾Studenckie Koło Naukowe Przy Zakładzie Radiologii Zabiegowej i Neuroradiologii UM w Lublinie

Opiekun naukowy: dr n med. Michał Sojka

Ignacy Rożek: ignacy-rozek@o2.pl

Słowa kluczowe: glejak, radiologia, nowotwór

Streszczenie

Wstęp: Wyściółczak to nowotwór glejowy wywodzący się z tkanki wyścielającej światło komór mózgu i kanału środkowego rdzenia kręgowego. Wyściółczak rdzenia kręgowego występuje głównie u dorosłych i stanowi 10% guzów kanału kręgowego.

Materiały i metody: W oparciu o dostępne materiały dokonano przeglądu najnowszych metod diagnostyki obrazowej. Na podstawie uzyskanych informacji zapoznano się również z charakterystyką, klasyfikacją oraz aktualnymi możliwościami leczenia wyściółczaka rdzenia kręgowego, jednocześnie skupiając się przede wszystkim na aspekcie diagnostycznym. Przeanalizowano również dostępny autorom przypadek kliniczny, w celu porównania wyników z badaniami udokumentowanymi w literaturze.

Wyniki: Na podstawie analizy opublikowanych materiałów naukowych podkreślono istotną rolę wykorzystania rezonansu magnetycznego w ocenie lokalizacji i morfologii guza.

Wnioski: Badanie MR jest metodą z wyboru w diagnostyce zmian nowotworowych w kanale kręgowym. Służy do rozpoznawania i monitorowania wielkości guza.

1. Wstęp

Wyściółczak rdzenia kręgowego (spinal cord ependymoma) jest rzadko występującym guzem, najczęściej nie złośliwym. Pełna chirurgiczna resekcja została uznana za leczenie pierwszego stopnia i zazwyczaj kończy się sukcesem. Jednakże, wyściółczaki mają tendencję do nawrotów, gdy całkowita resekcja guza nie jest możliwa. Szacuje się, że prawdopodobieństwo pięcioletniego przeżycia wynosi od 40 do 60 procent, i jest znacząco większe u dorosłych niż u dzieci.

Obrazowanie MR wzmocnione kontrastem jest stosowane jako narzędzie diagnostyczne od 1984 r. i zostało po raz pierwszy zastosowane w diagnostyce guzów rdzenia kręgowego w 1985 r. Przez długi czas wzmocnienie pokontrastowe zmian wewnątrzrdzeniowych było uważane za typowe dla zmian złośliwych. Jednak w kolejnych pracach udowodniono, że wzmocnienie pokontrastowe występuje we wszystkich rodzajach nowotworów rdzenia kręgowego, niezależnie od stopnia jego inwazyjności. Powszechnie przyjmuje się, że wyściółczaki rdzenia kręgowego prawie zawsze intensywnie wzmocniają się po podaniu dożylnym środka kontrastowego.

Poniższa praca powstała w oparciu o najnowsze doniesienia naukowe, aktualne publikacje i inną dostępną literaturę. Do części opisującej zagadnienie dołączono przypadek kliniczny obrazujący wykorzystanie nowoczesnej metody diagnostycznej w praktyce. Jako główne źródło niezbędnych materiałów wybrano bazę danych „PubMed

Postępujący rozwój metod diagnostyki obrazowej wskazują, że niegdyś stosowane techniki obrazowania ustępują coraz dokładniejszym, szybszym i bezpieczniejszym metodom. Celem poniższej pracy jest ocena aktualnie wykorzystywanych metod diagnostycznych oraz ich wpływu na wybór leczenia u pacjentów ze stwierdzonym wyściółczakiem rdzenia kręgowego.

2. Opis zagadnienia

W Stanach Zjednoczonych każdego roku wyściółczak rozpoznawany jest u 1000-2000 dorosłych; U 75% występuje w kanale kręgowym, 25% to guzy rdzenia kręgowego wewnątrzczaszkowe. Wyściółczaki stanowią 2% nowotworów pierwotnych ośrodkowego układu nerwowego (OUN) (Chamberlain 2003). Chorzy są zazwyczaj w wieku 30-40 lat, mężczyźni i kobiety chorują równie często.

Czynniki prowadzące do rozwoju wyściółczaka nie są dobrze poznane. Najbardziej prawdopodobną przyczyną, są aberracje chromosomowe. Czynniki środowiskowe nie mają wpływu na powstawanie ani rozwój tego nowotworu.

U chorych na wyściółczaka rdzenia kręgowego zazwyczaj występują niespecyficzne objawy postępujące przez lata przed rozpoznaniem, chociaż rzadkie przypadki krwawienia śródściennego mogą powodować ostre pogorszenie stanu pacjenta. Częste objawy to ból pleców, spastyczność kończyn dolnych, ataksja chodu, utrata czucia i parestezje. Guzy w części szyjnej rdzenia kręgowego mogą powodować objawy w obrębie kończyn górnych i dolnych. Guzy lędźwiowe mogą powodować nietrzymanie moczu, ból pleców i nóg, a nawet asymetryczne osłabienie. (Schwartz i McCormick 2000).

Podtypy histologiczne wyściółczaka wg WHO podzielone są na trzy grupy w zależności od stopnia złośliwości stwierdzonego w obrazie mikroskopowym. Wyściółczak śluzakowobrodawczakowaty i podwyściółczak to zmiany I stopnia, najbardziej łagodne w wyglądzie histologicznym. Zmiany II stopnia obejmują podtypy klasyczne, komórkowe, brodawkowe, jasnokomórkowe i tanycytarne, zgrupowane razem z powodu braku cech anaplastycznych i podobieństw biologicznych. Wyściółczaki anaplastyczne mają III stopień zaawansowania, a co za tym idzie, charakteryzują się najbardziej złośliwym przebiegiem. Stopnie te różnią się pod względem najbardziej prawdopodobnego umiejscowienia w obrębie rdzenia kręgowego, łatwości resekcji oraz tendencji do nawrotów (Perry i Prayson 2012).

II stopień "klasyczny" wyściółczaka obejmuje 55-75% zmian w rdzeniu kręgowym, najczęściej występujących w okolicy szyjnej lub piersiowej, rzadko w rdzeniu lędźwiowym. Wyściółczaki II stopnia rdzenia kręgowego są typowo śródmiąższowe i często torbielowate. Guzy zbudowane są z komórek o regularnych, okrągłych lub owalnych jądrach z obfitą, ziarnistą chromatyną. Między jądrami jest włóknikowe tło o zmiennej gęstości. Komórki guza mogą formować okrągłe lub wydłużone struktury (rozety, kanały), przypominające zarodkowy kanał ependymalny, z długimi, delikatnymi wyrostkami ciągnącymi się do światła. Częściej obecne są okołonaczyniowe rozety rzekome (pseudorozety), w których komórki nowotworowe są rozmieszczone dookoła naczyń, ze strefą zawierającą wyrostki ependymalne między komórkami a naczyniami (Klekamp 2015).

Wyściółczak komórkowy jest identyfikowany na podstawie zwiększonej ilości komórek i wysokiego stosunku liczby atomów do liczby cytoplazmy z nielicznymi rozetami, ale brak jest proliferacji mikronaczyniowej, pleomorfizmu komórkowego lub mitoz, które odpowiadają zmianom III stopnia. Wyściółczak jasnokomórkowy jest rzadkim podtypem, który podobnie jak oligodendroglioma, zawiera aureole okołojądrowe wraz z pseudorozetami i ostrymi granicami histologicznymi. Nabłoniak brodawkowaty identyfikowany jest histologicznie na podstawie rozmieszczenia komórek nowotworowych wokół rdzenia włóknistego naczynia. Wyściółczak tanycytarny, najmniej rozpowszechniony podtyp II stopnia, występuje w rdzeniu kręgowym częściej niż w mózgu i zawiera komórki o długich wyrostkach podobnych do astrocytów pilocytarnych (Smirniotopoulos 2013).

Zmiany III stopnia są najrzadziej spotykanym podtypem wyściółczaka u dorosłych, charakteryzującym się histologicznie częstymi mitozami, proliferacją śródbłonna i pleomorfizmem jądrowym. W przeciwieństwie do wyściółczaków II stopnia, ependymiaki anaplastyczne mają tendencję do przenikania do otaczających tkanek i tym samym rzadziej pozwalają na całkowitą resekcję (Oh, Ivan i in. 2013).

Guzy I stopnia obejmują podwyściółczaka i wyściółczaka śluzakowobrodawczakowatego. Podwyściółczaki rzadko występują w rdzeniu kręgowym i mogą się wyróżniać tendencją do

obwodowego umiejscowienia w obrębie rdzenia, ponieważ inne podtypy zazwyczaj lokalizują się ośrodkowo. Obraz histologiczny podwyściółczaków wykazuje mikrocystyczne przestrzenie i zgrupowane komórki na gęstym, włóknistym tle. Wyściółczak śluzakowobrodawczakowaty nazywany jest tak ze względu na mikroskopijny wygląd komórek o luźnej strukturze z występującymi nagromadzeniami mucyny, często z wyraźnie zhialinizowanymi naczyniami krwionośnymi. U dorosłych zmiany śluzakowobrodawczakowate stanowią około jednej czwartej przypadków wyściółczaków rdzenia kręgowego. Guzy te występują niemal wyłącznie wokół stożka rdzenia kręgowego, często z udziałem konia ogoniastego lub nici końcowej. Chociaż nie mają one złośliwych cech histologicznych, charakteryzują się większą częstością nawrotów niż wyściółczaki II stopnia. Chociaż nawroty mogą występować w 15-33% przypadków, śmiertelność jest niska - przeżywalność szacuje się na 85-100% po 5 latach (Tarapore i in. 2013).

Obrazowanie rezonansem magnetycznym (MR), z kontrastem i bez kontrastu, jest najlepszą metodą oceny w podejrzeniu nowotworów rdzenia kręgowego, jeżeli nie występują przeciwwskazania do wykonania badania. Spektroskopia MR oraz perfuzja MRI nie są zazwyczaj przydatne ze względu na małą średnicę kanału kręgowego i artefakty związane z przepływem krwi. Tomografia komputerowa (TK) jest mało przydatna diagnostycznie poza identyfikacją obszarów zwapnień i dlatego stanowi alternatywę tylko wtedy, gdy MR jest nieosiągalny. W badaniu PET wyściółczaki wydają się zazwyczaj hipometaboliczne ze względu na małą gęstość komórek i powolny wzrost (Mineura i in. 1997).

Ocena zmian rozrostowych sznura rdzenia kręgowego jest kluczowe w identyfikacji guzów śródrzeniowych; w przypadku prawidłowej wielkości sznura należy rozważyć również procesy nienowotworowe, takie jak choroba demielinizacyjna. W odniesieniu do rdzenia kręgowego, wyściółczaki są zwykle hipointensywne na obrazach T1-zależnych, hiperintensywne na obrazach T2-zależnych i wzmacniają się po podaniu kontrastu. Często zawierają obszary zmian torbielowatych, krwotoku, martwicy i/lub zwapnień, które mogą dawać niejednorodny sygnał (Koeller 2000).

Wyściółczaki śluzakowobrodawczakowate występują zwykle w okolicy stożka rdzenia kręgowego (conus medullaris). Charakterystyczne w obrazowaniu jest niejednorodne uszkodzenie z izodensyjnymi składnikami komórkowymi i hiperdensyjnymi obszarami wytwarzania mucyny lub krwotoku (na T1 i T2). Te dobrze zlokalizowane guzy wzmacniają się równomiernie (Koeller 2000).

Wyściółczaki anaplastyczne są zwykle izointensywne na obrazach T1-zależnych, izo- lub hiperdensyjne na obrazach T2-zależnych i mają zmienne wzmocnienie pokontrastowe. Nacieki do otaczającej tkanki może być widoczny, co utrudnia odróżnienie ich od glejaka naciekowego.

W pracy omówiono przypadek 25 letniego pacjenta, który zgłosił z objawami neurologicznymi i został skierowany na badanie MR celem oceny odcinka piersiowego kręgosłupa z podejrzeniem zmiany ogniskowej. Na podstawie badania MR na wysokości trzonów Th10, Th11 stwierdzono niewielki guz wypełniający centralnie światło kanału kręgowego powodujący hydrosyryngomielię powyżej i poniżej tkanki guza oraz zaburzenia przepływu krwi przez naczynia rdzeniowe. W badaniu kontrolnym po roku wielkość guza oraz jego morfologia wykazywały charakter stacjonarny w stosunku do badania poprzedniego. Kolejne kontrolne badania MR wykonane po roku, dwóch oraz trzech latach wykazały postępującą progresję guza. Ostatnie badanie uwidocznilo ponad dwukrotny wzrost masy nowotworowej. Pacjent został zakwalifikowany do operacji.

Jak w przypadku większości innych guzów, celem operacji jest całkowita resekcja (gross total resection - GTR) z zachowaniem zdrowej tkanki. Zakres resekcji w przypadku wyściółczaka rdzenia kręgowego zależy od lokalizacji, wielkości, histologii i obecności torebki lub syrinxsa (zapewniającego płaszczyznę resekcji) guza. Częstość GTR w przypadku wyściółczaka rdzenia kręgowego jest wysoka (84-93% przypadków).

W wielu badaniach retrospektywnych wykazano związek między zakresem resekcji a przeżyciem bez progresji (progression-free survival - PFS) u chorych z wyściółczakiem rdzenia kręgowego. Brakuje jednak dowodów na istnienie ostatecznych związków z PFS lub całkowitym przeżyciem (overall survival - OS) ze względu na rzadkość występowania wyściółczaków. Oceniono związek między wynikami klinicznymi a oceną histologiczną u 175 dorosłych pacjentów z wyściółczakiem rdzenia kręgowego. Dla całej badanej grupy GTR był związany z lepszym PFS

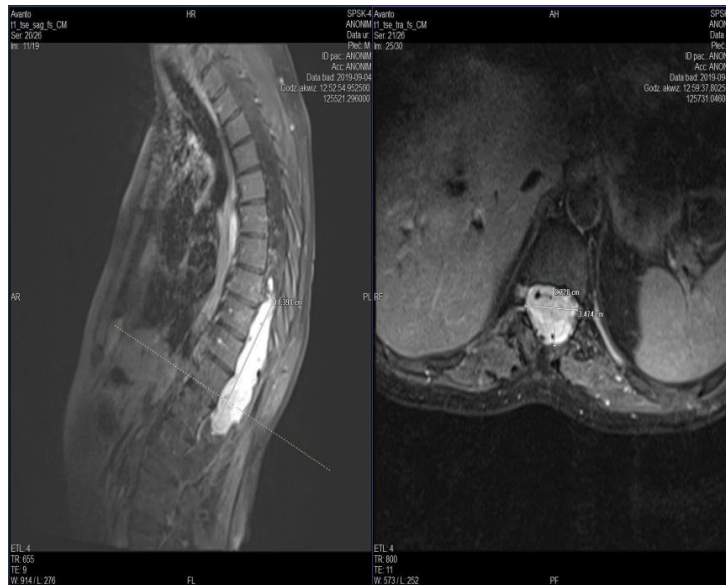
i OS. W przypadku pacjentów z wyściółczakiem II stopnia, u których GTR miał znamienne niższy wskaźnik nawrotów w porównaniu z pacjentami z całkowitą resekcją (subtotal resection - STR). Natomiast w przypadku wyściółczaka śluzakowobrodawkowatego I stopnia częstość nawrotów nie różniła się istotnie u pacjentów z GTR w porównaniu z STR (odpowiednio 4/33 pacjentów (12,1%) i 6/23 pacjentów (26,1%), $p = 0,705$). W przypadku wyściółczaka III stopnia częstość nawrotów była niższa u pacjentów, którzy uzyskali GTR w porównaniu z STR (0/3 pacjentów w porównaniu z 6/8 pacjentów), przy 5 zgonach w grupie STR; jednakże liczba pacjentów była zbyt mała, aby wykazać istotną różnicę. Stwierdzono również istotny związek między histologią guza a zakresem resekcji, przy wyższym wskaźniku GTR u pacjentów ze zmianami II stopnia (78,8%) w porównaniu z wyściółczakiem śluzakowobrodawkowatym I stopnia (58,9%, $p < 0,001$), który był większy niż wskaźnik GTR dla wyściółczaka III stopnia (27,3%, $p < 0,001$) (Oh, Kim i in. 2013).



Rys.1. Badanie kontrolne MR kręgosłupa wykonane po roku. Guz ma średnicę ponad 4 centymetrów.



Rys.2. Badanie kontrolne MR kręgosłupa wykonane po 2 latach. Guz ma średnicę około 7,5 centymetra.



Rys.3. Badanie kontrolne MR kręgosłupa wykonane po 3 latach. Guz ma średnicę ponad 11 centymetrów.

Mimo wysiłków zmierzających do zachowania prawidłowej tkanki, pooperacyjne deficyty neurologiczne są niestety powszechne. W porównaniu z chorymi z deficytami wyjściowymi chorzy z dobrą funkcjonalnością neurologiczną przed zabiegiem operacyjnym mają mniejsze szanse na wystąpienie objawów neurologicznych pooperacyjnych, a większe prawdopodobieństwo poprawy w przypadku ich wystąpienia. Chorzy z guzami na poziomie klatki piersiowej mają zazwyczaj większe deficyty czynnościowe po zabiegu resekcji, prawdopodobnie związane ze stosunkowo ograniczonym ukrwieniem okolicy i wąskim kanałem kręgowym. Guzy z wyraźniejszymi torbielami są związane z mniejszą liczbą pooperacyjnych deficytów neurologicznych, prawdopodobnie dlatego, że łatwiej je oddzielić od prawidłowej tkanki. Co ciekawe, nie stwierdzono, aby zakres resekcji korelował z pooperacyjną funkcją neurologiczną. Guzy śluzakowobrodawkowate, ze względu na ich typowe położenie w pobliżu rdzenia kręgowego, charakteryzują się najwyższą częstością występowania objawów pooperacyjnych dotyczących pęcherza moczowego i jelit. W przypadku tych guzów ważne jest rozważenie, czy maksymalna resekcja jest warta potencjalnego ryzyka urazu, gdyż brak jest obecnie dowodów na korzyść z GTR dla tego podtypu wyściółczaka. Niektórzy badacze sugerują, że zachowanie integralności torbieli może być istotne dla zapobiegania nawrotom, jednak obecnie brak jest ostatecznych dowodów. Potrzebne są dalsze badania w celu określenia optymalnych technik chirurgicznych dla zachowania funkcji neurologicznej i zapobiegania nawrotom wyściółczaka śluzakowobrodawkowatego (Chang i in. 2002).

3. Podsumowanie i wnioski:

Wyściółczaki rdzenia kręgowego są najczęstszym guzem wewnątrzrdzeniowym u dorosłych. Objawy pojawiają się dosyć późno oraz zazwyczaj są niespecyficzne. Jak najszybsza diagnostyka obrazowa umożliwia podjęcie wczesnej decyzji o interwencji chirurgicznej, co znacząco zwiększa rokowanie. Wyściółczaki rdzenia kręgowego charakteryzują torbiele wewnątrz- i zewnątrzpochodne, złogi hemosyderyny oraz silne wzmocnienie części litej guza, co pomaga w ustaleniu diagnozy przedoperacyjnej. Ze względu na specyfikę tkanki nerwowej oraz niezwykle niebezpieczne skutki jej uszkodzenia, podjęcie szybkiej interwencji lekarskiej, sprawna diagnoza oraz wdrożenie odpowiedniego leczenia są niezwykle istotne. Spośród dostępnych metod diagnostycznych rezonans magnetycznych jest metoda z wyboru w diagnostyce wyściółczaka rdzenia kręgowego.

4. Bibliografia

- Chamberlain MC, (2003), Ependymomas, *Curr Neurol Neurosci Rep*, 3(3):193-9.
- Schwartz TH, McCormick PC, (2000), Intramedullary ependymomas: clinical presentation, surgical treatment strategies and prognosis, *J Neurooncol*, 47(3):211-8.
- Perry A, Prayson RA, (2002), *Glial and Glioneuronal Tumors Neuropathology*. 2. Elsevier Inc, pp. 461–512.
- Klekamp J, *Neurosurg*, (2015), Spinal ependymomas. Part 1: Intramedullary ependymomas, *Focus*, 39(2):E6.
- Smirniotopoulos JG, *Brain E*, (2013), Non-astrocytic gliomas, *Neuropathology*. Elsevier Inc, pp. 729–742
- Oh MC, Ivan ME, Sun MZ i in., (2013), Adjuvant radiotherapy delays recurrence following subtotal resection of spinal cord ependymomas, *Neuro Oncol*, 15(2):208-15.
- Tarapore PE, Modera P, Naujokas A i in., (2013), Pathology of spinal ependymomas: an institutional experience over 25 years in 134 patients, *Neurosurgery*, 73(2):247-55; discussion 255.
- Mineura K, Shioya H, Kowada M i in., (1997), Subependymoma of the septum pellucidum: characterization by PET, *32(2):143-7*.
- Koeller KK, Rosenblum RS, Morrison AL, (2000), Neoplasms of the spinal cord and filum terminale: radiologic-pathologic correlation, *Radiographics*, 20(6):1721-49.
- Oh MC, Kim JM, Kaur G i in., (2013), Prognosis by tumor location in adults with spinal ependymomas, *J Neurosurg Spine*, 18(3):226-35.
- Chang UK, Choe WJ, Chung SK i in., (2002), Surgical outcome and prognostic factors of spinal intramedullary ependymomas in adults, *J Neurooncol*, 57(2):133-9.

14. Narastający problem występowania otyłości i cukrzycy wśród dzieci i młodzieży

A growing problem of obesity and diabetes among children and adolescents

Dorota Szałabska⁽¹⁾, Karolina Jędrzysek⁽³⁾, Mateusz Grajek⁽⁵⁾, Karolina Sobczyk⁽⁴⁾, Klaudia Alcer⁽²⁾, Eliza Działach⁽⁵⁾

⁽¹⁾Oddział Kliniczny Ginekologii i Położnictwa, Katedra Zdrowia Kobiety, Wydział Nauk o Zdrowiu w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁽²⁾Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Zdrowia Publicznego, Katedra Polityki Zdrowia Publicznego, Wydział Zdrowia Publicznego w Bytomiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁽³⁾Zakład Medycyny Ratunkowej, Katedra Medycyny Ratunkowej i Neurochirurgii Dziecięcej, Wydział Zdrowia Publicznego w Bytomiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁽⁴⁾Zakład Ekonomiki i Zarządzania w Ochronie Zdrowia, Wydział Zdrowia Publicznego w Bytomiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁽⁵⁾Zakład Zdrowia Publicznego, Katedra Polityki Zdrowia Publicznego, Wydział Zdrowia Publicznego w Bytomiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Szałabska Dorota: dorotaszalabska@gmail.com

Słowa kluczowe: młodzież, dzieci, otyłość, nadwaga, dietetyka

Streszczenie

Praca ma na celu przedstawienie aktualnych poglądów dotyczących epidemiologii, patogenezy, diagnostyki oraz wytycznych dotyczących leczenia i prewencji otyłości oraz towarzyszącej jej cukrzycy u dzieci i młodzieży. Problem otyłości u dzieci znany jest od dawna i narasta od kilkudziesięciu lat. Wielu rodziców nie uważa otyłości za chorobę. Brak dostrzeżenia problemu i trwanie w przekonaniu, że dziecko jest zdrowe często prowadzi do zbagatelizowania chorób współistniejących. Tymczasem zaawansowana otyłość i nadwaga stanowią zagrożenie dla zdrowia i należą do współczesnych chorób tzw. cywilizacyjnych. Szczególnie w ostatnich dwóch dekadach zauważono, że nadwaga i otyłość wśród dzieci i młodzieży występuje równolegle z cukrzycą lub innymi chorobami, a jej występowanie nieustannie wzrasta w różnych społecznościach na świecie, włączając w to Polskę. Otyłość u dzieci i młodzieży stwarza ryzyko występowania również innych chorób tj. chorób układu oddechowego, endokrynologicznego, stłuszczenia wątroby, nieprawidłowości ortopedycznych i zaburzeń psychicznych, a w wieku późniejszym zaawansowanych schorzeń układu sercowo-naczyniowego.

1. Wstęp

W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat zaobserwowano gwałtowny wzrost otyłości dziecięcej. Szacuje się, że na świecie aktualnie około 110 milionów dzieci ma nadwagę lub otyłość. Jednocześnie notuje się wzrost liczby dzieci i nastolatków ze zdiagnozowaną cukrzycą typu 2 oraz innych schorzeń połączonych z otyłością. Powiązanie wzrostu diagnoz otyłości i cukrzycy w widoczny sposób alarmuje naukowców. W wielu państwach świata wskaźniki otyłości u dzieci i młodzieży są ekstremalnie wysokie i pogarszają się szczególnie wśród późnych nastolatków/młodych dorosłych. Dodatkowo liczba małoletnich osób ze znaczącą otyłością rośnie w zastraszającym tempie. Jest to jednocześnie grupa, w której diagnozuje się choroby współistniejące, takie jak wspomniana cukrzyca typu 2. Najbardziej widoczny problem jest w krajach wysoce rozwiniętych np. Stanach Zjednoczonych. Ekspersi Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) od początku milenium podają, że do ponad 300 mln dorosłych wzrosła liczba zaklasyfikowanych, jako osoby otyłe, z czego 132 mln w krajach rozwiniętych i 170 mln w innych regionach świata. Sytuacja ta dotyczy się proporcjonalnie dzieci i młodzieży. Problem narastania otyłości dotyczy również polskich dzieci. W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat w naszym kraju dokonały się zasadnicze zmiany w sposobie żywienia i szeroko

rozumianym trybie życia młodego pokolenia (preferencje i brak dyscypliny w żywieniu, statyczny sposób spędzania wolnego czasu, ograniczenie aktywności fizycznej, zaniedbanie właściwego rozwoju fizycznego) (Fichna i Skowrońska 2008).

Procesem pierwotnym przyczyniającym się do rozwoju otyłości jest nadmierna i nieumiarkowana konsumpcja pokarmów (otyłość alimentacyjna, czyli otyłość prosta), która prowadzi do magazynowania nadmiaru energii w postaci lipidów w zwiększonej masie tkanki tłuszczowej. Skala zjawiska pozwala mówić o epidemii otyłości wśród dzieci i młodzieży. Jednocześnie obserwuje się coraz większą liczbę zachorowań na cukrzycę typu 2. (Type 2 Diabetes Mellitus, w skrócie T2DM), która przestała być diagnozowana prawie wyłącznie w populacji osób dorosłych, a na coraz częstszą skalę występuje współistniejąco wraz z otyłością dzieci. Zwiększoną częstość występowania tej choroby u dzieci i młodzieży na początku dostrzeżono w Stanach Zjednoczonych, gdzie już w latach 90. ubiegłego wieku wśród nowo ujawnionych przypadków cukrzycy rozpoznano około 3% cukrzycy typu 2. Nie można zapomnieć, że poza otyłością (która jest głównym czynnikiem predysponującym do ujawnienia się T2DM), istotny jest również udział czynników genetycznych i środowiskowych. Jednocześnie, wraz ze wzrostem częstości występowania otyłości w całej populacji dzieci i młodzieży, proporcjonalnie zwiększa się liczba otyłych pacjentów z cukrzycą typu 1 (Type 1 Diabetes Mellitus, T1DM). Stanowi to coraz poważniejszy i bardziej istotny problem diagnostyczny i terapeutyczny w praktyce pediatricznej. Lekarze nie mają wątpliwości, że znaczna otyłość jest przyczyną cukrzycy. Nie jedyną, ale bezpośrednią. Ostrzegają, że rosnące wskaźniki otyłości nieuchronnie prowadzą do większej zachorowalności na cukrzycę typu 2 (Mikoś i in. 2010).

2. Opis zagadnienia

Otyłość jest przewlekłą chorobą o złożonym genetycznym i środowiskowym podłożu. Objawia się głównie nadmiernym rozwojem tkanki tłuszczowej w organizmie i patologicznym zwiększeniem masy ciała powyżej przyjętej normy. Jest jednym z najczęstszych zaburzeń w rozwoju fizycznym dzieci i młodzieży. Nadwaga jest to różnica pomiędzy aktualną a należną masą ciała wyrażona w kilogramach lub procentach zgodnie ze wzorem (Mikoś i in. 2010):

$$\text{Nadwaga} = \frac{\text{aktualna masa ciała} - \text{należna masa ciała}}{\text{należna masa ciała}} * 100\%$$

Otyłość jest to zwiększenie ponad miarę masy tkanki tłuszczowej w organizmie. Prowadzi to do upośledzenia funkcji różnych narządów wewnętrznych i w rezultacie do wzrostu ryzyka chorobowości. Pokazuje to, że stan ten należy traktować w kryteriach choroby, a nie tylko w kryteriach defektu kosmetycznego. U dorosłych pacjentów otyłość rozpoznaje się, gdy zawartość tkanki tłuszczowej jest większa niż 30% należnej masy ciała u kobiet i 25% u mężczyzn; u dzieci zawartość tkanki tłuszczowej w organizmie ściśle zależy od wieku i płci. Do dokonania oceny stopnia otyłości oraz przedstawienia rozkładu danych antropometrycznych wykorzystuje się m.in. wskaźnik BMI, siatki centylowe, wskaźnik Cole'a lub pomiary obwodu talii i bioder oraz tzw. fałdomierz. Podstawę diagnostyki stanowią opracowane siatki centylowe przedstawiające w sposób graficzny stosunek masy do wieku, wzrost w stosunku do wieku i masę w stosunku do wzrostu. W Polsce najczęściej stosowane są siatki centylowe opracowane w Instytucie Matki i Dziecka. Dany parametr jest za ich pomocą porównywany z przyjętą normą. Kolejnym ważnym wskaźnikiem jest Body Mass Index (BMI) (Mikoś i in. 2010).

$$\text{BMI} = \frac{\text{masa rzeczywista}}{\text{wzrost}^2} [\text{kg} * \text{m}^{-2}]$$

Norma według WHO wynosi 19–25 kg*m⁻². W przypadku osób dorosłych wartość z przedziału 25 do 30 kg*m⁻² jest diagnozowana jako nadwaga, a gdy BMI przekracza 30 kg*m⁻² mamy do czynienia z otyłością. U dzieci wartość otrzymanego z obliczeń BMI porównuje się z danymi z siatki centylowej. Metoda ta pozwala na odpowiednią ocenę stanu odżywienia dziecka

i powszechnie uważana jest za standardową metodę diagnostyki otyłości. Praktyka jednak często skłania nas do stwierdzenia, że wspomniana metoda nie jest często stosowana przez pediatrów. Zdarza się, że częściej posługują się oni siatkami masy ciała i proporcji. Jeszcze rzadziej stosuje się faldomierze, które służą do oceny grubości tkanki tłuszczowej podskórnej. Alternatywą zwłaszcza u młodszych dzieci jest stosowanie tzw. wskaźnika Cole'a (Least Mean Square, LMS) (Mikoś i in. 2010).

$$LMS = \frac{\text{masa rzeczywista} * \text{standardowy wzrost}^2}{\text{masa standardowa} * \text{rzeczywisty wzrost}^2} * 100\%$$

Korzystając ze wzoru na wyznaczenie BMI powyższy wzór można sprowadzić do postaci:

$$LMS = \frac{\text{aktualne BMI}}{\text{standardowe BMI}} * 100\%$$

Wskaźnik Cole'a jest ilorazem aktualnego i standardowego Wskaźnika Masy Ciała. Standardowe parametry przyjęte do obliczeń zależą od płci i wieku dziecka. Wartości LMS z przedziału 90-110% uznawane są za prawidłowe. Wzrost wartości do >120% świadczy o nadwadze, a wartości >120% o otyłości (Mikoś i in. 2010).

Pomocnicze znaczenie w ocenie, rozwoju i diagnostyce otyłości mogą mieć badania bioimpedancji elektrycznej, które pozwalają w znaczącym przybliżeniu oceniać skład masy ciała z rozróżnieniem udziału w niej tkanki tłuszczowej i mięśniowej oraz wody. Metoda jest bezinwazyjna i bezpieczna w stosowaniu. Duży stopień zautomatyzowania badania sprawia, że aparatura pomiarowa jest coraz częściej dostępna w naszej przestrzeni życiowej. Upowszechnienie tej metody badania daje nam kolejne narzędzie diagnostyczne mogące w łatwy sposób potwierdzić nasze obawy związane z pierwszymi fizycznymi objawami nadwagi. Metoda ta nie jest jednak pozbawiona wad. Największym problemem są braki norm populacyjnych i konieczność utrzymania powtarzalnych warunków pomiaru. Mimo tych wad metoda pozwala w rzetelny sposób ujawniać dynamikę zmian u chorych lub porównywać efekty leczenia nadwagi lub otyłości. Istnieją również inne metody badań. Są one jednak kosztowne i pracochłonne, dlatego w praktyce stosuje się je rzadko. W badaniach klinicznych i patofizjologicznych można dodatkowo zastosować pomiar ilości tkanki tłuszczowej metodą absorpcjometrii podwójnej energii promieniowania rentgenowskiego (DEXA, dual energy X-ray absorptometry), rezonansu magnetycznego, lub zmierzenie całkowitej ilości wody w ustroju z wykorzystaniem tomodensytometrii (Fichna i Skowrońska 2008).

Amerykańskie Towarzystwo Diabetologiczne (ADA, American Diabetes Association) klasyfikuje cukrzycę typu 1., jako chorobę autoimmunologiczną związaną z destrukcją komórek beta wysp trzustkowych, prowadzącą do niedoboru lub braku insuliny, której towarzyszy obecność przeciwciał przeciwwyspowych ICA, przeciw endogennej insulinie IAA, przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego GAD 65, oraz przeciwko fosfatazom tyrozyny (IA-2 i IA-2b). T2DM jest w głównej mierze związana z otyłością, której towarzyszą insulinooporność i względny niedobór insuliny. Nie cechuje jej autoimmunizacja oraz do niedawna była zwykle rozpoznawana w populacji osób dorosłych. W populacji dzieci i młodzieży rozpoznaje się ją najczęściej w okresie dojrzewania płciowego, najczęściej 13–14 lat (4.–5. stopień w skali Tannera). Stopień dojrzałości płciowej nie może być jednak cechą determinującą zdiagnozowanie T2DM i T1DM, gdyż ta ostatnia może się również ujawnić w tym samym okresie pokwitania. Cukrzyca stanowi bardzo duży i stale rosnący problem na skalę całego świata. Dane szacunkowe podają, że około 5% populacji choruje na cukrzycę, w tym około 95% stanowi cukrzyca typu 2. Przyjmuje się, że cukrzyca T2DM w nawet połowie przypadków pozostaje niezdiagnozowana (Antosz i Małecka-Tendera 2012).

3. Przegląd literatury

Problem społeczny, jakim jest nadmierna masa ciała w świadomości społecznej funkcjonuje od co najmniej 1997 roku, kiedy to Światowa Organizacja Zdrowia oficjalnie ogłosiła otyłość ogólnosiwiatową epidemią obejmującą dzieci i dorosłych. Już ponad dwie dekady temu problem ten

uznano za jedno z największych zagrożeń dla zdrowia ludzkości. Liczba osób otyłych cały czas gwałtownie rośnie, wbrew propagowanemu w wielu społecznościach wizerunku szczupłej sylwetki (Galal i Hulett, 2005). Wśród młodzieży otyłość wynika ze zwolnienia szybkości wzrastania, co powoduje zmniejszone zapotrzebowanie energetyczne organizmu. Wzmószony apetyt dziecka jest w tym czasie dość spory, zatem gromadzenie zapasów tkanki tłuszczowej ma na celu magazynowanie zapasów energii niezbędnej do znacznych wydatków metabolicznych w fazie dojrzewania. Dziewczynki bardzo wcześnie, bo już na początku dojrzewania, a chłopcy nieco później, wchodzą w tzw. skok wzrostowy. Ograniczenie tempa przyrostu masy ciała w stosunku do jego długości może skutkować dużymi szansami ograniczenia wystąpienia otyłości. Otyłość wtórna (patologiczna) wynika ze schorzeń endokrynologicznych, układu nerwowego, wad genetycznych lub jest skutkiem przewlekłego leczenia. Za przyczyny otyłości wtórnej można wymienić m.in.: choroby układu wewnątrzwydzielniczego, niedoczynność tarczycy lub przytarczyc, chorobę Cushinga, niedobór hormonu wzrostu, liczne zaburzenia okresu pokwitania, przekwitania, mózgowie porażenie dziecięce, rdzeniowy zanik mięśni, guzy ośrodkowego układu nerwowego, stan po zapaleniu opon mózgowych i mózgu, stan po urazach ośrodkowego układu nerwowego (Sikorska-Wiśniewska 2007).

Ilość spożywanego pokarmu ma fundamentalny wpływ na predyspozycje do otyłości. Kontrolę nad tym sprawują ośrodki głodu i sytości znajdujące się w ośrodkowym układzie nerwowym: w podwzgórzu, układzie limbicznym, węchomózgowiu i w korze mózgu. Zaburzenia pracy tych ośrodków mogą powodować spożywanie obfitszych w energię posiłków, co skutkuje powolnym odkładaniem się tkanki tłuszczowej. Główną strukturą tego systemu jest jądro łukowate, obejmujące zarówno neurony wytwarzające neuroprzekaźniki pobudzające, jak i hamujące apetyt. Ośrodki pokarmowe otrzymują informacje natury chemicznej na zapotrzebowanie organizmu na energię poprzez substraty energetyczne (glukoza, wolne kwasy tłuszczowe, aminokwasy) i poprzez neuroprzekaźniki (kwas gammaaminomasłowy GABA, acetylocholina, adrenalina, dopamina, serotonina, endorfiny). Informacje te są nieprzerwanie dostarczane do odpowiednich ośrodków regulacyjnych, które wpływają na zużycie glukozy, uwalnianie insuliny w trzustce, termogenezę i finalnie pobór pożywienia. Na łaknienie mają największy wpływ neurotransmitery pobudzające nasz apetyt na węglowodany tj. noradrenalina lub też hamujące ten proces, np. serotonina i dopamina (hamująca spożywanie tłuszczów). Olbrzymi wpływ na ten proces ma również środowisko i idące za tym możliwości dostępu do składników pokarmowych. Za jedną z przyczyn większej częstości występowania otyłości u dzieci z biednych regionów uznaje się nieprawidłowo zbilansowaną dietę, która obfituje w tańsze, bogato węglowodanowe i bogato tłuszczowe składniki oraz nieregularne spożywanie posiłków. Największy wpływ na dobór pokarmów w domowej diecie dziecka mają matki i są one źródłem podstawowych informacji o żywieniu. Może być to olbrzymią zaletą w walce z otyłością lub w pewnych przypadkach wręcz przeciwnie, gdyż najczęściej otyłość u młodzieży wynika właśnie z dodatniego bilansu energetycznego. Bilans ten powstaje na skutek nadmiernego dostarczania energii dla organizmu z pokarmu w stosunku do wydatku na podstawowe funkcje życiowe, ruch i termogenezę. Najbardziej znaczące negatywne czynniki w procesie odżywiania to m.in.: spożywanie zbyt dużych ilości żywności (przejadanie się), nieprawidłowy skład posiłków z dużą ilością cukrów prostych i tłuszczów. Duże znaczenie ma także rola gotowych do spożycia produktów - mało wartościowych, kalorycznych, często błędnie stanowiąca w wielu rodzinach podstawę żywienia. Dieta dzieci oparta o batony, chipsy, ciastka, produkty wysokokaloryczne i napoje typu cola, stwarza warunki sprzyjające rozwojowi otyłości. Młodzież często żywi się w barach szybkiej obsługi. Żywność typu „fast food” zwykle zawiera znaczne ilości tłuszczów nasyconych, a jednocześnie śladową ilość błonnika pokarmowego (Sikorska-Wiśniewska 2007).

Prowadzenie działań prewencyjnych i profilaktycznych przeciwko otyłości i cukrzycy powinno mieć na celu zapobieganie lub zmniejszenie szans na ich wystąpienie. Do głównych, rekomendowanych zmian w stylu życia należą: zwiększenie aktywności fizycznej, która korzystnie wpływa na insulinowrażliwość, zmniejszenie ilości spożywanych kalorii, w tym tłuszczów (szczególnie nasyconych), niezależnie od wpływu na BMI, spożywanie w ciągu doby odpowiedniej ilości potraw zawierających błonnik, dbanie o gospodarkę wodną, mikro i makro elementy oraz konsultowanie swojej diety z dietetykiem. Według aktualnych zaleceń każde dziecko z BMI ≥ 85 powinno być monitorowane pod względem powikłań współistniejących z nadmierną masą ciała.

Pod uwagę powinny być brane zarówno dane z wywiadu, jak i badanie fizykalne oraz wyniki badań dodatkowych (Fichna i Skowrońska 2008).

Warto wspomnieć też o coraz większej wiedzy z zakresu wpływu czynników genetycznych na proces powstania otyłości. Podatność na czynniki genetyczne jest inna u każdego człowieka i najczęściej nierozzerwalnie wiąże się z czynnikami środowiskowymi. Przyjmowane leki, tryb życia czy stres pozwalają uwolnić predyspozycje genetyczne do rozwoju otyłości lub odwrotnie - są hamulcem. Aby w danym środowisku rozwinęła się otyłość, muszą istnieć genetyczne predyspozycje, które pozwalają czynnikom zewnętrznym zmienić bilans energetyczny. Istnieje wiele genetycznych cech związanych z otyłością. Można wśród nich wymienić zmniejszoną podstawową przemianę materii, nasilone różnicowanie preadypocytów w komórki tłuszczowe, zwiększoną wrażliwość na odżywianie wysokotłuszczowe czy wrażliwość na insulinę. Dotychczasowe badania pozwoliły zlokalizować kilkanaście miejsc w ludzkim DNA powiązanych z masą ciała oraz typem rozmieszczenia tkanki tłuszczowej. Należy jednak pamiętać, że otyłości nie można wytłumaczyć jedynie czynnikami genetycznymi (Maślanek i in. 2013).

Odżywianie się kobiety w okresie prenatalnym jest niezwykle istotne dla kształtowania masy ciała dziecka po porodzie i w wieku późniejszym. Zaburzenia odżywiania mogą negatywnie wpływać na ciążę. Wyniki badań wskazują, że nadwaga u matki i nadmierny dowóz energii w okresie prenatalnym sprzyjają otyłości dziecięcej. Pokazuje to, że wpływ na predyspozycje do otyłości u każdego z nas może zacząć się już na wczesnym etapie życia. Efektem ww. zaburzeń mogą być: zwiększone ryzyko zespołu metabolicznego w związku z uszkodzeniem aparatu wyspowego trzustki, powstanie insulinooporności, zmiana w reaktywności naczyń i nadciśnienie tętnicze. Uważa się również, że wczesne sztuczne karmienie sprzyja nadmiarowi masy ciała u niemowląt z racji zwiększonego w stosunku do niemowląt karmionych naturalnie, spożycia białka. Obserwuje się częstsze występowanie otyłości u dzieci, których rodzice też mają nadwagę. Obecnie wiadomo, że prawidłowa masa ciała jest w dużej mierze uwarunkowana wielogenowo, a otyłość może być wynikiem zaburzenia funkcjonowania genów kontrolujących masę ciała poprzez wpływ m. in. na prawidłową termogenezę, czy gospodarkę tłuszczową w organizmie. Genetyczne uwarunkowanie skłonności do otyłości zależy od wpływów środowiska. W warunkach prostego i nieskrępowanego dostępu do pokarmu przy jednoczesnym ograniczeniu wysiłku fizycznego, ekspresja genów warunkujących przyrost masy ciała doprowadza do otyłości. Wpływ środowiska prawdopodobnie jest najsilniejszy w okresie dzieciństwa, kiedy kształtują się nawyki żywieniowe, zazwyczaj zgodne z rodzicielskimi (Sikorska-Wiśniewska 2007).

Początki choroby dzieci i młodzieży najłatwiej uchwycić w formie nadwagi. W przypadku rozwinięcia się choroby jej czas trwania jest jeszcze wciąż krótki w porównaniu z osobami dorosłymi, u których choroba może rozwijać się latami. Możemy wskazać najbardziej charakterystyczne, postępujące po sobie, etapy rozwoju otyłości oraz jej komplikacji (Antosz i Małecka-Tendera 2012):

- a) Nadwaga.
- b) Otyłość prosta.
- c) Otyłość z insulinoopornością.
- d) Otyłość z insulinoopornością i upośledzoną tolerancją glukozy.
- e) Zespół metaboliczny.
- f) Cukrzyca typu 2.

Nieleczona otyłość może prowadzić do wielu komplikacji i chorób współtowarzyszących. W porównaniu z osobami szczupłymi, u osób otyłych może z większym prawdopodobieństwem wystąpić (Antosz i Małecka-Tendera 2012):

- a) cukrzyca (10-krotnie zwiększone ryzyko zachorowania na cukrzycę typu 2);
- b) nadciśnienie tętnicze (3-krotnie zwiększone ryzyko);
- c) dyslipidemia;
- d) kamica pęcherzyka żółciowego i zespół bezdechu sennego;
- e) choroba wieńcowa (ponad 2-krotnie wyższe zagrożenie);
- f) chorobą zwyrodnieniową stawów;
- g) nowotwory (rak piersi, macicy, jelita grubego, trzustki).

Jednym z klasycznych przykładów wykrywania powikłań otyłości jest stwierdzenie w wywiadzie charakterystycznych objawów cukrzycy (poliuria, polidypsja, spadek masy ciała). Dodatkowo w badaniu przedmiotowym i podmiotowym oraz w badaniach dodatkowych cech zaburzenia miesiączkowania, trądzik, hirsutyzm, podwyższone stężenie testosteronu we krwi itp. (Fichna i Skowrońska 2008).

Możliwe do wystąpienia powikłania otyłości wieku rozwojowego:

- a) Zaburzenia gospodarki węglowodanowej.
- b) Zaburzenia gospodarki lipidowej.
- c) Zespół metaboliczny.
- d) Niealkoholowa choroba tłuszczowa wątroby.
- e) Szklwienie kłębuszków nerkowych.
- f) Obturacyjny bezdech senny.
- g) Astma oskrzelowa (ma przebieg cięższy niż u dzieci szczupłych).
- h) Choroby układu kostno-stawowego.
- i) Zaburzenia emocjonalne i konsekwencje psychopoleczne.
- j) Wczesne dojrzewanie płciowe i hiperandrogenizm.
- k) W wieku dojrzałym udary i miażdżycza naczyń.

Wśród populacji dzieci i młodzieży z T2DM występują znacznie częściej już w chwili rozpoznania niż u pacjentów z T1DM. Progresja tych schorzeń również jest znacznie szybsza. (Gawlik i in. 2012). Cukrzyca jest skutkiem insulinooporności rozwijającej się wskutek długotrwałe utrzymującej się poposiłkowej hyperglikemii. Prowadzi to do spadku ilości receptorów insulinowych lub istotnej zmiany ich struktury. Ponadto dzieci otyłe są dyskryminowane przez rówieśników, mają niską samoocenę. Zauważono związek, że depresja (i jej objawy) jest tym silniej wyrażana, im wyższy jest wskaźnik BMI. Opisano przypadki gdzie cienka granica zdrowia psychicznego dzieliła przejście z nadwagi do powstawania jadłowstrętu psychicznego i bulimii. Według zaleceń lekarzy specjalistów leczeniem powinny być objęte dzieci z otyłością rozpoznaną na podstawie wskaźnika BMI, którego wartość przekracza 95 (Sikorska-Wiśniewska 2007).

Leczenie otyłych dzieci chorych na cukrzycę powinno być opracowane przy współudziale wielu specjalistów, w tym pediatry, endokrynologa, diabetologa, dietetyka i psychologa, oraz indywidualnie dopasowana do każdego pacjenta. Leczenie ma na celu przede wszystkim eliminację objawów cukrzycy (hiperglikemii), a także stopniowe dążenie do uzyskania prawidłowej masy ciała oraz utrzymanie normoglikemii. Rozpoczynając leczenie należy pamiętać o zróżnicowaniu typu cukrzycy (T1DM i T2DM). Zgodnie z zaleceniami należy stale kontrolować gospodarkę lipidową u wszystkich pacjentów w chwili rozpoznania cukrzycy. Każdorazowo po wyrównaniu zaburzeń metabolicznych w przebiegu ostrej hiperglikemii i kwasicy ketonowej należy ten proces powtarzać (Antosz i Małacka-Tendera 2012).

4. Podsumowanie i wnioski

Czasy, kiedy na dziecko z otyłością prostą rodzice spoglądali bezkrytycznie minęły bezpowrotnie. Niemal na całym świecie zarówno w krajach rozwiniętych, jak i rozwijających się obserwuje się wzrost liczby osób z nadwagą i otyłością oraz T2DM. W miarę coraz częstszego występowania poważnych przypadków otyłości środowisko medyczne zdało sobie sprawę z jej powikłań, do których dochodzi już w okresie dzieciństwa. Szczególnie niebezpieczne skutki otyłości w połączeniu z towarzyszącą im cukrzycą mogą prowadzić do poważnych stanów chorobowych. Istnieje bardzo pilna potrzeba edukacji zdrowotnej dzieci i młodzieży, gdyż niemal 30 % populacji młodzieży z nadmierną masą ciała objawia cechy zespołu metabolicznego. Na szczęście nie zawsze otyłe dziecko staje się otyłym nastolatkiem. Zarówno lekarze, rodzice, jak i sama młodzież, powinni wspólnie dbać o uświadamianie w społeczności konieczność stosowania zbilansowanej, prawidłowej diety opartej o zasady dobrego żywienia, unikania sytuacji sprzyjających tyciu oraz propagowania aktywnego trybu życia. Przekaz ten powinien być kierowany nie tylko do osób otyłych, stanowiących grupę podwyższonego ryzyka, ale do wszystkich. Dbanie o prawidłową masę ciała w czasie dzieciństwa, dojrzewania i młodości wcale nie chroni przed rozwojem nadwagi w późniejszym okresie. Zróżnicowanie T2DM i T1DM w populacji otyłych dzieci stanowi istotny problem

diagnostyczno-terapeutyczny, związany niejednokrotnie z podobieństwem objawów klinicznych w obu grupach pacjentów w momencie zdiagnozowania choroby. Należy podkreślić, że strategia leczenia dzieci T2DM nie może być prostym odzwierciedleniem terapii w populacji osób dorosłych. W populacji otyłych dzieci z T2DM niezbędne jest przeprowadzenie randomizowanych badań klinicznych w celu ustalenia wskazań do insulinoterapii oraz optymalnych metod leczenia chorób współistniejących, takich jak nadciśnienie tętnicze czy dyslipidemia.

5. Literatura

- Antosz A, Małecka-Tendera E (2012) Cukrzyca w populacji otyłych dzieci i młodzieży - problem diagnostyczno-terapeutyczny. *Endokrynologia, Otyłość i Zaburzenia Przemiany Materii* 8(2): 65-72.
- Fichna P, Skowrońska B (2008) Otyłość oraz zespół metaboliczny u dzieci i młodzieży. *Family Medicine & Primary Care Review* 10(2): 269–278.
- Galal O.M., Hulett J (2005) Obesity among schoolchildren in developing countries. *Food Nutr. Bull.* 26(2): 261-266.
- Gawlik A, Zachurzok-Buczyńska A, Małecka-Tendera E (2009) Powikłania otyłości u dzieci i młodzieży. *Endokrynologia, Otyłość i Zaburzenia Przemiany Materii* 5(1): 19-27
- Maślanek A, Pieszko M, Małgorzewicz S (2013) Przyczyny otyłości prostej u dzieci i młodzieży. *Forum Zaburzeń Metabolicznych* 4(1): 29-36.
- Mikoś HMM, Obara-Moszyńska M, Niedziela M (2010) Nadwaga i otyłość u dzieci i młodzieży. *Nowiny Lekarskie* 79(5): 397–402.
- Sikorska-Wiśniewska G (2007) Nadwaga i otyłość u dzieci i młodzieży. *Żywność* 6(55): 71 – 80.

15. Narażenie zawodowe na stanowiskach pracy w podmiotach leczniczych

Occupational exposure at workplaces in medical entities

Dorota Szałabska⁽¹⁾, Przemysław Suchoń⁽²⁾, Karolina Jędrzysek⁽³⁾, Karolina Sobczyk⁽⁴⁾, Mateusz Grajek⁽⁵⁾, Klaudia Alcer⁽²⁾

⁽¹⁾Oddział Kliniczny Ginekologii i Położnictwa, Katedra Zdrowia Kobiety, Wydział Nauk o Zdrowiu w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁽²⁾Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Zdrowia Publicznego, Katedra Polityki Zdrowia Publicznego, Wydział Zdrowia Publicznego w Bytomiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁽³⁾Zakład Medycyny Ratunkowej, Katedra Medycyny Ratunkowej i Neurochirurgii Dziecięcej, Wydział Zdrowia Publicznego w Bytomiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁽⁴⁾Zakład Ekonomiki i Zarządzania w Ochronie Zdrowia, Wydział Zdrowia Publicznego w Bytomiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁽⁵⁾Zakład Zdrowia Publicznego, Katedra Polityki Zdrowia Publicznego, Wydział Zdrowia Publicznego w Bytomiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Szałabska Dorota: dorotaszalabska@gmail.com

Słowa kluczowe: narażenie zawodowe, choroby zawodowe, personel medyczny

Streszczenie

Narażenie zawodowe jest jednym z ważniejszych czynników, który odgrywa istotną rolę przy rozpoznawaniu chorób zawodowych. Za chorobę zawodową uważa się chorobę, wymienioną w wykazie chorób zawodowych, jeżeli w wyniku oceny warunków pracy można stwierdzić bezspornie lub z wysokim prawdopodobieństwem, że została ona spowodowana działaniem czynników szkodliwych dla zdrowia występujących w środowisku pracy albo w związku ze sposobem wykonywania pracy, zwanych narażeniem zawodowym. Choroby zawodowe pracowników podmiotów leczniczych wywołują czynniki szkodliwe i uciążliwe miejsca pracy. Wśród czynników szkodliwych występują: czynniki chemiczne oraz pyły, hałas, drgania mechaniczne, oświetlenie, promieniowanie elektromagnetyczne i jonizujące oraz czynniki biologiczne. Z kolei wśród czynników uciążliwych miejsca pracy znajdują się: wymuszona pozycja ciała, obciążenie fizyczne wywołane pracą, hałas i oświetlenie, mikroklimat, monotonia i obciążenie statyczne, a także obciążenie psychiczne. Do określenia czynników szkodliwych i uciążliwych, wykonywania ich pomiarów i badań zobowiązany jest pracodawca. Ma on za zadanie określić co jest źródłem emisji szkodliwych czynników, jaki jest poziom narażenia pracowników, a także ocenić warunki wykonywania pracy, mające wpływ na poziom natężeń i stężeń czynników szkodliwych.

1. Wstęp

Narażenie zawodowe jest jednym z ważniejszych czynników, który odgrywa istotną rolę przy rozpoznawaniu chorób zawodowych. Za chorobę zawodową uważa się chorobę, wymienioną w wykazie chorób zawodowych, jeżeli w wyniku oceny warunków pracy można stwierdzić bezspornie lub z wysokim prawdopodobieństwem, że została ona spowodowana działaniem czynników szkodliwych dla zdrowia występujących w środowisku pracy albo w związku ze sposobem wykonywania pracy, zwanych narażeniem zawodowym (Ustawa z dnia 26 czerwca 1974). Choroba powstała wskutek pracy w warunkach szkodliwych bądź w związku z wykonywaną pracą musi zostać wymieniona w wykazie. Aktualny wykaz zawarty jest w Rozporządzeniu Rady Ministrów z dnia 30 czerwca 2009 roku w sprawie chorób zawodowych. To ustawodawca decyduje o tym, jakie choroby znajdują się w wyżej wymienionym wykazie, jednakże zawsze mają one związek z wykonywaną przez pracownika pracą, która wykonywana jest w warunkach szkodliwych.

Warunkiem zakwalifikowania powstałej choroby jako zawodowej jest jej wywołanie poprzez narażenie na czynniki szkodliwe dla pracownika, na które był on narażony podczas

wykonywania zleconych mu przez pracodawcę zadań. Choroba zawodowa może zostać rozpoznana zarówno w trakcie trwania stosunku pracy pomiędzy pracodawcą a pracownikiem, jak również po jego ustaniu bądź przeniesieniu do innej pracy, która nie naraża pracownika na pracę w szkodliwym środowisku – nie później jednak niż do czasu, który został określony w odpowiednim załączniku, pt. „Wykaz chorób zawodowych, wraz z okresem, w którym wystąpienie udokumentowanych objawów chorobowych upoważnia do rozpoznania choroby zawodowej pomimo wcześniejszego zakończenia pracy w narażeniu zawodowym” (Kaczocha 2017).

2. Czynniki szkodliwe występujące na stanowiskach pracy w podmiotach leczniczych

Do określenia czynników szkodliwych, wykonywania ich pomiarów i badań zobowiązany jest pracodawca. Ma on za zadanie określić co jest źródłem emisji szkodliwych czynników, jaki jest poziom narażenia pracowników, a także ocenić warunki wykonywania pracy, mające wpływ na poziom natężeń i stężeń czynników szkodliwych. Po wykonaniu odpowiednich pomiarów uzyskane wyniki porównuje się z wartościami normatywów higienicznych, które określone są w Rozporządzeniu Ministra Pracy i Polityki Społecznej z 06.06.2014 r. w sprawie najwyższych dopuszczalnych stężeń i natężeń czynników szkodliwych dla zdrowia w środowisku pracy (Rozporządzenie z dnia 6 czerwca 2014).

Wspomniane wyżej rozporządzenie opisuje trzy kategorie, tj. najwyższe dopuszczalne stężenie (NDS), najwyższe dopuszczalne stężenie chwilowe (NDSCh) oraz najwyższe dopuszczalne stężenie pułapowe (NDSP). W zależności od wymienionej kategorii mowa jest o maksymalnym dopuszczalnym średnim stężeniu czynnika w zależności od czasu oddziaływania na pracownika. W przypadku NDS określa się to stężenie w odniesieniu do 8-godzinnego dobowego i przeciętnego tygodniowego wymiaru czasu pracy, jaki określony jest w Kodeksie Pracy. W przypadku NDSCh mowa jest o stężeniu, którego długość trwania nie może przekraczać 15 minut i nie może występować częściej niż 2 razy w trakcie 1 zmiany roboczej w odstępnie minimum godziny czasu. Jeżeli spełnione są zasady określone w NDS oraz NDSCh to występowanie czynników szkodliwych nie powinno spowodować ujemnych zmian w stanie zdrowia pracownika. NDSP z kolei to wartość stężenia, która nie może być przekroczona nigdy w czasie trwania pracy (Kujawa 2017).

2.1 Chemiczne czynniki szkodliwe i pyły

Do chemicznych czynników szkodliwych, na które są narażeni w szczególności pracownicy szpitali i laboratoriów można zaliczyć gazy anestetyczne (wykorzystywane na salach zabiegowych i salach operacyjnych) oraz odczynniki chemiczne, które stosuje się do sterylizacji i dezynfekcji (np. sprzętu medycznego), a także w pracowniach preparatyki tkankowej. Szkodliwe substancje chemiczne mogą powstawać także w czasie używania palników gazowych w laboratoriach. Czynniki chemiczne mogą wnikać do organizmu poprzez wdychanie, czyli drogą oddechową, ale również poprzez kontakt ze skórą. Przy stosowaniu środków chemicznych należy korzystać z karty charakterystyki danego środka, która określa jakie czynniki szkodliwe mogą wystąpić. Są one stosowane w każdym pomieszczeniu. Pyły występują na tych stanowiskach pracy, gdzie wykonywane są odlewy gipsowe dla protezowanych pacjentów, a także w czasie obróbki protez. Częstotliwość wykonywania badań i pomiarów czynników chemicznych i pyłów wykonuje się w określonych przez Ministra Zdrowia odstępach czasu, które mogą wynosić od 3 miesięcy do 2 lat. Możliwe jest także odstępnie od wykonywania pomiarów, jeżeli pomiary wskazują na odpowiednio niskie wartości NDS (Rozporządzenie z dnia 2 lutego 2011).

2.2 Hałas

Pomiary natężenia hałasu wykonuje się w celu ochrony pracowników przed szkodliwym jego działaniem na narząd słuchu. Narażenie pracowników placówek ochrony zdrowia na hałas jest powodowane głównie poprzez pracę mechanicznej wentylacji, w tych pomieszczeniach, w których występuje wymuszony obieg powietrza (np. laboratoria diagnostyczne) oraz w pracowniach z hałaśliwą aparaturą medyczną. Ponadto hałas wywoływany jest przez dużą grupę głośno rozmawiających osób między innymi na korytarzach czy poczekalniach, ale także przez dźwięk wydawany przez jadące na sygnale karetki pogotowia ratunkowego. Hałas jako czynnik szkodliwy występuje w przypadku przekroczenia dopuszczalnych, określonych w przepisach wartości oraz

w przypadku narażenia na długotrwałą pracę w narażeniu na ultradźwięki. Badanie najwyższego dopuszczalnego natężenia dla hałasu powinno być wykonywane co roku lub co 2 lata lub można odstąpić od wykonywania tych pomiarów, jeżeli pomiary wykazują odpowiednio niskie wartości NDN (Kujawa 2017).

2.3 Drgania mechaniczne

Drgania mechaniczne dzieli się na oddziaływujące na organizm przez kończyny górne oraz o ogólnym oddziaływaniu na organizm człowieka. Na kończyny górne oddziałują ręczne narzędzia wibrujące. Na ich działanie narażeni są głównie stomatolodzy, którzy wykorzystują w trakcie pracy unity stomatologiczne. Podczas pracy z takim urządzeniem energia drgających elementów urządzenia przenoszona jest na organizm. W przypadku istnienia długotrwałego narażenia na drgania może dojść do powstawania zespołu wibracyjnego, objawiającego się różnymi zmianami chorobowymi. Badanie NDN dla drgań mechanicznych oddziałujących na organizm poprzez kończyny górne powinno być wykonywane co roku lub co 2 lata lub można odstąpić od wykonywania tych pomiarów, jeżeli pomiary wykazują odpowiednio niskie wartości NDN. Należy jednakże zaznaczyć, że wszelkie zmiany na stanowisku pracy, takie jak zmiana urządzeń czy zmienione warunki pracy mogą mieć wpływ na zmianę poziomu narażenia i pracodawca zobligowany jest do wykonania ponownych pomiarów i badań. Drgania mechaniczne o ogólnym oddziaływaniu na organizm człowieka to te, które przenoszą się od drgającego podłoża na organizm, tj. plecy i boki oraz miednicę. Dolegliwości jakie wywołują mogą takie drgania to dolegliwości różnego rodzaju, takie jak: dolegliwości ze strony układu nerwowego, kręgosłupa, przewodu pokarmowego, krążenia czy układu rozrodczego. Na działania tego typu drgań są narażeni przede wszystkim kierowcy karettek (Kujawa 2017).

2.4 Oświetlenie

Zapewnienie odpowiedniego, prawidłowego oświetlenia stanowisk pracy w placówkach leczniczych to jeden z ważnych elementów gwarantujących warunki pozwalające na wykonywanie obowiązków w sposób bezpieczny i higieniczny. Ustalone w normie normatywy higieniczne mają zapewnić pracownikom możliwość wykonywania swoich obowiązków w odpowiedni sposób (wydolność wzrokowa), a zarazem bezpieczny zarówno dla personelu jak i pacjentów, jak i z odpowiednim komfortem widzenia, który wpływa na dobre samopoczucie personelu, a przez to pośrednio na wydajność. Należy podkreślić, że właściwe oświetlenie jest szczególnie ważne podczas wykonywania prac o dużej dokładności, czyli podczas zabiegów czy operacji, gdyż szczególnie istotne jest tutaj rozróżnianie szczegółów. Niezapewnienie odpowiedniego oświetlenia może powodować zmęczenie wzroku, które w dalszej kolejności prowadzi do osłabienia widzenia, bólów głowy i podrażnienia narządu wzroku (Kujawa 2017).

2.5 Promieniowanie elektromagnetyczne

Na promieniowanie elektromagnetyczne wśród pracowników placówek medycznych narażone są osoby, które korzystają z urządzeń stosowanych podczas różnego rodzaju procedur. Zalicza się do nich: diatermie fizykoterapeutyczne i elektrochirurgiczne, urządzenia do magnetoterapii oraz tomografy rezonansu magnetycznego. Należy zaznaczyć, że na działanie tego pola narażony jest nie tylko personel, ale również pacjenci i inne osoby czy urządzenia znajdujące się w pobliżu źródła promieniowania. Pole elektromagnetyczne, które oddziałuje na organizm ludzki powodować może dolegliwości ze strony układów nerwowego i sercowo-naczyniowego, ale także, poprzez pochłanianie energii przez tkanki powodować może zmianę ich temperatury, a nawet obniżenie. Badania i pomiary dla promieniowania elektromagnetycznego wykonuje się przynajmniej raz w roku lub raz na dwa lata w przypadku spełnienia odpowiednich warunków lub można odstąpić od wykonywania tych pomiarów, jeżeli nie stwierdza się występowania stref ochronnych w dwóch ostatnich badaniach i pomiarach (Karpowicz i in. 2013).

2.6 Czynniki biologiczne

Praca w ochronie zdrowia szczególnie mocno obciążona jest narażeniem na czynniki biologiczne. Do zakażenia takim czynnikiem może dojść poprzez kontakt bezpośredni z zarażoną osobą, poprzez drogę pokarmową czy kropelkową, jak również skaleczenie czy wszczepienie. Według Wilczyńskiej i wsp. choroby zakaźne i pasożytnicze to najczęściej rozpoznawane choroby

zawodowe wśród pracowników ochrony zdrowia i pomocy społecznej za lata 1994–2008 (Wilczyńska i Szeszenia–Dąbrowska 2010). Zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 22 kwietnia 2005 r. w sprawie szkodliwych czynników biologicznych dla zdrowia w środowisku pracy oraz ochrony zdrowia pracowników zawodowo narażonych na te czynniki, do czynników biologicznych, które mogą powodować alergie, zatrucia czy zakażenia zalicza się pasożyty wewnętrzne człowieka, hodowle komórkowe, drobnoustroje komórkowe (również zmodyfikowane genetycznie) oraz jednostki bezkomórkowe, które mają zdolność do replikowania lub przenoszenia materiału genetycznego (również zmodyfikowane genetycznie) (Rozporządzenie z dnia 22 kwietnia 2005).

Szkodliwe czynniki biologiczne dzieli się na wirusy, priony, bakterie, grzyby i pasożyty wewnętrzne. Czynniki biologiczne klasyfikuje się na czterostopniowe grupy zagrożenia, spośród których grupa 1 to czynniki, przez które wywołanie choroby u człowieka jest mało prawdopodobne. Grupa 2 to czynniki, których rozprzestrzenienie w populacji jest mało prawdopodobne, mogą wywołać chorobę, z kolei dla pracowników mogą być niebezpieczne, ale z reguły dają się leczyć i można im zapobiegać. Grupa 3 reprezentuje czynniki wywołujące ciężkie choroby o dużym prawdopodobieństwie rozprzestrzenienia się w populacji, jednak zwykle istnieją metody leczenia i profilaktyki. Grupa 4 różni się od 3 brakiem skutecznych metod leczenia i profilaktyki (Garus–Pakowska 2016). W tabeli 1 przedstawiono niektóre choroby wywoływane przez różne czynniki biologiczne.

Tab. 1. Choroby wywoływane przez różne czynniki biologiczne stanowiące zagrożenie wśród personelu ochrony zdrowia (Kujawa 2017).

RODZAJ CZYNNIKA	WYWOŁYWANE SCHORZENIE	CZYNNIK WYWOŁUJĄCY
WIRUSY	WIRUSOWE ZAPALENIE WĄTROBY TYPU A	WIRUS HAV
	WIRUSOWE ZAPALENIE WĄTROBY TYPU B	WIRUS HBV
	WIRUSOWE ZAPALENIE WĄTROBY TYPU C	WIRUS HCV
	ZAKAŻENIA GORĄCZKOWE	WIRUS RÓŻYCZKI, REOWIRUSY, PNEUMOWIRUSY, ADENOWIRUSY
	PRIONY	GĄBCZASTE ZWYRODNIENIE MÓZGU
BAKTERIE	GRUŻLICA	PRĄTEK GRUŻLICY
	SALMONELLOZA	SALMONELLA
	CZERWONKA (DYZENTERIA)	SHIGELLA
	GRZYBY	GRZYBICE
PASOŻYTY	CHOROBY PASOŻYTNICZE	PASOŻYTY

Obowiązkiem pracodawcy jest stosowanie wszelkich dostępnych środków, które eliminują narażenie lub ograniczają stopień narażenia na ryzyko zawodowe. Przy doborze odpowiednich środków zapobiegawczych należy w pierwszej kolejności dokonać oceny ryzyka zawodowego i zaklasyfikować szkodliwe czynniki biologiczne do odpowiednich grup zagrożenia. W przypadku czynników zakwalifikowanych do grupy 3 i 4 zagrożenia należy prowadzić rejestr prac, które narażają pracowników na te czynniki. Prace w narażeniu na czynniki 3 i 4 grupy zagrożenia powinny być wykonywane przez personel z odpowiednio dużym doświadczeniem, z odpowiednim zabezpieczeniem i odbytymi dostępnymi szczepieniami ochronnymi (Paruzel i in. 2014).

2.7 Promieniowanie jonizujące

Promieniowanie jonizujące jest często stosowane w procesie leczniczym, m.in. w procedurach radiologicznych czy medycynie nuklearnej. W medycynie stosuje się przede

wszystkim promieniowanie alfa, beta, gamma, rentgenowskie (X) oraz neutrony. Mają one zdolność przenikania przez materię w różnym stopniu, przykładowo promieniowanie alfa nie przenika przez kartkę papieru, beta przez blachę aluminiową, zaś promieniowanie gamma i neutrony są zdolne do przenikania przez płytę ołowianą. Kobiety w ciąży i karmiące nie mogą pracować w określonych warunkach narażenia na promieniowanie jonizujące. Każdy z pracowników, który wykonuje swoje obowiązki w narażeniu ma obowiązek stosowania dozymetrów indywidualnych (Wróblewska i Kluszczyński 2016).

Według Wilczyńskiej i wsp. spośród wszystkich stwierdzonych w latach 1994–2006 nowotworów spowodowanych promieniowaniem jonizującym, 34,3% dotyczyło pracowników placówek ochrony zdrowia. Z kolei w roku 2001 stwierdzono jeden nowotwór u pracownika, który był wywołany działaniem opisywanego czynnika szkodliwego (Wilczyńska i Szeszenia–Dąbrowska 2010).

3. Czynniki uciążliwe występujące na stanowiskach pracy w podmiotach leczniczych

Szczególnie narażonym personelem na dolegliwości ze strony układu mięśniowo–szkieletowego są pielęgniarki oraz sanitariusze. Jest to związane z pracą polegającą często na dźwiganiu otulonych pacjentów. Występuje tutaj obciążenie statyczne, związane m.in. z pielęgnacją chorych oraz obciążenie dynamiczne, związane z przenoszeniem czy dźwiganiem chorych (Kujawa 2017).

3.1 Dolegliwości mięśniowo–szkieletowe

Choroby zawodowe, które dotyczą narządu ruchu są chorobami o przebiegu przewlekłym, które dotyczą układu mięśniowo–szkieletowego i wywołane są ze względu na sposób wykonywania przez pracownika pracy zawodowej. W wyniku ciągłego przeciążenia dochodzi do powstawania urazów czy mikrourazów, przez co niektóre tkanki są nadmiernie przeciążone i dochodzi do powstania różnego rodzaju dysfunkcji układu ruchu ze względu na przekroczenie wytrzymałości tych tkanek. Przeciążenia tkanek zwane bywają także reumatyzmem tkanek miękkich. Powodują one schorzenia nadgarstków, łokci oraz barków (Kujawa 2017).

Powstanie urazów układu ruchu wywoływane jest wieloma różnymi czynnikami, do których należą: przenoszenie pacjentów bez wykorzystania urządzeń pomocniczych, częste pochylanie się czy klękanie i skręcanie tułowia, obciążenie statyczne, mała powierzchnia pracy, sprzęt starego typu, niedostosowany budynek, utrudniające wykonywanie pracy obuwie i odzież, stres, drgania mechaniczne, zbyt niska wiedza w zakresie prawidłowego przenoszenia ciężarów i ergonomii (Kujawa 2017).

3.2 Obciążenie fizyczne wywołane pracą

Praca fizyczna może wywoływać nadmierne obciążenie organizmu w przypadku, gdy jest ona bardzo wymagająca dla pracownika i zajmuje znaczną część jego czasu pracy. Obciążenie to powoduje nie tylko opisane powyżej dolegliwości ze strony układu mięśniowo–szkieletowego, ale także zmiany fizjologiczne, do których należą: zmiana temperatury wewnętrznej ciała, zmiana wentylacji płuc, zwiększona objętość powietrza, które przepływa przez płuca w ciągu minuty, zmiany w układzie krążenia, zmniejszenie oporu obwodowego w mięśniach, wzrost pojemności minutowej serca, przemiany biochemiczne w mięśniach (Trzcńska 2016).

Przy ocenie obciążenia fizycznego wykorzystuje się m.in. metodę tabelaryczno–chronometrażową oraz wentylacji płuc. Metoda wentylacji płuc polega na pomiarze objętości powietrza, które jest wdychane i wydychane i na tej podstawie obliczana jest wartość wydatku energetycznego. Metoda tabelaryczno–chronometrażowa to metoda szacunkowa, którą wykonuje się za pomocą tabel zawierających określone czynności, które wypisuje się obserwując pracę personelu podczas wykonywania przez nich regularnych czynności zawodowych. Metoda ta jest niedokładna i istnieje ryzyko zawiżenia wydatku energetycznego (Trzcńska 2016).

3.3 Hałas, oświetlenie, mikroklimat jako czynniki uciążliwe

Hałas, oświetlenie mogą mieć charakter zarówno czynników szkodliwych, jak i uciążliwych. Zakwalifikowanie do odpowiedniej kategorii zależy m.in. od siły działania danego czynnika. Poniżej

opisano te czynniki w kontekście czynników uciążliwych. Hałas odpowiedzialny jest za rozproszenie uwagi i szybsze zmęczenie pracownika. Powoduje to pogorszenie się wydajności pracy i poziomu skupienia i może predysponować do popełnienia błędu (Kujawa 2017).

Oświetlenie charakteryzuje się jako czynnik uciążliwy, gdy występuje nadmierne oświetlenie, które powoduje efekt olśnienia i zaburzenie prawidłowego widzenia lub niedostateczne oświetlenie stanowiska pracy, wywołujące zmniejszoną ostrość widzenia, zdolność do akomodacji i widzenia barwnego. Przy projektowaniu oświetlenia w sąsiadujących pomieszczeniach należy unikać występowania dużych różnic w natężeniu światła. Ponadto należy zapewnić odpowiednią równomierność oświetlenia w każdym z pomieszczeń, gdyż może rzutować to na szybkie męczenie się oczu z powodu konieczności częstego dostosowywania się oka do ciemności i światła. Ważnym elementem jest także zapewnienie odpowiedniego, tj. stabilnego napięcia prądu do urządzeń emitujących światło w celu eliminacji zjawiska migotania światła, które rozprasza pracowników (Kujawa 2017).

Mikroklimat jako czynnik uciążliwy to takie zmiany temperatury, zarówno w górę jak i w dół, które powodują odczuwanie zimna lub gorąca (pocenie się), co prowadzi w konsekwencji do zmniejszonej zdolności koncentracji i zachowania należytej uwagi, niemożności wykonywania pracy umysłowej. Konsekwencją mogą być zarówno wzmożona liczba błędów, jak i wypadków w pracy. Mikroklimat możemy różnicować na gorący i zimny. Narażeni na niego są pracownicy, którzy pracują np. w kostnicach czy prosektoriach (mikroklimat zimny) oraz m.in. w sterylizatorniach czy kuchniach przyszpitalnych (mikroklimat gorący) (Kujawa 2017).

3.4 Monotonia i obciążenie statyczne

Monotonne wykonywanie pracy, polegające na wykonywaniu powtarzalnych czynności przez dłuższy okres czasu jest przyczyną niedociążenia emocjonalnego, wywołanego przez brak bodźców, jednostajność otoczenia, wymaganie stałego skupienia oraz łatwość pracy. Praca monotonna prowadzi, oprócz dyskomfortu psychicznego, do dolegliwości ze strony układu ruchu, w ramach którego najbardziej obciążone są zwykle kończyny górne (staw nadgarstkowy, barkowy, łokciowy). Praca monotonna wywołuje obniżenia sprawności fizycznej i psychicznej (Kujawa 2017).

Obciążenie statyczne występuje w przypadku bezruchu i długotrwałego skurczu mięśnia. Brak ruchu dynamicznego powoduje brak możliwości przepompowania krwi przez daną część ciała w odpowiedniej ilości, co prowadzi do zakwaszenia mięśni oraz ich zmęczenia. Obciążenie statyczne jest powiązane z wykonywaniem pracy monotonnej, np. podczas ciągłego stania czy siedzenia, więc dotyczyć będzie m.in. lekarzy dentyistów czy chirurgów podczas wielogodzinnych zabiegów (Kujawa 2017).

3.5 Obciążenie psychiczne

Czynnik psychiczny jest często pomijany podczas podejmowania działań mających na celu ochronę zdrowia pracowników. Należy pamiętać jednak o definicji zdrowia wg Światowej Organizacji Zdrowia, gdzie za zdrowie odpowiada m.in. dobrostan psychiczny oraz społeczny, a nie tylko fizyczny. Stres jest czynnikiem psychospołecznym który w sposób niekorzystny oddziałuje na pracownika. Należy dążyć do identyfikowania, monitorowania wraz z oceną i eliminowania wszelkich istniejących zagrożeń (Kędra i Nowocien 2015).

Stres w miejscu pracy może być powodowany poprzez: nadmiar zleconej pracy, który pośrednio może być wywołany zbyt małą liczną kadrą, zbyt dużą liczbą pacjentów czy pracą w godzinach nadliczbowych. Ponadto stres wywołany może zostać w wypadku braku odpowiedniego przygotowania pracownika, np. przy braku odpowiednich szkoleń, ale również, gdy pracownik wykonuje prace proste, które są poniżej ambicji czy umiejętności pracownika (np. młodzi lekarze wypełniający dokumentację). Innymi czynnikami mogą być: brak kontroli nad pracą – stałe i niezmiennie godziny pracy, brak możliwości pracy w godzinach nadliczbowych (dyżury), niejasność roli – brak ustalonych obowiązków czy odpowiedzialności lub zatrudnienie na podstawie kontaktu, konflikt roli – brak możliwości awansowania i rozwijania się, otrzymywanie zmiennych i sprzecznych poleceń od przełożonych, wymagana stała dyspozycyjność, brak wsparcia – brak współpracy pomiędzy pracownikami danej jednostki, np. oddziału, rywalizacja między personelem i brak wsparcia przełożonych, skargi pacjentów, przemoc ze strony pacjentów, niewykorzystanie

potencjału nowych i młodych pracowników, fizyczne warunki pracy – niedostosowanie oświetlenia i temperatury, nadmierny hałas, ciężka praca fizyczna przy nieodpowiednim wyposażeniu stanowiska (Najder i Potocka 2015).

4. Literatura

- Garus–Pakowska A (2016) Narażenie personelu medycznego na materiał potencjalnie zakaźny. Ochronne działania poekspozycyjne. *Forum Zakażeń* 7(1): 25–31.
- Kaczocha M (2017) Choroby zawodowe. [W:] Kujawa A, Kaczocha M. BHP w służbie zdrowia. Warszawa: C.H. Beck, str. 323–341.
- Karpowicz J, Gryz K, Leszko W, Zradziński P (2013) Zobiektywizowana ocena narażenia chirurgów na radiofalone pola elektromagnetyczne – w kontekście czasu narażenia oraz polskich i znowelizowanych międzynarodowych wymagań dotyczących ochrony pracowników. *Medycyna Pracy* 64(4): 487–501.
- Kędra E, Nowocień M (2015) Czynniki stresogenne a ryzyko wypalenia zawodowego w pracy pielęgniarek. *Pielęgniarstwo Polskie* 3(57): 293–306.
- Kujawa A (2017) Ogólne zasady i instytucje bezpieczeństwa i higieny pracy w służbie zdrowia. [W:] Kujawa A, Kaczocha M. BHP w służbie zdrowia. Warszawa: C.H. Beck, str. 1–92.
- Najder A, Potocka A (2015) Psychospołeczne zagrożenia zawodowe i ich związek ze zdrowiem oraz funkcjonowaniem zawodowym pracowników ochrony zdrowia. *Pielęgniarstwo Polskie* 3(57): 313–320.
- Paruzel D, Braczkowska B, Kowalska M (2014) Ekspozycja zawodowa na krew i materiał potencjalnie zakaźny pracowników Okręgowego Szpitala Kolejowego w Katowicach w latach 2007–2012. *Forum Zakażeń* 5(5): 263–269.
- Rozporządzenie Ministra Pracy i Polityki Społecznej z dnia 6 czerwca 2014 r. w sprawie najwyższych dopuszczalnych stężeń i natężeń czynników szkodliwych dla zdrowia w środowisku pracy (Dz.U. 2014 poz. 817).
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 lutego 2011 r. w sprawie badań i pomiarów czynników szkodliwych dla zdrowia w środowisku pracy (Dz.U. 2011 nr 33 poz. 166).
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 22 kwietnia 2005 r. w sprawie szkodliwych czynników biologicznych dla zdrowia w środowisku pracy oraz ochrony zdrowia pracowników zawodowo narażonych na te czynniki (Dz.U. 2005 nr 81 poz. 716).
- Trzecińska A (2016) Ekspozycja zawodowa – problem wciąż aktualny. *Forum Nefrol.* 9(1): 66–71.
- Ustawa z dnia 26 czerwca 1974 r. Kodeks pracy (Dz.U. 1974 nr 24 poz. 141).
- Wilczyńska U, Szeszenia–Dąbrowska N (2010) Choroby zawodowe wśród pracowników ochrony zdrowia i pomocy społecznej w Polsce. *Medycyna Pracy* 61(6): 597–605.
- Wróblewska D, Kluszczyński D (2016) Ochrona personelu medycznego przed promieniowaniem jonizującym. *Ogólnopol. Prz. Med.* (6): 40–42.

16. Pęcherzyki błonowe bakterii Gram-ujemnych - rola oraz możliwości praktycznego zastosowania w przyszłości

Outer membrane vesicles of Gram-negative bacteria- the role and the possible applications in the future

Dominika Szczerbiec ^(1,3), Mateusz Kciuk ^(2,3)

⁽¹⁾ Katedra Biologii Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

⁽²⁾ Katedra Biotechnologii Molekularnej i Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

⁽³⁾ Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych UŁ, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

Opiekun naukowy: dr hab. Dominika Drzewiecka

Dominika Szczerbiec: dominika.szczerbiec@unilodz.eu

Słowa kluczowe: OMVs, pęcherzyki błony zewnętrznej, szczepionki bakteryjne

Streszczenie

Pęcherzyki błony zewnętrznej (OMVs) są zewnątrzkomórkowymi strukturami, wytwarzanymi przez bakterie Gram-ujemne. Tworzenie tych sferycznych struktur jest naturalnym, często występującym zjawiskiem szczególnie u bakterii chorobotwórczych. Odgrywają one znaczącą rolę w patogenezie wielu chorób bakteryjnych czy transferze genów. Zainteresowanie OMVs wśród badaczy stale rośnie, ze względu na możliwości ich wykorzystania w przyszłości. Działanie immunomodulujące tych struktur zostało już wykorzystane przy opracowywaniu szczepionek. Wskazuje się, że pęcherzyki błonowe to obiecujący nośnik wielu leków, mówi się również o ich potencjalnym zastosowaniu w leczeniu nowotworów.

1. Wstęp

Bakterie Gram-ujemne wykazują się zdolnością do tworzenia charakterystycznych zewnątrzkomórkowych struktur, pęcherzyków błonowych (OMVs). Pęcherzyki błonowe tworzą się poprzez uwypuklenie błony zewnętrznej bakterii, która następnie zaciska się i zostaje uwolniona sferyczna struktura o średnicy 20-400 nm (Haurat i in. 2015). OMVs, ze względu na ich powstawanie z błony zewnętrznej, zbudowane są głównie z fosfolipidów, lipopolisacharydu oraz białek (Włodarczyk i Matlakowska 2010). Analiza ich struktury wykazała, że mogą zawierać również czynniki wirulencji: adhezyny, toksyny, enzymy oraz metabolity bakteryjne. W budowie pęcherzyków błonowych wyróżnić można pewne specyficzne struktury (PAMPs), które są rozpoznawane przez układ odpornościowy gospodarza, co ma istotny wpływ na rozwój i przebieg infekcji (Ellis i Kuehn 2010).

Bakterie Gram-dodatnie, archeony oraz komórki eukariotyczne również wytwarzają pęcherzyki z błon komórkowych. W przypadku bakterii Gram-dodatnich, eukariontów oraz archeonów, pęcherzyki powstają z błony cytoplazmatycznej więc nie zawierają w swoim składzie lipopolisacharydu (Nasarabadi i in. 2019).

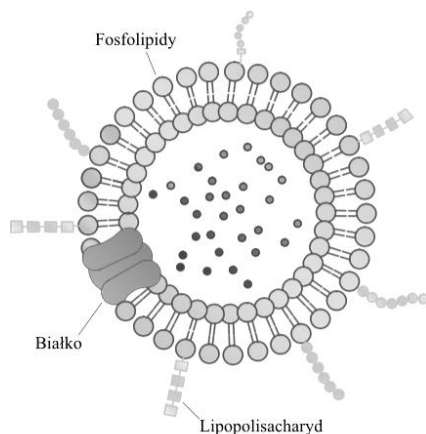
2. Mechanizmy tworzenia OMVs

Proces powstawania pęcherzyków błonowych jest ściśle kontrolowany na poziomie genetycznym i wymaga od komórki dużych nakładów energii (Kulkarni i Jagannadham 2014).

Dokładny mechanizm ich tworzenia nie jest jeszcze poznany, natomiast istnieje kilka teorii, które wyjaśniają to zjawisko. Jedną z pierwszych tez twierdziła, że OMVs tworzone są w konsekwencji szybszej syntezy błony zewnętrznej bakterii niż peptydoglikanu. Na skutek tego błona zewnętrzna komórki uwypukla się a następnie odrywa w postaci pęcherzyka błonowego. Następnie zaproponowano, że fragmenty peptydoglikanu tworzone podczas syntezy ściany

komórkowej, zgromadzone w przestrzeni peryplazmatycznej bakterii, mogą wywierać ciśnienie i oddziaływać mechanicznie na komórkę, co w konsekwencji prowadzi do wybrzuszenia i produkcji OMV (Kulkarni i Jagannadham 2014; Haurat i in. 2015). Kolejna hipoteza związana jest ze zmianą składu białek w miejscu powstawania pęcherzyków błonowych. Obecność takich białek jak OmpA, TolB, TolA czy Pal wpływa na stopień integracji komórkowych błon cytoplazmatycznej i zewnętrznej. Jak zaobserwowano, zaburzenia występowania tych specyficznych białek są związane ze zwiększoną produkcją OMVs.

Warto podkreślić, że mechanizmy związane z powstawaniem omawianych struktur nie wykluczają się wzajemnie, najprawdopodobniej są od siebie ściśle zależne oraz mogą działać wszystkie naraz (Włodarczyk i Matlakowska 2010; Kulkarni i Jagannadham 2014).



Rys. 1. Schemat budowy pęcherzyka błonowego bakterii Gram-ujemnej (Hasegawa i in. 2015, zmodyfikowano).

3. Funkcje pęcherzyków błonowych

Ściśle związane z funkcjonowaniem pęcherzyków błonowych jest zjawisko ich fuzji z komórkami docelowymi. Fuzja OMVs może przebiegać zarówno z komórkami eukariotycznymi gospodarza, jak i innymi drobnoustrojami Gram-ujemnymi (O'Donoghue i Krachler 2016). Polega ona na wbudowywaniu się pęcherzyka błonowego do błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnej (Toyofuku i in. 2015). Jest to powiązane z większością omawianych w dalszej części pracy funkcji, jakie mogą pełnić pęcherzyki, między innymi: transportem czynników wirulencji, substancji antybakteryjnych czy transferem DNA. Obejmuje to również przekazywanie sygnałów komórkowych oraz jest związane z rozwojem odpowiedzi immunologicznej w komórkach gospodarza (Ellis i Kuehn 2010).

Pęcherzyki błonowe są uwalniane we wszystkich fazach wzrostu drobnoustrojów, jednak ich ilość oraz skład różnią się w zależności od warunków prowadzenia hodowli (Kulkarni i Jagannadham 2014). Szybkość ich wytwarzania nie jest jednakowa, nawet w obrębie jednego szczepu bakterii. Na ich produkcję mają wpływ zarówno czynniki środowiskowe, jak i stresowe (Ellis i Kuehn 2010).

Wszystkie mikroorganizmy, a zatem również bakterie Gram-ujemne, oddziałują z otaczającym je środowiskiem. Do tego celu wykorzystywane są między innymi pęcherzyki błonowe, które umożliwiają oddziaływanie z otoczeniem poprzez rozprzestrzenianie i przekazywanie substancji biologicznych (Kulp i Kuehn 2010). Są wytwarzane zarówno przez drobnoustroje patogenne, jak i niechorobotwórcze, u których odgrywają głównie funkcje ochronne (Kuehn i Kesty 2005). Odgrywają kluczową rolę między innymi w patogenezie chorób bakteryjnych, sygnalizacji *quorum sensing*, pozyskiwaniu składników odżywczych, tworzeniu biofilmu czy transferze genów (Kulp i Kuehn 2010). OMVs charakteryzują się również zdolnością do pobudzania układu odpornościowego, co może stanowić obiecującą perspektywę do stosowania ich jako szczepionek (Kulkarni i Jagannadham 2014).

3.1 Rola w patogenezie

Pęcherzyki błonowe mogą chronić komórkę bakteryjną przed odpowiedzią immunologiczną gospodarza bezpośrednio wiążąc i usuwając jego czynniki bakteriobójcze, umożliwiają przetrwanie podczas infekcji oraz pomagają w pozyskiwaniu składników odżywczych (Kulp i Kuehn 2010; Ellis i Kuehn 2010).

Związkami dostarczanymi i wydzielanymi przez OMVs są czynniki wirulencji, stanowiące kluczową rolę w przebiegu chorób bakteryjnych. Przykładami toksyn dostarczanych do komórek gospodarza są: termostabilna enterotoksyna *Escherichia coli*, VacA, toksyna Shiga czy cytotoksyna ClyA wytwarzana przez bakterie *E. coli* (Kulkarni i Jagannadham 2014; Haurat i in. 2015).

Bakterie wytwarzają większe ilości OMVs w odpowiedzi na stres. Do czynników stresowych działających na drobnoustroje zalicza się niedobór składników odżywczych w hodowli bakteryjnej czy działanie antybiotyków. Jak udokumentowano, bakterie bronią się przed efektami ich działania. Mogą wyłapywać antybiotyk i transportować takie cząsteczki z dala od drobnoustroju. Skutkuje to zmniejszeniem stężenia czynnika bakteriobójczego, a co za tym idzie, zabezpieczeniem i ochroną komórki bakteryjnej. Kolejną możliwością jest inaktywacja antybiotyków poprzez działanie enzymów hydrolizujących ich wiązania. Przykładem są badania nad *Pseudomonas aeruginosa*, opornych na działanie antybiotyków β -laktamowych. Na ich przykładzie, dowiedziono, że OMVs mogą dzięki β -laktamazom, znajdującym się w ich wnętrzu, eliminować antybiotyki ze środowiska (Włodarczyk i Matlakowska 2010; Kulkarni i Jagannadham 2014).

OMVs stanowią również czwarty (po koniugacji, transformacji i transdukcji) sposób transferu materiału genetycznego pomiędzy bakteriami, przyczyniając się do ich różnorodności. Błona pęcherzyka chroni zawarty w środku kwas nukleinowy przed degradacją. Jak wskazują badania, pęcherzyki *P. aeruginosa* mogą również transportować enzymy oporności na antybiotyki do innych mikroorganizmów (Kuehn i Kesty 2005).

Biofilm to wielokomórkowa struktura zbudowana z DNA, białek, egzopolisacharydów oraz wielu innych cząsteczek bakteryjnych, w których osadzone są komórki mikroorganizmów (Kulkarni i Jagannadham 2014). Ma ona związek z licznymi infekcjami bakteryjnymi, w tym chorobami układu moczowego, zakażeniami cewników, chorobami zatok, przyzębia czy przewlekłymi ranami (Metcalfe i Bowler 2013).

Jak wykazały badania, pęcherzyki błonowe wielu bakterii Gram-ujemnych umożliwiają oraz stymulują tworzenie biofilmów. Pełnią one rolę w sygnalizacji oraz porozumiewaniu się bakterii poprzez przekazywanie cząsteczek sygnałowych. Chronią utworzoną błonę biologiczną poprzez wiązanie i inaktywację szkodliwych cząsteczek, na przykład antybiotyków (Kulp i Kuehn 2010). Szczególnie licznie pęcherzyki błonowe są wytwarzane przez bakterie jamy ustnej: *Porphyromonas gingivalis* czy *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Indukuje to agregację z innymi bakteriami i tworzenie biofilmu, co ma istotny wpływ na patogenezę chorób przyzębia (Kuehn i Kesty 2005). Stanowią istotny składnik macierzy biofilmu (Włodarczyk i Matlakowska 2010).

4. Praktyczne zastosowanie OMVs

Stale rośnie zainteresowanie tematem pęcherzyków błonowych, ich rolą w patogenezie wielu chorób oraz złożonością funkcji, jakie pełnią. Wiele prac dotyczących tej dziedziny odnosi się do przyszłego zastosowania takich struktur. Obecnie już wykorzystuje się je do tworzenia skutecznych szczepionek przeciwko *Neisseria meningitidis* serogrupy B oraz poszukuje się skutecznych rozwiązań z ich użyciem w konstrukcji szczepionek przeciwko: *Salmonella enterica*, *Vibrio cholerae*, *Mycobacterium tuberculosis* czy *P. aeruginosa*. Perspektywy w tym obszarze obejmują zaprojektowanie bezpiecznych i globalnych szczepionek przeciwko wielu rodzajom mikroorganizmów, niezawierających żywych drobnoustrojów (Klim i Godlewska 2017; Tan i in. 2018). Badania dotyczące tego aspektu, stale dostarczają obiecujących danych, jak na przykład te, dotyczące szczepionki opartej na oczyszczonych pęcherzykach zewnątrz błonowych *V. cholerae*. W badaniach *in vivo* na myszach potwierdzono już jej skuteczność i wykazano zdolność do indukowania odporności swoistej. Co więcej, udało się uzyskać szczepionkę opartą na pęcherzykach pięciu zjadliwych szczepów *V. cholerae*, która posiada zdolność pobudzania układu

odpornościowego, a myszy nią immunizowane drogą oralną wytwarzały długo utrzymujące się przeciwciała klasy IgG, IgA oraz IgM (Sinha i in. 2014).

Bakterie z rodzaju *Salmonella* wykorzystane zostały w eksperymencie do produkcji OMVs, zawierających wewnątrz pneumokokowe białka powierzchniowe PspA (*Pneumococcal Surface protein A*) w celu uzyskania donosowej szczepionki, zapewniającej ochronę przed zakażeniem *Streptococcus pneumoniae* (Muralinath i in. 2011). Natomiast pęcherzyki błonowe pochodzące z drobnoustrojów *E. coli*, zawierające rekombinowaną proteazę serynową HtrA, wykorzystano do badań nad rozwojem szczepionki przeciw chlamydiom. Jak się okazało te rekombinowane struktury aplikowane myszom domięśniowo indukują powstawanie przeciwciał, co jest obiecującą przesłanką ich wykorzystania do tworzenia skutecznych szczepionek, jednak po osłabieniu obecnej w nich endotoksyny, ze względu na drogę podania (Bartolini i in. 2013).

Pęcherzyki błonowe zawierają w swojej strukturze lipopolisacharyd (LPS), który jest silną toksyną. Podawany wraz z pęcherzykami na błony śluzowe (np. drogą doustną czy donosową, także do układu moczowego czy pochwy) nie stanowi zagrożenia, gdyż naturalnie występuje w tych miejscach, skolonizowanych w większym czy mniejszym stopniu przez bakterie Gram-ujemne. Natomiast po dostaniu się do krwi stanowi ryzyko wywołania silnej reakcji zapalnej, a nawet szoku septycznego. Dlatego wyzwaniem dla badaczy jest uzyskanie bezpiecznej i skutecznej szczepionki OMV ze zmniejszoną ilością endotoksyny LPS. Jedną z metod jest ekstrakcja detergentem-najczęściej deoksycholanem (DOC). Jest to efektywna metoda, mająca jednak wiele wad. Skutkuje ona utratą wielu lipoprotein, co w konsekwencji prowadzi do obniżenia ogólnego potencjału immunogennego pęcherzyków. Można też neutralizować LPS z użyciem aluminium (Bartolini i in. 2013). W wykorzystywanej szczepionce przeciwko *N. meningitidis* zmniejszono toksyczność LPS w pęcherzykach poprzez mutację w genie *lpxL1*, co skutkowało modyfikacją w regionie LPS odpowiadającym za jego toksyczność - lipidzie A i nie wiązało się z utratą właściwości adiuwantowych pęcherzyka błonowego (Van der Ley i van den Dobbelsteelen 2011; Acevedo 2014).

OMV mają wiele specyficznych cech, które czynią je atrakcyjnymi jako potencjalne szczepionki, adiuwanty, środki immunoterapii czy nośniki umożliwiające ukierunkowane dostarczanie leków lub środków antybakteryjnych. Spełniają wszystkie kluczowe warunki w wykorzystaniu ich w szczepionkach. Mają bardzo małą wielkość, pochodzą od bakterii, zawierają w swojej budowie PAMPs i antygeny związane z patogenem (rozpoznawane przez układ odpornościowy gospodarza) oraz mogą zostać sfagocytowane aby następnie dotrzeć do węzłów chłonnych dzięki komórkom prezentującym antygen APC (Li i in. 2020).

Dokładne poznanie mechanizmów powstawania oraz funkcjonowania tych struktur może być bodźcem do prób zakłócenia interakcji pomiędzy komórkami gospodarza a czynnikami wirulencji przenoszonymi przez OMVs. Ingerencja w produkcję pęcherzyków błonowych może przynieść realne skutki i prowadzić do zmniejszenia chorobotwórczości czy wpływać na mechanizmy układu odpornościowego gospodarza.

Wykorzystanie znajomości zjawiska fuzji pęcherzyków błonowych oraz zastosowanie pęcherzyków jako systemu sekrecji i transportu może być istotne w opracowaniu ukierunkowanego leczenia. OMVs mogłyby umożliwić dostarczanie terapeutyków do konkretnych tkanek czy nawet nowotworów (Ellis i Kuehn 2010). Wykorzystując fakt, że pęcherzyki błonowe mogą zamykać w sobie różne substancje przeciwdrobnoustrojowe i dostarczać je do celu w wysokim stężeniu, można byłoby wykorzystać je do zabicia wewnątrzkomórkowych patogenów. OMVs posiadają wiele charakterystycznych cech, które czynią je potencjalnymi kandydatami na nośniki leków. Ich wielkość umożliwia pasywne gromadzenie się w nowotworach, związane z efektem EPR (*Enhanced permeability and retention*), co umożliwiłoby dostarczanie leku do guza. Ich budowa chroni materiał oraz zawarte w nich substancje, jak na przykład środki antybakteryjne lub leki przed degradacją, co sprzyja bezpiecznemu i szybkiemu dotarciu do miejsc lub komórek docelowych. OMVs indukują również odpowiedź immunologiczną, która, kontrolowana, mogłaby być korzystna w leczeniu nowotworów. Ostatnie badania dotyczące tego zjawiska wskazują na skuteczność OMVs w terapii przeciwnowotworowej. W badaniach *in vivo* wykazano, że pęcherzyki po iniekcji dożylniej gromadziły się w tkankach nowotworowych i indukowały trwałą odpowiedź immunologiczną (Li i in. 2020).

5. Podsumowanie

Obecnie prowadzonych jest szereg badań na temat produkcji OMVs przez wiele rodzajów drobnoustrojów oraz funkcji czy zastosowań, które mogą pełnić. Wskazuje się na ich ogromną rolę w patogenezie, tworzeniu biofilmów bakteryjnych, quorum sensing, dostarczaniu czynników wirulencji oraz w horyzontalnym transferze genów. Ich budowa oraz zdolność fuzji czy transportu składników nawet na dużą odległość czyni je obiecującymi nośnikami leków, a ich działanie immunomodulujące jest już wykorzystywane w tworzeniu szczepionek. Nadal pozostaje jednak wiele kwestii do rozwiązania i zbadania, zanim struktury te będą używane w powszechnym leczeniu klinicznym. Jedną z przeszkód jest bezpieczeństwo ich stosowania, ze względu na obecność endotoksyny w ich budowie. Obecnie prowadzonych jest wiele badań, które umożliwiłyby zmniejszenie toksyczności LPS, zachowując przy tym pierwotne cechy pęcherzyków, na przykład ich właściwości adiuwantowe. Biorąc pod uwagę ten i wiele innych względów ważne jest coraz lepsze poznanie wielu aspektów związanych z funkcjonowaniem pęcherzyków błonowych (Li i in. 2020).

6. Literatura

- Acevedo R, Fernandez S, Zayas C i in. (2014) Bacterial outer membrane vesicles and vaccine applications. *Frontiers in Immunology* 5: 121. doi: 10.3389/fimmu.2014.00121.
- Bartolini E, Ianni E, Frigmelica E i in. (2013) Recombinant outer membrane vesicles carrying *Chlamydia muridarum* HtrA induce antibodies that neutralize chlamydial infection in vitro. *Journal of Extracellular Vesicles* 2: 20181.
- Ellis TN, Kuehn MJ (2010) Virulence and Immunomodulatory Roles of Bacterial Outer Membrane Vesicles. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74: 81-94.
- Hasegawa Y, Futamata H, Tashiro Y (2015) Complexities of cell-to-cell communication through membrane vesicles: implications for selective interaction of membrane vesicles with microbial cells. *Frontiers in Microbiology* 6: doi: 10.3389/fmicb.2015.00633.
- Haurat MF, Elhenawy W, Feldman (2015) Prokaryotic membrane vesicles: new insights on biogenesis and biological roles. *De Gruyter* 396: 95-109.
- Klim JJ, Godlewska R (2017) Zastosowanie bakteryjnych pęcherzyków zewnątrz błonowych w konstrukcji szczepionek. *Postępy Mikrobiologii* 56: 43-55.
- Kuehn MJ, Kesty NC (2005) Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes & Development* 19: 2645-2655.
- Kulkarni HM, Jagannadham MV (2014) Biogenesis and multifaceted roles of outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria. *Microbiology* 160: 2109-2121.
- Kulp A, Kuehn MJ (2010) Biological Functions and Biogenesis of Secreted Bacterial Outer Membrane Vesicles. *Annual Review of Microbiology* 64: 163-184.
- Li, M, Zhou H, Yang Ch i in. (2020) Bacterial outer membrane vesicles as a platform for biomedical applications: An update. *Journal of Controlled Release* 323: 253-268.
- Metcalf DG, Bowler PG (2013) Biofilm delays wound healing: A review of the evidence. *Burns & Trauma* 1: 5-12.
- Muralinath M, Kuehn M, Roland K i in. (2011) Immunization with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium-derived outer membrane vesicles delivering the pneumococcal protein PspA confers protection against challenge with *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity* 79: 887-894.
- Nasarabadi A, Berleman JE, Auer M (2019) Outer membrane vesicles of bacteria: structure, biogenesis and function. *Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer, Cham.
- O'Donoghue EJ, Krachler AM (2016) Mechanisms of outer membrane vesicle entry into host cells. *Cellular Microbiology* 18: 1508-1517.
- Sinha R, Koley H, Nag D i in. (2014) Pentavalent outer membrane vesicles of *Vibrio cholerae* induce adaptive immune response and protective efficacy in both adult and passive suckling mice models. *Microbes and Infection*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2014.10.011>.

- Tan K, Li R, Huang X i in. (2018) Outer membrane vesicles: Current Status and Future Direction of These Novel Vaccine Adjuvants. *Frontiers in Microbiology* 9: 1-12.
- Tofofuku M, Tashiro Y, Hasegawa Y i in. (2015) Bacterial membrane vesicles, an overlooked environmental colloid: Biology, environmental perspectives and applications. *Advance in Colloid and Interface Science* 226: 65-77.
- Van der Ley P, van den Dobbelen G (2011) Next-generation outer membrane vesicle vaccines against *Neisseria meningitidis* based on nontoxic LPS mutants. *Human Vaccines* 7: 886-890.
- Włodarczyk A, Matlakowska R (2010) Pęcherzyki błonowe- system sekrecji i transportu u bakterii gram ujemnych. *Postępy Mikrobiologii* 49: 305-315.

17. Wpływ temperatury na wiązanie losartanu do glikowanej albuminy surowicy krwi ludzkiej

The influence of temperature on losartan binding to glycated human serum albumin

Szkudlarek Agnieszka⁽¹⁾, Gryma-Kowalik Jolanta⁽²⁾, Maciążek-Jurczyk Małgorzata⁽¹⁾

⁽¹⁾Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej Wydziału Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

⁽²⁾Studium Doktoranckie Wydziału Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

Agnieszka Szkudlarek: aszkudlarek@sum.edu.pl

Słowa kluczowe: glikowana fruktozą albumina surowicy krwi ludzkiej, metoda wygaszania fluorescencji, losartan

Streszczenie

Albumina surowicy krwi ludzkiej (HSA) wiążąc substancje egzogenne, również leki, wpływa na ich biologiczną dostępność, dystrybucję, właściwości farmakokinetyczne i farmakodynamiczne. Na wiązanie się leku z HSA mają wpływ różne czynniki, do których należy temperatura. Modyfikacje konformacyjne w obrębie albuminy, w tym glikacja HSA, są przyczyną utraty jej pierwotnych właściwości oraz pełnionych przez nią funkcji fizjologicznych. W związku z tym, celem przedstawionej pracy było zbadanie powinowactwa losartanu (LOS), leku stosowanego w leczeniu nadciśnienia tętniczego, do niemodyfikowanej (HSA) i glikowanej (gHSA_{FRC}) ludzkiej albuminy surowicy krwi oraz wykazanie wpływu temperatury na tworzenie kompleksu losartan-albumina. Jak przedstawiono w pracy, temperatura wpływa na wiązanie LOS zarówno do albuminy HSA, jak i gHSA_{FRC}. W zakresie temperatury fizjologicznej (36-37°C) zaobserwowano wzrost stałej asocjacji K_a losartanu do makrocząsteczek, będący konsekwencją zmniejszenia puli wolnego, odpowiedzialnego za działanie terapeutyczne farmaceutyku. W związku z tym, aby uzyskać odpowiedni efekt leczniczy, konieczne jest odpowiednie zwiększenie dawki losartanu. Z kolei w temperaturze powyżej 39°C stała asocjacji K_a losartanu do albuminy zmniejszyła się, co wiąże się z ryzykiem wystąpienia działań niepożądanych i może być wskazaniem do obniżenia dawki losartanu. Ponieważ jedynie frakcja wolna leku może wywołać oczekiwany efekt terapeutyczny bądź toksyczny, znajomość aktywności wiążącej albuminy w różnych stanach chorobowych, również u pacjentów w podeszłym wieku, pozwoli uzyskać satysfakcjonujące rezultaty wybranej terapii.

1. Wstęp

Albumina należy do grupy rozpuszczalnych białek najliczniej występujących we krwi, gdzie jej stężenie sięga 580-725 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ (Artali i in. 2005), stanowiąc 55-65% wszystkich protein obecnych w osoczu. Cząsteczkę ludzkiej albuminy surowicy krwi (HSA) tworzy 585 reszt aminokwasowych, które stanowią połańdowany w strukturę III-rzędową łańcuch polipeptydowy (w 67% tworzący strukturę α -helisy, 23% to rozciągnięte fragmenty polipeptydowe, a w 10% zakręty β) (Peters 1996). Struktura albuminy bezpośrednio koreluje z wieloma kluczowymi funkcjami jakie pełni ona w utrzymaniu homeostazy ustroju. HSA decyduje o prawidłowym ciśnieniu onkotycznym i optymalnym pH osocza krwi (Evans 2002), odpowiada także za zachowanie równowagi osmotycznej między krwią krążącą, a przestrzeniami tkankowymi, dzięki czemu zapewnia utrzymanie odpowiedniej hemodynamiki krwi oraz zapobiega obrzękom (Nicholson i in. 2000). Posiada właściwości buforujące, antyoksydacyjne i wykazuje aktywność przeciwzakrzepową, poprzez bezpośrednie hamowanie aktywności antytrombiny III. Jedną z najistotniejszych właściwości HSA jest zdolność transportu do tkanek docelowych wielu związków biologicznie czynnych przez odwracalne wiązanie substancji endo- i egzogennych jak: niestryfikowane kwasy tłuszczowe, barwniki żółciowe, hormony, witaminy, a także toksyny, leki oraz jony metali

prześciowych (Peters 1996; Ascoli i in. 2006). Transport ligandów zarówno tych egzo-, jak i endogennych w kompleksie z albuminą, objawia się wzrostem rozpuszczalności tych związków w surowicy, zmniejszeniem ich toksyczności oraz ochroną przed ich utlenianiem.

Jedną z ważniejszych przemian biochemicznych, która wywołuje szereg zmian konformacyjnych w strukturze II- i III-rzędowej albuminy, a tym samym wpływa na pełnione przez albuminę funkcje fizjologiczne, jest glikacja (Rondeau i Bourdon 2011). Zmniejszenie/zwiększenie powinowactwa glikowanej albuminy do różnych substancji *in vivo* i *in vitro* sugeruje, że główne miejsca glikacji odgrywają kluczową rolę w wiązaniu ligandów. Modyfikacje w strukturze domeny II i III HSA powodują m.in. zmniejszenie powinowactwa glikowanej albuminy do bilirubiny i do wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, czy też zmiany konformacji kieszeni otaczającej Trp-214, skutkujące zmniejszeniem jego fluorescencji (Shaklai i in. 1984; Szkudlarek-Hańnik i in. 2015). Z uwagi na silny charakter nukleofilowy, najbardziej wrażliwymi na glikację resztami aminokwasowymi HSA *in vivo* i *in vitro* są reszty lizyny (Lys), argininy (Arg) oraz wolna grupa tiolowa Cys-34 (Rondeau i Bourdon 2011). Na Rys.1 przedstawiono specyficzne miejsca wiązania ligandów w strukturze ludzkiej albuminy surowicy krwi (tj. I i II miejsce według nomenklatury Sudlowa) z rozmieszczeniem głównych miejsc glikacji *in vivo* HSA – reszt lizyniowych (Rys.1a) i reszt argininiowych (Rys.1b) (Szkudlarek i in. 2019).

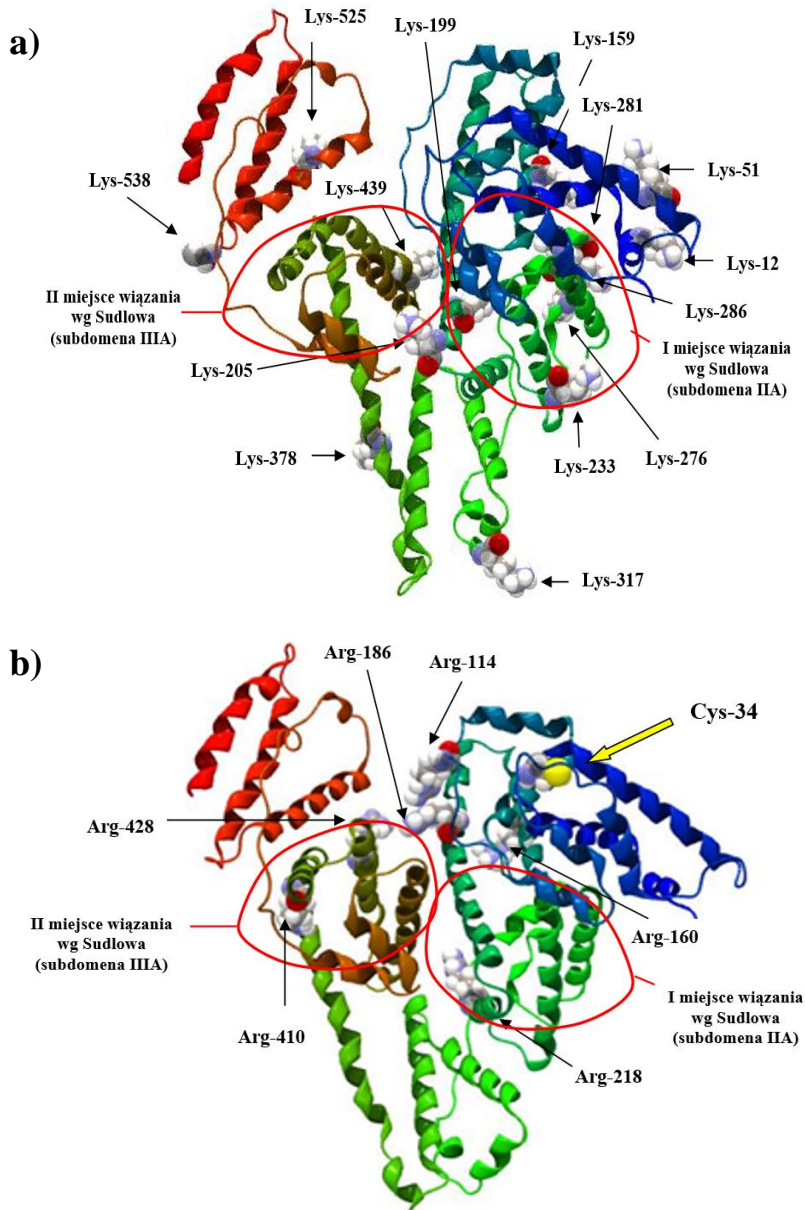
Mechanizm i siła wiązania leku z albuminą zależy od właściwości fizykochemicznych i stężenia danego leku, zdolności wiążących albuminy, a także wpływu środowiska. Lek, który tworzy kompleks z HSA jest nieczynny farmakologicznie, ponieważ za działanie terapeutyczne farmaceutyku odpowiedzialne są jego cząsteczki w stanie wolnym (Broderson i in. 1977). Celem przedstawionej pracy było zbadanie powinowactwa losartanu (LOS), leku stosowanego w leczeniu nadciśnienia tętniczego, do glikowanej ludzkiej albuminy surowicy krwi (gHSA_{FRC}) i analiza wpływu temperatury na tworzenie kompleksu losartan-albumina. Do eksperymentu wybrano temperaturę 36°C i 37°C, która odpowiada temperaturze fizjologicznej organizmu oraz temperaturę 39°C i 41°C, która odpowiada stanowi chorobowemu w organizmie. Analizę układu LOS-HSA i LOS-gHSA_{FRC} przeprowadzono techniką wygaszania fluorescencji.

2. Material i metody

W badaniu użyto: albuminę surowicy krwi ludzkiej liofilizowaną, nasyconą kwasami tłuszczowymi (HSA) – frakcja V (MP Biomedicals™ Inc, LLC, Francja), losartan potasu (LOS) (BIOFARM, Polska), D(-)-fruktozę (FRC), Tris (hydroksymetylo)aminometan (TRIS), kwas solny (chlorowodorowy) (0.1 mol/dm³, HCl) (POCH S.A., Polska), azcydek sodu (Sigma-Aldrich Chemistry, Niemcy), metanol do badań spektroskopowych (Merck KGaA, Niemcy).

Roztwory albuminy surowicy krwi ludzkiej (HSA) o stężeniu 5·10⁻⁶ mol/dm³ i fruktozy (FRC) o stężeniu 1.25 mol/dm³ sporządzono w 0.05 mol/dm³ buforze TRIS-HCl z 0.015 mol/dm³ azcykiem sodu (pH 7.4). Sporządzono roztwór albuminy o stężeniu 5·10⁻⁶ mol/dm³ stanowiący próbkę kontrolną (HSA) oraz roztwór albuminy o stężeniu 5·10⁻⁶ mol/dm³ w obecności 0.1 mol/dm³ fruktozy – układ (HSA-FRC). Przygotowane roztwory przepuszczono przez filtry membranowe o średnicy porów 0.2 μm, a następnie przez okres 21 dni inkubowano w temperaturze 37°C. Po tym czasie, roztwór próby kontrolnej (HSA) oraz roztwór albuminy glikowanej (gHSA_{FRC}) poddano 24 godzinnej dializie ekstensywnej wobec buforu. Proces ten umożliwił usunięcie reszty niezwiązanej fruktozy. Następnie roztwory HSA i gHSA_{FRC} po raz wtórny przesączono przez filtry membranowe i tak przygotowane próbki poddano pomiarom fluorescencyjnym. Zapasowy roztwór losartanu o stężeniu 5·10⁻³ mol/dm³ sporządzono na wodzie destylowanej. Pomiary fluorescencyjne przeprowadzono spektrofлуorymetrem JASCO FP-6500. Analizę oddziaływania LOS z niemodyfikowaną (HSA) i glikowaną (gHSA_{FRC}) albuminą przeprowadzono techniką wygaszania fluorescencji makrocząsteczki. Do pomiarów w układzie LOS-HSA i LOS-gHSA_{FRC} wykorzystano roztwory białek o stałym stężeniu 5·10⁻⁶ mol/dm³, bez (0) i w obecności losartanu o rosnącym stężeniu: 5·10⁻⁶ mol/dm³ (1), 1·10⁻⁵ mol/dm³ (2), 1.5·10⁻⁵ mol/dm³ (3), 2·10⁻⁵ mol/dm³ (4), 2.5·10⁻⁵ mol/dm³ (5), 3·10⁻⁵ mol/dm³ (6), 3.5·10⁻⁵ mol/dm³ (7), 4·10⁻⁵ mol/dm³ (8), 4.5·10⁻⁵ mol/dm³ (9), 5·10⁻⁵

mol/dm³ (10). Stopień wygaszania fluorescencji albuminy przez losartan określono względem fluorescencji roztworów białek niezawierających liganda. Ze względu na występowanie efektu wewnętrznego filtra rejestrowaną fluorescencją HSA, gHSA_{FRC} bez i w obecności LOS korygowano za pomocą wzoru przedstawionego przez Lakowicza (Lakowicz 2006). Pomiar absorpcyjny wykonano na spektrofotometrze dwuwiązkowym firmy JASCO (model V-760).



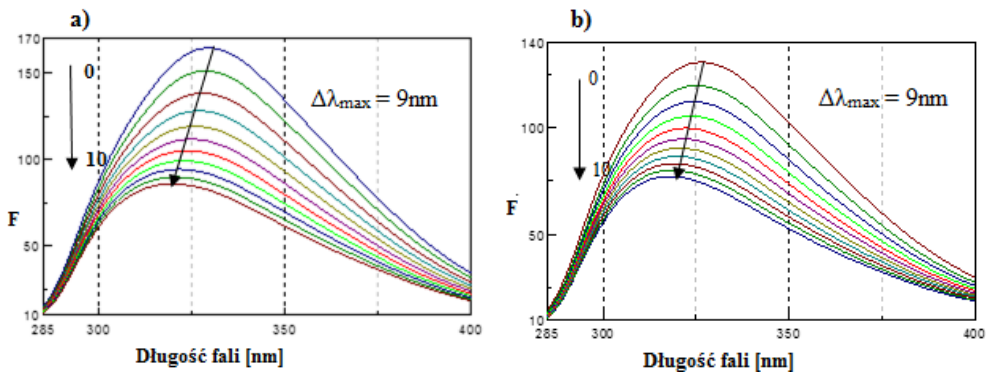
Rys.1. Miejsca glikacji *in vivo* w strukturze HSA dla a) reszt lizyny (Lys) i b) arginy (Arg) (Szkudlarek i in. 2019).

Zastosowanie techniki wygaszania fluorescencji fluoroforów albuminy niemodyfikowanej i glikowanej przez losartan, wzbudzonej promieniowaniem o długości fali $\lambda_{ex} = 275$ nm (wzbudza reszty tyrozylowe i resztę tryptofanową) oraz promieniowaniem o długości fali $\lambda_{ex} = 295$ nm (wzbudza prawie wyłącznie resztę tryptofanową) w wybranym zakresie temperatur, tj. w temperaturze 36°C i 37°C odpowiadającej temperaturze fizjologicznej organizmu oraz

w temperaturze 39°C i 41°C odpowiadającej stanowi chorobowemu w organizmie, umożliwiło ustalenie mechanizmu wygaszania fluorescencji fluoroforów HSA i gHSA_{FRC} przez losartan, określenie charakteru oddziaływania LOS z glikowaną i niemodyfikowaną albuminą, oszacowanie wartości stałych Sterna-Volmera (K_{SV}) dm³/mol, stałych asocjacji (K_a) dm³/mol i liczby klas miejsc wiążących (n) dla kompleksu LOS-HSA i LOS-gHSA_{FRC}.

3. Wyniki i dyskusja

Na podstawie analizy emisyjnych widm fluorescencyjnych niemodyfikowanej (HSA) i glikowanej (gHSA_{FRC}) albuminy dla wszystkich wybranych temperatur pomiaru (36°C (**Rys.2**), 37°C, 39°C i 41°C) zaobserwowano stopniowe zmniejszenie intensywności fluorescencji makrocząsteczek wraz ze wzrostem stężenia losartanu (LOS) zarówno po wzbudzeniu długością fali $\lambda_{ex} = 275$ nm, jak i po wzbudzeniu długością fali $\lambda_{ex} = 295$ nm. Efekt ten najprawdopodobniej związany jest z przejmowaniem części energii pochodzącej od wzbudzonych fluoroforów HSA i gHSA_{FRC} przez znajdujący się w odległości nie większej niż 10 nm losartan (Lakowicz 2006). W badanym układzie LOS-HSA i LOS-gHSA_{FRC} wzbudzonym $\lambda_{ex} = 275$ nm dla każdej temperatury pomiaru w miarę wzrostu stężenia LOS nastąpiło przesunięcie pasma emisji fluorescencji ($\Delta\lambda_{max}$) w kierunku krótkofalowym względem maksimum emisji fluorescencji niezwiązanej HSA i gHSA_{FRC}. Przesunięcie hipsochromowe świadczy o wzroście hydrofobowego charakteru otoczenia fluoroforów na skutek oddziaływania leku z albuminą i sugeruje istnienie oddziaływań między pierścieniem aromatycznym LOS, a pierścieniami aromatycznymi reszt aminokwasowych zlokalizowanych w hydrofobowej kieszeni albuminy w obrębie subdomeny IIA, IB, IIB i IIIA.



Rys.2 Przykładowe emisyjne widma fluorescencyjne **a)** HSA, **b)** gHSA_{FRC} bez (0) i w obecności LOS o rosnącym stężeniu $5 \cdot 10^{-6}$ mol/dm³ (1) – $5 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³ (10), $\lambda_{ex} = 275$ nm, [HSA, gHSA_{FRC}] $5 \cdot 10^{-6}$ mol/dm³, $t = 36^\circ\text{C}$. Strzałką zaznaczono kierunek przesunięcia maksimum fluorescencji ($\Delta\lambda_{max}$) albuminy HSA i gHSA_{FRC}.

W zakresie temperatur 36–41°C, dla gHSA_{FRC} następuje silniejsze wygaszenie fluorescencji LOS o rosnącym stężeniu niż dla HSA zarówno po wzbudzeniu falą o długości $\lambda_{ex} = 275$ nm, jak i $\lambda_{ex} = 295$ nm (Tab.1). Silniejsze wygaszenie fluorescencji gHSA_{FRC} świadczy o większej zdolności przejmowania energii przez LOS od wzbudzonych fluoroforów albuminy glikowanej niż wzbudzonych fluoroforów albuminy niemodyfikowanej, co ma związek ze zmniejszeniem odległości między fluoroforem i ligandem wskutek zmian strukturalnych makrocząsteczki.

Mechanizm wygaszania fluorescencji HSA i gHSA_{FRC} w obrębie subdomen, które zawierają reszty aminokwasowe biorące udział w tworzeniu kompleksu LOS-albumina, określono na podstawie przebiegu zależności Sterna-Volmera (Jiang i in. 2013). Ujemne odchylenie od prostoliniowej zależności $F_0/F = f[C_{LOS}]$ dla kompleksu LOS-HSA i LOS-gHSA_{FRC} otrzymane dla wszystkich temperatur pomiaru (danych nie pokazano) wskazuje na złożony mechanizm wygaszania fluorescencji albuminy przez losartan, w którym obok wygaszania dynamicznego występuje także wygaszanie statyczne (formowanie się trwałego kompleksu ligand-albumina w stanie podstawowym). Zgodnie z teorią Eftinka i Ghirona ujemne odchylenie od prostoliniowego przebiegu krzywej Sterna-Volmera świadczy o zajmowaniu przez lek w pierwszej kolejności łatwiej dostępnych miejsc wiązania, a dopiero po ich wysyceniu wiązaniu się liganda w obszarach trudniej dostępnych

w makrocząsteczce (Eftink i Ghiron 1981; Grigoryan i Ghazaryan 2013). Stałe Sterna-Volmera K_{SV} wyznaczone ze zmodyfikowanej przez Lehrera zależności Sterna-Volmera (zależność $F_0/\Delta F = f(1/[C_{LOS}])$) przyjmują większe dla wzbudzenia $\lambda_{ex} = 275$ nm i mniejsze dla wzbudzenia $\lambda_{ex} = 295$ nm wartości dla układu LOS-gHSA_{FRC} w porównaniu ze stałymi K_{SV} otrzymanymi dla układu LOS-HSA (Tab.2). Większe wartości stałej Sterna-Volmera wskazują o lokowaniu się cząsteczek losartanu bliżej reszty Trp-214 i reszt Tyr glikowanej niż albuminy niemodyfikowanej.

Tab.1. Procentowe wartości wygaszenia fluorescencji HSA i gHSA_{FRC} prze losartan dla stosunku molowego LOS:HSA (LOS:gHSA_{FRC}) 10:1, $\lambda_{ex} = 275$ nm i $\lambda_{ex} = 295$ nm.

t [°C]	% wygaszenia fluorescencji			
	$\lambda_{ex} = 275$ nm		$\lambda_{ex} = 295$ nm	
	HSA	gHSA _{FRC}	HSA	gHSA _{FRC}
36	37	45	29	38
37	27	33	22	26
39	32	41	29	38
41	35	42	28	37

Tab.2 Stałe Sterna-Volmera K_{SV} wyznaczone ze zmodyfikowanej przez Lehrera zależności Sterna-Volmera oraz stałe asocjacji K_a otrzymane metodą Klotza dla kompleksu losartan-albumina (LOS:HSA, LOS:gHSA_{FRC} 10:1), t = 36-41°C, $\lambda_{ex} = 275$ nm i $\lambda_{ex} = 295$ nm.

t [°C]	$K_{SV} \cdot 10^4 \pm SE^* [dm^3/mol]$			
	$\lambda_{ex} = 275$ nm		$\lambda_{ex} = 295$ nm	
	LOS-HSA	LOS-gHSA _{FRC}	LOS-HSA	LOS-gHSA _{FRC}
36	1.53 ± 0.03	3.61 ± 0.03	1.67 ± 0.04	1.23 ± 0.09
37	2.07 ± 0.09	6.99 ± 0.15	1.70 ± 0.05	2.16 ± 0.04
39	2.21 ± 0.03	2.40 ± 0.07	1.40 ± 0.03	1.20 ± 0.03
41	1.96 ± 0.05	2.03 ± 0.08	1.46 ± 0.04	1.16 ± 0.02
t [°C]	$K_a \cdot 10^4 \pm SE^* [dm^3/mol]$			
	$\lambda_{ex} = 275$ nm		$\lambda_{ex} = 295$ nm	
	LOS-HSA	LOS-gHSA _{FRC}	LOS-HSA	LOS-gHSA _{FRC}
36	1.67 ± 0.08	4.69 ± 0.05	1.20 ± 0.05	2.01 ± 0.05
37	2.63 ± 0.05	10.67 ± 0.14	2.17 ± 0.02	2.56 ± 0.03
39	2.62 ± 0.02	2.88 ± 0.07	2.23 ± 0.03	2.66 ± 0.02
41	2.28 ± 0.03	2.38 ± 0.09	1.67 ± 0.04	1.66 ± 0.02

*) niepewność pomiarowa

Na wartość stałej Sterna-Volmera K_{SV} wpływa także temperatura pomiaru układu losartan-albumina. Największą stałą K_{SV} uzyskano dla układu LOS-gHSA_{FRC} w temperaturze 37°C ($\lambda_{ex} = 275$ nm), z kolei najmniejszą stałą K_{SV} uzyskano w temperaturze 41°C ($\lambda_{ex} = 295$ nm). Można więc przypuszczać, że w podwyższonej temperaturze dostęp losartanu do fluoroforów albuminy glikowanej może być utrudniony. De Oliveira i in. (2016) badając wiązanie valsartanu (leku z grupy sartanów) do HSA w temperaturze 39°C otrzymali niemalże 3-krotnie większą wartość stałej Sterna-Volmera ($K_{SV} = 5.87 \cdot 10^4$ dm³/mol) od stałej K_{SV} uzyskanej dla układu losartan-HSA w niniejszej pracy ($K_{SV} = 2.21 \cdot 10^4$ dm³/mol), co związane jest prawdopodobnie z różnymi warunkami przechowywania/przygotowania albuminy, będącej w prezentowanej pracy próbą kontrolną dla albuminy glikowanej.

Kształt izoterm wiązania (zależność $r = f([L_f])$) dla kompleksu LOS-HSA i LOS-gHSA_{FRC} po wzbudzeniu $\lambda_{ex} = 275$ nm i $\lambda_{ex} = 295$ nm wskazuje na mieszany (specyficzny i niespecyficzny) charakter oddziaływania losartanu z albuminą surowicy krwi. Można więc przyjąć, że losartan wiąże

się nie tylko w specyficznych dla niego miejscach wiążących w cząsteczce niemodyfikowanej i glikowanej HSA (I i II miejsce wiążące według nomenklatury Sudlowa), ale również niespecyficznie oddziałuje z hydrofobowymi fragmentami powierzchni makrocząsteczek (Taira i Terada 1985). Skoro LOS wysyca miejsca wiązania niemodyfikowanej i glikowanej HSA, na podstawie krzywych Klotza wyznaczono stałe asocjacji K_a , które określają stabilność utworzonego kompleksu ligand-białko (**Tab.2**). Wyznaczono również liczbę cząsteczek LOS tworzących kompleks z jedną cząsteczką albuminy w stanie równowagi (n). Stała asocjacji K_a wyznaczona dla kompleksu LOS-gHSA_{FRC} zarówno po wzbudzeniu $\lambda_{ex} = 275$ nm, jak i $\lambda_{ex} = 295$ nm jest większa niż dla kompleksu LOS-HSA. Natomiast średnia liczba cząsteczek losartanu związana z jedną cząsteczką albuminy glikowanej i niemodyfikowanej (n) jest w przybliżeniu równa jedności. Oznacza to, że glikacja albuminy zwiększa trwałość (stabilność) wiązania leku przez albuminę, ale jednocześnie nie ma wpływu na liczbę cząsteczek LOS wiążącą się do jednej cząsteczki albuminy. Ponadto prostoliniowość zależności Klotza świadczy o występowaniu jednej klasy miejsc wiążących losartanu do makrocząsteczek. W całym zakresie badanych temperatur (36-41°C) stałe K_a kompleksów LOS-HSA i LOS-gHSA_{FRC} są większe, gdy układ wzbudzano długością fali $\lambda_{ex} = 275$ nm niż długością fali $\lambda_{ex} = 295$ nm, co wskazuje na udział zarówno reszt tyrozylowych rozmieszczonych w subdomenie IIA (Tyr-263), IB (Tyr-138, Tyr-140, Tyr-148, Tyr-150, Tyr-161), IIB (Tyr-319, Tyr-332, Tyr-334, Tyr-341, Tyr-353, Tyr-370) i IIIA (Tyr-401, Tyr-411, Tyr-452, Tyr-497) oraz reszty tryptofanowej (Trp-214) ulokowanej w subdomenie IIA w wiązaniu losartanu do niemodyfikowanej i glikowanej HSA. W swojej pracy Ferdosi Kabir i in. przy użyciu ranitydyny i diazepam – znaczników odpowiednio I i II miejsca wiązania ligandów według nomenklatury Sudlowa dowiedli, że zarówno subdomena IIA, jak i subdomena IIIA wołowej albuminy surowicy krwi (BSA) jest głównym miejscem wiązania losartanu. W przeprowadzonych badaniach Zhou i in. podkreślili, że wiązaniu losartanu do albuminy towarzyszy obniżenie ilości powstających końcowych produktów zaawansowanej glikacji (AGEs). Pomimo 76% homologii BSA do HSA, Mingyan i in. dla kompleksu LOS-BSA badanego w temperaturze 36°C otrzymali stałą asocjacji o rząd wielkości niższą ($K_a = 3.32 \cdot 10^3$ dm³/mol) od stałej K_a otrzymanej w niniejszej pracy. Opierając się na wynikach *in vitro* dotyczących wpływu glikacji i temperatury na wiązanie losartanu do ludzkiej albuminy surowicy krwi można przypuszczać, że w warunkach nieprawidłowej gospodarki węglowodanowej oraz podwyższonej temperatury w organizmie może dochodzić do zaburzenia farmakokinetyki farmaceutyku. W zakresie temperatury fizjologicznej (36-37°C) obserwuje się zwiększone wiązanie losartanu do albuminy, tym samym zmniejsza się pula wolnego leku odpowiedzialnego za działanie lecznicze. Aby uzyskać odpowiedni efekt terapeutyczny z zastosowaniem losartanu konieczne jest odpowiednie zwiększenie dawki leku. W temperaturze powyżej 39°C siła wiązania losartanu do makrocząsteczki zmniejsza się, co wiąże się z ryzykiem wystąpienia działań niepożądanych i może być wskazaniem do obniżenia dawki farmaceutyku. Ponieważ jedynie frakcja wolna leku może wywołać oczekiwany efekt terapeutyczny bądź toksyczny, znajomość aktywności wiążącej białek w różnych stanach chorobowych oraz u pacjentów w podeszłym wieku pozwoli uzyskać satysfakcjonujące rezultaty wybranej terapii.

4. Wnioski

Pomiary spektrofluorymetryczne pozwoliły uzyskać dane, na podstawie których określono wpływ glikacji i temperatury na właściwości wiążące albuminy.

- a) Udowodniono tworzenie się kompleksów losartanu (LOS) z niemodyfikowaną (HSA) i glikowaną (gHSA_{FRC}) albuminą. Silniejsze wygaszanie gHSA_{FRC} przez LOS w stosunku do HSA świadczy o wpływie glikacji na powinowactwo losartanu do albuminy.
- b) Oddziaływanie losartanu z HSA i gHSA_{FRC} następuje przy udziale reszty tryptofanowej (Trp-214) ulokowanej w subdomenie IIA oraz reszt tyrozylowych (Tyr) znajdujących się w subdomenach IB, IIB, IIA, IIIA.
- c) Na podstawie krzywych Sterna-Volmera dla układu LOS-HSA i LOS-gHSA_{FRC} stwierdzono, że wygaszanie fluorescencji albuminy przez losartan ma charakter dynamiczny i statyczny.

- d) Na podstawie stałych asocjacji K_a losartanu do niemodyfikowanej i glikowanej HSA wyznaczonych z zależności Klotza potwierdzono wpływ temperatury na wiązanie LOS z HSA i gHSA_{FRC}. Wzrost temperatury powyżej fizjologicznej prowadzi do osłabienia oddziaływania lek-albumina. Podwyższona temperatura organizmu może powodować wzrost stężenia wolnej frakcji leku i nasilać działania niepożądane farmaceutyku.

Praca zrealizowana ze środków finansowych umowy realizowanej przez Młodego Naukowca nr KNW-2-O14/N/9/K oraz umowy statutowej nr KNW-1-033/N/9/O.

5. Literatura

- Artali R, Bombieri G, Calabi L et al. (2005) A molecular dynamics study of human serum albumin binding sites. *II Farmaco* 60(6): 485–495.
- Ascoli GA, Domenici E, Bertucci C (2006) Drug binding to human serum albumin: abridged review of results obtained with high-performance liquid chromatography and circular dichroism. *Chirality* 18: 667–679.
- Broderson R, Sjodin T, Sjöholm I (1977) Independent binding of ligands to human serum albumin. *J Biol Chem* 252: 5067–5072.
- Eftink MR, Ghiron CA (1981) Fluorescence quenching studies with proteins. *Anal Biochem* 114: 199–227.
- Evans TW (2002) Review article: albumin as a drug-biological effects of albumin unrelated to osmotic pressure. *Aliment Pharmacol Ther* 16 (5): 6–11.
- Ferdosi Kabir A, Uddin N, Sadat AFN et al. (2010) Interaction of palmitic acid with losartan potassium at the binding sites of bovine serum albumin. *ARS Pharmaceutica* 51(2): 28–36.
- Grigoryan KR, Ghazaryan AG (2013) Quenching mechanism of human serum albumin fluorescence by Gangleron. *Chem Biol* 2: 6–10.
- Jiang H, Chen R, Wang H et al. (2013) Interaction of cyproheptadine hydrochloride with human serum albumin using spectroscopy and molecular modeling methods. *Luminescence* 28(2): 244–252.
- Lakowicz JR (2006) Principles of fluorescence spectroscopy. *Springer* 1(26): 529–535.
- Nicholson JP, Wolmarans MR, Park GR (2000) The role of albumin in critical illness. *Br J Anaesth* 85: 599–610.
- de Oliveira SR, Boffo FE, Reis CCF et al. (2016) A ruthenium polypyridyl complex with the antihypertensive drug valsartan: Synthesis, theoretical calculations and interaction studies with human serum albumin. *Polyhedron*.
- Peters TJr (1996) All about albumin: biochemistry, genetics and medical applications. Academic Press, San Diego.
- Rondeau P, Bourdon E (2011) The glycation of albumin: structural and functional impacts. *Biochimie* 93: 645–658.
- Shaklai N, Garlick RL, Bunn HF (1984) Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin alters its conformation and function. *J Biol Chem* 259(6): 3812–3817.
- Sun M, Su M, Sun H (2016) Spectrofluorimetric study on the interaction of losartan potassium and bovine serum albumin. *IJPSR* 7(3): 1026–34.
- Szkudlarek-Haśnik A, Maciążek-Jurczyk M, Chudzik M et al. (2016) Effects of non-enzymatic glycation in human serum albumin. Spectroscopic analysis. *Spectrochim Acta A Biomol Spectrosc* 152: 645–653.
- Szkudlarek A, Pożycka J, Maciążek-Jurczyk M (2019) Influence of piracetam on gliclazide-glycated human serum albumin interaction. A spectrofluorometric study. *Molecules* 24(1): 111.
- Taira Z, Terada H (1985) Specific and non-specific ligand binding to serum albumin. *Biochem Pharm* 34(11): 1999–2005.
- Zhu WW, Liu XP, Wu N et al. (2007) Beneficial effects of losartan on vascular injury induced by advanced glycosylation end products and their receptors in spontaneous hypertension rats. *Mol Cell Biochem* 304: 35–43.

18. Albumina surowicy krwi i jej funkcje w organizmie

Serum albumin and its functions in the body

Szkudlarek Agnieszka⁽¹⁾, Kokot Teresa⁽²⁾

⁽¹⁾Koło Naukowe przy Katedrze i Oddziale Klinicznym Chorób Wewnętrznych, Wydział Nauk o Zdrowiu w Bytomiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁽²⁾Katedra i Oddział Kliniczny Chorób Wewnętrznych, Wydział Nauk o Zdrowiu w Bytomiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
Opiekun naukowy: Prof. dr hab. n. med. Teresa Kokot

Szkudlarek Agnieszka: aszkudlarek@sum.edu.pl

Słowa kluczowe: białko osocza, struktura i właściwości HSA, oddziaływanie ligand-albumina

Streszczenie

Białka odgrywają decydującą rolę w niemal wszystkich procesach biologicznych. Są zasadniczymi elementami metabolicznymi i strukturalnymi komórek, tkanek i narządów każdego żywego organizmu. Albumina surowicy krwi (HSA) należy do najważniejszych spośród białek transportujących. Wiążąc wiele substancji egzogennej i endogennej, wpływa na ich biologiczną dostępność, dystrybucję, właściwości farmakokinetyczne i farmakodynamiczne. Stany zapalne, procesy chorobowe mogą powodować strukturalną i funkcjonalną modyfikację HSA, która przejawia się m.in. zaburzeniem zdolności do wiązania i transportu wielu ligandów. Aspekt ten jest istotny zarówno podczas ustalania dawek leku, jak i podczas sposobu ich podawania, co jest szczególnie istotne w kuracjach wielolekowych. Powszechnie uważa się, że zaburzenia w obrębie struktury przestrzennej makrocząsteczki wywołują indukację procesów patologicznych, stąd badania pozwalające na obserwację zmian konformacyjnych albuminy powodowanych różnymi czynnikami są niezwykle istotne.

1. Wstęp

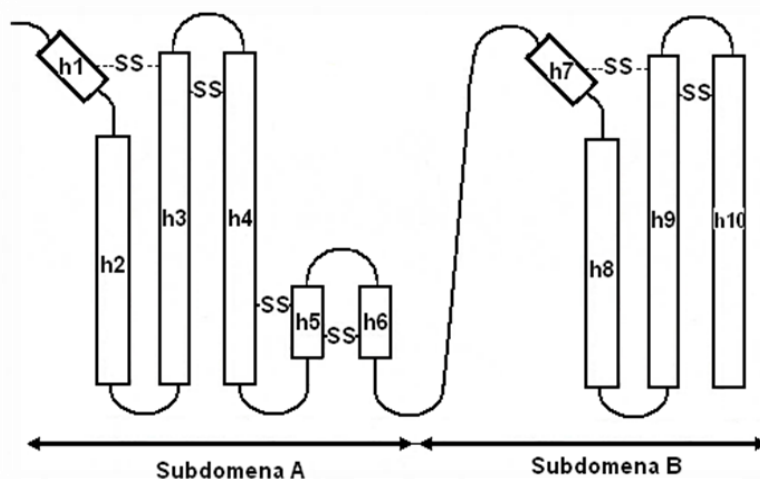
Białka odgrywają decydującą rolę w niemal wszystkich procesach biologicznych. Są zasadniczymi elementami metabolicznymi i strukturalnymi komórek, tkanek i narządów każdego żywego organizmu. Albuminy są najliczniej występującymi białkami osocza krwi o stężeniu sięgającym 0.58-0.73 mmol/l (40-50 g/l), co stanowi 55-65% całkowitej zawartości protein osocza. Stężenie albuminy to wypadkowa syntezy, rozmieszczenia między osoczem i płynem śródmiąższowym oraz degradacji. Według różnych źródeł, biologiczny okres półtrwania ($T_{1/2}$) HSA wynosi od 19 do 21 dni (Carter i Ho 1994; Trynda-Lemiesz i in. 2010), natomiast w przestrzeni wewnątrzkomórkowej 14 h. Albumina surowicy krwi ludzkiej (*Human Serum Albumin*, HSA) stanowi silnie hydrofilowe, globularne białko proste, posiadające ujemny ładunek elektryczny w fizjologicznym pH (Kłosowska 2007). Większość albuminy uwalniana jest do krwiobiegu, tylko niewielka jej ilość (~ 2 g) magazynowana jest w wątrobie. Jako preproteina syntetyzowana jest przez komórki wątroby w ilości 10-15 g w ciągu doby, co stanowi około 10% ogólnej syntezy białek w tym narządzie. Ostateczna forma albuminy powstaje w procesie enzymatycznym, po odszczepieniu heksapeptydu od N-końca proalbuminy (Carter i Ho 1994). Katabolizm HSA zachodzi głównie w mięśniach i skórze (~ 40-60%) oraz w około 10% w nerkach (Gburek i in. 2011). Ze względu na dobrze poznaną budowę, stabilność struktury oraz zdolność do wiązania i transportu wielu endo- i egzogennej substancji, albumina surowicy krwi ludzkiej jest często stosowanym w badaniach naukowych białkiem modelowym.

2. Struktura i funkcje fizjologiczne HSA

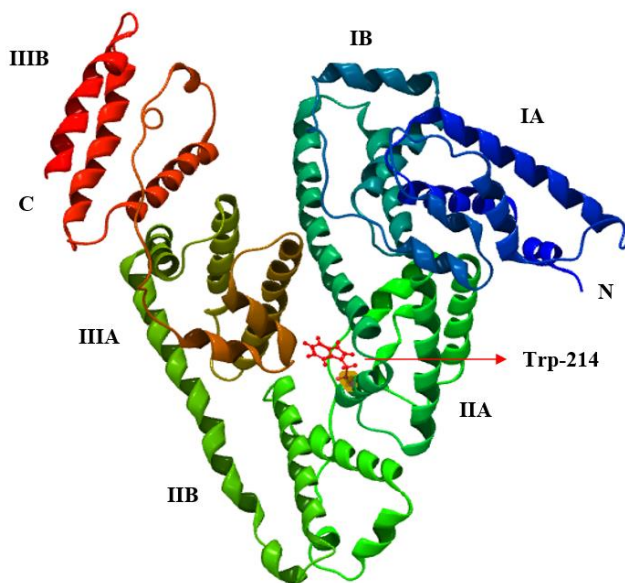
Według analiz krystalograficznych albumina surowicy krwi (HSA) tworzy połałdowany w kształcie serca o wymiarach 80 x 80 x 80 x 30Å łańcuch polipeptydowy (Carter i Ho 1994), zbudowany z 585 reszt aminokwasowych w 67% tworzący strukturę α -helisy, w 23% rozciągnięte

fragmenty polipeptydowe, a w 10% zakrety β (He i Carter 1992; Peters 1996). W budowie HSA nie występują struktury β -harmonijki, co zapewnia albuminie wysoką elastyczność konformacyjną. Dzięki temu makrocząsteczka ta posiada wiele hydrofobowych miejsc wiążących zarówno egzogenne, jak i endogenne związki. Sekwencja aminokwasowa zawiera 17 mostków disulfidowych oraz jedną wolną grupę sulfhydrylową –SH (Cys-34). HSA zawiera w swym składzie aminokwasowym pojedynczą resztę tryptofanylową w pozycji 214 (Trp-214), co jest bardzo korzystne w przypadku stosowania metod badawczych z wykorzystaniem sond fluorescencyjnych. Skład aminokwasowy albuminy, w odróżnieniu od innych białek, charakteryzuje niewielka zawartość reszt metioniny, glicyny i izoleucyny, podczas gdy aminokwasy jonowe takie jak kwas glutaminowy, kwas asparaginowy czy lizyna występują w dużej liczbie. Regiony albuminy bogate w ujemnie naładowane reszty aminokwasowe powodują wysoką rozpuszczalność tego białka w wodnych roztworach, fragmenty nie posiadające ładunku elektrycznego biorą udział w wiązaniu kwasów tłuszczowych oraz innych substancji hydrofobowych (Peters 1996).

Badania prowadzone przez He i Cartera wykazały, że pojedyncza cząsteczka albuminy składa się z trzech strukturalnie homologicznych domen oznaczonych od aminowego N-końca białka: I, II i III, z których każda utworzona jest przez dwie mniejsze subdomeny A i B (He i Carter 1992). Subdomeny przemieszczają się względem siebie za pośrednictwem elastycznych pętli zbudowanych z reszt proliny, co umożliwiłoby dostosowanie budowy cząsteczki albuminy do wiązania dużej liczby różnorodnych ligandów (Carter i Ho 1994). Sztwywność w obrębie każdej z subdomen białka zapewniają wewnątrzcząsteczkowe wiązania disulfidowe (S-S). Reszty aminokwasowe wchodzące w skład łańcucha polipeptydowego od 1 do 195 tworzą domenę I, natomiast aminokwasy od 196 do 383 oraz od 384 do 585 stanowią odpowiednio domenę II i III. W każdej domenie wyróżnia się 10 helis głównych oznaczonych od h1 do h10. Helisom h1-h4 subdomeny A odpowiadają helisy h7-h10 subdomeny B. Subdomena A posiada dodatkowo wnękę disulfidową, utworzoną przez dwie krótkie, naprzeciwległe helisy h5 oraz h6, połączone mostkiem disulfidowym (Carter i He 1990). Subdomeny IA, IB, IIA są ściśle upakowane tworząc głowę albuminy, natomiast subdomeny IIB, IIIA, IIIB tworzą wydłużony ogon cząsteczki. Badania nad strukturą albumin pochodzących z różnych gatunków ssaków wykazały wysoki stopień podobieństwa w sekwencjach aminokwasów oraz umiejscowieniu mostków disulfidowych w strukturze III-rzędowej tych protein (Carter i Ho 1994). Rys.1 przedstawia schemat budowy jednej z domen albuminy surowicy krwi ludzkiej. Na Rys.2 zobrazowano strukturę przestrzenną HSA z zaznaczonymi trzema domenami oraz wyszczególnioną resztą Trp-214 makrocząsteczki.



Rys. 2. Schemat budowy pojedynczej domeny ludzkiej albuminy surowicy krwi z oznaczeniem helis h1-h10 oraz lokalizacją mostków disulfidowych (Carter i He 1990).



Rys. 3. Trójwymiarowa struktura HSA z wyróżnieniem sześciu subdomen IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB i zaznaczoną resztą Trp-214 (He i Carter 1992).

Fizjologicznie albumina ludzka występuje w osoczu/surowicy krwi w dwóch formach: zredukowanej (*Human Mercaptalbumin*, HMA) jako merkaptalbumina oraz w formie utlenionej (*Human Nonmercaptalbumin*, HNA) jako nimerkaptalbumina. HMA posiada wolną grupę sulfhydrylową –SH (Cys-34), która odgrywa istotną rolę podczas molekularnego starzenia HSA oraz uczestniczy w tworzeniu wiązań disiarczkowych. HNA, pozbawiona wolnej grupy sulfhydrylowej, stanowi mieszaninę związków disiarczkowych powstałych wskutek oddziaływań merkaptalbuminy z L-cysteiną oraz w mniejszym stopniu z glutationem (Sogami i in. 1985). Obie formy HMA i HNA mogą wzajemnie w siebie przechodzić. Forma zredukowana występuje w zdecydowanej większości. Zawartość frakcji merkaptalbuminy wyraźnie maleje wraz z wiekiem, podczas uprawiania intensywnych ćwiczeń, w niektórych stanach chorobowych (m.in. w cukrzycy), przy narażeniu na zwiększoną ilość wolnych rodników lub innych czynników utleniających. Jest to niekorzystne dla organizmu ze względu na zmniejszenie puli antyoksydantów.

Cząsteczka albuminy wykazuje wysoki stopień zmienności konformacyjnej w zależności od pH środowiska. Zmiany pH powodują modyfikację sieci wiązań wodorowych, lokalne zmiany konformacyjne związane z protonacją i deprotonacją, którym ulegają np. reszty histydyny (Diaz i in. 2001). Podczas zmian pH, oprócz formy, zmienia się także budowa helikalna cząsteczki. Albumina przyjmuje różne formy izomeryczne: N (*Normal*) – neutralna, F (*Fast*) – szybka w elektroforezie żelowej, E (*Expanded*) – rozciągnięta, B (*Basic*) – zasadowa oraz A (*Aged*) – zestarzała (Dockal i in. 2000). Przemiana konformacji N w F albuminy, wymaga rozfałdowania domeny III (Khan 1986). Forma F charakteryzuje się wzrostem lepkości, zmniejszeniem rozpuszczalności oraz znacznie mniejszym stopniem helikalności. Według Harringtona przy wartości pH poniżej 4.0 albumina ulega rozfałdowaniu wskutek rozsuwania się połączonych ze sobą helis: helisy (10) domeny I połączonej z helisą (1) domeny II oraz helisy (10) połączonej z helisą (1) domeny III (Harrington 1956). Taka konformacja albuminy to jej forma E charakteryzująca się zwiększoną lepkością oraz zwiększoną hydrodynamiką osiową. W środowisku zasadowym (pH = 9.0) albumina przyjmuje formę B. Warunkiem przekształcenia formy B w konformację A jest mała siła jonowa, środowisko zasadowe i czas 3-4 dni przechowywania roztworu albuminy w temperaturze 3 °C.

Struktura albuminy bezpośrednio koreluje z wieloma kluczowymi funkcjami jakie pełni ona w utrzymaniu homeostazy ustroju. Ze względu na małą masę cząsteczkową (66.5-66.9 kDa)

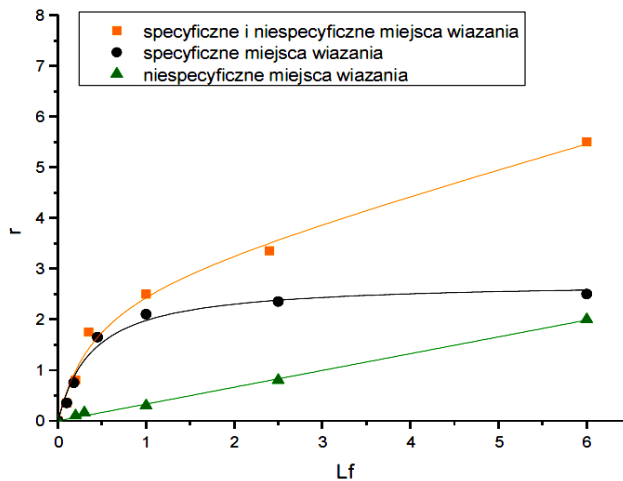
w porównaniu z innymi globulinami osocza, HSA decyduje o utrzymaniu stałego ciśnienia onkotycznego krwi i optymalnym pH osocza krwi (Evans 2002). Odpowiada także za zachowanie równowagi osmotycznej między krwią krążącą, a przestrzeniami tkankowymi, dzięki czemu zapewnia utrzymanie odpowiedniej hemodynamiki krwi oraz zapobiega obrzękom. Posiada właściwości buforujące, antyoksydacyjne oraz wykazuje aktywność przeciwzakrzepową, poprzez bezpośrednie hamowanie aktywności antytrombiny III. Albumina wykazuje również aktywność enzymatyczną przejawiającą się m.in. w przekształcaniu form nieaktywnych do aktywnych leków (Kragh-Hansen i in. 2002). Jedną z najistotniejszych właściwości tego białka jest zdolność transportu do tkanek docelowych wielu związków biologicznie czynnych przez odwracalne wiązanie substancji endo- i egzogennych jak: niezestryfikowane kwasy tłuszczowe, barwniki żółciowe, hormony, witaminy, a także toksyny, leki oraz jony metali przejściowych (Peters 1996). HSA wiąże się również kowalencyjnie i nieodwracalnie z D(+)-glukozą, D(-)-fruktozą i D(+)-galaktozą (Evans 2002). Transport ligandów zarówno tych egzo-, jak i endogennych w kompleksie z albuminą, objawia się wzrostem rozpuszczalności tych związków w surowicy, zmniejszeniem ich toksyczności oraz ochroną przed ich utlenianiem. W badaniach *in vivo* albumina stosowana jest jako parametr diagnostyczny i prognostyczny w wielu stanach chorobowych, w których obserwowane jest przede wszystkim zmniejszenie jej stężenia w osoczu (hipoalbuminemia) związane z zaburzoną syntezą na tle schorzeń wątroby (częściowa dysfunkcja, marskość wątroby), ze wzrostem zapotrzebowania (choroby nowotworowe) lub nadmierną utratą z organizmu (enteropatia, zespół nerczycowy, rozległe oparzenia) (Miller i Jędrzejczak 2001). Poza tym, w stanach hipoalbuminemii spotęgowane jest działanie leków wiązanych przez albuminę na skutek wzrostu frakcji farmakologicznie czynnej. Hiperalbuminemia jest stanem rzadko spotykanym, który nie wiąże się z poważniejszymi zaburzeniami (Gburek i in. 2011). W przypadku niedoboru niezbędnych aminokwasów HSA pełni rolę rezerwy białkowej organizmu. Albumina stosowana jest również jako lek-preparat krwiozastępczy we wstrząsie krwotocznym, w oparzeniach, hemodializach, a także w terapii fotodynamicznej i terapii genowej (Fischer i in. 2001).

3. Miejsca wiązania ligandów oraz właściwości wiążące albuminy surowicy krwi

Techniki dializy równowagowej, krystalografii rentgenowskiej oraz metody spektroskopowe pozwoliły na wskazanie miejsc wiązania wielu ważnych fizjologicznie ligandów w hydrofobowych wnękach albuminy surowicy krwi. W cząsteczce HSA występują dwa miejsca specyficznego wiązania substancji egzo- i endogennych, określane jako miejsce I i II według nomenklatury Sudlowa (Sudlow i in. 1975). Do I miejsca ulokowanego w subdomenie IIA, największe powinowactwo wykazują heterocykliczne związki anionowe z ujemnym ładunkiem elektrycznym w centralnej pozycji cząsteczki, m.in. leki przeciwzakrzepowe (acenokumarol), przeciwzapalne (indometacyna, fenylbutazon, salicylany), przeciwcukrzycowe (tolbutamid), sulfonamidy (sulfatiazol), diuretyki (furosemid, piretanid), a także substancje endogenne (bilirubina, hemina, eikozanoidy) (Quinlan i in. 2005). Ponadto jest ono miejscem wiązania warfaryny i DNSA, które traktowane są jako jego selektywne znaczniki. Badania spektroskopowe wykazały, że w miejscu I znajduje się reszta lizyny (Lys-199) i jedyna w całej sekwencji aminokwasowej reszta tryptofanu (Trp-214). Mutacje tego miejsca mają bardzo duży wpływ na konformację i stabilność termiczną białka. Doświadczenia przeprowadzone przy użyciu acenokumarolu, dansylo-L-asparaginy i n-butylo-p-aminobenzoesanu, wykazały, że miejsce to składa się z trzech regionów: Ia, Ib, Ic, dla których ligandy te są odpowiednio markerami (Yamasaki i in. 1996). Regiony te częściowo na siebie zachodzą, stąd można przyjąć, że miejsce wiązania I jest na tyle duże, że może związać dwa z trzech wcześniej wymienionych ligandów, jednak zbyt małe, aby pomieścić je wszystkie. W II miejscu wiązania, zwanym miejscem wiążącym indol i benzodiazepinę (subdomena IIIA) przyłączają się mniejsze aromatyczne związki z bardziej obwodowo rozmieszczonym ładunkiem, np. niesteroidowe leki przeciwzapalne (ketoprofen, ibuprofen, naproksen, diklofenak), benzodiazepiny (diazepam), tiazydy (chlorotiazyd) i substancje endogenne (L-tryptofan, L-tyroksyna, kwas hipurowy). Miejsce to wydaje się być mniejsze, a także mniej elastyczne, gdyż wiązanie w tym regionie HSA silnie zależy od stereoselektywności wiązanych cząsteczek. Pomimo tego, że miejsce II wiąże wiele ligandów, to wiązanie w tym miejscu jest bardziej wybiórcze niż wiązanie w I miejscu wiążącym. Największe

znaczenie w aktywności tego obszaru ma reszta Arg-410 oraz reaktywna grupa hydroksylowa Tyr-411 wykazująca aktywność esterazową (Kragh-Hansen i in. 2002). Carter i in. opisali sześć miejsc wiążących dla różnych pod względem strukturalnym ligandów: dwa wiążące małe, heterocykliczne lub aromatyczne kwasy karboksylowe (zlokalizowane w subdomenie IIA oraz IIIA), dwa wiążące kwasy tłuszczowe o długim łańcuchu i małe związki anionowe (ulożone w domenie I i III w subdomenach B) oraz dwa miejsca wiążące jony metali (subdomena IIIA). Subdomena IA nie posiada właściwości wiążących ligandy, pomimo homologii do subdomeny IIA i IIIA, które wiążą większość leków (Carter i Ho 1994; He i Carter 1992). Wydłużony łańcuch polipeptydowy od Cys-62 (h3) w subdomenie IA jest rozwinięty i nie może tworzyć hydrofobowej wnęki z helisą h4, tak jak się to dzieje w domenie II.

Peyrin i in. wskazali na dwuetapowy przebieg oddziaływania ligand-białko (Peyrin i in. 1998). W pierwszym etapie cząsteczka liganda zbliża się do wnęki hydrofobowej albuminy, co jest spowodowane efektem hydrofobowym. Następnie ligand wiąże się do niej za pomocą oddziaływań krótkiego zasięgu, tj. wiązań wodorowych, sił van der Waalsa, oddziaływań sferycznych i elektrostatycznych. Ligand może też przyłączyć się do albuminy kowalencyjnie w sposób nieodwracalny (Trynda-Lemiesz i in. 2010). Leki wiążą się także w niespecyficznych miejscach z hydrofobową powierzchnią albuminy, co jest związane z ich powinowactwem zależnym głównie od ich hydrofobowości, bez względu na posiadaną strukturę chemiczną. Specyficzne wiązanie charakteryzuje bardzo duże powinowactwo i niewielka zdolność wiążąca, podczas gdy wiązanie niespecyficzne małe powinowactwo i nieograniczona zdolność wiązania ligandów (Taira i Terada 1985). W celu ustalenia modelu wiązania liganda do białka pomocne jest wykreślenie tzw. izoterm wiązania (Rys.3).



Rys.4 Określenie modelu wiązania leku do białka na podstawie przebiegu izoterm wiązania (Taira i Terada 1985).

Oddziaływanie leków z białkiem transportującym stanowi ważny element terapii, ponieważ HSA wpływa na dystrybucję substancji leczniczej w organizmie, na jej własności farmakokinetyczne i farmakodynamiczne. Mechanizm wiązania lek-albumina zależy od właściwości fizykochemicznych i stężenia danego leku, zdolności cząsteczek białka do wiązania leku, a także wpływu środowiska. W polipragmazji, ligandy mogą konkurować ze sobą o miejsce wiązania i wzajemnie wypierać się z połączenia z białkami osocza. Lek, który tworzy kompleks z białkiem nie podlega biotransformacji i eliminacji – stanowi nieczynną farmakologicznie pulę zapasową, bowiem za działanie terapeutyczne farmaceutyku odpowiedzialne są jego cząsteczki w stanie wolnym. Związanie liganda do albuminy może spowodować zmianę jej konformacji przestrzennej, która uniemożliwi wiązanie się innych ligandów, bądź wzmocni wiązanie już istniejące. Ponadto związanie leku do jednego miejsca

wiążącego może zmienić strukturę innych miejsc wiążących lub ich liczby w cząsteczce albuminy (Broderson i in. 1977).

Stany zapalne, procesy chorobowe mogą powodować strukturalną i funkcjonalną modyfikację HSA, która przejawia się m.in. zaburzeniem zdolności do wiązania i transportu wielu endo- i egzogennych ligandów. Ma to kluczowe znaczenie w planowaniu terapii, gdyż charakter i siła oddziaływania leków z głównym ich dystrybutorem może ulec zmianie przy współistniejącej np. cukrzycy. Aspekt ten jest istotny zarówno podczas ustalania dawek leku, jak również podczas sposobu ich podawania, co jest szczególnie istotne w kuracjach wielolekowych. Do procesów powodujących utratę pierwotnych właściwości albuminy oraz zaburzenie pełnionych przez nią funkcji fizjologicznych należy m.in. glikacja i oksydacja. Związki powstałe podczas tych procesów, odpowiedzialne są za uszkodzenia struktur komórkowych i tkankowych, a tym samym do wystąpienia szeregu konsekwencji zdrowotnych oraz przedwczesnego starzenia się organizmu.

4. Podsumowanie

Białka są związkami wielkocząsteczkowymi, różnorodnymi strukturalnie i funkcjonalnie. Pełnią bardzo istotne funkcje w organizmach żywych poczynając od funkcji mechaniczno-strukturalnych, poprzez budowanie enzymów, ochronę immunologiczną, transport wielu cząsteczek, odbieranie, wytwarzanie i przekazywanie sygnałów, aż do koordynowania funkcjami biologicznymi komórek. Do najliczniej występujących białek osocza krwi należą albuminy. Pomimo stabilizacji struktury albuminy m.in. przez 17 mostków disulfidowych, ulega ona reakcjom prowadzącym do zmian konformacyjnych, które odpowiedzialne są za utratę pełnienia przez nią funkcji fizjologicznych. Szereg strukturalnych modyfikacji, zwłaszcza w II-rzędowej i III-rzędowej konformacji ludzkiej albuminy surowicy krwi, przypisuje się procesom m.in. glikacji i oksydacji. Modyfikowana HSA nie funkcjonuje poprawnie, co prowadzi do indukcji procesów patologicznych w organizmie. Albuminy o zmodyfikowanej strukturze wykryto we krwi osób z niewydolnością i marskością wątroby, cukrzycą, chorobami nerek, a także niektórymi chorobami nowotworowymi. Wobec powyższego badania pozwalające na obserwację zmian konformacyjnych białek powodowanych różnymi czynnikami są niezwykle istotne.

5. Literatura

- Broderson R, Sjodin T, Sjöholm I (1977) Independent binding of ligands to human serum albumin. *J Biol Chem* 252: 5067–5072.
- Carter DC, Ho JX (1994) Structure of serum albumin. *Adv Protein Chem* 45: 153–203.
- Carter DC, He XM (1990) Structure of serum albumin. *Science* 249: 302–303.
- Diaz N, Suárez D, Sordo TL i in (2001) Molecular dynamics study of the IIA binding site in human serum albumin: influence of the protonation state of Lys 195 and Lys 199. *J Med Chem* 44: 250–260.
- Dockal M, Carter DC, Rüker F (2000) Conformational transitions of the three recombinant domains of human serum albumin depending on pH. *J Biol Chem* 275(5): 3042–3050.
- Evans TW (2002) Review article: albumin as a drug-biological effects of albumin unrelated to osmotic pressure. *Aliment Pharmacol Ther* 16(5): 6–11.
- Fischer D, Bieber T, Brüsselbach S i in. (2001) Cationized human serum albumin as a non-viral vector system for gene delivery? Characterization of complex formation with plasmid DNA and transfection efficiency. *Int J Pharm* 225: 97–111.
- Gburek J, Gołąb K, Juszczynska K (2011) Nerkowy katabolizm albuminy-aktualne poglądy i kontrowersje. *Postępy Hig Med Dosw* 65: 668–677.
- Harrington WF, Johnson P, Ottewill RH (1956) Bovine serum albumin and its behaviour in acid solution, *Biochem J* 62: 569–582.
- He XM, Carter DC (1992) Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature* 358: 209–215.
- Khan MY (1986) Direct evidence for the involvement of domain III in the N-F transition of bovine serum albumin. *Biochem J* 236: 307–310.

- Kłósowska K (2007) Albumina jako główne białko transportowe osocza. *Bad Diagn* 13: 21–23.
- Kragh-Hansen U, Chuang VT, Otagiri M (2002) Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. *Biol Pharm Bull* 25(6): 695–704.
- Miller A, Jędrzejczak WW (2001) Albumina-funkcje biologiczne i znaczenie kliniczne. *Postępy Hig Med Dośw* 55(1): 17–36.
- Peters TJr (1996) All about albumin: biochemistry, genetics and medical applications. Academic Press, San Diego (CA).
- Peyrin E, Guillaume YC, Morin N i in. (1998) Sucrose dependence of solute retention on human serum albumin stationary phase: hydrophobic effect and surface tension considerations. *Anal Chem* 70: 2812–2818.
- Quinlan GJ, Martin GS, Evans TW (2005) Albumin: biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology* 41(6): 1211–1219.
- Sogami M, Nagoka S, Era S i in (1985) HPLC-studies on nonmercapt-mercapt conversion of human serum albumin. *Int J Peptide Protein Res* 25(4): 398–402.
- Sudlow G, Birkett DJ, Wade DN (1975) The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol Pharmacol* 11: 824–832.
- Taira Z, Terada H (1985) Specific and non-specific ligand binding to serum albumin. *Biochem Pharm* 34(11): 1999–2005.
- Trynda-Lemiesz L, Wiglusz K, Mucha J (2010) Rola albuminy w diagnostyce. Wiązanie jonów i kompleksów metali. *Wiad Chem* 64(1-2): 81–104.
- Yamasaki K, Maruyama T, Kragh-Hansen U i in.(1996) Characterization of site I on human serum albumin: concept about the structure of a drug binding site. *Biochim Biophys Acta* 1295: 147–157.