

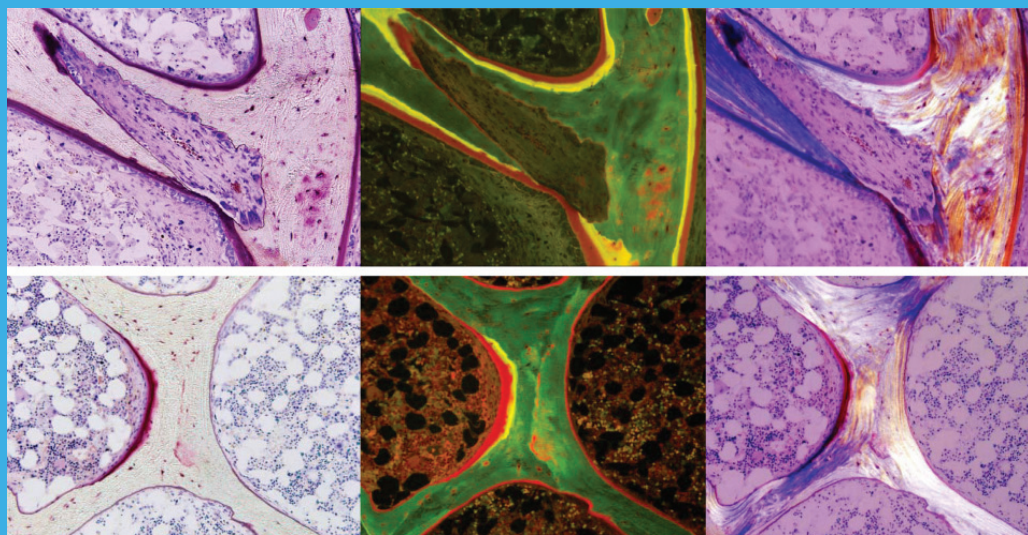
Biomedycyna

badania, diagnostyka, leczenie

Biomedicine

research, diagnostic, treatment

1



Redakcja
Monika Olszówka
Kamil Maciąg
Mirosław Szala

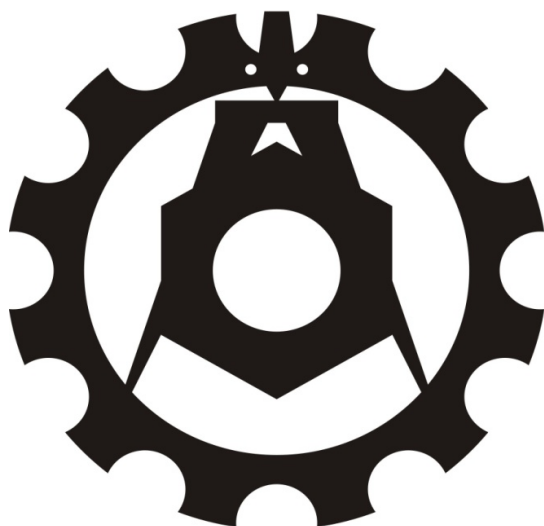
Politechnika Lubelska
Lublin 2014

Biomedycyna **badania, diagnostyka, leczenie**

Biomedicine
research, diagnostic, treatment

Politechnika Lubelska

Wydział Mechaniczny



Biomedycyna **badania, diagnostyka, leczenie**

Biomedicine
research, diagnostic, treatment

1

redakcja
Monika Olszówka
Kamil Maciąg
Mirosław Szala



Politechnika Lubelska
Lublin 2014

Recenzenci:

prof. dr hab. n. med. Janusz Kocki

prof. dr hab. n. med. Jacek Roliński

dr n. med. Wojciech Brzozowski

dr hab. Barbara Barszcz, prof. nadzw. UJK

dr hab. Krzysztof Grzywnowicz, , prof. nadzw. UMCS

dr hab. Agnieszka Szuster-Ciesielska, prof. nadzw. UMCS

dr hab. n. med. Witold Krupski

dr hab. Roman Paduch

Wszystkie opublikowane artykuły zostały pozytywnie zrecenzowane

Wydano za zgodą Rektora Politechniki Lubelskiej

© Copyright by Politechnika Lubelska 2014

ISBN 978-83-7947-046-4

Wydawca: Politechnika Lubelska

ul. Nadbystrzycka 38D, 20-618 Lublin

Realizacja: Biblioteka Politechniki Lubelskiej

Ośrodek ds. Wydawnictw i Biblioteki Cyfrowej

ul. Nadbystrzycka 36A, 20-618 Lublin

tel. (81) 538-46-59, email: wydawca@pollub.pl

www.biblioteka.pollub.pl

Druk: TOP Agencja Reklamowa Agnieszka Łuczak

www.agencjatom.pl

Elektroniczna wersja książki dostępna w Bibliotece Cyfrowej PL www.bc.pollub.pl

Nakład: 50 egz.

SPIS TREŚCI

ANTYNOWOTWOROWE I CHEMOPREWENCYJNE WŁAŚCIWOŚCI KURKUMINY..... 7

Anna Wawruszak, Karolina Okła, Sylwia Katarzyna Król, Artur Anisiewicz

AUTYZM U DZIECI A MATCZYNE PRZECIWCIAŁA – CZY ISTNIEJE ZWIĄZEK? 17

Karolina Gasińska, Tomasz Michalski, Anna Szajerska, Paweł Binko, Joanna Horbaczewska, Milena Karpiarz, Lidia Kotuła

CUKRZYCA CIAŻOWA. CZY NADAL STANOWI PROBLEM? 27

Paulina Chwil, Karol Terlecki, Paulina Sobstyl, Jan Sobstyl, Lidia Kotuła, Katarzyna Schab, Magdalena Amarowicz, Marcin Urbańczuk, Dominika Mulawka, Paulina Mulawka

CYTOMETRYCZNE WYKŁADNIKI ZABURZEŃ FUNKCJI UKŁADU ODPORNOŚCIOWEGO U OSÓB PODDANYCH SPLENEKTOMII..... 37

Justyna Markowicz, Tomasz Roman, Agnieszka Szymczyk, Arkadiusz Macheta, Ewelina Grywalska

INTERAKCJE LEKÓW I SKŁADNIKÓW DYMU TYTONIOWEGO – KOLEJNE NIEBEZPIECZEŃSTWA WYNIKAJĄCE Z PALENIA 53

Katarzyna Schab, Magdalena Amarowicz, Dominika Mulawka, Paulina Mulawka, Marcin Urbańczuk, Jan Sobstyl, Paulina Sobstyl, Paulina Chwil, Karol Terlecki, Lidia Kotuła

KOMPLEKSY ANTYMONU Z BIOLIGANDAMI STOSOWANE W MEDYCYNIE..... 63

Mateusz Kowalik

NOWA METODA WALKI Z WIRUSEM EBOLA I WIRUSEM WŚCIEKLIZNY..... 73

Magdalena Starosielec, Mateusz Smyk

SORTER MOFLO JAKO NOWOCZESNE NARZĘDZIE SELEKCJI KOMÓREK I CHROMOSOMÓW 87

Małgorzata Filas, Piotr Chomik, Marcin Czop, Agnieszka Wojcieszek, Roman Pińkowski, Aneta Gorący, Mateusz Wiliński, Janusz Kocki

WPLYW ALKOHOLU, PAPIEROSÓW I KAWY NA UKŁAD SERCOWO-NACZYNIOWY . 97

Paweł Binko, Anna Szajerska, Milena Karpiarz, Joanna Horbaczewska, Adam Iwaniuk, Karolina Gasińska, Elżbieta Mazur-Stążka

WPLYW ETANOLU I SILDENAFILU NA WĄTROBE 107

Justyna Semeniuk, Olga Ślabczyńska, Karolina Okła, Artur Anisiewicz

ANTYNOWOTWOROWE I CHEMOPREWENCYJNE WŁAŚCIWOŚCI KURKUMINY

1. Wstęp

Jednym z niezwykle obiecujących działań na rzecz ograniczenia ryzyka wystąpienia choroby nowotworowej jest chemoprewencja. Polega ona na wykorzystaniu związków, głównie pochodzenia naturalnego, w celu odwrócenia, zahamowania lub opóźnienia procesu transformacji nowotworowej. Kurkumina – substancja wyizolowana z kłącza ostryżu długiego, ze względu na swoje szerokie spektrum aktywności biologicznej jest doskonałym przykładem związku o charakterze chemoprewencyjnym.

2. Ostryż długi (kurkuma)

Ostryż długi to roślina z rodziny Imbirowatych (*Zingiberaceae*), pochodzenia tropikalnego lub subtropikalnego, mierząca do 1,5 metra wysokości. Uprawiana najczęściej w Chinach, Indiach, Pakistanie, Ceylonie oraz na Półwyspie Malajskim [1]. W medycynie Dalekiego Wschodu, ze względu na swoje doskonałe właściwości lecznicze, znana jest od ponad 4000 lat. Stosowana była, między innymi w dolegliwościach przewodu pokarmowego, w leczeniu ostrych stanów zapalnych czy trudno gojących się ran [2].

Roślina posiada charakterystyczny pęd kwiatowy, z osadzonymi na nim dużymi, żółtymi kwiatami zebranymi w kłos. Do celów przyprawowych i leczniczych stosuje się kłącze ostryżu długiego – *Rhizoma Curcuma longa* L. [1].

3. Właściwości fizyczne i chemiczne kurkuminy

Kurkumina, czyli (1*E*,6*E*)-1,7-bis(4-hydroksy-3-metoksyfenylo)hepta-1,6-dien-3,5-dion, jest związkiem chemicznym należącym do grupy polifenoli, występującym w kłączach ostryżu długiego w stężeniu 5-10% suchej masy. Związek ten występuje pod postacią charakterystycznego żółto-pomarańczowego proszku, o masie molowej równej 368,37 g/mol

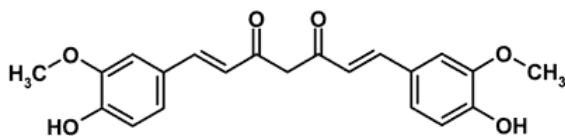
¹anna_wawruszak@interia.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym, Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej;

²lolikik@02.pl, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Biotechnologii, Studenckie Koło Naukowe „Mikron”;

³sylwia_krol15@wp.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym, Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej;

⁴a.anisiewicz@gmail.com, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Biotechnologii, Studenckie Koło Naukowe „Mikron”;

oraz temperaturze topnienia 183°C [3]. Częsteczka kurkuminy, w zależności od odczynu środowiska, występuje w dwóch formach tautomerycznych – ketonowej i enolowej. Forma enolowa występuje w środowisku zasadowym, ketonowa natomiast – przy pH poniżej 7 [5]. Spośród naturalnie występujących kurkuminoidów wyizolowanych z kłącza ostryżu długiego wymienić należy: kurkuminę (rys. 2), bisdemetoksykurkuminę, demetoksykurkuminę oraz cyklokurkuminę [3, 4].



Rys.1. Wzór strukturalny kurkuminy

Struktura chemiczna kurkuminy zaproponowana została w 1910 roku przez polskich badaczy i uczonych J. Miłorzębską, K. Kostaneckiego i W. Lampe [2].

Poważnym ograniczeniem w doustnym stosowaniu kurkuminy jest jej niska biodostępność. Ze względu na hydrofobowy charakter cząsteczki oraz fakt, że ulega zmetabolizowaniu w wątrobie, kurkumina słabo wchłania się z przewodu pokarmowego, ulegając unieczynnieniu przed osiągnięciem krążenia ogólnego [2].

4. Aktywność biologiczna kurkuminy

Kurkumina jest jednym z najlepiej poznanych związków pochodzenia roślinnego. W literaturze najszerzej udokumentowano jej właściwości antyoksydacyjne, przeciwzapalne, przeciwnowotworowe, proapoptotyczne, chemoprewencyjne, neuroprotektoryjne, a także właściwości modulujące funkcjonowanie układu odpornościowego. Wielokierunkowość działania kurkuminy jest bardzo istotnym aspektem w prewencji i leczeniu chorób o bardzo złożonej etiologii, do których zaliczyć można choroby nowotworowe i schorzenia neurodegeneracyjne [2].

5. Właściwości przeciwutleniające

Reaktywne formy tlenu (RFT) są produktami częściowej lub całkowitej redukcji i wzbudzenia cząsteczki tlenu. Do grupy tej zalicza się między innymi wolne rodniki tlenowe, tlen singletowy, anionorodnik ponadtlenkowy, rodnik wodoronadtlenkowy, rodnik hydroksylowy, nadutlenek wodoru, dwutlenek azotu. RFT są produktami fizjologicznych procesów metabolicznych i w prawidłowych stężeniach odgrywają w organizmie funkcje regulacyjne. Jednak zbyt ich wysokie stężenie prowadzi do poważnych uszkodzeń składników komórkowych, takich jak białka, lipidy czy kwasy nukleinowe. Zaburzenie równowagi pomiędzy syntezą a degradacją reaktywnych form tlenu prowadzi w konsekwencji do powstania stresu oksydacyjnego, czyli następujących po sobie sekwencji biochemicznych reakcji indukujących uszkodzenie komórek

oraz ich śmierć [6]. Reaktywne formy tlenu związane są z powstawaniem wielu niekorzystnych procesów, takich jak inaktywacja enzymów antyoksydacyjnych i białek transportowych, pęknięcia nici i uszkodzenia zasad DNA, uszkodzenie chromosomów, modyfikacja właściwości antygenowych komórek, zmiana morfologii komórek, mutacje i transformacje nowotworowe, aktywacja kompleksu białkowego AP-1 i kancerogenów [7].

W badaniach laboratoryjnych wykazano, że kurkumina może nie tylko bezpośrednio neutralizować reaktywne formy tlenu, w tym rodnik hydroksylowy, anionorodnik ponadtlenkowy czy tlenku azotu, ale także hamować aktywność kompleksu białkowego AP-1 [2, 8]. Ponadto w badaniach wykazano, że kurkumina jest w stanie indukować wzrost stężenia glutationu, związku o silnych właściwościach antyutleniających [2].

6. Właściwości przeciwzapalne

Jednym z istotnych elementów związanych z powstaniem stanu zapalnego jest aktywność jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Czynniki ten pełni znaczącą rolę w procesach odpornościowych i prozapalnych, hamuje bowiem apoptozę, nasila proces angiogenezy oraz indukuje proliferację, przez co wykazuje istotny wpływ na indukcję onkogenezy i progresji nowotworowej. Wykazano, że przekąźnictwo NF- κ B związane jest także z innymi szlakami wewnątrzkomórkowej sygnalizacji, uczestniczącymi w procesach obronnych, zapalnych i nowotworzeniu [2, 9]. Czynniki transkrypcyjny jest w stanie regulować aktywność takich białek, jak: interleukiny (1 α , 1 β , 2, 6, 9, 11, 12), cząsteczki adhezyjne (VCAM-1, ICAM-1, ELAM-1), interferony β i γ , enzymy (lipoksygenaza 5, dysmutaza ponadtlenkowa, cyklooksygenaza-2). Inhibicja aktywności czynnika transkrypcyjnego NF- κ B powoduje spadek ekspresji genów kodujących wymienione powyżej białka [2, 10].

W badaniach wykazano, że kurkumina, poprzez hamowanie aktywności kinazy inhibitora NF- κ B (IKK), jest w stanie hamować aktywację czynnika NF- κ B, a w konsekwencji obniżać ekspresję genów, odpowiedzialnych za syntezę białek uczestniczących w procesach zapalnych. Do białek tych należą między innymi interleukina-8, cyklooksygenaza-2, izoformy syntazy tlenku azotu [2].

Proces nowotworzenia związany jest ze wzmożoną syntezą prostaglandyn. Cyklooksygenaza-2 wykazuje działanie antyapoptotyczne, wzmacnia proliferację komórek oraz hamuje syntezę cykliny D, przez co komórka ma problem w wejściu w fazę mitotyczną. Kurkumina jest w stanie hamować proliferację komórek nowotworowych w wyniku obniżenia ekspresji genów dla cyklin (A, B1) oraz kinaz zależnych od tych cyklin. Inhibitory COX indukują apoptozę komórek transformowanych nowotworowo, poprzez wzrost stężenia białek proapoptotycznych Bax i Bak oraz obniżenie stężenia białek antyapoptotycznych, takich jak Bcl-2 czy surwiwina [11].

7. Właściwości proapoptotyczne

Apoptoza, czyli genetycznie zaprogramowana śmierć komórki, to proces wpisany w prawidłowe funkcjonowanie organizmu. Odgrywa istotną rolę w utrzymaniu równowagi między proliferacją a degradacją uszkodzonych lub starzejących się komórek. Komórka pobudzana jest do apoptozy poprzez aktywację białek p53, Bax-Bcl-2 czy interakcje receptorów Fas-Fas ligand. Jednakże bezpośrednio za śmierć komórki odpowiada aktywacja kaskady kaspaz. Kaspazy, to grupa enzymów proteolitycznych, które w cytoplazmie występują w formie nieaktywnej. Do wewnątrzkomórkowej aktywacji proenzymów dochodzi także na skutek uszkodzenia integralności błony mitochondrialnej, przy udziale białek z rodziny Bcl-2. Duże nagromadzenie na zewnętrznej błonie mitochondrialnej białek proapoptotycznych indukuje tworzenie kanałów transportujących do cytozolu czynniki indukujące apoptozę, a także cytochrom c łączący się z Apaf-1 i prokaspazą 9, co w konsekwencji prowadzi do aktywacji kaskady kaspaz [12].

W badaniach wykazano, że kurkumina poprzez aktywację kaspazy-8 i kaspazy-3 indukuje rozpad białka Bid, podczas którego następuje uwolnienie cytochromu c z przestrzeni mitochondrialnej. W literaturze opisanych zostało wiele przykładów indukcji apoptozy w licznych liniach komórkowych (raka piersi, płuc nerek, wątroby, okrężnicy, jajników, a także liniach białaczkowych). Kurkumina jest w stanie indukować apoptozę zarówno na drodze szlaku zewnętrznego (komórki ludzkiego czerniaka), jak i mitochondrialnego (komórki linii HL-60) [2].

Białko p53, zwane także „strażnikiem genomu” (*guardian of the genome*), poprzez aktywację transkrypcji genu kodującego białko p21 jest w stanie doprowadzić do zahamowania cyklu komórkowego w celu naprawy uszkodzonego DNA lub indukcji zaprogramowanej śmierci komórki, czyli apoptozy. Transformacja nowotworowa prowadzi do rozregulowania funkcji białka p53. Zmutowana forma traci zdolność do wiązania DNA, przez co p21 nie może zostać zaktywowane, komórka nie dostaje sygnałów do zaprzestania podziałów i stale proliferuje [13]. Ponad połowa nowotworów wykazuje mutacje w genie p53. W badaniach wykazano, że kurkumina indukuje syntezę p53, przez co hamuje wzmożoną proliferację komórek.

8. Regulacja cyklu komórkowego

Rozregulowanie cyklu komórkowego ma niezwykle istotny wpływ na wszystkie etapy kancerogenezy, poczynając od inicjacji, na terminacji kończąc. Kurkumina może regulować nie tylko punkty kontrolne cyklu, ale także białka regulatorowe biorące udział w prawidłowej proliferacji komórkowej. Badania na wybranych liniach komórkowych wykazały, że substancja ta, wykazuje działanie antyproliferacyjne, nie tylko dzięki zdolności do indukowania procesu apoptozy, ale także zdolności do zatrzymania cyklu komórkowego w dowolnej fazie [3, 14].

Kurkumina posiada zdolność do zatrzymywania cyklu komórkowego, przede wszystkim w fazach G0/G1 i/lub G2/M. Główny mechanizm działania kurkuminy w zahamowaniu cyklu komórkowego polega na zwiększonej syntezie inhibitorów CDK, tj. p16INK4a, p27Kip1, p21Cip1, zahamowaniu syntezy cykliny D1, cykliny E oraz hiperfosforylacji białka Rb. Kurkumina stymuluje także degradację cykliny E na drodze proteolizy ubikwitynozależnej. Kurkumina oddziałuje także z fosfatazą cdc 25A, zaburza tworzenie kompleksu cykliny E/CDC2 i zatrzymuje cykl komórkowy w fazie G2/M [15]. Ponadto, kurkumina, hamując aktywność kinazy tymidynowej jest w stanie zatrzymać podział komórki w fazie S cyklu [14, 16].

Badanie prowadzone z wykorzystaniem płaskonabłonkowego raka głowy i szyi wykazały, że kurkumina, poprzez hamowanie ekspresji genów dla COX-2, cykliny D1, IL-6, Bcl-2 czy MMP-9, może zatrzymywać komórki w fazie G1/S cyklu. Kurkumina wpływa nie tylko na fazy G1/S cyklu komórkowego, ale także na fazę G2/M czy G0/G1, powodując zahamowanie syntezy DNA oraz indukcję apoptozy lub katastrofy mitotycznej, hamując tym samym rozwój komórek nowotworowych [7]. Antyproliferacyjne właściwości kurkuminy potwierdzono w badaniach na wielu rodzajach nowotworów, w tym raku płuc, piersi, prostaty, jelita grubego, głowy i szyi, białaczkach czy chłoniakach [15].

Wykazano, że kurkumina w stężeniu 5-10 μM istotnie hamowała proliferację szczurzych osteoblastów, nie indukując przy tym apoptozy, a prowadząc do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G1. Co więcej, substancja ta, stymulowała ekspresję mRNA dla p21WAF1/CIP1, którego białkowy produkt jest w stanie hamować aktywność cyklinozależnych kinaz oraz fosforylację histonu H1 [3, 17].

9. Wpływ na angiogenezę i przerzutowanie

Angiogeneza, zwana także neowaskularyzacją, to proces polegający na tworzeniu nowych naczyń krwionośnych na bazie już istniejących. W przebiegu różnych chorób, w tym chorób nowotworowych, zaobserwowano nadmierną angiogenezę. Nowopowstałe naczynia różnią się zdecydowanie od naczyń macierzystych. Są nieregularnego kształtu, wykazują też nietypowy

rozmiar, są niedojrzałe, kręte i rozdęte. Posiadają także liczne wypustki umożliwiające im wejście do światła naczyń. Połączenia między komórkami są bardzo szerokie, pojawiają się też liczne pory, co sprawia, że są o wiele bardziej przepuszczalne od naczyń prawidłowych. Odpowiednie ukrwienie w obrębie guza sprzyja przedostawaniu się komórek nowotworowych do krwiobiegu, co skutkuje zainicjowaniem procesu przerzutowania. Określenie liczby włosowatych naczyń krwionośnych w preparatach histopatologicznych z materiału pochodzenia nowotworowego ma niezwykle istotne znaczenie prognostyczne i diagnostyczne, umożliwiające określenie stopnia ryzyka tworzenia przerzutów [18].

Głównymi czynnikami indukującymi proces angiogenezy są: płytkowy czynnik wzrostu PDGF, angiopoetyna 1. i 2., czynnik martwicy nowotworu TNF- α , cytokiny, zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów bFGF, naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu VEGF. Kurkumina hamując ekspresję białek proangiogennych jest bezpośrednim inhibitorem neowaskularyzacji [16, 19].

Metaloproteinazy macierzy (MMP) to endopeptydazy zależne od cynku, posiadające zdolność degradacji składników macierzy pozakomórkowej, umożliwiając tym samym przerzutowanie komórek nowotworowych do miejsc odległych poprzez gęstą sieć naczyń krwionośnych i limfatycznych. W badaniach eksperymentalnych wykazano, że kurkumina jest w stanie skutecznie hamować aktywność żelatynazy A (MMP-2) w linii komórek czerniaka B16F10. Ponadto kurkumina w stężeniu 10 μ M obniżała migrację i zdolność do przerzutowania ludzkich komórek raka wątrobowo komórkowego linii SK-Hep-1, dzięki zahamowaniu wydzielania żelatynazy B (MMP-9) [3, 20, 21].

10. Kurkumina jako związek o właściwościach chemoprewencyjnych

Jednym z działań zmniejszającym ryzyko wystąpienia nowotworów, w którym pokłada się obecnie wielkie nadzieje, jest chemoprewencja. Termin ten został wprowadzony po raz pierwszy przez amerykańskiego uczonego Michaela B. Sporna w 1976 roku [22]. Chemoprewencja, w definicji Sporna, to „zapobieganie powstaniu nowotworu przez przyjmowanie nietoksycznych środków farmakologicznych lub naturalnych substancji obecnych w pożywieniu, które mogą zatrzymać lub spowolnić przebieg karcynogenezy czy też spowodować regresję już powstałych zmian” [11, 23]. Większość znanych i stosowanych związków chemoprewencyjnych to substancje pochodzenia roślinnego, charakteryzujące się znikomą toksycznością i brakiem niepożądanych efektów ubocznych [2].

Na etapie inicjacji i promocji procesu nowotworowego działanie związków chemoprewencyjnych polega na hamowaniu proliferacji komórek i replikacji DNA nasileniu procesów naprawczych w uszkodzonych cząsteczkach DNA, zapobieganiu wnikania mutagenów do komórek, unieczynnieniu działania mutagenów poprzez ich związanie, niszczeniu reaktywnych form tlenu oraz

hamowaniu metabolicznej detoksykacji premutagenów. Działanie związków chemoprewencyjnych na etapie progresji polega w głównej mierze na ich cytotoksycznej i cytostatycznej aktywności w stosunku do komórek nowotworowych. Ponadto, opiera się na licznych działaniach antyoksydacyjnych i proapoptotycznych, na hamowaniu procesów angiogenezy oraz tworzenia sieci naczyń krwionośnych [24].

Chemoprewencyjne właściwości kurkuminy ściśle związane są z inhibicją czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, AP-1, a także z zahamowaniem ekspresji genu *mdr-1* [2].

11. Właściwości neuroprotektcyjne kurkuminy

Badania epidemiologiczne wykazały, że kurkumina, podobnie jak niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ), obniża ryzyka wystąpienia choroby Alzheimera lub istotnie spowalnia postęp choroby. W odróżnieniu od tradycyjnych leków przeciwzapalnych kurkumina nie wywołuje skutków ubocznych, jest związkiem nietoksycznym i bezpiecznym podczas długotrwałego stosowania. W badaniach eksperymentalnych wykazano, że kurkumina już w bardzo niskich stężeniach jest w stanie hamować agregację β -amyloidu. Kurkumina, będąca związkiem o złożonym działaniu pleiotropowym, może okazać się doskonałym terapeutą stosowanym w chorobach o wieloczynnikowej etiologii, do których bez wątpienia należą choroby neurodegeneracyjne. Obecnie trwają badania kliniczne II fazy nad terapeutycznym wykorzystaniem kurkuminy u osób dotkniętych łagodną i umiarkowaną postacią choroby Alzheimera [2].

12. Podsumowanie

Wielokierunkowe działanie kurkuminy jest niezwykle istotne w leczeniu chorób o bardzo złożonej etiologii. Naukowcy są więc coraz bardziej zainteresowani doskonałymi właściwościami kurkuminy, a szczególnie ich wykorzystaniem w walce z rakiem, czy postępującą demencją w chorobie Alzheimera. Szczególne nadzieje upatruje się w związkach o działaniu chemoprewencyjnym, które cechuje duża dostępność, gotowość zastosowania, niski koszt użycia, a także niska cytotoksyczność w stosunku do komórek prawidłowych. Do związków tych, bez wątpienia należy opisana powyżej kurkumina, która wykazuje szeroką aktywność biologiczną, w tym właściwości przeciwutleniające, przeciwzapalne i proapoptotyczne. Ponadto, jest w stanie regulować cykl komórkowy oraz procesy angiogenezy i przerzutowania, przez co stanowi doskonałą alternatywę w zapobieganiu chorobom nowotworowym.

Literatura

1. Ożarowski A., Jaroniewski W., *Rośliny lecznicze i ich praktyczne zastosowanie*, Warszawa, Instytut Wydawniczy Związków Zawodowych, 1987;
2. Wolanin K., Piwocka K., *Kurkumina – od medycyny naturalnej do kliniki*, Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych, 2008, vol.1-2, s.53-65;
3. Szczepański M., Grzanka A., *Chemoprewencyjne i przeciwnowotworowe właściwości kurkuminy*, Nowotwory. Journal of Oncology, 2009, vol.59, s. 377-384;
4. Kiiuchi F., Goto Y. i wps., *Nematocidal activity of turmeric: synergistic action of curcuminoid*, Chem Pharm Bull, 1993, vol. 41, s. 1640-1643;
5. Żurkowska K., *Kurkumina: detoksykacja i ochrona wątroby*, Farmacja i ja, 2011, s. 48-50;
6. Radwańska-Wala B., Buszman E., Drużba D., *Udział reaktywnych form tlenu w patogenezie chorób ośrodkowego układu nerwowego*, Wiadomości lekarskie, 2008, vol.61, s.1-3;
7. Kalisz O., Wolski T., Gerkowicz M., Smorawski M., *Reaktywne formy tlenu (RFT) oraz ich rola w patogenezie niektórych chorób*, Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Lublin-Polonica, 2007, vol. 62, s. 1-13;
8. Scherrmann J. M., *Drug delivery to brain via the blood-brain barrier*, Vascular Pharmacology, 2002, vol. 38, s. 349–354;
9. Skórka K., Giannopoulos K., *Budowa i funkcje jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF kappa β (NF- κ) oraz jego znaczenie w przewlekłej białaczce limfocytowej*, Acta Haematologica Polonica, 2012, vol.43, s. 54-62;
10. Pahl H., *Activators and target genes of Rel/ NF-kappa β transtriprion factors*, Oncogene, 2012, vol.18, s. 6853-6866;
11. Szumiło J., Burdan F., Szumiło M., Lekwoicz D., Kedzierawska- Kurylcio A., *Inhibitory cykooksygenazy w chemoprewencji i leczeniu raka płaskonabłonkowego przełyku*, Pol Merk Lek, 2009, s.408-411;
12. Kopaczewska M., Kopaczewski B., *Apoptoza - genetycznie zaprogramowana śmierć komórki*, Nowiny Lekarskie, 2004, vol. 73, s. 389-392;
13. <http://bioinfo.mol.uj.edu.pl/articles/Slezak05>;
14. Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP, *Curcumin - the story so far*, Eur J Cancer vol.41, 1955-1968;
15. Ravindran J., Prasad S., Aggarwal B. B., *Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively?* The AAPS Journal, 2009, vol. 11, s. 495–510;
16. Szczepański M., Grzanka A., *Chemoprewencyjne i przeciwnowotworowe właściwości kurkuminy*, Nowotwory Journal of Oncology, 2009, vol 59, s.377-384;
17. Notoya M, Nishimiura H, Woo JT, *Curcumin inhibits the proliferation and mineralization of cultured osteoblast*, Eur J Pharmacol, 2006, vol. 534, 55-62;
18. Banyś A., Bułaś L., Długosz E., Szulc-Musiał B., Jankowski A., *Angiogeneza w chorobie nowotworowej*, Patofizjologia, 2009, vol. 65, s. 247-250;
19. Markowska J., Szala S., *Znaczenie angiogenezy w raku szyjki macicy. Czy ma związek z terapią tego raka?* Nowotwory J Oncol, 2005, vol. 5, s. 390-394;
20. Banerij A., Chakrabarti J., Mitra A., *Effect of curcumin on gelatinase A (MMP-2) activity in B16F10 melanoma cells*, Cancer Lett, 2004, vol. 211, s. 235-242;
21. Lin LI, Ke YF, Ko YC, *Curcumin inhibits SH-Hep-1 hepatocellular carcinoma cell invasion in vitro and suppress matrix metalloproteinase-9 secretion*, Oncology, 1998, vol.55, 349-353;

22. Cyranka M., Kapka L., Rzeski W., *Chemoprewencja nowotworów – perspektywy zastosowania w profilaktyce i terapii*, Zdr Publ; 2009, vol. 119, s. 223-227;
23. Sporn M.B., Suh N., *Chemoprevention of cancer*, Carcinogenesis, 2000, vol. 21, s. 525-530;
24. Olejnik A., Tomczyk J., Kowalska K., Grajek W., *Rola naturalnych składników diety w chemoprewencji nowotworów jelita grubego*, Postepy Hig Med Dosw, 2010, vol. 64, s. 175-187.

Antynowotworowe i chemoprewencyjne właściwości kurkuminy

Streszczenie

W ciągu ostatniego dziesięciolecia nastąpił wyraźny postęp w poznaniu i zrozumieniu mechanizmów biologii molekularnej nowotworów. Jednak jak dotąd, nikt nie odkrył cudownego leku na raka, który byłby w stanie wyeliminować tę niezwykle częstą i poważną chorobę. Alternatywę dla tradycyjnej chemioterapii stanowi chemoprewencja, czyli wykorzystanie substancji naturalnych lub syntetycznych w celu zahamowania, opóźnienia lub odwrócenia procesu transformacji nowotworowej. Chemoprewencja hamuje przede wszystkim wczesne etapy kancerogenezy, a mianowicie inicjację i promocję. Związki o charakterze chemoprewencyjnym charakteryzują się stosunkowo niską toksycznością oraz brakiem lub łagodnymi skutkami ubocznymi. Większość z nich to związki pochodzenia naturalnego, głównie roślinnego. Jednym ze związków o charakterze chemoprewencyjnym jest kurkumina - substancja zawarta w kłączach ostrzyżu długiego (*Curcuma Longa L.*), wykazująca szerokie spektrum aktywności biologicznej. W medycynie Dalekiego Wschodu, ze względu na swoje doskonałe właściwości lecznicze znana od ponad 4000 lat. Najszerzej udokumentowane i najlepiej poznane jest jej działanie przeciwnowotworowe i chemoprewencyjne, dlatego praca ta ma na celu przedstawienie biologicznych właściwości kurkuminy, z uwzględnieniem procesu transformacji nowotworowej.

Słowa kluczowe: kurkumina, ostrzyż długi, nowotworzenie, chemoprewencja.

Anti-cancer and chemopreventive properties of curcumin

Abstract

Over the last decade there has been significant progress in the knowledge and understanding of the mechanisms of molecular biology of cancer. But so far, no one has discovered a miraculous cure for cancer, which would be able to eliminate this extremely common and serious disease. An alternative to traditional chemotherapy is chemoprevention, ie the use of natural or synthetic substances to inhibit, delay or reverse the process of oncogenic transformation. Chemoprevention primarily inhibits the early stages of carcinogenesis, namely initiation and promotion. Chemopreventive compounds that have a relatively low toxicity and lack of side effects or mild. Most of them are compounds of natural origin, mainly plant. One chemopreventive compound is curcumin - a substance contained in a long turmeric (*Curcuma longa L.*), having a broad spectrum of biological activity. In medicine, the Far East, due to its excellent healing properties known for over 4,000 years. The most widely documented and best known is its anti-cancer and chemopreventive effects, which is why this work is to present the biological properties of curcumin, including the process of oncogenic transformation.

Keywords: curcumin, turmeric, carcinogenesis, chemoprevention

Karolina Gasińska¹, Tomasz Michalski², Anna Szajerska³, Paweł Binko⁴, Joanna Horbaczewska⁵, Milena Karpiarz⁶, Lidia Kotuła⁷

AUTYZM U DZIECI A MATCZYNE PRZECIWCIAŁA – CZY ISTNIEJE ZWIĄZEK?

1. Wprowadzenie

Autyzm jest ciężkim zaburzeniem rozwojowym, którego objawy zaczynają się pojawiać w przeciągu trzech lat od poczęcia lecz mogą występować tuż po urodzeniu. Istotą choroby jest występowanie nieprawidłowości w zakresie trzech sfer funkcjonalnych człowieka: interakcji społecznych, komunikacji oraz zachowania. Dawniej choroba ta traktowana była jako zespół chorobowy o podłożu psychicznym, jednak wraz z rozwojem wiedzy na jej temat obecnie opisywana jest szerzej i klasyfikowana łącznie z podobnymi zaburzeniami neurorozwojowymi jako spektrum autyzmu (ang. *Autism Spectrum Disorders*, ASD). Zalicza się do niego wszystkie choroby, którym towarzyszą objawy w/w. triady zaburzeń, tj. autyzm, zaburzenie Aspergera i nieswoiste całościowe zaburzenia rozwojowe [1].

2. Epidemiologia

Przez wiele lat autyzm był rzadką chorobą, występującą z częstością około 5 na 10 000 osób. Jednakże od początku wczesnych lat 90-tych, liczba ta zaczęła znacznie wzrastać i obecnie wynosi 60-70 przypadków na 10 000 osób. Choroba występuje częściej u chłopców (4:1), lecz u dziewczynek charakteryzuje się cięższym przebiegiem [2].

¹ karolina.gasinska@onet.eu, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, i Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Studenckie Koło Naukowe Genetyki Medycznej przy Zakładzie Genetyki Klinicznej;

² poolak47@gmail.com, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, i Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Klinice Rehabilitacji i Ortopedii;

³ szajer@poczta.onet.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, II Wydział Lekarski z Oddziałem Angiojęzycznym, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Klinice Kardiologii;

⁴ pawele90@gmail.com, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, i Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Klinice Kardiologii;

⁵ joanna.horbaczewska@gmail.com, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, II Wydział Lekarski z Oddziałem Angiojęzycznym, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Klinice Kardiologii;

⁶ milenakarpiarz@wp.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, II Wydział Lekarski z Oddziałem Angiojęzycznym, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Klinice Kardiologii;

⁷ zgkumlub@wp.pl, i Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Zakład Genetyki Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie;

3. Przyczyny

Właściwa przyczyna zachorowań na autyzm jest dotychczas nieznana, lecz badania wykazały istnienie kilku prawdopodobnych czynników, takich jak: dziedziczność, zaburzenia metaboliczne i neurologiczne, pewne typy infekcji oraz komplikacje okołoporodowe [3].

Ostatnio szczególnie zwraca się uwagę na predyspozycje genetyczne, co oznacza, iż pewna grupa ludzi może dziedziczyć skłonność do zachorowania na autyzm od rodziców. Wykazano większą częstość występowania autyzmu u obu bliźniąt jednojajowych oraz większe prawdopodobieństwo wystąpienia zaburzeń rozwoju i zaburzeń poznawczych u krewnych osób autystycznych. Trwają obecnie badania nad lokalizacją genów, przyczyniających się do rozwoju choroby. Autyzmowi towarzyszą ponadto inne zaburzenia genetyczne, takie jak: zespół kruchego chromosomu X, stwardnienie guzowe i fenyloketonuria [4].

Zaobserwowano, że dzieci, u których stwierdzono autyzm, miały gorsze warunki życia płodowego i porodu. Wymienia się tutaj najczęściej komplikacje w trakcie ciąży, między innymi: drgawki, nadciśnienie, białkomocz, utratę poprzedniej ciąży, zaawansowany wiek rodziców, cukrzycę oraz przyjmowanie leków przez matkę w okresie prenatalnym [4].

Czynniki neurologiczne również uznawane są za jedną z przyczyn autyzmu. Badania obrazowe wykazują nieprawidłowości budowy struktur mózgu (MRI) oraz zaburzenia jego funkcjonowania (EEG) [4]. Dzieci z autyzmem mają ponadto zaburzony schemat rozwoju CUN. We wczesnym dzieciństwie ich mózgi rosną szybciej i osiągają większe rozmiary niż u rówieśników, jednak w późniejszym okresie życia, gdy zdrowe dzieci wchodzi w etap intensywnego rozwoju i organizacji struktur CUN, mózgi dzieci autystycznych rozwijają się o wiele wolniej [3].

Nie odnaleziono dotychczas żadnych obiektywnych dowodów, potwierdzających teorię o psychicznym podłożu tego schorzenia. Nie potwierdzono również w badaniach klinicznych związku pomiędzy szczepieniami, zwłaszcza szczepionką MMR, a autyzmem [4].

4. Objawy

Objawy autyzmu pojawiają się zazwyczaj zanim dziecko ukończy 3 r. ż. i trwają przez całe życie. Ich nasilenie może być zróżnicowane, od łagodnego do ciężkiego stopnia, uniemożliwiającego jakiekolwiek funkcjonowanie w społeczeństwie [3]. Czasami spotyka się trudności w uchwyceniu początku choroby, zwłaszcza u małych dzieci, gdzie może ona mieć zróżnicowany przebieg i stopień nasilenia oraz trudno jest odróżnić zachowanie prawidłowe od nietypowego. Objawy mogą pojawiać się tuż po urodzeniu a jeśli występują między 2 a 3 r.ż., choroba ma zazwyczaj łagodniejszy przebieg. Pełny obraz autyzmu obserwuje się u dzieci w wieku 2-5 lat [5].

Chorzy prezentują zaburzenia w zakresie 3 głównych grup objawów:

- komunikacja – trudności w komunikacji werbalnej, wliczając problemy z posługiwaniem się i rozumieniem języka; niezdolność uczestniczenia w konwersacji, nawet jeśli dziecko potrafi mówić; trudności w komunikacji niewerbalnej, takie jak zubożenie lub brak gestów i mimiki twarzy;
- interakcje społeczne – trudności w nawiązywaniu kontaktów koleżeńskich; preferencje do samotności; słabe zdolności naśladowania innych, bierność;
- zachowanie i zainteresowania – nietypowe sposoby bawienia się zabawkami i innymi przedmiotami, np. układania ich wg określonego schematu; trudności w dostosowywaniu się do zmian w najbliższym otoczeniu; stereotypowe, powtarzalne zachowania; nietypowe reakcje na dźwięki i smaki; brak wrażliwości na ból, zimno, gorąco [3].

5. Leczenie

Nie ma możliwości całkowitego wyleczenia autyzmu, lecz wcześniej wdrożone właściwe postępowanie może poprawić stan dziecka, ponieważ choroba rozwija się w pierwszych trzech latach jego życia. Najwięcej korzyści przynoszą terapie behawioralne, czyli programy dla bardzo małych dzieci jak np. Early Start Denver Model (ESDM) [4].

Pojawiły się doniesienia o skuteczności suplementacji diety (witaminy, antyoksydanty, kwasy omega-3), aczkolwiek brak jak do tej pory większych randomizowanych badań, które by potwierdziły skuteczność i bezpieczeństwo takiego leczenia [4].

Wykazano również szereg nieprawidłowości, dotyczących poziomu neuroprzekazników, neuropeptydów i endorfin. Podanie leków hamujących wydzielanie dopaminy przyczynia się do ograniczenia występowania ruchów stereotypowych i samookaleczenia, zaś wykrycie roli oksytocyny w modulowaniu zachowań społecznych skłania do rozważenia włączenia jej do terapii [4].

Wiele osób z autyzmem wykazuje dodatkowe zaburzenia, takie jak drgawki, nietolerancja pokarmowa, epilepsja czy zaburzenia snu, co wymaga wdrożenia właściwego schematu leczenia objawowego [4].

6. Matczyne przeciwciała a autyzm – wyniki badań

Dalton i wsp. [2003] przeprowadzili badania, mające na celu potwierdzenie hipotezy, że zaburzenia neurorozwojowe mogą być spowodowane przez przeciwciała matczyne. Surowicę krwi pobrano od 38-letniej kobiety, mającej troje dzieci: 9-letniego, zdrowego chłopca, 8-letnią dziewczynkę z zaawansowanymi objawami autystycznymi oraz 6-letniego chłopca z poważnymi, specyficznymi zaburzeniami mowy. Dzieci były poddane niezależnej ocenie klinicznej trzech specjalistów z dziedziny pediatrii. Rodzice matki byli zdrowi.

Grupę kontrolną w badaniu stanowiły 4 kobiety, które posiadały zdrowe dzieci. Surowicę krwi matek wstrzykiwano myszom w trakcie ciąży w dawce 0,5 ml/dzień, a następnie w drugiej części eksperymentu w dawce 1,0 ml/dzień. Potomstwo myszy urodziło się w sposób naturalny. Cechy takie jak: przyrost masy ciała, otwieranie oczu, preferencja ciemności nad światłem siła mięśniowa, aktywność na przyspieszającym drążku wirnika oraz pamięć nie różniły się pomiędzy potomstwem myszy z grupy badawczej i kontrolnej. Jednakże w grupie badawczej zaobserwowano niewielkie spowolnienie odruchów wyprostnych, obniżoną wytrzymałość w testach fizycznych, wydłużenie czasu reakcji na zmiany w otoczeniu.

W potomstwie myszy, które otrzymały surowicę od matki posiadającej chore dzieci wykazano zmiany w badaniu MRI mózdzku oraz koordynacji ruchowej, w porównaniu z potomstwem myszy, którym podano surowicę od matek zdrowych dzieci. Zmiany te spowodowane były silnym wiązaniem się IgG obecnych we wstrzykiwanej surowicy z cytoplazmą mózdkowych komórek Purkiniego i niektórymi dużymi neuronami pnia mózgu u rozwijających się myszy. IgG miały również wysokie powinowactwo do łączenia się z powierzchnią komórek linii NB-1 (*ang. neuroblastoma*). IgG surowicy z grupy kontrolnej nie wiązały się preferencyjnie z żadnymi strukturami mózgowymi.

Wskaźnik intensywności fluorescencji wynosił $4,9 \pm 2,3$ w grupie badawczej i $2,0 \pm$ w grupie kontrolnej. W 9-tym miesiącu życia myszy przeprowadzono badanie obrazowe mózdzku oraz użyto MRS (*ang. Magnetic Resonance Spectroscopy*). Jest to metoda analityczna, która pozwala na identyfikację i pomiar ilościowy metabolitów w danych próbkach. Odnotowano umiarkowaną redukcję stężenia choliny i kreatyny u myszy, których matki pochodziły z grupy badawczej. Wyniki tego badania potwierdziły hipotezę, że niektóre zaburzenia neurorozwojowe mogą być spowodowane poprzez transport przeciwciał matki przez łożysko. Przeciwciała te wpływają następnie na rozwój mózgu płodu. Chociaż w rodzinie matki, która urodziła chore dzieci, istniały przypadki zaburzeń autystycznych i opóźnienia mowy, obecność patogennych przeciwciał w surowicy, powodujących zmiany u potomstwa myszy, wskazuje, w patogenezie autyzmu znaczenie mają nie tylko czynniki genetyczne, ale również matczyne przeciwciała. Przeprowadzone badanie nie dowodzi jednak, że matczyne przeciwciała są odpowiedzialne za wszystkie przypadki autyzmu czy innych zaburzeń rozwojowych [6].

Zimmerman i wsp. [2006] podzielili uczestników badania na 6 grup. Grupę I stanowiły matki dzieci z autyzmem – 11 matek w wieku od 30 do 48 lat (średni wiek 36,8 lat) zrekrutowano w Developmental and Genetic Center of the University of Tennessee Medical Center, Knoxville (UTMCK). Trzy spośród nich miały chorobę autoimmunologiczną – reumatoidalne zapalenie stawów i toczень rumieniowaty układowy. Podczas ciąży 2 matki były leczone lekami immuno-modulującymi (azatiopryna, prednizon). Żadna z kobiet nie

przyjmowała leków wpływających na produkcję przeciwciał. W grupie II znajdowały się matki, które urodziły zdrowe, typowo rozwijające się dzieci – 10 matek w wieku od 31 do 41 lat (średni wiek 34,2 lata) zostało wybranych spośród społeczności East Tennessee. W ich rodzinach nie było przypadków zaburzeń rozwojowych. Kobiety nie przyjmowały również żadnych leków i były w dobrym ogólnym stanie zdrowia, bez obciążenia chorobami autoimmunologicznymi.

Do grupy III zakwalifikowano dzieci z autyzmem (Grupa I): 12 chłopców w wieku od 2 do 18 lat (średni wiek 8,8 lat). Podzielono je na dwie podgrupy – z ciężkim autyzmem (IQ < 70) i łagodnym autyzmem (IQ > 70), używając klasyfikacji zaburzeń psychicznych Amerykańskiego Towarzystwa Psychiatrycznego DSM-IV (*ang. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*), a także CARS (*ang. Childhood Autism Rating Scale*). Dzieci nie przyjmowały żadnych leków wpływających na układ odpornościowy i nie posiadały chorób autoimmunologicznych. U dwojga występowała epilepsja. Grupę IV stanowiły dzieci z innymi zaburzeniami neurorozwojowymi – 14 chłopców w wieku od 4 do 14 lat (średni wiek 8,7 lat) było ocenianych w Developmental and Genetic Center UTMCK przez genetyków klinicznych. Diagnostyka obejmowała ADHD, opóźnienie rozwojowe, makrocefalię, apraksję w mowie, zespół Smith–Lemli–Opitz i zespół łamliwego chromosomu X. Żadne dziecko nie przyjmowało leków i nie miało choroby autoimmunologicznej. W grupie V umieszczono rodzeństwo dzieci z autyzmem – 10 prawidłowo rozwijających się dzieci – 5 dziewczynek i 5 chłopców w wieku od 6 do 14 lat (średni wiek 8,8 lat), nie związanych pokrewieństwem z Grupą I i III. Ci badani nie przyjmowali żadnych leków ani nie mieli rozpoznanych chorób immunologicznych.

Grupa VI utworzona była przez czwórkę prawidłowo rozwijających się dzieci – 2 dziewczynki i 2 chłopców w wieku od 9 do 11 lat (średni wiek 9,5 lat), niezwiązanych z matkami z grupy kontrolnej. Dzieci nie otrzymywały leków i nie posiadały chorób immunologicznych. Podczas badania przetestowano reaktywność surowicy krwi od osób z poszczególnych grup z białkami mózgów szczurzych w okresie prenatalnym, postnatalnym oraz osobników dorosłych, wykorzystując metodę immunoblottingu. Podobne wzory reaktywności względem białek prenatalnych, lecz nie postanatalnych i dorosłych mózgów szczurzych zidentyfikowano u dzieci z autyzmem, ich matek o dzieci z innymi zaburzeniami neurorozwojowymi. Wyniki te różniły się od otrzymanych u matek zdrowych dzieci, zdrowego rodzeństwa dzieci z autyzmem i zdrowych dzieci, u których w rodzinie nie występował autyzm. Jak wykazały późniejsze badania, specyficzne wzory reaktywności przeciwciał były obecne w surowicy krwi matek dzieci z autyzmem przez okres od 2 do 18 lat po porodzie. Badanie techniką immunoblottingu używając specyficznych antygenów MBP (*ang. Myelin Basic Protein*) oraz GFAP (*ang. Glial Acidic Fibrillary Protein*)

sugeruje, że białka te nie są celami matczynych przeciwciał. Identyfikacja charakterystycznych IgG w surowicy krwi matek, których dzieci chorowały na autyzm, rozpoznających antygeny mózgowe o ekspresji prenatalnej pozwala przypuszczać, iż te przeciwciała mogą przenikać przez łożysko i powodować zmiany w rozwoju mózgu płodu [7].

Nowsze badania, przeprowadzone przez Bauman'a i wsp. [2013] dostarczają również interesujących danych. Od 246 matek dzieci chorujących na autyzm pobrano surowicę krwi, z której następnie wyizolowano przeciwciała. IgG wykazywały autoreaktywność w stosunku do płodowych białek mózgu o masie 73 i 38 kDa. Grupę kontrolną stanowiła surowica krwi pochodząca od 149 matek zdrowych dzieci. Do analizy reaktywności białek mózgu u płodu użyto metody western blot. W badaniu wzięły udział 24 samice wieloródki z gatunku rehus makak (łac. *Macaca mulatta*) w wieku od 6 do 16 lat (średni wiek 11 lat). W zależności od płci potomstwa, ciężarne małpy podzielono na 3 grupy badawcze: I grupa, w której znajdowało się 8 zwierząt, po 4 z każdej płci, otrzymała IgG matek dzieci z autyzmem. II grupa, licząca 8 zwierząt – 3 płci męskiej i 5 płci żeńskiej otrzymała IgG matek dzieci o prawidłowym rozwoju, natomiast III grupa, licząca 8 osobników, po 4 z każdej płci, stanowiła grupę kontrolną. Oczyszczone IgG, rozcieńczone w 3 ml soli fizjologicznej było wstrzykiwane dożylnie. Zwierzęta uprzednio poddano sedacji z użyciem ketaminy ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) w 30., 44., 58., 72., 86. i 100. dniu ciąży. W ciągu dwóch lat prowadzono ocenę mózgu i rozwoju behawioralnego potomstwa samic. Małpy, których matki otrzymały surowicę krwi ze specyficznymi przeciwciałami wykazywały znaczące odchylenia od typowych dla swojego gatunku zachowań społecznych. Badanie MRI ujawniło, że potomstwo płci męskiej miało powiększoną objętość mózgu w porównaniu z grupą kontrolną. Analiza statystyczna udowodniła, że 23% matek, których dzieci urodziły się z autyzmem, posiadało krążące w surowicy krwi przeciwciała z powinowactwem do co najmniej dwóch białek mózgowych, podczas gdy immunoglobuliny te były obecne tylko u 1% matek zdrowo urodzonych dzieci. Specyficzność do rozwoju autyzmu tych przeciwciał wynosi ponad 99%, co oznacza mniej niż 1 na 100 wyników fałszywie pozytywnych w trakcie badań [8].

Braunschweig i wsp. [2013] przeprowadzili badania w University of California, Davis, dzięki którym odkryli w surowicy ciężarnych matek zestaw autoprzeciwciał, indukujących odpowiedź immunologiczną przeciwko strukturom płodu. do analiz wykorzystali surowicę krwi 61 matek dzieci z autyzmem oraz 102 matek dzieci bez autyzmu. Dzieci zostały podzielone na trzy podgrupy: chore na autyzm (AU, 61 badanych), z zaburzeniami rozwojowymi bez autyzmu (DD, 40 badanych) oraz prawidłowo rozwijające się (TD, 62 badanych). Przeciwciała matczyne przeciwko białkom mózgu obecne w surowicy krwi zostały przeanalizowane za pomocą metody western blot w grupie badawczej i kontrolnej. Zaobserwowano ich reaktywność względem dwóch łańcuchów białkowych o masie 73 i 37 kDa w surowicy 7 z 61 matek

(11,5%) dzieci AU, natomiast w żadnej surowicy matek dzieci DD i TD. Ponadto powinowactwo przeciwciał względem białek mózgu było związane z regresją behawioralną dzieci AU, czego nie stwierdzono u dzieci DD i TD. Dalsze badania dowiodły, że przeciwciała te łączą się z sześcioma konkretnymi białkami występującymi w mózgu i biorącymi udział w jego rozwoju. STIP1 (ang. *Stress-Induced Phosphoprotein*) wpływa np. na tworzenie nowych neuronów a cypina na liczbę odgałęzień jakie wytworzą. CRMP1 i CRMP2 (ang. *Collapsin Response Mediator Proteins*) hamują dalszy rozrost neuronów determinując w ten sposób ich długość. YBX1 (ang. *Y-Box-Binding*) jest zaangażowane w proces transkrypcji oraz migrację neuronów w trakcie rozwoju dziecka. Funkcja białka LDH jest jak do tej pory najmniej poznana w patogenezie z całej szóstki, ale wydaje się być najbardziej związana z rozwojem autyzmu. Podejrzewa się, iż bierze udział w metabolizmie lub w odpowiedzi na infekcję wirusową czy toksyny. Obecność przeciwciał przeciwko wymienionym białkom w surowicy niektórych matek dzieci chorych na autyzm może sugerować istnienie związku pomiędzy przechodzeniem IgG przez łożysko podczas wczesnego okresu neurorozwojowego i stanowić czynnik ryzyka wystąpienia autyzmu u potomstwa [9].

7. Podsumowanie

Przedstawione powyżej wyniki badań wskazują na zależność pomiędzy obecnością przeciwciał w organizmie ciężarnej matki a rozwojem objawów autyzmu u potomstwa. Pozostaje jednakże wiele niewyjaśnionych zjawisk. Matczyne IgG są wykrywane w płodowym krążeniu już od 13 tygodnia ciąży, tj. czasu, w którym zachodzi intensywna neurogeneza i migracja neuronalna. Nawet najdrobniejsza zmiana i ingerencja w naturalny przebiegu tych procesów może dramatycznie wpłynąć na dalszy rozwój układu nerwowego. Nie wiadomo dotychczas, dlaczego i kiedy dokładnie powstają przeciwciała, przyczyniające się do rozwoju autyzmu u dziecka. Ich obecność potwierdzono w ciągu całego okresu trwania ciąży. W niektórych przypadkach utrzymywały się nawet do 18 lat po urodzeniu chorego dziecka. Nieznane jest również z jakiego powodu ekspozycja na badane przeciwciała zmienia objętość mózgu jedynie u osobników płci męskiej, podczas gdy wpływ na zachowanie obserwuje się u przedstawicieli obu płci. Ponadto ciągle nie opisano mechanizmu powodującego powiększenie mózgu w obecności autoprzeciwciał [8].

Obiecujących możliwości dostarczają badania, przeprowadzane na małpach z gatunku rezus makak. Dzięki nim istnieje szansa na opracowanie diagnostycznej procedury, oceniającej realne czynniki ryzyka rozwoju autyzmu. Ponadto przewiduje się, iż w niedalekiej przyszłości powstaną skuteczne modele terapii oraz profilaktyki, które będzie można wprowadzać już u najmłodszych pacjentów. Konieczne są zatem dalsze badania, prowadzące do identyfikacji

komórkowego i molekularnego podłoża nieprawidłowego rozwoju mózgu. Odkrycie to pozwoli wyjaśnić patomechanizm przynajmniej części zaburzeń wchodzących w skład ASD, a tym samym wyznaczy kierunek opracowywania skutecznych leków, które zapobiegą lub ograniczą częstość występowania autyzmu [8].

Literatura

1. Autyzm [online], [dostęp 10 lutego 2014]. Dostępny w World Wide Web: <http://www.autyzmasd.pl/>;
2. Mumper, E., *Prognosis*, Autism Research Institute [online], [dostęp 10 lutego 2014]. Dostępny w World Wide Web: <http://www.autism.com/index.php/prognosis>;
3. *Autism Symptoms, Causes, Treatment, and More*, WebMD [online], [dostęp 10 lutego 2014]. Dostępny w World Wide Web: <http://www.webmd.com/brain/autism/mental-health-autism>;
4. *Przyczyny wystąpienia autyzmu*, Autyzm [online], [dostęp 10 lutego 2014]. Dostępny w World Wide Web: <http://www.autyzmasd.pl/przyczyny.php>;
5. *Objawy i przebieg autyzmu*, Autyzm [online], [dostęp 10 lutego 2014]. Dostępny w World Wide Web: <http://www.autyzmasd.pl/objawy-przebieg.php>;
6. Dalton P., Deacon R., Blamire A., et al., *Maternal Neuronal Antibodies Associated with Autism and a Language Disorder*, *Annals of Neurology*, 2003 vol. 54, s. 533-537;
7. Zimmerman A., Connors S., Matteson K., et al., *Maternal antibrain antibodies in autism*, *Brain, Behavior, and Immunity*, 2007 vol. 21, s. 351–357;
8. Bauman M., Ashwood P., Braunschweig D., et al., *Maternal antibodies from mothers of children with autism alter brain growth and social behavior development in the rhesus monkey*, *Translational Psychiatry*, 2013 vol. 3, s. 278;
9. Braunschweig D., Krakowiak P., Duncanson P., et al., *Autism-specific maternal autoantibodies recognize critical proteins in developing brain*, *Translational Psychiatry*, 2013 vol. 3, s. 277;

Autyzm u dzieci a matczyne przeciwciała – czy istnieje związek?

Streszczenie

Początkowo autyzm był traktowany jako zespół chorobowy o podłożu psychicznym. Obecnie wiadomo, że jest to zaburzenie rozwojowe charakteryzujące się występowaniem nieprawidłowości w zakresie trzech sfer funkcjonowania człowieka: interakcji społecznych, komunikacji oraz zachowania. Częstość występowania autyzmu szacuje się na 60-70 przypadków na 10 000 osób. Większe ryzyko zachorowania występuje u płci męskiej. Celem pracy jest analiza związku między rozwojem autyzmu u dzieci a wytwarzanymi przez matkę przeciwciałami w czasie ciąży. Przeprowadzono dotychczas liczne badania poświęcone temu zagadnieniu. Udowadniają one, że zaburzenia neurorozwojowe potomstwa mogą być spowodowane atypową odpowiedzią immunologiczną organizmu matki w okresie prenatalnym. Według badań immunoglobuliny po przeniknięciu łożyska wiązały się z sześcioma białkami, odpowiedzialnymi w różnym stopniu za rozwój mózgu: STIP1 (ang. *Stress-Induced Phosphoprotein*), cypiną, CRMP1 i CRMP2 (ang. *Collapsin Response Mediator Proteins*), YBX1 (ang. *Y-Box-Binding*) oraz dehydrogenazą mleczanową (ang. *Lactate Dehydrogenase*, LDH). Mierzona aktywność specyficznych przeciwciał utrzymywała się w surowicy krwi matki od 2 do 18 lat po porodzie. Dzięki metodom immunoblottingu i immunocytochemicznym zbadano obecność przeciwciał przeciwko ludzkim nerwowym komórkom progenitorowym w surowicy krwi dzieci z autyzmem i porównano z wynikami uzyskanymi u zdrowych dzieci. Badania te ujawniły znacznie wyższą

aktywność immunoglobulin u dzieci chorych. Dokładne poznanie mechanizmów rozwoju zaburzeń neurorozwojowych u dziecka w okresie ciąży stwarza szansę na opracowanie skutecznych metod profilaktycznych, które pozwolą uchronić dziecko przed zachorowaniem. Dlatego konieczne są dalsze badania dotyczące autyzmu.

Słowa kluczowe: autyzm, dzieci, przeciwciała, matka

Autism in children and mother's antibodies – is there a relation?

Abstract

Initially autism was treated as a mentally motivated syndrome. Currently, it is known that it is developmental disorder characterized by occurrence of abnormalities in 3 areas of human functioning: social interactions, communication and behavior. Autism prevalence rate is estimated to be 60-70 cases per 10 000 people. Higher risk of disease occurs in males. The aim of the work is to analyse the relation between development of autism in children and antibodies created by mother during pregnancy. Numerous research concerning this issue have been conducted. They prove that neurodevelopmental disorders of offspring may be caused by atypical immunological response of mother's organism in prenatal period. According to research after transferring into placenta immunoglobulins bind to 6 proteins responsible for brain development: STIP1 (*Stress-Induced Phosphoprotein*), cypin, CRMP1 and CRMP2 (*Collapsin Response Mediator Proteins*), YBX1 (*Y-Box-Binding*) and lactate dehydrogenase (LDH). Measured activity of specific antibodies persisted in mother's serum from 2-18 years after birth. Owing to immunoblotting and immunocytochemical methods, researchers examined presence of antibodies acting against human progenitor nerve cells in blood serum of children with autism and compared with results obtained in healthy children. The research have shown much higher activity of immunoglobulins in disordered children. Exact recognition of mechanisms of neurodevelopmental disorders development in a child during pregnancy gives a chance to create effective prophylactic methods which will allow to protect a child from the disorder. That is why further research on autism are necessary.

Keywords: autism, children, antibodies, mother

Paulina Chwil¹, Karol Terlecki², Paulina Sobstyl, Jan Sobstyl, Lidia Kotuła, Katarzyna Schab, Magdalena Amarowicz, Marcin Urbańczuk, Dominika Mulawka, Paulina Mulawka

CUKRZYCA CIĄŻOWA. CZY NADAL STANOWI PROBLEM?

1. Wstęp

Ciąża jest szczególnym okresem w życiu każdej kobiety. Czekając na narodziny nowego życia wiele przyszłych matek musi zmagać się z nowymi przeszkodami, jakie stawia przed nimi ich organizm. Cukrzyca ciążowa (*Gestational Diabetes Mellitus* – GDM) według definicji Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego jest to zaburzenie tolerancji węglowodanów lub cukrzyca rozwijające się, lub po raz pierwszy rozpoznane w czasie ciąży [1]. Najczęściej ustępuje po jej zakończeniu [6]. Jednostka ta stanowi jedną z częściej spotykanych przyczyn powikłań w czasie ciąży i dotyczy nawet 78-88% wszystkich ciąż powikłanych cukrzycą [6]. Szacuje się, że u 30-45% ciężarnych z GDM po okresie 15 lat rozwinię się cukrzyca typu II [2], ryzyko wystąpienia tego powikłania wynosi aż 50% [3]. Niemniej istotny jest fakt, że GDM u około 30% występuje powtórnie w czasie kolejnej ciąży [2].

Zgodnie z klasyfikacją wyróżniamy cukrzycę ciążową typu G1 i G2. Pierwszym typem określamy stan, gdy pacjentce udaje się utrzymać prawidłowy poziom glikemii przy odpowiedniej diecie pomimo zaburzonej tolerancji glukozy. W typie G2 z kolei stan zdrowia chorej wymaga insulinoterapii i specjalistycznej diety z racji występującej u niej hiperglikemii na czczo lub po jedzeniu.

Różni autorzy podają, że cukrzyca ciążowa dotyczy od 3 do 5% kobiet ciężarnych [2] lub zakres ten wynosi 1-10% [6]. Natomiast różne zaburzenia gospodarki cukrowej występują u kobiet, które stanowią od 1 do 14% [4]. Opisywana jednostka w przeważającej części występuje u pacjentek, u których przed ciążą stwierdzono zaburzenia wydzielania insuliny oraz cechy insulinooporności [3]. Należy pamiętać, że do grupy z *Gestational Diabetes Mellitus* trzeba zaliczyć również te kobiety, które cierpiały na cukrzycę przed poczęciem dziecka, jednak choroba nie była u nich wtedy zdiagnozowana [1]. W Polsce problem GDM dotyczy od 0,7 do 12,3% (średnio 2-4%) ciężarnych [6.]

Wahania poziomu glikemii u ciężarnej i związane z tym zmiany homeostazy jej organizmu mają wpływ na rozwijający się płód. GDM towarzyszy szereg zaburzeń

¹ paulina.chwil@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe Genetyki Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Zakład Genetyki Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie ul. Radziwiłłowska 11 20-080 Lublin;

² karol.terlecki@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe Genetyki Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym, Zakład Genetyki Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie ul. Radziwiłłowska 11 20-080 Lublin;

metabolicznych, w tym gospodarki lipidowej u matki, a także jest przyczyną makrosomii płodu (masa przekraczająca 4000 g, 4200 g lub 4500 g [5]) lub *Large of Gestational Age* (LGA), gdzie nadmierny ciężar płodu przekracza 90 centyl lub dwa odchylenia standardowe masy należnej dla danego wieku ciążowego. Należy odróżniać hipertrofię związaną z GDM, gdzie powiększeniu ulega głównie głowa oraz obręcz barkowa dziecka, od obejmującej głowę i cały tułów hipertrofii u noworodków rodzonych przez matki wolne od cukrzycy ciążowej. Powyższe zaburzenia rozwojowe płodu występują z 10-krotnie większą częstością u matek z GDM niż u w populacji ogólnej [6]. Z hipertrofią związane są trudności okołoporodowe takie jak wzrost konieczności rozwiązywania ciąży przez cięcia cesarskie, czy też urazy okołoporodowe [1] np. dystocja barkowa przy porodach siłami natury [6], wielowodzie (poliuria płodowa [6]), EPH- gestozy i niska punktacja w skali APGAR. Do innych znacznie poważniejszych konsekwencji niekontrolowanej hiperglikemii i niedoboru insuliny ciężarnych zaliczamy: przedwczesny poród, niedotlenienie i kwasica u płodu, wady rozwojowe, a także martwe urodzenia. Do najczęściej spotykanych wad zalicza się wady serca i ośrodkowego układu nerwowego [2].

2. Patogeneza Gestational Diabetes Mellitus

Podczas ciąży dochodzi do wydzielania antagonistów insuliny takich jak laktogen łożyskowy (hPL z ang. *human placental lactogen*) i do wzmożonego unieczynnienia insuliny spowodowanego aktywnością insulinazową łożyska [2, 6]. Ukształtowanie łożyska w GDM (gruba pępowina i zróżnicowana dojrzałość kosmków [6]) sprzyja przenikaniu dużych ilości substancji odżywczych do krwiobiegu płodowego, co dodatkowo wpływa na zwiększanie masy ciała. W efekcie występuje insulinooporność (postreceptorowa) i wzmożone zapotrzebowanie na ten hormon. Okres między 24. a 28. tygodniem to czas, kiedy najczęściej dochodzi do wyczerpania możliwości adaptacyjnych komórek β trzustki matki i zaburzeń w kontrolowaniu glikemii, zwłaszcza u kobiet, które już przed ciążą miały uwarunkowane predyspozycje do zaburzeń przemian węglowodanowych.

Tabela 1. Czynniki ryzyka Gestational Diabetes Mellitus

Czynniki ryzyka GDM	
Ciąża u kobiety powyżej 35. roku życia	Matka przed ciążą z wysokim BMI $>27 \text{ kg/m}^2$
Urodzenie dzieci o masie $> 4000\text{g}$ z poprzednich ciąży	GDM w wywiadzie podczas wcześniejszych ciąży
Urodzenie dziecka z wadą wrodzoną	Śmierć wewnątrzmaciczna płodu
Cukrzyca typu 2 w wywiadzie rodzinnym	

Źródło: opracowanie własne przy wykorzystaniu [2]

Glukoza przenika przez łożysko do krwi płodu, insulina produkowana przez matkę nie przekracza bariery krew matka- płód. Przy hiperglikemii u ciężarnej, również w organizmie płodu dochodzi do patologicznego wzrostu stężenia glukozy we krwi i do przerostu wysp Langerhansa oraz nadprodukcji insuliny (hiperinsulinemia płodowa) [2]. Hormon ten jest substancją działającą anabolicznie, co ostatecznie prowadzi do wspomnianej wcześniej makrosomii płodu i wszelkich konsekwencji z nią związanych.

W etiopatogenezie GDM można brać pod uwagę genetyczne podłoże choroby. U większości chorych bowiem zidentyfikowano genotyp HLA DR3 i DR4 [6].

Z danych literaturowych wynika, że częstość występowania cukrzycy ciążowej zależy również od:

- wykonywania testów przesiewowych;
- poziomu opieki zdrowotnej;
- czynników rasowych i czynników środowiskowych;
- sposobu życia;
- sposobu odżywiania się;
- zachorowalności na cukrzycę typu 2 kobiet będących w wieku rozrodczym [10].

3. Konsekwencje niekontrolowanej hiperglikemii

3.1. Konsekwencje dla organizmu matki [6]

Ciężarne z GDM narażone są na wiele zagrażających ich zdrowiu powikłań choroby:

- nadciśnienie indukowane ciążą;
- stan przedrzucawkowy;
- infekcje dróg moczowych (dotyczy nawet 12% chorych), bezobjawowy białkomocz (5-12%) i odmiedniczkowe zapalenie nerek (1/3 chorych);
- utrudniony poród drogami naturalnymi i/lub związane z tym urazy pochwy, krocza, pęcherza moczowego, powstawanie przetok pęcherzowo-moczowych;
- często konieczność rozwiązania ciąży cięciem cesarskim.

3.2. Konsekwencje dla płodu [5, 6]

Do powikłań hipertrofii noworodków urodzonych przez kobiety z GDP zaliczamy:

- kardiomiopatie przerostową;
- dystocję barkową (w 25 % kończy się zamartwicą wewnątrzmaciczną), a nawet zgon w około 2-4% przypadków;

- powikłania wynikające z dystocji barkowej: uszkodzenie splotu barkowego noworodka, porażenie włókien współczulnych, porażenie nerwów przeponowych, złamania kości kończyn górnych i obojczyków;
- kwasicę metaboliczną (występuje najwcześniej w II trymestrze, stąd konieczność zintensyfikowanej kontroli stanu zdrowia płodu w tym okresie).

3.3. Konsekwencje dla noworodka [6]

U noworodka urodzonego przez matkę z rozpoznanym Gestational Diabetes Mellitus występuje zespół zaburzeń oddychania (ZZO). Im wiek ciążowy jest niższy tym silniejsze jest nasilenie objawów zespołu zaburzeń oddychania. Nie jest to tylko związane z niedoborem surfaktantu, który wyściela pęcherzyki płucne, ale również z wpływem płodowej insuliny i glikemii na rozwijającą tkankę płucną. Do metabolicznych powikłań źle kontrolowanej lub w ogóle nieleczonej cukrzycy ciążowej zalicza się: hipoglikemię, hiperbilirubinemię, hipokalcemię i hipomagnezemię oraz polycytemię (nadmierna produkcja erytropoetyny) indukowaną przedłużającym się niedotlenieniem płodu.

4. Rozpoznanie GDM

Wczesna diagnoza Gestational Diabetes Mellitus i odpowiednio szybkie wdrożenie postępowania terapeutycznego zmniejsza ryzyko powikłań jakie mogą wystąpić u rozwijającego się płodu. Im wcześniej zaburzenie zostanie prawidłowo wykryte, tym krótszy jest okres narażenia płodu na niekorzystne działanie hipoglikemii i zmniejsza ryzyko poważnych konsekwencji dla rozwijającego się ustroju.

Podczas pierwszej wizyty przyszłej matki u ginekologa według rekomendacji powinno wykonać się test wstępnego oznaczenia glikemii. Za prawidłowe stężenie glukozy we krwi uznajemy wynik oznaczony na czczo i wynoszący <100 mg/dl. Wartości od 100 do 125 mg/dl (również na czczo) są nieprawidłowe i należy wówczas pacjentkę skierować natychmiastowo na doustny test obciążenia 75 g glukozy (OGTT, z ang. *Oral Glucose Tolerance Test*) z oznaczeniem po 120 minutach i wymogiem bycia na czczo. Jeśli pomiar glikemii na czczo wykaże wartości większe od 125 mg/dl, badanie wykonuje się powtórnie (również na czczo) w jak najkrótszym okresie. W przypadku ponownego wyniku >125mg/dl ciężarną należy natychmiast skierować do ośrodka referencyjnego [1].

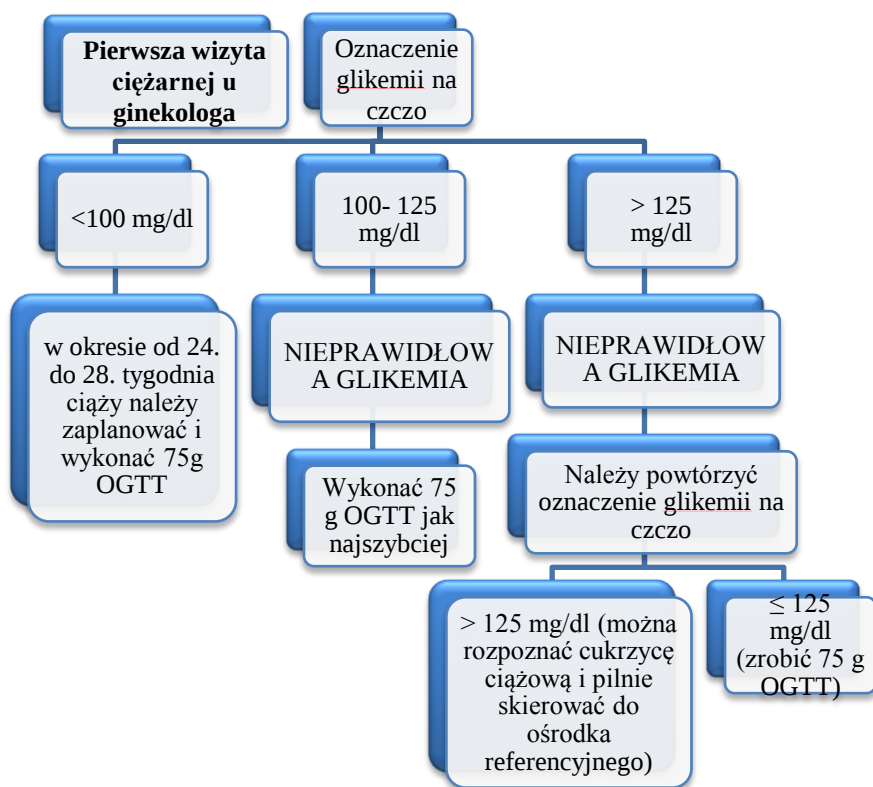
Tabela 2. Kryteria rozpoznania cukrzycy ciążowej na podstawie 75g OGTT

Czas wykonania badania	Stężenie glukozy w osoczu mg/d
Na czczo	≥100
2 godz. po obciążeniu	≥140

Źródło: opracowanie własne przy wykorzystaniu [7]

GCT, czyli z ang. *Glucose Challenge Test* to drugie, po doustnym teście obciążenia glukozą, możliwe badanie, które jednak ma mniejszą wartość diagnostyczną niż OGTT i wykonywane jest przesiewowo. Diagnozując GDP można zrezygnować z wykonywania GCT, gdyż nieprawidłowy wynik nie upoważnia do postawienia diagnozy. Wyjątek stanowi sytuacja, gdy w godzinę po przyjęciu 50g glukozy glikemia ma wartość >200 mg/dl.

Chora z cukrzycą w trakcie ciąży musi po jej zakończeniu mieć rozpoznany typ zaburzeń przemian węglowodanowych i powinna być odpowiednio leczona.



Rys. 1. Algorytm rozpoznawania *Gestational Diabetes Mellitus* w zależności od glikemii na czczo przy pierwszej wizycie u ginekologa. Prawidłowy wynik doustnego testu obciążenia 75 g glukozy (75 g OGTT) na początku ciąży u ciężarnych z grupy ryzyka oraz u pozostałych, zobowiązuje do powtórnego wykonania go u wszystkich ciężarnych w okresie od 24. do 28 tygodnia ciąży. Źródło: opracowanie własne przy wykorzystaniu zasobów Internetu i [2]

Tabela 3. Rozpoznanie Gestational Diabetes Mellitus na podstawie oznaczenia glikemii osocza krwi żyłnej

Cukrzyca ciążowa	
Na czczo	≥100 mg/dl
lub	
1 godzina	≥180 mg/dl
2 godzina	≥140 mg/dl

Źródło: opracowanie własne przy wykorzystaniu [1]

5. Leczenie

Leczenie Gestational Diabetes Mellitus rozpoczyna się od wdrożenia dostosowanej indywidualnie diety. Jeśli po upływie 5 do 7 dni zalecona modyfikacja nawyków żywieniowych nie przyniesie pożądanych efektów, należy rozpocząć insulinoterapię [2, 8].

W leczeniu farmakologicznym GDP obecnie nie zaleca się stosowania doustnych leków przeciwcukrzycowych. Według rekomendacji Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego najlepsza jest metoda wielokrotnych wstrzyknięć insuliny lub wlewu podskórnego przy pomocy osobistej pompy insulinowej. W Polsce istnieje możliwość nieodpłatnego wypożyczenia pomp insulinowych dla kobiet w ciąży [8]. Stosowane preparaty: krótko działająca insulina ludzka (podskórne wstrzyknięcia), analog szybko działający (tylko insulina ASPART zarejestrowana jest do stosowania u kobiet ciężarnych) oraz insulina ludzka średnio długo działająca (NPH). Wdrożenia insulinoterapii wymaga od 10 do 40% pacjentek z cukrzycą ciążową [8].

6. Leczenie w czasie ciąży

W insulinoterapii stosuje się metodę wstrzyknięć krótko działającej insuliny przed głównymi posiłkami oraz w godzinach porannych i wieczorem, lub tylko w godzinach wieczornych wstrzyknięcia preparatu o przedłużonym działaniu [8, 9]. Leczenie analogami o przedłużonym okresie działania nie jest zalecane w terapii GDM. Preparaty doustne przeciwcukrzycowe są przeciwwskazane.

7. Poród

Jeśli w trakcie ciąży cukrzyca ciążowa była prawidłowo kontrolowana tylko za pomocą diety, wówczas wskazaniem do podania insuliny przed samym porodem jest stężenie glukozy przekraczające wartość 130 mg/dl.

8. Terapia po porodzie

U kobiet z rozpoznaną cukrzycą typu I insulinoterapię kontynuuje się nawet po okresie połogu i karmienia piersią. Jeśli zaburzenie przemian węglowodanowych miało podłoże cukrzycy typu 2, a normoglikemii nie można było osiągnąć bez pomocy preparatów insuliny, terapię należy utrzymać do czasu zakończenia karmienia piersią i wdrożenia przeciwcukrzycowych preparatów doustnych. W pozostałych przypadkach cukrzycy ciążyowej przerwanie terapii insuliną możliwe jest od razu lub po upływie okresu nie dłuższego niż 5 lub 6 tygodni od rozwiązania ciąży [2].

9. Specjalistyczna dieta

Wspomniany wcześniej podział Gestational Diabetes Mellitus na typ G1 i G2 podkreśla wagę wdrożenia indywidualnie dobranej odpowiedniej diety. GDM typu G1 kontrolują się tylko za pomocą diety w połączeniu z sumiennością ciężarnej w przestrzeganiu zaleceń dietetycznych.

Tabela 4. Docelowe wartości glikemii dla kobiet ciężarnych, samokontrolę przy użyciu glukometru

Na czczo	60-95	mg/dl
Przed jedzeniem	60-105	
1 godzina po posiłku	<120	
2 do 4 godzin po posiłku	>60	

Źródło: opracowanie własne przy wykorzystaniu [1]

Tabela 5. Procentowy skład diety stosowanej w leczeniu GDM i zapotrzebowanie kaloryczne

Składnik odżywczy	% udział w dobowej diecie	Zapotrzebowanie kaloryczne		[kcal]
Węglowodany	40-50	35 kcal/ kg należnej masy ciała		1500-2400
Białka	30	Chore z nadwagą		
Tłuszcze	20-30	BMI ciężarnej kg/m ²	Rekomendowana podaż kcal na kg masy ciała	
		<19,8	35-40	
		19,8-26,0	30-32	
		26,1-29,0	25-30	
		>29,0	24-25	

Źródło: opracowanie własne na podstawie [1]

W trakcie leczenia cukrzycy ciąży istotna jest częsta kontrola glikemii. Ciężarne powinny zostać przeszkolone, jak wykonać pomiar glikemii przy pomocy glukometru oraz w jaki sposób prawidłowo kontrolować glikemię. Pomiar powinien odbywać się przynajmniej 4 razy dziennie z odpowiednio większą częstością przy cukrzycy niewyrównanej lub zmiennej. Zaleca się sporadyczną kontrolę glikemii w nocy (ryzyko hipoglikemii) oraz kontrolę ketonurii. Utrzymujące się stężenie ciał ketonowych w moczu pomimo wstrzyknięcia dodatkowej dawki insuliny przy hiperglikemii lub po spożyciu posiłku węglowodanowego w stanie hipoglikemii jest wskazaniem do leczenia szpitalnego [1].

Ostatnim, ale równie istotnym czynnikiem w leczeniu GDM jest w miarę możliwości fizycznych umiarkowana aktywność fizyczna. Jeśli tylko stan zdrowia pozwala na wysiłek fizyczny chore powinny regularnie ćwiczyć. Każda aktywność sprzyja obniżeniu poziomu glikemii przez utylizację glukozy, zmniejszenie insulinooporności, a zwiększenie insulino-wrażliwości tkanek chorej [1].

10. Podsumowanie

Dzięki wiedzy, jaką obecnie dysponujemy cukrzyca ciążowa, choć wiąże się z dużym ryzykiem powikłań, to szybko zdiagnozowana i prawidłowo leczona nie stanowi większego problemu terapeutycznego. Opieka specjalistyczna nad chorymi z Gestational Diabetes Mellitus powinna obejmować współpracę specjalistów m. in. ginekologa, diabetologa, a także dietetyka i lekarza rodzinnego. Równie ważna jest edukacja pacjentek w zakresie samokontroli glikemii i konieczności przestrzegania zaleceń dietetycznych, a jeśli sama dietoterapia nie przynosi efektów, o istocie prawidłowej insulinoterapii.

Utrzymywanie normoglikemii w trakcie ciąży pozwoli na zmniejszenie ryzyka groźnych powikłań wynikających z zaburzonego metabolizmu węglowodanów i związanych z nim zaburzeń metabolicznych. W ten sposób zapobiegniemy wadom rozwojowym płodu, patologiom u noworodków oraz długoterminowym negatywnym następstwom niekontrolowanej glikemii w rozwoju dziecka. Ciężarne z GDM w znacząco większym stopniu są narażone na wystąpienie u nich cukrzycy typu II w ciągu kolejnych 15 lat, a także ponownego GDM w trakcie kolejnej ciąży. Niezmiernie istotne są zalecenia zmiany i poprawy stylu życia w zakresie odżywiania się produktami o niskim indeksie glikemicznym, pełnowartościowymi białkami i dobrej jakości tłuszczami [8] oraz utrzymywania aktywności fizycznej.

Wczesne rozpoznanie, indywidualnie dobrana dieta, prawidłowe leczenie i samodyscyplina w zakresie przestrzegania wszystkich zaleceń lekarskich przez ciężarną pozwalają na urodzenie zdrowego dziecka i wyeliminowanie ryzyka powikłań wynikających z Gestational Diabetes Mellitus.

Literatura

1. Wender-Ożegowska, E., *Standardy Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego postępowania u kobiet z cukrzycą*, Ginek. Pol., 2011, 82, s. 474-479;
2. Sieradzki, J. *Cukrzyca ciążowa*, [W:] Interna Szczeklika. Podręcznik chorób wewnętrznych (red) P. Gajewski. Kraków, Skleniarz, 2012, s. 1345- 1347;
3. Grzymisławski, M., *Żywnie w cukrzycy*, [W:] Żywnie człowieka zdrowego i chorego, pod red. J. Hasik, J. Gawęcki, Warszawa, PWN, 2005, s. 177-185;
4. Cypryk, K., Kamińska, P., Kosiński, M. et al. *A comparison of the effectiveness, tolerability and safety of high and low carbohydrate diets in women with gestational diabetes*, Endokrynol. Pol., 2007; zeszyt 58; s. 314-319
5. Zaręba-Szczudlik, J., Romejko, E., Saada, A. *Makrosomia płodu jako problem kliniczny – rozpoznawanie i postępowanie*, Perinatologia, Neonatologia i Ginekologia, 2010, tom 3, zeszyt 2, s. 117-123;
6. Wilczyński, J., Dziatosz, K. *Cukrzyca ciążowa- ryzyko dla matki i jej dziecka*, Perinatologia, Neonatologia i Ginekologia, 2009 tom 2, zeszyt 2, s. 85-89;
7. Walicka, M., Czerwińska, E., Marciniowska-Suchowierska, E., *Cukrzyca a ciąża*, Borgis - Postępy Nauk Medycznych, 2010, zeszyt 5, s. 360-368;
8. Grzelak, T., Janicka E., Kramkowska M., Walczak, M., Czyżewska, K., *Cukrzyca ciążowa, skutki niewyrównania i podstawy regulacji glikemii*, Nowiny Lekarskie 2013, tom 82, zeszyt 8, s. 163–169;
9. Stanowisko Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego. Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę, 2012. Diabetol Klin. 2012; zeszyt 1, supl. A, A1-A52;
10. Bomba-Opoń D., Horosz E., prezentacja multimedialna *Ciąża powikłana cukrzycą*, <http://starynkiewicz.pl/wp-content/uploads/2012/12/GDM-2013.pdf>, [dostęp 11 lutego 2014].

Cukrzyca ciążowa. Czy nadal stanowi problem?

Streszczenie

Ciąża jest szczególnym okresem w życiu każdej kobiety. Czekając na narodziny nowego życia wiele przyszłych matek zmaga się z nowymi przeszkodami, jakie stawia przed nimi ich organizm. Cukrzyca ciążowa (*Gestational Diabetes Mellitus* – GDM) jest to zaburzenie tolerancji węglowodanów lub cukrzyca rozwijające się, lub po raz pierwszy rozpoznane w czasie ciąży. Cukrzyca ciążowa stanowi jedną z najczęstszych przyczyn powikłań w czasie ciąży. U znaczącej części kobiet z cukrzycą ciążową po okresie 15 lat rozwinię się cukrzyca typu II. Niemniej istotny jest fakt, że GDM może wystąpić powtórnie w czasie kolejnej ciąży. W Polsce problem ten dotyczy od 0,7 do 12,3% (średnio 2-4%) ciężarnych. GDM towarzyszy szereg zaburzeń metabolicznych u matki, a także jest przyczyną makrosomii płodu. Ponadto z niekontrolowaną hiperglikemią wiążą się nieprawidłowości takie jak: przedwczesny poród, niedotlenienie i kwasica u płodu, wady rozwojowe, a także martwe urodzenia. Wczesna diagnoza i odpowiednio szybkie wdrożenie postępowania terapeutycznego zmniejsza ryzyko powikłań. Rozpoznanie stawia się na podstawie analizy poziomu glikemii. Leczenie rozpoczyna się od wdrożenia odpowiedniej dostosowanej indywidualnie diety. Obecnie nie zaleca się stosowania doustnych leków przeciwcukrzycowych, a za najlepszą metodę uważana jest insulinoterapia metodą wielokrotnych wstrzyknięć lub wlewu podskórnego przy pomocy osobistej pompy insulinowej. Edukacja pacjentek w zakresie samokontroli glikemii i prawidłowe leczenie cukrzycy ciężarnych daje szansę na zminimalizowanie ryzyka negatywnych skutków choroby, a młodym matkom szansę na szczęśliwe macierzyństwo.

Słowa kluczowe: cukrzyca ciążowa, GDM, Gestational Diabetes Mellitus, powikłania GDM

Gestational Diabetes Mellitus. Is it still a problem?

Abstract

Pregnancy is a special period of life for every woman. Awaiting new birth a lot of future mothers struggle with new obstacles concerned their health. Gestational Diabetes Mellitus (GDM) is a disturbance of carbohydrate adaptation in the mother's body or diabetes developed or originally diagnosed in course of pregnancy. GDM is one of the common complications following pregnancy. Development of diabetes type II is probable to occur in the period of 15 years in significant part of afflicted woman. GDM can reoccur during following pregnancy. GDM concerned 0,7-2,3% of pregnant woman in Poland. GDM is accompanied by number of metabolism disturbances in the mother's body, it is also responsible for macrosomia of the fetus. Disability to maintain normoglycemia, results in the occurrence of many disabilities (premature births, anoxia and acidosis of the fetus, birth defects and dead births). Diagnosis of GDM is made by analyzing glucose levels. Early diagnose and introduction of pharmaceutical therapy reduce the risk of antenatal complications. Initially the treatment is started with an individually-matched diet.. The best way of treatment GDM is an insulin-therapy (repeatedly injections during the day or by the use of personal insulin pump). Educational support to pregnant woman to glycemic self-control and accurate treatment may minimize the risk of negative complications of Gestational Diabetes Mellitus. More than that, it gives the opportunity to celebrate happiness and stressless maternity and has a positive impact of both the mother and their newborns.

Keywords: GDM, Gestational Diabetes Mellitus, diabetes, pregnancy

Justyna Markowicz¹, Tomasz Roman², Agnieszka Szymczyk³, Arkadiusz Macheta⁴, Ewelina Grywalska⁵

CYTOMETRYCZNE WYKŁADNIKI ZABURZEŃ FUNKCJI UKŁADU ODPORNOŚCIOWEGO U OSÓB PODDANYCH SPLENEKTOMII

1. Wstęp

Śledziona będąca największym obwodowym narządem limfatycznym naszego organizmu pełni wielorakie funkcje. Z immunologicznego punktu widzenia jest ona przede wszystkim miejscem rozwoju reakcji immunologicznych zachodzących w odpowiedzi na obce antygeny dopływające do narządu wraz z krążącą krwią. Śledziona bierze udział zarówno w mechanizmach swoistej jak i nieswoistej odpowiedzi odpornościowej. Eliminacja patogenów bakteryjnych może odbywać się przy udziale makrofagów tkankowych na drodze fagocytozy bądź poprzez wytwarzanie przeciwciał. To właśnie w śledzionie dochodzi do aktywacji limfocytów i różnicowania się ich w komórki efektorowe odpowiedzi immunologicznej. Śledziona uczestniczy również w neutralizacji toksyn bakteryjnych. Ponadto bierze ona udział w wytwarzaniu niektórych komórek układu odpornościowego w tym limfocytów i monocytów przez całe życie, a także innych elementów morfotycznych krwi w życiu płodowym. Do pozostałych funkcji śledziony należą magazynowanie krwi i krwinek, współudział w wytwarzaniu bilirubiny a także niszczenie zużytych erytrocytów, leukocytów czy trombocytów [1]. Chirurgiczne usunięcie śledziony (splenektomia) jest stosunkowo często wykonywaną procedurą medyczną. Zabieg może być przeprowadzany ze wskazań nagłych tj. pęknięcie śledziony (pourazowe, jatrogenne, samoistne) bądź jako zabieg planowy w przebiegu niektórych schorzeń limfoproliferacyjnych, zmian torbielowatych narządu lub podejrzenia procesu nowotworowego [2] (Tab. 1).

¹ markowicz_j@o2.pl; Katedra i Zakład immunologii Klinicznej, II Wydział Lekarski z Oddziałem Angnolójczycznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, www.am.lublin.pl;

² tomek.gov@gmail.com; Zakład Radiologii Zabiegowej i Neuroradiologii, II Wydział Lekarski z Oddziałem Angnolójczycznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, www.am.lublin.pl;

³ agusia_szymczyk@wp.pl; Katedra i Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, www.am.lublin.pl;

⁴ arek.macheta@gmail.com, Katedra i Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, www.am.lublin.pl;

⁵ ewelina.grywalska@umlub.pl, Katedra i Zakład immunologii Klinicznej, II Wydział Lekarski z Oddziałem Angnolójczycznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, www.am.lublin.pl;

Tab. 1. Wskazania do splenektomii całkowitej lub częściowej

Wskazania terapeutyczne	Wskazania diagnostyczne
Wrodzone schorzenia układu czerwono krwinkowego np. sferocytoza wrodzona (SF)	Splenomegalia o nieznanej przyczynie
Autoimmunologiczna niedokrwistość hemolityczna (ang. Autoimmune hemolytic anemia, AIHA)	Zmiany mięszu śledziony o nieznanej przyczynie
Pierwotna małopłytkowość immunologiczna (ang. Idiopathic thrombocytopenic purpura, ITP)	Ocena choroby resztkowej po radio/chemioterapii
Zakrzepowa plamica <i>małopłytkowa</i> (zespół Moschcowitza, ang. thrombotic thrombocytopenic <i>purpura</i> , TTP)	
Mielofibroza	
Hipersplenizm	
Choroba Gauschera	
Przyczyny pourazowe	

Źródło: Opracowanie własne przy wykorzystaniu [3]

Asplenia niesie ze sobą zwiększone ryzyko rozwoju zakażeń bakteryjnych. Pacjenci z pierwotnym lub wtórnym brakiem śledziony są szczególnie narażeni na rozwój uogólnionych infekcji wywoływanych przez patogeny otoczkowe takie jak *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* oraz *Neisseria meningitidis*. Najpoważniejszą konsekwencją takiego zakażenia może być wystąpienie zespołu OPSI (*Overwhelming post-splenectomy infection*) wiążącego się nawet z 70% śmiertelnością [4]. Analiza parametrów immunologicznych w tej grupie chorych może przyczynić się do dokładniejszego poznania zaburzeń funkcji układu immunologicznego w szczególności dotyczących odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego, na temat której istnieje dotychczas ograniczona liczba doniesień.

2. Metodologia

2.1. Grupa badana i kontrolna

Grupę badaną stanowiło 100 osób z wtórną asplenią w będących pacjentami Poradni Immunologicznej Samodzielnego Publicznego Szpitala Klinicznego Nr 4 w Lublinie. Średni wiek pacjentów w grupie badanej wynosił 42,04±16,42 lat. Pacjenci Ci nie zgłaszali objawów mogących wskazywać na aktualnie toczącą się infekcję, nie byli poddawani terapii immunosupresyjnej bądź immunomodulującej w ciągu ostatnich 12 miesięcy oraz nie mieli wykonanego wcześniej szczepienia przeciwko bakteriom otoczkowym. U 67 pacjentów

(67%) powodem przeprowadzenia splenektomii była wskazania życiowe, u pozostałych 33 osób (33%) procedurę wykonano w trybie planowym. Elektywna splenektomia wykonywana była z powodu ITP (19 osób) oraz SF (14 osób). Średni czas od chirurgicznego usunięcia śledziony w grupie badanej wynosił $8,67 \pm 9,2$ lat. W skład grupy kontrolnej wchodziło 20 osób zdrowych w średnim wieku $42,35 \pm 15,31$ lat. (Tab.2)

Tab. 2. Charakterystyka grupy badanej i kontrolnej

			Grupa badana		Grupa kontrolna
Liczba osób			100		20
Średni wiek (lata)			42,04±16,4		42,35±15,3
Średni czas od chwili splenektomii (lata)			8,67± 9,2		
Tryb przeprowadzenia operacji	Ze wskazań życiowych		67		
	Zabieg planowy	ITP	19	33	
		SF	14		

Źródło: Opracowanie własne

2.2. Materiał badany

Materiał badany stanowiła krew obwodowa, pobierana w ilości 5ml z żyły odłokciowej od pacjentów oraz osób z wchodzących w skład grupy kontrolnej. Do oceny antygenów powierzchniowych limfocytów izolowanych z krwi obwodowej wykorzystana została krew pełna. Odpowiednie przeciwciała monoklonalne dodawane były w ilości po 5ul na próbkę. Do każdej z próbek zawierających przeciwciała monoklonalne dodawano krew pełna w ilości 30ul. Mieszaninę tą poddano następnie 20 min inkubacji w temperaturze pokojowej. Po inkubacji do każdej z próbek dodawano roztwór lizujący w ilości 2ml, a następnie przeprowadzano 8 minutowa inkubacja w temperaturze pokojowej. Po inkubacji komórki były dwukrotnie przepłukane roztworem PBS (700 x g, 5 minut) i niezwłocznie poddawane analizie w cytometrze przepływowym. FACSCalibur (BD Biosciences). Do analizy wyników i ich graficznej prezentacji wykorzystany zostanie program komputerowy CellQuest (Becton Dickinson).

2.3. Oznaczenia odsetka limfocytów Treg CD4+/CD25+/FOXP3+

Odsetek limfocytów T CD4+CD25+ high /FOXP3+ oznaczony został za pomocą Human Treg Flow™ Kit(FOXP3 Alexa Fluor® 488/CD4 PE-Cy5/CD25 PE) firmy BioLegend (USA) i cytometru przepływowego. Procedurę przeprowadzono zgodnie z protokołem producenta.

2.4. Ocena komórek Th17

W celu oceny komórek Th17 przeprowadzono 4 godzinne hodowle komórek jednojądrzastych krwi obwodowej i szpiku ($2 \times 10^6/\text{ml}$) w obecności stymulatorów: jonomycyny ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) i PMA ($50 \text{ ng}/\text{ml}$) oraz w obecności brefeldyny A. W celu oceny spontanicznej ekspresji IL-17 w 10 badanych hodowlach przeprowadzona została inkubacja w podłożu hodowlanym bez dodatku PMA i jonomycyny, tylko w obecności brefeldyny A. Po 4 godz. inkubacji komórki znakowano przeciwciałami skierowanymi przeciwko antygenom powierzchniowym limfocytów (CD3, CD4, CD8). Następnie próbki utrwalano, permeabilizowano i znakowano przeciwciałem przeciwko wewnątrzkomórkowej IL-17, zgodnie z procedurą producenta (eBiosciences, San Diego, USA). Ekspresję IL-17 w limfocytach oceniano metodą cytometrii przepływowej.

2.5. Opracowanie statystyczne

Analizę statystyczną wykonano przy użyciu programu Statistica 9.0, za poziom istotności statystycznej przyjmując wartość $p < 0,05$.

3. Wyniki

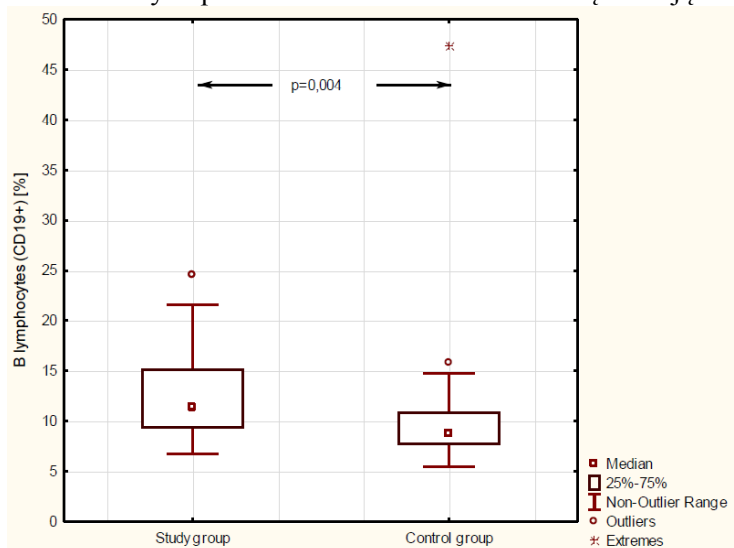
Oceniono wartość odsetkową oraz całkowitą liczbę limfocytów w tym limfocytów T (CD3+) i ich subpopulacji tj. limfocyty pomocnicze (Th) CD4+/CD3+, limfocyty cytotoksyczne (Tc) CD8+/CD3+, limfocyty regulatorowe (Treg) CD4+25+Foxp3 oraz limfocytów B (CD19+). W obrębie wyżej wymienionych subpopulacjach komórek określono ekspresję markerów aktywacji CD69+. Określono także odsetek i całkowitą liczbę limfocytów Th17. Wyniki analizy przedstawia Tab.3. Całkowity odsetek limfocytów T (CD3+) wynoszący prawidłowo 60-75% był podwyższony u 23% osób po splenektomii oraz prawidłowy w pozostałych 67% przypadków. Całkowity odsetek limfocytów B wynoszący prawidłowo 6-17% był podwyższony w 8% przypadków, u pozostałych 92% pacjentów, jego wartości odpowiadały zakresowi normy.

Tab. 3. Wartości średnie, maksymalne i minimalne całkowitej liczby oraz odsetka poszczególnych subpopulacji limfocytów

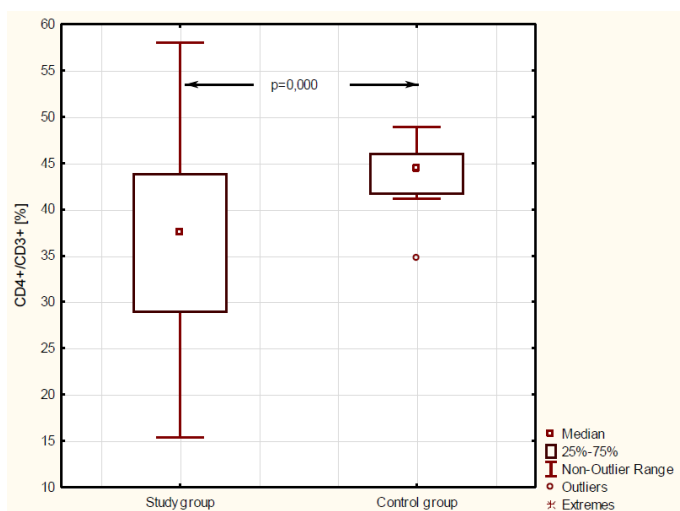
	Grupa badana (n=100)	Grupa kontrolna (n=20)
Całkowita liczba limfocytów [10 ³ /mm ³]	2.66 ±0.87	2.45 ±0.6
Limfocyty T (CD3+) [%]	65.98 ±8.14	65.75 ±13.25
Limfocyty T (CD3+) [10 ³ /mm ³]	1.74 ±0.59	1.61 ±0.52
Limfocyty CD4+/CD3+ [%]	36.46±9.42	44.04±3.41
Limfocyty CD4+/CD3+ [10 ³ /mm ³]	0.95±0.34	1.08±0.28
Limfocyty CD8+/CD3+ [%]	25.99±8.56	30.43±7.19
Limfocyty CD8+/CD3+ [10 ³ /mm ³]	0.70±0.36	0.73±0.21
Limfocyty CD3+/CD69+ [%]	2.54±2.72	1.88±0.67
Limfocyty CD3+/CD69+ [10 ³ /mm ³]	0.06±0.06	0.05±0.02
Limfocyty CD4+/CD69+ [%]	1.71±1.64	0.82±1.23
Limfocyty CD4+/CD69+ [10 ³ /mm ³]	0.04±0.04	0.02±0.03
Limfocyty CD8+/CD69+ [%]	1.10±1.66	2.65±4.59
Limfocyty CD8+/CD69+ [10 ³ /mm ³]	0.02±0.03	0.07±0.12
Limfocyty Treg (CD4+CD25+Foxp3) [%]	10.34±5.86	6.36±3.04
Limfocyty Treg (CD4+CD25+Foxp3) [10 ³ /mm ³]	8.98±2.92	5.23±1.69
Limfocyty Th17 [%]	1.39±1.04	2.83±1.84
Limfocyty Th17 [10 ³ /mm ³]	0.04±0.04	0.07±0.06
Limfocyty B (CD19+) [%]	12.42±3.94	11.33±8.95
Limfocyty B (CD19+) [10 ³ /mm ³]	0.32±0.15	0.27±0.27
Limfocyty CD19+/CD69+ [%]	1.38±1.92	0.73±0.46
Limfocyty CD19+/CD69+ [10 ³ /mm ³]	0.03±0.04	0.02±0.01

Źródło: Opracowanie własne

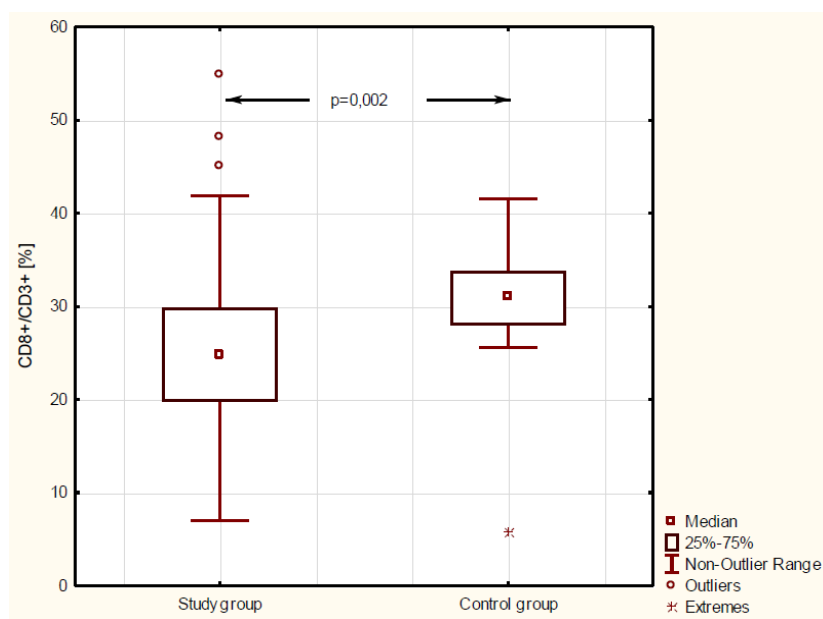
Przeprowadzona analiza wykazała istotne statystycznie różnice w składzie odsetkowym i liczbowym populacji limfocytów B (CD19+) pomiędzy grupą badaną i kontrolną. Pacjenci po splenektomii mieli wyższy odsetek limfocytów B w krwi obwodowej w porównaniu do osób zdrowych (Rys.1). Wartość odsetka limfocytów T (CD3+) nie wykazywała istotnie statystycznych różnic pomiędzy grupą badaną i kontrolną. Wśród pacjentów z wtórną asplenią wykazano niższy odsetek limfocytów Th (CD3+/CD4+) oraz Tc (CD3+/CD8+) w porównaniu do grupy kontrolnej (Rys.2,3). Splenektomia wiązała się ze wzrostem liczby aktywowanych limfocytów T (CD3+/CD25+, CD4+/CD25+, CD8+/CD25+) oraz aktywowanych limfocytów B (CD19+/CD25+). Dodatkowo wśród pacjentów z wtórną asplenią odsetek limfocytów Treg był wyższy a odsetek limfocytów Th17 niższy w porównaniu do osób z zachowaną funkcją śledziony.



Rys.1. Różnice w składzie odsetkowym subpopulacji limfocytów B (CD19+) pomiędzy grupą badaną i kontrolną [opracowanie własne]



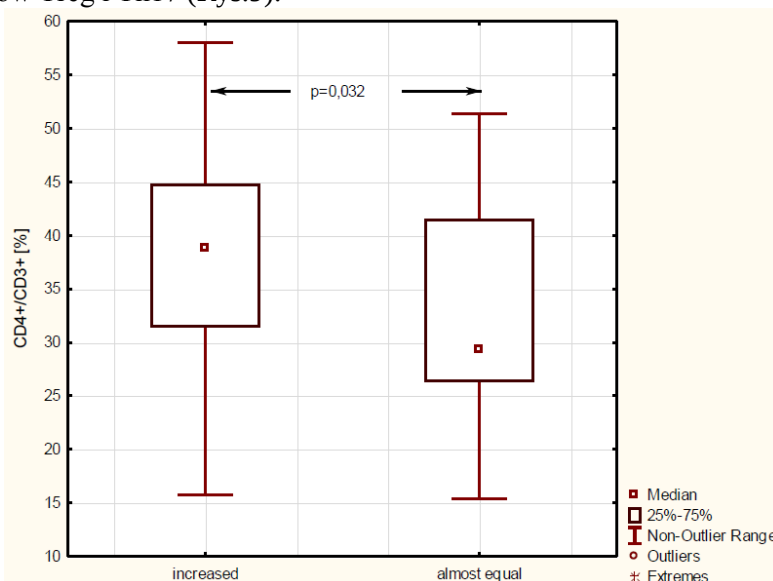
Rys. 2. Różnice w składzie odsetkowym limfocytów CD4+/CD3+ pomiędzy grupą badaną i kontrolną [opracowanie własne]



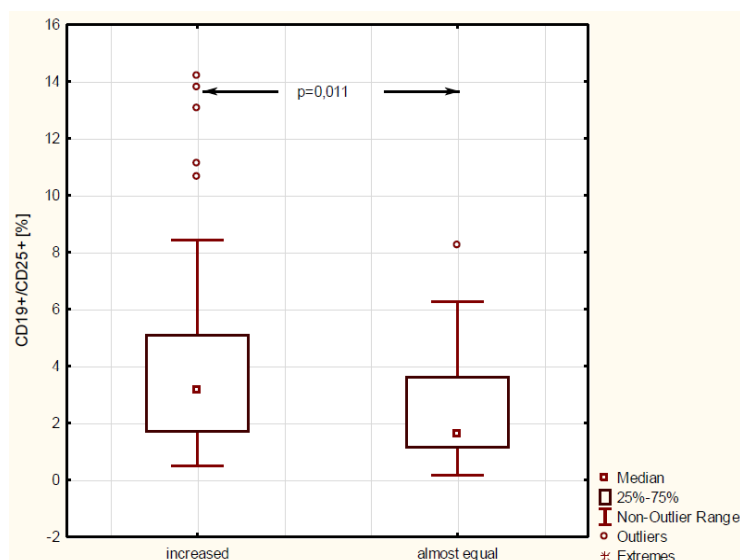
Rys. 3. Różnice w składzie odsetkowym limfocytów CD8+/CD3+ pomiędzy grupą badaną i kontrolną [opracowanie własne]

71 osób z grupy badanej (71%) zaobserwowała wzrost częstości infekcji po wykonaniu splenektomii, 28 osób (28%) częstość infekcji pozostała bez

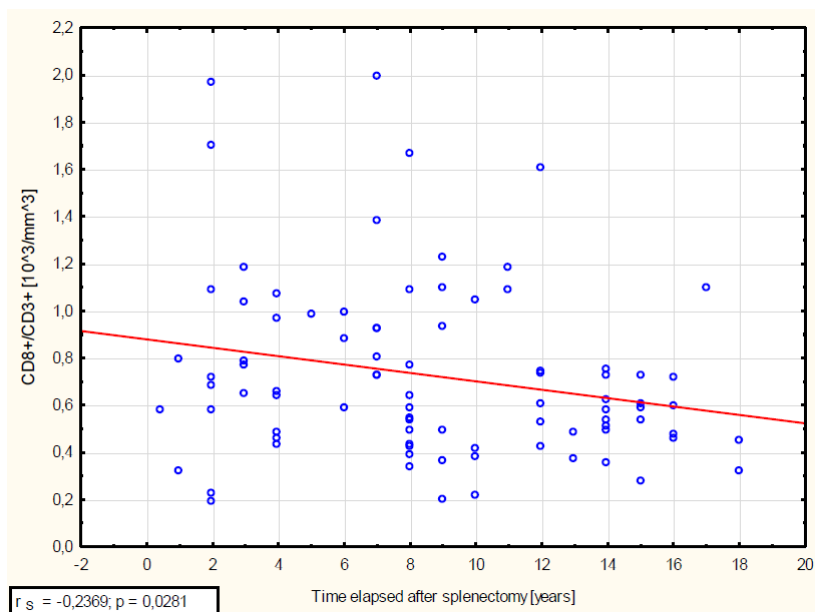
zmian. Zauważono dodatnią korelację pomiędzy odsetkami aktywowanych limfocytów Tc (CD8+/CD25+) (Rys.4) i B (CD19+/CD25+) (Rys.5) a częstością infekcji obserwowanych przez pacjentów z brakiem śledziony. Wraz z upływem czasu, który minął od chwili chirurgicznego usunięcia śledziony zaobserwowano wzrost odsetek limfocytów CD19+ oraz CD19+/CD25+, któremu towarzyszył spadek odsetek limfocytów CD3+ i CD8+/CD3+ (Rys.6). Wyższe wartości odsetkowe limfocytów Treg obserwowano w grupie osób po splenektomii wykonanej ze wskazań życiowych (Rys.7) oraz zgłaszających wzrost częstości infekcji po zabiegu (Rys.8). W przypadku populacji limfocytów Th17 niższy odsetek tych komórek wiązał się ze zwiększoną częstością infekcji w grupie badanej. Ponadto istniała ujemna korelacja pomiędzy odsetkami limfocytów Treg i Th17 (Rys.9).



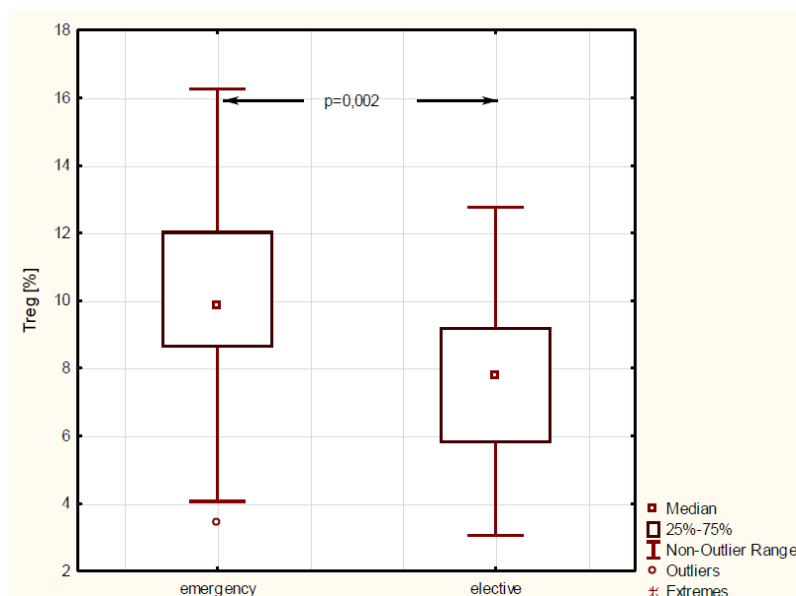
Rys. 4. Zależność pomiędzy składem odsetkowym limfocytów CD4+/CD25+ a częstością infekcji zgłaszanych przez pacjentów po wykonaniu zabiegu splenektomii [pracowanie własne]



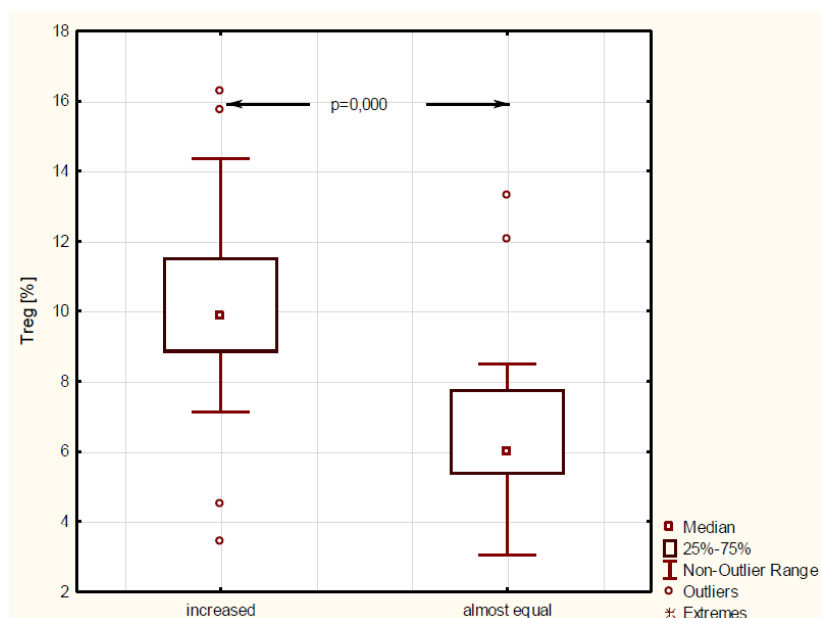
Rys. 5. Zależność pomiędzy składem odsetkowym limfocytów CD4+/CD25+ a częstością infekcji zgłaszanych przez pacjentów po wykonaniu zabiegu splenektomii [opracowanie własne]



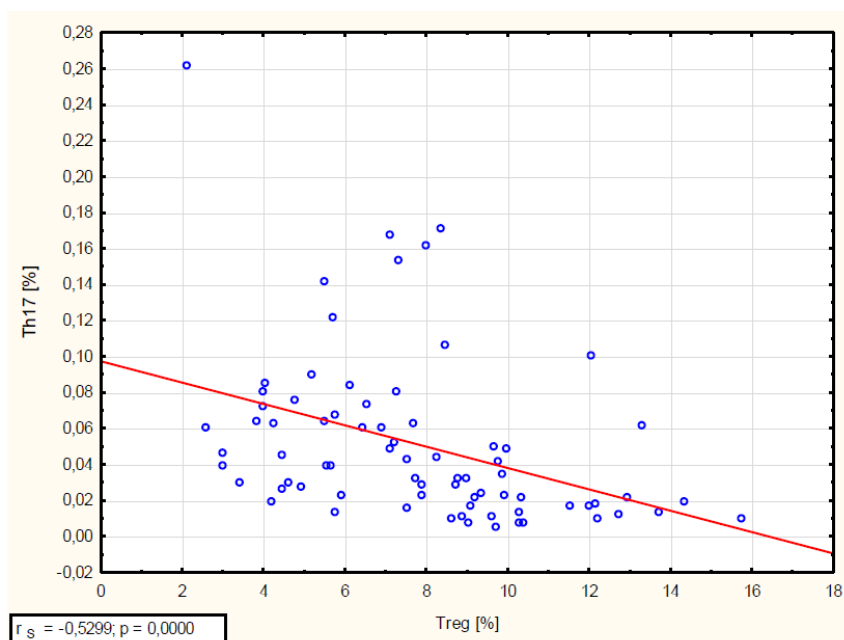
Rys. 6. Korelacja pomiędzy czasem, który upłynął od chwili splenektomii a częstością infekcji w grupie pacjentów z wtórną asplenią [opracowanie własne]



Rys. 7. Zależność pomiędzy odsetkiem limfocytów Treg a trybem przeprowadzenia zabiegu splenektomii [opracowanie własne]



Rys.8. Zależność pomiędzy odsetkiem limfocytów Treg a częstością infekcji zgłaszanych przez pacjentów po splenektomii [opracowanie własne]



Rys. 9 Korelacja pomiędzy odsetkami limfocytów Treg i Th17 [opracowanie własne]

4. Dyskusja

Śledziona jest kluczowym narządem regulującym homeostazę układu odpornościowego. W celu dokładniejszego poznania zaburzeń immunologicznych będących następstwem tego zabiegu potrzebne są dalsze badania. Chirurgicalne usunięcie śledziony skutkuje zaburzeniem licznych funkcji układu immunologicznego zależnych od limfocytów T, B oraz komórek żernych. Asplenia zwiększa ryzyko rozwoju ciężkich zakażeń bakteryjnych. Wynika to głównie z upośledzenia odporności humoralnej zależnej od wytwarzania przeciwciał IgM [5]. Brak śledziony wiąże się ponadto z osłabieniem odpowiedzi odpornościowej typu komórkowego. Odpowiedź ta jest upośledzona zarówno w przypadku antygenów grasiczniezależnych jak i grasiczozależnych [6].

Dotychczasowe badania oceniające parametry immunologiczne u pacjentów po chirurgicznego usunięcia śledziony wskazują iż zabieg ten wpływa na całkowitą liczbę i odsetek limfocytów, jak również prowadzi do ilościowych i jakościowych zmian w obrębie poszczególnych subpopulacji komórek krwi obwodowej [6-10]. Podobnie jak inni autorzy [9-13] w przeprowadzonym badaniu zaobserwowaliśmy wzrost całkowitej liczby limfocytów oraz limfocytów T u pacjentów po splenektomii w porównaniu z grupą kontrolną, różnice te nie były jednak istotne statystycznie. Pacjenci po przebytej splenektomii mieli ponadto wyższy odsetek limfocytów B w krwi obwodowej

w porównaniu do osób zdrowych. Według Pedersena i wsp. długotrwała limfocytoza będąca następstwem splenektomii związana jest głównie z podwyższoną liczbą limfocytów B [14]. Rosing i wsp. w swoim badaniu sugerują iż obecność podwyższonej całkowitej liczby limfocytów B zarówno w szpiku kostnym jak i węzłach chłonnych, będąca następstwem splenektomii, jest reakcją kompensacyjną mającą na celu przywrócenia prawidłowej liczebności tej populacji komórek [15]. Pacjenci z wtórną asplenią wykazują obniżony poziom immunoglobulin obecnych w surowicy szczególnie w klasie IgM oraz zaburzenia zmiany klas przeciwciał z IgM na IgG [16,17]. Dotychczas nie wyjaśniono czy powyższe zmiany wynikają z zaburzonej funkcji limfocytów B, limfocytów T czy być może obu tych populacji.

Do najczęściej opisywanych zmian dotyczących komórkowych parametrów układu odpornościowego u pacjentów z asplenią należą obniżenie całkowitej liczby i odsetka komórek CD4⁺ oraz stosunku limfocytów CD4⁺/CD8⁺ [6,9]. Część autorów wykazała jednak wzrost odsetka limfocytów CD4⁺ i CD8⁺ oraz zredukowany stosunek CD4⁺/CD8⁺ [18-20]. W naszym badaniu u pacjentów po splenektomii w porównaniu do grupy kontrolnej wykazano niższy odsetek limfocytów CD3⁺/CD4⁺ oraz CD3⁺/CD8⁺. Wykazaliśmy ponadto iż splenektomia wiązała się ze wzrostem liczby aktywowanych limfocytów T (CD3⁺/CD25⁺, CD4⁺/CD25⁺, CD8⁺/CD25⁺), co jest zbieżne z wynikami otrzymanymi przez Karakantza i wsp [7].

Istotnym zagadnieniem z klinicznego punktu widzenia jest pytanie czy zaburzenia immunologiczne będące następstwem splenektomii ustępują wraz z czasem jaki upłynął od chwili zabiegu. Badania na modelu zwierzęcym dotyczące odpowiedzi immunologicznej T- zależnej wskazują na długoterminowe utrzymywanie się tych odchyleń, natomiast w przypadku ludzi dane są niejednoznaczne. Karakantza i wsp. wykazali iż ilościowe i jakościowe zaburzenia w obrębie poszczególnych subpopulacji limfocytów były silniej wyrażone u pacjentów, u których czas od chwili wykonania splenektomii był dłuższy niż 8 lat. Przy czym czas potrzebny do normalizacji odsetka poszczególnych subpopulacji był odmienny. Wzrost odsetka limfocytów B i limfocytów CD4⁺ zachodził powoli przy długotrwałe utrzymującej się niskiej całkowitej licznie komórek CD4⁺CD45RA⁺ [7]. W naszym badaniu wraz z upływem czasu, który minął od chwili chirurgicznego usunięcia śledziony zauważono wzrost odsetek zarówno limfocytów B jak i aktywowanych komórek CD19⁺/CD25⁺, któremu towarzyszył spadek odsetek limfocytów T i CD3⁺CD8⁺.

Splenektomi upośledza mechanizmy obronne ustroju, głównie przeciwko patogenom bakteryjnym, co wiąże się ze zwiększoną zapadalnością na infekcje w tej grupie osób. Zgodnie z powyższą tezę, przeprowadzona przez nas analiza wykazała wzrost częstości infekcji zgłaszany przez ponad 70% badanych. Zauważono ponadto dodatnią korelację pomiędzy odsetkami aktywowanych limfocytów Tc (CD8⁺/CD25⁺) i B (CD19⁺/CD25⁺) a częstością infekcji w tej

grupie pacjentów, podczas gdy Brodsky i wsp. ze zmożoną zapadalnością na infekcję wiąże długotrwały spadek ilości limfocytów CD4+ bardziej niż obniżenie stosunku komórek CD4+/CD8+ [19]. W przeprowadzonej przez nas analizie parametrów immunologicznych uwzględnili również limfocyty Th17. Komórki te ułatwiają rozwój szybkiej reakcji zapalnej w miejscu wniknięcia drobnoustrojów oraz uczestniczą w odporności przeciwzakaźnej. W badanej przez nas grupie pacjentów po splenektomii stwierdzono obniżenie odsetka tych komórek, co wiązało się z wyższą zapadalnością na infekcje.

Ważnym elementem naszego badania była ponadto ocena odsetka limfocytów Treg. Komórki te pełnią rolę immunomodulującą, odpowiadając min. za utrzymanie stanu tolerancji immunologicznej ustroju. W naszym badaniu stwierdziliśmy podwyższenie odsetka limfocytów Treg u pacjentów po splenektomii. Wiązała się on z podwyższoną częstością infekcji zgłaszanych przez pacjentów. Podobne obserwacje dotyczące liczby limfocytów Trego wynikają z badania przeprowadzonego przez Zhu i wsp. Autorzy Ci wykazali podwyższoną całkowitą liczbę limfocytów Treg po splenektomii a następnie stopniową normalizację tych parametrów [21]. W przeciwieństwie do tych wyników, Read i wsp. opisali spadek całkowitej liczby limfocytów Treg wśród osób z wtórną asplenią, oraz związane z nim nasilenie objawów współistniejących schorzeń o podłożu autoimmunologicznym [22].

5. Wnioski

Splenektomia prowadzi w wtórnego niedoboru odporności oraz zmian komórkowych parametrów układu immunologicznego. W celu dokładniejszego poznania zaburzeń immunologicznych będących następstwem tego zabiegu potrzebne są dalsze badania.

Literatura

1. Gołąb J., Jakóbisiak M., Lasek W., Stokłosa T., *Immunologia*, Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2013;
2. Noszczyk W., *Chirurgia*, Tom 1, Warszawa, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2005;
3. Holzheimer R., Mannick J., *Surgical Treatment: Evidence-Based and Problem-Oriented*, Munich, Zuckschwerdt, 2001;
4. Serio B., Pezzullo L., Giudice V., Fontana R., Annunziata S., Ferrara I., Rosamilio R., De Luca C., Rocco M., Montuori N., Selleri C., *OPSI threat in hematological patients*, Transl Med UniSa, 2013 vol.6, s.2-10;
5. Di Sabatino A., Carsetti R., Corazza GR., *Post-splenectomy and hyposplenic states*, Lancet, 2011 vol.378, s.86-97;
6. Wolf HM., Eibl MM., Georgi E., Samstag A., Spatz M., Uranüs S., Passl R., *Long-term decrease of CD4⁺CD45RA⁺ T cells and impaired primary immune response after post-traumatic splenectomy*, Br J Haematol, 1999 wol.107, s. 55–68;

7. Karakantza M., Theodorou GL., Mouzaki A., Theodori E., Vagianos C., Maniatis A., *In vitro study of the long-term effects of post-traumatic splenectomy on cellular immunity*, Scand J Immunol, 2004 vol. 59, s.209-219;
8. Sieber G., Breyer HG., Herrmann F., Rühl H., *Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in splenectomized patient*, Immunobiology, 1985 vol. 169, s. 263–271;
9. Ferrante A., Drew PA., Kiroff GK., Zola H., *Peripheral blood leucocyte subpopulations in patients splenectomized for trauma*, Clin Exp Immunol, 1987 vol. 70 s.158–163;
10. Wang WC., Herrod HG., Valenski WR., Wyatt RJ., *Lymphocyte and complement abnormalities in splenectomized patients with hematologic disorder*, Am J Hematol, 1988 vol. 28, s. 239–245;
11. Lauria F., Pulvirenti A., Raspadori D., Tura S., *T-lymphocyte subsets in healthy splenectomised patients*, Boll Ist Sieroter Milan, 1981 vol. 60, s. 417-420;
12. Mazzucconi MG., Piola P., Arista MC., Bizzoni L., Antenucci A., Conti L., *Modifications of lymphocyte subsets in autoimmune thrombocytopenic purpura patients submitted to splenectomy*, Haematologica, 2000 vol. 85, s. 776-777;
13. Balsalobre B., Carbonell-Tatay F., *Cellular immunity in splenectomized patient*, J Investig Allergol Clin Immunol, 1991vol.1s. 235–238;
14. Pedersen B., Videbaek A., *On the late effects of removal of the normal spleen*, Acta Chirurgica Scandinavica, 1966 vol. 131, s. 89-98;
15. Rozing J., Brons NHC., Benner R., *B lymphocyte differentiation in lethally irradiated and reconstituted mice*, Cell. Immunol, 1977 vol. 31, s. 340;
16. Drew PA., Kiroff G.K, Ferrante A., Cohen RC., *Alterations in immunoglobulin synthesis by peripheral blood mononuclear cells from splenectomized patients with and without splenic regrowth*, J Immunol, 1984 vol. 132, s 191–196;
17. Müller .C, Mannhalter JW., Ahmad R., Zlabinger G., Wurnig P., Eibl MM., *Peripheral blood mononuclear cells of splenectomized patients are unable to differentiate into immunoglobulin-secreting cells after pokeweed mitogen stimulation*, Clin Immunol Immunopathol, 1984 vol. 31, s. 118–23;
18. Dürig M., Landmann RM., Harder F., *Lymphocyte subsets in human peripheral blood after splenectomy and autotransplantation of splenic tissue*, J Lab Clin Med, 1984 vol. 104, s. 110-115;
19. Brodsky E., Steiner Z., Manor Y., Schneider M., Druker I., Klajman A., *Changes in lymphocyte subpopulations in peripheral blood of splenectomized patients*, Isr J Med Sci, 1988 vol. 24, s. 702-705;
20. Sieber G., Breyer HG., Herrmann F., Rühl H., *Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in splenectomized patients*, Immunobiology, 1985 vol. 169, s. 263-271;
21. Zhu J., Chen S., Wang J., Zhang C., Zhang W., Liu P., Ma R., Chen Y., Yao Z., *Splenectomy increases the survival time of heart allograft via developing immune tolerance*, J Cardiothorac Surg, 2013 vol.8 , s. 129;
22. Read M., Andrews PS., Timmis J., Williams RA., Greaves RB., Sheng H., Coles M., Kumar V., *Determining disease intervention strategies using spatially resolved simulations*, PLoS One, 2013 vol.8, s.80506.

Cytometryczne wykładniki zaburzeń funkcji układu odpornościowego u osób poddanych splenektomii

Streszczenie

Wstęp: Wtórna asplenia, będąca następstwem chirurgicznego usunięcia śledziony, jest częstym problemem medycznym. W licznych doniesieniach wykazano, że splenektomia upośledza mechanizmy odporności humoralnej, w przypadku odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego istnieją tylko nieliczne dane na ten temat. Celem pracy była cytometryczna ocena wybranych populacji limfocytów w grupie pacjentów po splenektomii. Grupę badaną stanowiło 100 pacjentów z wtórna asplenią w wieku $42,04 \pm 16,42$ lat. Do grupy kontrolnej włączono 20 osób zdrowych w wieku $42,35 \pm 15,31$ lat. Materiałem badanym była krew obwodowa, pobierana w ilości 5ml. Wyizolowane limfocyty znakowane były odpowiednią kombinacją przeciwciał monoklonalnych sprzężonych z barwnikami fluorescencyjnymi, a następnie analizowane przy pomocy trójkolorowego cytometru przepływowego FACSCalibur i programu CellQuest. Analizę statystyczną wykonano przy użyciu programu Statistica 9.0, za poziom istotności statystycznej przyjmując wartość $p < 0,05$. Wśród pacjentów z wtórna asplenią wykazano niższy odsetek limfocytów Th (CD3+/CD4+) oraz Tc (CD3+/CD8+) w porównaniu do grupy kontrolnej. Wyższe wartości odsetkowe limfocytów Treg obserwowano w grupie osób po splenektomii wykonanej ze wskazań życiowych oraz zgłaszających wzrost częstości infekcji po zabiegu. Splenektomia wiązała się ze wzrostem liczby aktywowanych limfocytów T (CD3+/CD25+, CD4+/CD25+, CD8+/CD25+) i B (CD3+/CD25+, CD4+/CD25+, CD8+/CD25+). Zauważono ponadto dodatnią korelację pomiędzy odsetkami aktywowanych limfocytów Tc (CD8+/CD25+) i B (CD19+/CD25+) a częstością infekcji obserwowanych przez pacjentów z brakiem śledziony. Splenektomia powoduje wystąpienie szeregu zmian w składzie odsetkowym subpopulacji limfocytów, co znajduje odzwierciedlenie we wzmożonej podatności na infekcje w tej grupie chorych.

Słowa kluczowe: splenektomia, limfocyt CD3+, limfocyt CD19+, infekcje

Manifestations of impaired function of the immune system in splenectomized patients regarding flow cytometric parameters

Abstract

Introduction: Acquired asplenia following splenectomy is a common abnormality. While the knowledge about humoral immunity disturbances is well established in splenectomized patients, the abnormalities of cellular response remain still under investigation. To estimate the impact of splenectomy on postoperative quantitative changes of selected lymphocyte subsets. The study group encompassed 100 splenectomized patients with an average age $42,04 \pm 16,42$. The control group contained 20 healthy individuals aged $42,95 \pm 15,31$. Peripheral blood was collected from each person in amount of 5ml. Isolated lymphocytes were labeled with specific combination of monoclonal antibodies and fluorochromes and subsequently analyzed using three-color flow cytometer FACS Calibur and CellQuest program. Statistical analysis was performed using Statistica 9.0 software, with the level of statistical significance established at $p < 0,05$. In splenectomized patients statistically significant decrease in percentage of Th cells (CD3+/CD4+) and Tc (CD3+/CD8+) cells was observed in comparison to the control group. The increase in percentage of Treg cells was better pronounced in the individuals splenectomized due to trauma and those with higher frequency of infections. Higher levels of activated T lymphocytes (CD3+/CD25+, CD4+/CD25+, CD8+/CD25+) and activated B lymphocytes (CD19+/CD25+) were noticed in the study group compared to the controls. Analysis of the infection frequency was positively correlated with percentage of activated Tc (CD8+/CD25+) and activated B (CD19+/CD25+) cells. Splenectomy severely affects immunity. Our findings explain higher risk of infections in asplenic patients compared to individuals with the proper spleen function.

Keywords: splenectomy, CD3+ lymphocytes, CD19+ lymphocytes, infections

Katarzyna Schab¹, Magdalena Amarowicz, Dominika Mulawka, Paulina Mulawka, Marcin Urbańczuk, Jan Sobstyl, Paulina Sobstyl, Paulina Chwil, Karol Terlecki, Lidia Kotuła

INTERAKCJE LEKÓW I SKŁADNIKÓW DYMU TYTONIOWEGO – KOLEJNE NIEBEZPIECZEŃSTWA WYNIKAJĄCE Z PALENIA

1. Wstęp

Palenie tytoniu jest poważnym problemem zdrowotnym w krajach wysokorozwiniętych. Według danych zebranych w programie WHO (Światowej Organizacji Zdrowia) Global Adult Tobacco Survey 2010 aż co trzecia osoba czyli blisko 10 milionów ludzi w Polsce pali papierosy, przy czym aż 9 milionów osób w tej grupie deklaruje palenie nałogowe. Wysoki odsetek palących mężczyzn (33%) i kobiet (21%) plasuje nasz kraj powyżej średniej europejskiej, co zwraca uwagę na konieczność głębszego przyjrzenia się zagadnieniu palenia tytoniu w Polsce. Inicjowane przez Ministerstwo Zdrowia akcje edukacyjne ukazujące skutki palenia, oferowanie przez lekarzy i farmaceutów pomocy w rzuceniu nałogu oraz inne działania o zasięgu społecznym przyczyniły się do stopniowego obniżania się odsetka osób palących, niemniej jednak wskaźniki wciąż pozostają wysokie. Każdego roku w Polsce około 100 tysięcy zgonów ma bezpośredni związek z negatywnymi skutkami palenia tytoniu, przy czym ponad połowa z nich dotyczy osób w wieku 35-69 lat. Składniki dymu tytoniowego mają udowodnioną rolę w patogenezie chorób nowotworowych (nowotwory płuc, głowy i szyi, przełyku, nerki) i wielu chorób przewlekłych, w tym tkanki łącznej (RZS, choroba Buergera), układu sercowo-naczyniowego (miażdżyca, choroba niedokrwienna serca, nadciśnienie tętnicze, udary mózgu) czy oddechowego (POChP, astma).

Przedmiotem zainteresowania autorów niniejszej publikacji jest jednak fakt, że palenie tytoniu posiada również ogólnoustrojowe konsekwencje metaboliczne i hormonalne, co może warunkować nieprzewidziane i niepożądane oddziaływanie z przyjmowanymi przez palącego pacjenta lekami. Niektóre składniki dymu tytoniowego indukują izoenzymy cytochromu P450 w wątrobie i innych tkankach, co skutkuje nasilonym metabolizmem i słabszym działaniem ksenobiotyków przetwarzanych przy udziale tych izoenzymów. Efekty działania biologicznego nikotyny są z kolei przyczyną interakcji w fazie farmakodynamicznej. Biorąc pod uwagę rozpowszechnienie problemu uzależnienia od nikotyny w społeczeństwie polskim, a także częstość chorób przewlekłych wymagających leczenia farmako-

¹ kas.s@o2.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Zakład Genetyki Klinicznej;

logicznego również w grupie osób palących, interakcje leków ze składnikami dymu tytoniowego wydają się stanowić problem wart refleksji i głębszego rozpatrzenia.

2. Skład dymu tytoniowego

W oparciu o badania różnych ośrodków przyjmuje się, że dym tytoniowy zawiera około 4300 składników. Oprócz nikotyny, będącej głównym składnikiem uzależniającym, są tu także substancje o działaniu drażniącym, ciliotoksycznym i kancerogennym [1, 2]. Za interakcje z lekami odpowiadają w największym stopniu farmakologicznie czynna nikotyna i wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne. W zależności od miejsca i sposobu wydobywania się dymu wyszczególnia się różniące się składem strumień główny dymu i strumień boczny dymu [3].

Nikotyna, podobnie jak pozostałe alkaloidy pirydynowe pochodzące ze spalania tytoniu wchodzi w skład głównego strumienia dymu, a więc w przeważającej większości dostaje się do płuc palacza. Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne są z kolei zawarte w podobnym stężeniu zarówno w strumieniu bocznym jak i głównym, a zatem współtworzą także tzw. środowiskowy dym tytoniowy (ETS, *enviromental tobacco smoke*) i mogą oddziaływać na metabolizm leków u „biernych palaczy”.

3. Przemiany składników dymu tytoniowego

Ze względu na bardzo wysoką temperaturę żarzenia tytoniu (dochodzącą zwykle do 600-900°C) praktycznie wszystkie zawarte w nim składniki ulegają przekształceniom chemicznym podczas spalania papierosa i wchodząc w skład dymu ulegają inhalacji oraz wchłonięciu w drogach oddechowych. W niewielkim stopniu wchłanianie to zachodzi także w przewodzie pokarmowym w wyniku połykania wydzieliny oskrzelowej i śliny [4, 1]. Część przemian wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych ma miejsce już na poziomie nabłonka dróg oddechowych przy udziale zawartej tam formy oksydaz CYP2E1, których aktywność w wyniku przewlekłej ekspozycji na substrat ulega zwiększeniu. Główna rola w metabolizmie nikotyny przypada izoenzymom CYP2A6 oraz CYP2D6 cytochromu P450, utleniającym nikotynę do kotoniny. Zarówno składniki dymu tytoniowego jak też ich metabolity wydalone są z organizmu z powietrzem wydychanym, moczem lub kałem [4].

4. Efekty farmakologiczne składników dymu tytoniowego

W związku z różnorodnością struktury chemicznej tak dużej liczby składników dymu, wywiera on wielokierunkowe i złożone działanie biologiczne na organizm ludzki [4]. Głównym składnikiem dymu tytoniowego odpowiadającym za odczuwalne efekty palenia jest nikotyna. W małych dawkach zwiększa

wydzielanie adrenaliny z rdzenia nadnerczy i noradrenaliny z podwzgórza powodując krótkotrwałe przyspieszenie czynności serca i wzrost ciśnienia tętniczego [3]. W większych ilościach wykazuje jednak działanie ganglioplegiczne, wynikające z zablokowania receptorów nikotynowych w zwojach układu współczulnego [5]. Pobudza przekąźnictwo cholinergicznego, noradrenergicznego w ośrodkowym układzie nerwowym powodując pobudzenie i zwiększenie napędu oraz stymuluje układ nagrody (zwiększenie przekąźnictwa dopaminergicznego). Palenie papierosów wywołuje także szereg reakcji skutkujących skłonnością zakrzepową. Choć mechanizm predyspozycji osób palących do incydentów zakrzepowych nie jest w pełni poznany sugeruje się, że polega on na zwiększonej generacji trombiny i fibrynogenu a także aktywacji płytek krwi u osób palących [6].

5. Cytochrom P450 a składniki dymu tytoniowego

Cytochrom P450 jest hemoproteiną i częścią wspólną składającego się z wielu izoenzymów układu oksydaz, katalizujących przemiany I fazy (reakcje oksydoredukcji) ksenobiotyków. W największej ilości enzymy te zlokalizowane są w hepatocytach, choć znajdują się także w nabłonku dróg oddechowych, przewodu pokarmowego oraz w ośrodkowym układzie nerwowym. Długa lista interakcji z lekami wywołanych paleniem wynika ze zmian aktywności niektórych izoenzymów związanych z hemoproteiną P450. Najsilniejszym induktorem enzymów układu mikrosomalnego są wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne. Izoenzymy, których aktywność wzrasta w wyniku długotrwałej ekspozycji na wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) to przede wszystkim CYP1A1, 1A2 (obecne głównie w wątrobie) oraz 2E1 (płuca, mózg). Choć udział tych izoenzymów w całym metabolizmie leków jest oceniany jako niewielki, okazuje się, że w warunkach ekspozycji na dym tytoniowy aktywność może znacząco wzrastać i powodować istotne zmiany klirensu niektórych leków.

Jak wykazały badania na zwierzętach również nikotyna, mimo, że jest metabolizowana przez inne układy mikrosomalne, oddziałuje na aktywność izoenzymu CYP2A1/2A2 w ośrodkowym układzie nerwowym, będąc działającą w sposób niejednorodny (indukując lub blokując te enzymy) w zależności od okolicy mózgu [7].

Inne składniki dymu tytoniowego również mogą oddziaływać z enzymami mikrosomalnymi, jednak ich rola wydaje się mniejsza. Istnieją doniesienia, że niektóre związki zawarte w dymie mogą zwiększać aktywność także innych izoenzymów mikrosomalnych, w tym CYP3A, a także intensyfikować procesy glikozylacji, co sprzyja szybszej eliminacji leku przeciwnowotworowego irynotekanu [8].

6. Interakcje leków ze składnikami dymu tytoniowego

6.1. Interakcje w fazie farmakokinetycznej

Większość interakcji leków ze składnikami dymu tytoniowego zachodzi w fazie farmakokinetycznej czyli jest efektem zmian wchłaniania i metabolizmu leków indukowanych przewlekłym narażeniem na dym tytoniowy. Przyczyną największej ilości interakcji natury farmakokinetycznej z lekami różnych grup są zawarte w dymie tytoniowym wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne. Zgodnie z opisanym wcześniej wpływem na izoenzymy układu P450 powodują one przede wszystkim nasilenie metabolizmu leków a więc obniżają ich stężenie w surowicy i osłabiają działanie. Wiele grup leków jest uwikłanych w tego typu interakcje ze składnikami dymu tytoniowego. Stosowanie niektórych leków podczas palenia tytoniu może także nasilać toksyczne efekty nikotyny, takich jak nudności, wymioty, biegunka, bóle brzucha czy zawroty głowy. Reakcje takie opisywano dla cymetydyny i innych antagonistów receptora H₂ (ranitydyna, famotidyna), które obniżają klirens nikotyny o 30% [9]. Interakcja jest w tym przypadku dwustronna – palenie tytoniu (głównie w związku z indukcją przez WWA enzymów mikrosomalnych wątroby) może zmieniać stężenie leków tej grupy w osoczu krwi [9].

6.2. Leki antyarytmiczne

Wśród oddziaływań o znaczeniu klinicznym znajdują się interakcje składników dymu tytoniowego z lekami antyarytmicznymi. U osób uzależnionych od nikotyny stwierdza się niższe stężenia amiodaronu i meksyletyny w surowicy niż u pacjentów niepalących [7]. Wykonane metaanalizy ukazują również szybszy klirens flekainidu w grupie osób palących w porównaniu z niepalącymi, a zatem konieczność podawania wyższej dawki leku u palaczy tytoniu [8], jednak dane literaturowe nie wskazują tej interakcji jako niebezpiecznej [9]. Palenie tytoniu powoduje zmniejszenie biodostępności podawanej doustnie lidokainy, podczas gdy podana dożylnie zachowuje normalną biodostępność [9]. Uważa się, że efekty metaboliczne dymu tytoniowego na dostępność lidokainy manifestują się jedynie przy podaniu doustnym, gdyż wtedy zaznacza się efekt pierwszego przejścia lidokainy przez wątrobę, gdzie zostaje częściowo metabolizowana przez wydrukowane przez dym oksydazy [8].

6.3. Leki przeciwbólowe

U pacjentów palących dochodzi do zmian metabolizmu i działania niesteroidowych leków przeciwzapalnych, paracetamolu oraz opioidów. Spośród NLPZ palenie wywiera największy wpływ na stężenie fenazonu (wzrost

klirensu) oraz wywiera niepewny wpływ na stężenie fenylbutazonu. Wydaje się nie wpływać na metabolizm pozostałych leków tej grupy [8]. Przemiany paracetamolu ulegają nasileniu jedynie u osób palących dużo i długo. Wydaje się, że palacze stanowią grupę obciążoną gorszą prognozą w razie zatrucia paracetamolem [8]. Efekt przeciwbólowy opioidów ulega obniżeniu, w przypadku pentazocyny nawet do 40-50% [9]. Palący wymagają wyższych dawek opioidów w pooperacyjnej terapii bólu.

6.4. Leki przeciwplatekcyjne

Palenie tytoniu podczas leczenia preparatami przeciwplatekcyjnymi może powodować nieprawidłową odpowiedź płytek na standardowo stosowane dawki tych leków. Według dostępnych danych odpowiedź płytek na kwas acetylosalicylowy jest osłabiona lub mieści się w granicach normy, natomiast działanie kłopidogrelu ulega nasileniu u palących pacjentów z chorobą niedokrwienną serca. Indukcja izoenzymu CYP1A2 przez składniki dymu tytoniowego powoduje zwiększenie przemian kłopidogrelu do jego aktywnego metabolitu, stąd wspomniane nasilenie efektu terapeutycznego u palaczy.

6.5. Leki przeciwkrzepliwne

Palacze wymagają wyższych dawek heparyny niefrakcjonowanej. Pod wpływem składników dymu tytoniowego następuje skrócenie czasu biologicznego półtrwania heparyny oraz szybsza eliminacja z ustroju. Podobnie, poziom w osoczu i działanie przeciwkrzepliwne warfaryny ulega obniżeniu. Rekomenduje się zmniejszenie dawek leków przeciwkrzepliwych po zaprzestaniu przez pacjenta palenia papierosów.

6.6. Leki psychotropowe i działające na ośrodkowy układ nerwowy

Pośród leków działających na ośrodkowy układ nerwowy palenie tytoniu pobudza metabolizm środków nasennych i uspokajających z grupy benzodiazepin jak też zolpidemu i zopiklonu. Podobnie, u palących pacjentów mogą być wymagane wyższe dawki leków psychotropowych – neuroleptyków starej (chlorpromazyna, haloperidol) i nowej generacji (klozapina, olanzapina), leków przeciwdepresyjnych z grupy TLPD i SSRI. W razie zaprzestania przez pacjenta palenia obowiązuje konieczność zmniejszenia dawek wymienionych leków. Palenie tytoniu powoduje także, że przy standardowych dawkach fenytoiny, fenobarbitalu i fenytoiny osiągnięte stężenie w surowicy ulega obniżeniu [9].

6.7. B-blokery i blokery kanału wapniowego

Zarówno kardioselektywne, jak też nieselektywne B-blokery są metabolizowane przy udziale CYP1A2, ich stężenie we krwi osób palących jest więc niższe niż u osób bez nałogów. Po rzuceniu palenia zalecane jest zmniejszenie dawki stosowanego przez pacjenta B-blokera [9]. Analogicznie przedstawia się kwestia stosowania werapamilu [9].

6.8. Leki przeciwcukrzycowe

Palący pacjenci z cukrzycą wymagają 15-30% wyższych dawek insuliny niż osoby niepalące. Podczas rzucania palenia dawki insuliny powinny być stopniowo zmniejszane [9].

6.9. Leki rozszerzające oskrzela

Nasilenie metabolizmu teofiliny i aminofiliny, rzadko stosowanych leków rozszerzających oskrzela powoduje obniżenie ich stężenia, skrócenie okresu półtrwania oraz zwiększenie objętości dystrybucji u pacjentów palących. Interakcja ta posiada istotne znaczenie kliniczne ze względu na wąski zakres terapeutyczny leków tej grupy. Zalecana jest kontrola dawki w zależności od ilości wypalanych papierosów, a także od formy przyjmowania nikotyny (papierosy, żucie tytoniu, gumy z nikotyną) [8].

6.10. Chemioterapeutyki

Policykliczne węglowodory aromatyczne znacząco nasilają metabolizm ciprofloksacyny oraz chininy. Pacjenci palący wymagają wyższych dawek tych leków by uzyskać stężenie terapeutyczne w surowicy [9]. Badania retrospektywne wykazały, że również metabolizm chemioterapeutyku przeciwnowotworowego irynotekanu jest wzmocniony u nałogowych palaczy. Zaobserwowano obniżoną toksyczność u pacjentów palących, co sugeruje także obniżoną jego efektywność. Nie podjęto jednak jeszcze decyzji co to zaleceń korekty dawek u pacjentów palących leczonych irynotekanem z powodu zbyt małej ilości zgromadzonych danych [8].

6.11. Interakcje w fazie farmakodynamicznej

Nikotyna posiada własną aktywność farmakologiczną, a więc może wchodzić w interakcje farmakodynamiczne z lekami o działaniu zbieżnym lub przeciwnym do jej efektów. Zdecydowanie najistotniejsze interakcje zachodzące w fazie farmakodynamicznej dotyczą kobiet palących, które stosują doustne środki antykoncepcyjne. Opisane efekty trombogenne palenia są w przypadku tych pacjentek dodatkowo potęgowane działaniem prozakrzepowym doustnych

środków antykoncepcyjnych, co stwarza duże ryzyko powikłań zatorowych w tej grupie. Dym tytoniowy ingeruje także w działanie wziewnych glikokortykosteroidów, obniżając ich efektywność w leczeniu zaostrzeń astmy [7]. Inne opisywane w literaturze interakcje natury farmakodynamicznej między składnikami dymu tytoniowego a lekami wydają się mieć mniejsze znaczenie kliniczne. Nie mniej jednak prawdopodobnym jest, że pacjenci palący mogą wymagać wyższych dawek B-blokerów ze względu na silne przeciwstawne do nich działanie farmakologiczne zawartej w dymie nikotyny [7]. Ze względu na ośrodkowe działanie pobudzające nikotyny osoba paląca może także słabiej odczuwać uspokajające i nasenne działanie benzodiazepin. Przypuszcza się, że także osłabienie efektu przeciwbólowego opioidów u osób palących w stosunku do niepalących może rozwijać się również po części w mechanizmie farmakodynamicznym [7]. Wydaje się jasnym, że nikotyna nasila także efekty krążeniowe adenozyne, choć znaczenie tej interakcji nie zostało jeszcze ustalone [8].

7. Podsumowanie

Palenie tytoniu stanowi jedno z najpoważniejszych współczesnych zagrożeń cywilizacyjnych zarówno ze względu na dużą skalę zjawiska, jak też jego niebezpieczne skutki zdrowotne. Długotrwała ekspozycja na składniki dymu tytoniowego oddziałuje na nabłonki dróg oddechowych, ścianę naczyń krwionośnych, funkcjonowanie komórek nerwowych i równowagę hormonalną, co więcej wykazuje także szereg działań metabolicznych, wpływając na ekspresję izoenzymów układu P450 w wątrobie, płucach i niektórych strukturach ośrodkowego układu nerwowego przyczyniając się do zmian w metabolizmie leków. O ile wiedza na temat interakcji między poszczególnymi lekami jest bardzo szeroka wśród lekarzy i farmaceutów, podobnie jak interakcje leków z pokarmem, o tyle niewiele uwagi skupia problem odchyień w działaniu leków u osób palących.

W związku z wysokim odsetkiem nałogowych palaczy konieczne jest wzięcie pod uwagę możliwości wystąpienia zmian w działaniu farmaceutyku u osób palących papierosy leczonych z powodu arytmii, astmy, cukrzycy, zaburzeń i chorób psychicznych, padaczki czy wymagających długotrwałego leczenia przeciwpłytkowego lub przeciwkrzepliwego. Szczególnie złożonym problemem wydaje się leczenie przeciwzakrzepowe u pacjentów palących ze względu na fakt działania prozakrzepowego składników dymu tytoniowego jak też ich liczne interakcje z lekami stosowanymi w stanach nadkrzepliwości. Podkreślić należy, że mimo analizy teoretycznej i przeglądu dotychczasowych informacji dotyczących mechanizmu i efektów wpływu składników dymu tytoniowego na stężenie we krwi i działanie leków problem ten pozostaje wciąż bardzo złożony, a uzyskane efektywne stężenia leków w surowicy pacjentów palących wciąż nieprzewidywalne. Zmiany w metabolizmie leków spowodowane działaniem dymu tytoniowego utrzymuje się także przez pewien czas po rzuceniu nałogu,

co dodatkowo utrudnia utrzymanie właściwego stężenia leku w organizmie, jednak już od samego początku „rzucania” przy braku induktora przemiany metaboliczne mogą ulegać zachwianiu. Prezentowany materiał jest próbą zasygnalizowania pewnego niebezpieczeństwa związanego z trudnymi do przewidzenia zmianami siły działania niektórych powszechnie stosowanych leków u osób palących w porównaniu z grupą ludzi nieuzależnianych od nikotyny.

Literatura

1. <http://www.psse.wroc.pl/oswiata/dinek/toksycznosc.pdf>;
2. Kulza M., *Interakcje metaboliczne pomiędzy dymem tytoniowym a alkoholem etylowym. Rozprawa doktorska*, Laboratorium Badań Środowiskowych Katedry i Zakładu Toksykologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu;
3. Florek E., *Skład chemiczny I kancerogeny dymu tytoniowego*, Alkoholizm I Narkomania 1999/36/3;
4. Starek A., *Toksykologia dymu tytoniowego. W: Zdrowotne następstwa palenia tytoniu w Polsce*, W. Zatoński, K. Przewoźniak, Ariel Sp, z 0.0., Warszawa 1992, 51-73;
5. Stańczak A., Lewgowski W., *Interakcje leków ze składnikami dymu tytoniowego. Cz. II*, *Bromat. Chem. Toksykol.* XLII, 2009, I, str. 97-103,
6. <http://laboratoria.net/pdf/?get=L3BsL2hvbWUvX2l0ZW0sMTM2MTcscHJpbnQsMSxwZGYsMS5odG1s>,
7. Zavin S., Benovitz N.L., *Drug interactions with Tobacco smoking*, *Clin. Pharmacokinet.* 1999;36:425-438;
8. Stockley I.H., *Drug interactions. 8th edition*, The Pharmaceutical Press, London 2007;
9. Hoffmann D., Wynder E.L., *Aktives I/ml passives Hauche/L W: Lehrbuch der Toxikologic. H. Marquardt und S.G. Schiifer. Mannheim, Leipzig, Wien, Zurich*, BI-Wiss.-Verl., 1994, 589-605.

Interakcje leków i składników dymu tytoniowego – kolejne niebezpieczeństwa wynikające z palenia

Streszczenie

Niepożądane interakcje leków stanowią poważny problem medyczny. Mogą one zachodzić nie tylko pomiędzy stosowanymi jednocześnie lekami, ale także pomiędzy lekiem a pokarmem, suplementem diety lub używką. Wiedza lekarzy i farmaceutów zwykle pozwala uniknąć niebezpiecznych interakcji między lekami. Również zagadnienie łączenia leków z niektórymi pokarmami i napojami (sok grapefruitowy, alkohol) zdobywa rosnące zainteresowanie pacjentów i lekarzy. Wciąż niewiele uwagi poświęca się jednak bardzo istotnemu czynniki ryzyka dla chorych przyjmujących leki jakim jest palenie tytoniu. Interakcje składników dymu tytoniowego z lekami zachodzą na zasadzie zmiany ich farmakokinetyki (wchłaniania i metabolizmu) lub farmakodynamiki. Na poziomie farmakokinetyki najczęściej interakcji wywołują wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne. Poprzez indukcję izoenzymów CYP1A1, CYP1A2 modyfikują one biotransformację wielu związków metabolizowanych z ich udziałem, prowadząc do zmniejszenia ich stężenia w osoczu. Dotyczy to m.in. wielu leków antyarytmicznych, przeciwastmatycznych, przeciwkrzepliwych, przeciwcukrzycowych, nasennych, przeciwpadaczkowych, psychotropowych. Pacjenci palący mogą zatem wymagać

wyższych dawek tych leków. Niebezpieczne klinicznie interakcje zachodzące w fazie farmakodynamicznej dotyczą z kolei głównie kobiet palących papierosy i stosujących doustne środki antykoncepcyjne oraz osób przyjmujących glikokortykosteroidy w postaci wziewnej. Osoby palące mogą wymagać jednak także wyższych dawek B-blokerów w leczeniu nadciśnienia i wyższych dawek morfiny w terapii bólu niż ludzie wolni od nałogu. Niniejsze opracowanie ma na celu podsumowanie dostępnych informacji na temat istotnych klinicznie interakcji leków z paleniem tytoniu. W pracy ujęto mechanizm interakcji oraz wyszczególniono leki jakich interakcje te dotyczą. Podkreślono także znaczenie palenia biernego, wywołującego te same szkodliwy wpływ na przemianę leków w organizmie co palenie czynne.

Interactions between tobacco smoke contents and medications – another danger of smoking

Abstract

Adverse drugs interactions constitute a serious medical problem. Interactions may occur not only between two drugs when taken together but also between a drug and food, diet supplement or stimulant. The good level of knowledge about drug interactions among health care professionals allows to avoid dangerous interplay between medications. Also the awareness of possible unwanted or unsought-for effects of combining drugs with some sorts of food and beverages (alcohol, grapefruit juice) seems getting wider. However, what still demands more attention in terms of interacting with drugs is smoking cigarettes. Tobacco smoke contents may interact with medications either by changing their pharmacokinetics (absorption, metabolism) or affecting its pharmacodynamics. The great majority of pharmacokinetic interactions with smoking are the result of induction of CYP1A1 and CYP1A2 isoenzymes in lung and liver tissue by polycyclic aromatic hydrocarbons, resulting in enhanced drugs biotransformation. Many antiarrhythmic, antiasthmatic, antiepileptic drugs as well as sedatives, anticoagulants and insulin are metabolized with those P450 isoenzymes and so they reach lower serum concentrations and higher dosages might be needed to achieve good therapeutic effect. Through pharmacodynamic mechanism tobacco smoke interacts with oral contraceptive measures, inhaled glucocorticosteroids, B-blockers and morphine. The aim of our study was to summarize the recent data about clinically relevant interactions between tobacco smoke and drugs. The medications involved in interactions with tobacco smoke were listed. The mechanism involved in each interaction was described and the clinical significance of chosen interactions was investigated. We also emphasized the importance of passive smoking, which appears to have the same harmful effects on drug metabolism as being active smoker.

KOMPLEKSY ANTYMONU Z BIOLIGANDAMI STOSOWANE W MEDYCYNIE

1. Wstęp

Chemia arsenu, antymonu i bizmutu jest interesującą płaszczyzną badań dla wielu naukowców od ponad czterech dekad. Wynika to z wielu zastosowań związków tych pierwiastków praktycznie we wszystkich dziedzinach nauk ścisłych i przyrodniczych. Szczególnie ciekawym pierwiastkiem 15 grupy układu okresowego okazał się antymon, który poza unikalnymi właściwościami fizycznymi, wykazuje także ciekawą aktywność biologiczną [1]. Chemia bionieorganiczna tego pierwiastka nie jest jeszcze tak dogłębnie poznana jak np. bizmutu, co stwarza dodatkowe możliwości badawcze, szczególnie w aspekcie medycznym.

Antymon w systemach biologicznych występuje najczęściej na +III stopniu utlenienia, rzadziej na +V ($E_{\text{SbV/SbIII}}^0 = 0,59 \text{ V}$). Antymon(III) wykazuje wysokie powinowactwo wobec ligandów zawierających azot, tlen oraz siarkę, a jego liczba koordynacyjna (CN) wykazuje znaczne zróżnicowanie. Natomiast kompleksy antymonu(V) przyjmują zwykle geometrię oktaedryczną lub zniekształconą oktaedryczną z powodu braku wolnej pary elektronowej ($5s^2$) zlokalizowanej na jonie Sb(V). Proces redukcji jonu Sb(V) do Sb(III) może zachodzić *in vitro* lub *in vivo* pod wpływem specyficznych reduktaz lub małowcząsteczkowych biomolekuł zawierających siarkę [2].

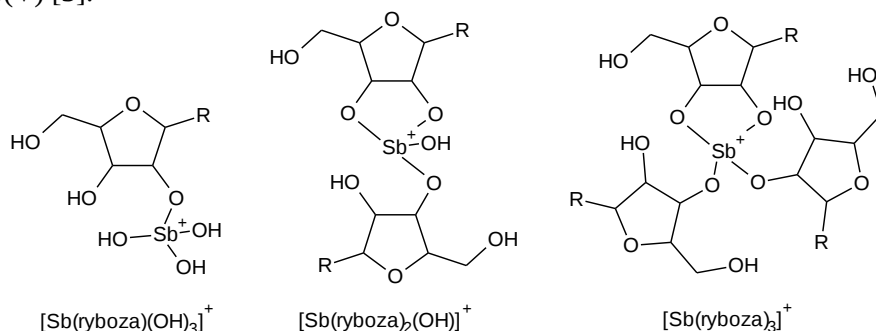
Dzięki swojej aktywności biologicznej, związki antymonu były stosowane w medycynie już w XVI wieku, np. jako środki wymiotne. Obecnie ich kliniczne zastosowanie wiąże się głównie z leczeniem leiszmaniozy. Kompleksy antymonu wykazują także zwiększoną aktywność cytotoksyczną wobec innych pasożytów, wirusów oraz wybranych nowotworowych linii komórkowych [2].

2. Kompleksy antymonu z biocząsteczkami

Antymon nie jest pierwiastkiem istotnym dla prawidłowego funkcjonowania organizmu, stąd też nie istnieją typowe procesy jego wchłaniania i transportu do wnętrza komórek. Dlatego tworzenie kompleksów z biocząsteczkami jest ważnym czynnikiem w badaniach nad zrozumieniem jego biologicznej aktywności.

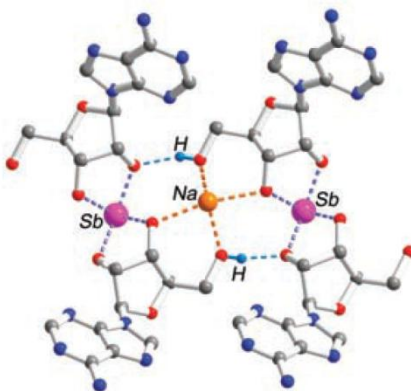
¹ mateuszkowalik.86@gmail.com, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Instytut Chemii, SKN Kalcyt;

Antymon(V) może tworzyć połączenia z biomolekułami zawierającymi rybozę w stosunku 1:1, 1:2 i 1:3 (Rys. 1). Zostało to potwierdzone w badaniach połączeń Sb(V) z oligonukleotydami DNA i RNA [3]. Okazało się, że antymon wiąże się tylko z fragmentami RNA, ujawniając istotną rolę wicynalnych grup *cis*-hydroksylowych rybozy w tym procesie. Dodatkowo stwierdzono, że fragment pochodzący od zasady azotowej nie bierze udziału w koordynacji Sb(V) [3].



Rys. 1. Schematy koordynacji jonu Sb(V) przez cząsteczki rybozy w stosunku 1:1, 1:2 i 1:3 (na podstawie [3])

Antymon (III) tworzy stabilne kompleksy z nukleozydami w podobny sposób jak Sb (V), również wiążąc się z fragmentami *cis*-2',3'-diolowymi rybozy. W zarejestrowanej strukturze krystalicznej kompleksu $\text{Na}[\text{Sb}^{\text{III}}(\text{adenozyna})_2]$ (Rys. 2) widać, że dwie zdeprotonowane grupy hydroksylowe dwóch cząsteczek adenozyny kompleksują na sposób chelatowy jon Sb^{3+} , tworząc dwa pierścienie pięcioczłonowe. Dwie takie podjednostki łączą się ze sobą poprzez skoordynowany jon sodu i międzycząsteczkowe wiązania wodorowe, formując strukturę dimerową [4].



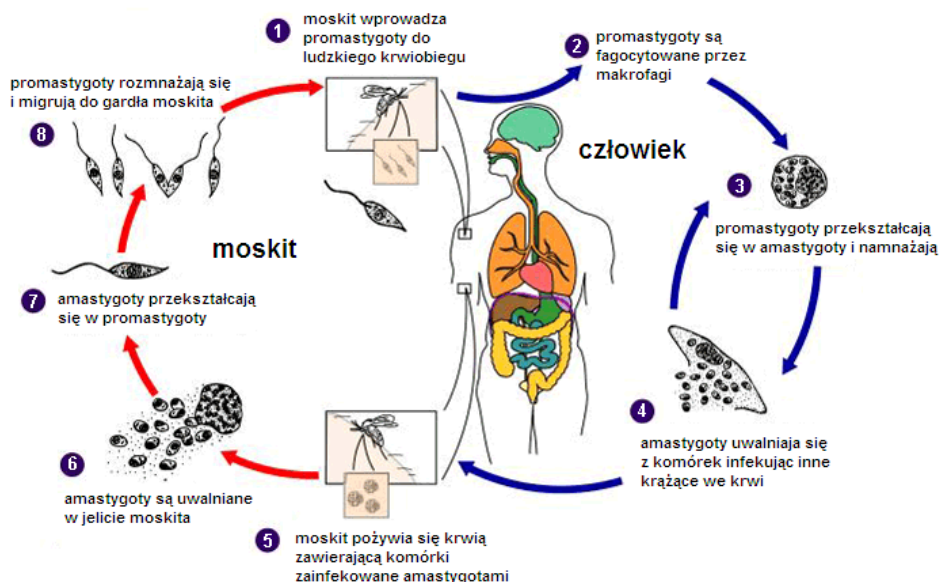
Rys. 2. Struktura kompleksu $\text{Na}[\text{Sb}^{\text{III}}(\text{adenozyna})_2]$ [4]

Antymon (III) może tworzyć także stabilne kompleksy z aminokwasami, np. walina, poprzez koordynację bidentnymi grupami karboksylowymi z utworzeniem liniowego polimeru. Podobnie, wykorzystując atomy donorowe siarki, może wiązać się z peptydami zawierającymi cysteinę, np. glutationem (GSH) i trypanotieniem ($T(SH)_2$). Zdeprotonowane grupy tiolowe reszt cysteiny są jedynymi fragmentami wiążącymi Sb(III), co prowadzi do utworzenia trwałego kompleksu $[Sb(GS)_3]$. Trypanotien jest natomiast najobficiej występującym małowcząsteczkowym tiolem w komórkach pasożytów z rodzaju *Leishmania* (patrz dalej) i może koordynować Sb(III) w stosunku 1:2. Jon centralny łączy się z dwiema resztami cysteiny dwóch cząsteczek peptydu. W przeciwieństwie do dużej trwałości termodynamicznej tych kompleksów, są one kinetycznie labilne. Wymiana ligandów jest w nich uzależniona od pH środowiska i dla niskich wartości pH jest stosunkowo powolna, a dla pH biologicznego – szybka. Dzięki tym właściwościom jony Sb(III) mogą być transportowane w organizmie w postaci połączeń z ligandami tiolowymi [5, 6].

3. Związki antymonu w leczeniu leishmaniozy

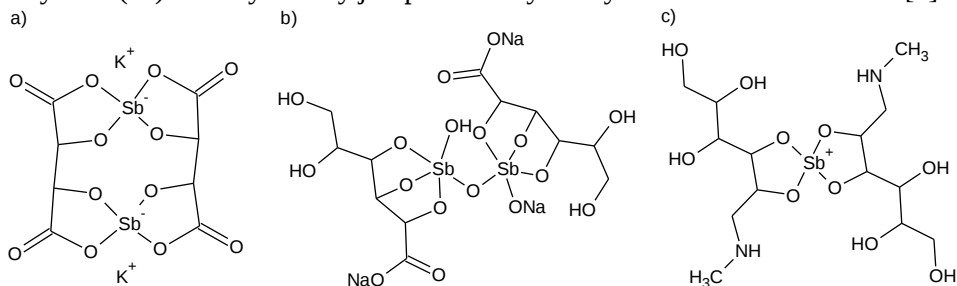
Leishmanioza jest chorobą pasożytniczą, wywoływaną przez różne gatunki pierwotniaków z rodzaju *Leishmania*. Człowiek zaraża się nią poprzez ukąszenia moskitów. Pasożyty są wprowadzane do krwi w postaci promastygotów. Ślina moskitów zawiera składniki powstrzymujące krzepnięcie krwi, rozszerzające naczynia krwionośne oraz przeciwzapalne i znieczulające, które spełniają rolę czynników wspomagających zarażenie. Promastygoty są fagocytowane przez makrofagi, w których przekształcają się w amastygoty i namnażają. Po pewnym czasie amastygoty uwalniają się z makrofagów infekując inne komórki w krwiobiegu. Następnie moskit kąsając ponownie zarażonego człowieka pobiera komórki zawierające amastygoty. Formy te przekształcają się w jelicie moskita z powrotem w promastygoty, namnażają i wędrują do gardła, skąd mogą być ponownie wprowadzone do organizmu człowieka przy następnym ukąszeniu (Rys. 3) [7].

Leishmanioza jest chorobą tropikalną i subtropikalną, która występuje w trzech postaciach: trzewna, skórna i skórno-śluzówkowa. Do najczęstszych objawów choroby należą: gorączka, nudności, obrzęki, anemia, owrzodzenia skóry i tkanek miękkich, trudno gojące się, martwicze rany oraz zniekształcenie twarzy. Nieleczona leishmanioza powoduje śmierć organizmu [8].



Rys. 3. Cykl życiowy *Leishmania* spp. (na podstawie [7])

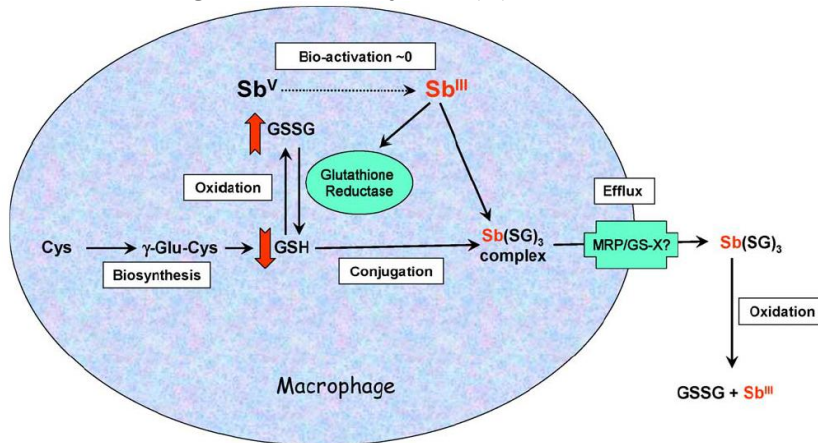
Pierwszym związkiem antymonu zastosowanym przeciwko leishmaniozie ok. 1910 roku był winian antymonu(III) potasu, o wzorze sumarycznym $K_2Sb_2(C_4H_2O_6)_2$ (Rys. 4a). Związek ten jest dimerem, w którym każdy jon antymonu(III) skoordynowany jest przez cztery atomy donorowe tlenu winianu [9].



Rys. 4. Wzory strukturalne: a) winianu antymonu(III) potasu, b) glukonian antymonu(V) sodu, c) megluminianu antymonu(V) (na podstawie [2, 9])

Natomiast związki antymonu na +V stopniu utlenienia, takie jak glukonian antymonu(V) sodu (Rys. 4b) i megluminian antymonu(V) (Rys. 4c) są używane w wielu krajach już od ponad 50 lat jako leki pierwszego wyboru przeciwko leishmaniozie. Są one wysoce skuteczne, tym bardziej, że są jednocześnie nietoksyczne dla organizmu gospodarza. Związane jest to z faktem, że związki $Sb(V)$ występują w roli pro-leku, który jest nieaktywny i nietoksyczny, a dopiero po redukcji w organizmie do $Sb(III)$ staje się formą toksyczną, a zarazem

wykazującą działanie terapeutyczne. W procesie redukcji biorą udział peptydy tiolowe typu glutation, czy trypanotion. Redukcja jest dużo bardziej efektywna w środowisku o pH lekko kwasnym, jakie występuje w komórkach fagolizosomów i makrofagów (Rys 5.), w których egzystuje *Leishmania* [10÷13]. Farmakokinetyka leków na bazie antymonu(V) jest udowodniona w badaniach *in vivo* na chomikach zainfekowanych pasożytami *Leishmania garnhami*. Wykryto u nich znaczące ilości Sb(III) w tkankach i osoczu krwi w trakcie leczenia megluminianem antymonu(V) sodu [14].



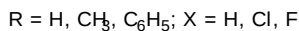
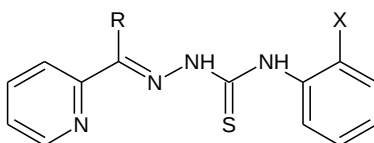
Rys. 5. Schemat działania związków antymonu w komórce makrofaga [13]

Z drugiej strony zdolność związków antymonu do interakcji z nukleozydami i do inhibicji pasożytniczej topoizomerazy (enzym odpowiadający za skrócenie podwójnej helisy podczas replikacji) sugeruje bezpośrednie zaangażowanie antymonu(V) w mechanizmach biologicznej aktywności. Ponadto *Leishmania spp.* jest pozbawiona zdolności syntezy zasad purynowych (auksotrof), dlatego kompleksy [Sb(V)–pochodne puryny] mogą działać jako potencjalne inhibitory enzymów w szlakach metabolicznych wykorzystujących zasady purynowe [15]. Zbadano, że Sb(V) w formie megluminianu tworzy trwałe połączenia z adenozyną w temperaturze pokojowej i środowisku o pH zbliżonym do fizjologicznego. Reakcja jest szczególnie faworyzowana w lekko kwaśnym pH, jakie występuje we wspomnianych komórkach, które zasiedla *Leishmania*. Jest to więc prawdopodobnie główny mechanizm działania leków antymonopochodnych w leczeniu leishmaniozy.

4. Aktywność antymonu wobec innych mikroorganizmów

Kompleksy antymonu wykazują także zwiększoną cytotoksyczność wobec innych mikroorganizmów. Przykładowo zasadowy galusan antymonu(III) sodu był stosowany od 1970 roku w leczeniu schistosomatozy – pasożytniczej choroby wywoływanej przez przywry z rodzaju *Schistosoma* [2].

Inna poważną chorobą pasożytniczą jest trypanosomoza amerykańska (choroba Chagasa) wywoływana przez świdrowca *Trypanosoma cruzi*, przenoszonego na ludzi przez przywry. Biochemiczne podobieństwo *Leishmania spp.* i *Trypanosoma spp.* sprawia, że prowadzi się badania nad aktywnością związków antymonu także wobec *T. cruzi*. Skuteczne w zwalczaniu tego pasożyta okazały się kompleksy antymonu z tiosemikarbazonami acetylopirydyny (Rys. 6) [16, 17]. Ich właściwości porównuje się do związków stosowanych obecnie w terapii: nifurtimoxem, benznidazolem. Większość zbadanych związków, różniących się niewiele strukturą liganda, ukazała zwiększoną cytotoksyczność o 5 do 70 razy niż wspomniane leki, a także kilkukrotnie zwiększoną niż wolne ligandy. Nie udało się jednak ustalić zależności struktura-aktywność (SAR) dla tych związków. Aktywność zbadanych kompleksów wynikała prawdopodobnie z inhibicji reduktazy trypanotyonu (TR), enzymu który jest niezbędny do przetrwania pasożytów, chroniąc ich komórki przed niszczycielskim działaniem wolnych rodników. Dodatkowo zwiększona aktywność biologiczna wynika z redukcji polarności jonu centralnego na skutek chelatacji ligandami tiosemikarbazonowymi, co sprzyja przenikaniu kompleksów przez warstwę lipidową błony komórkowej mikrobów.

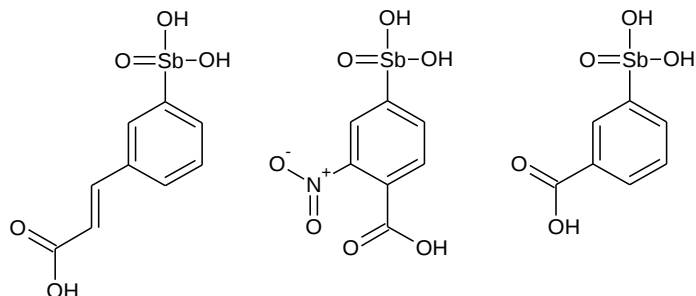


Rys. 6. Wzór strukturalny pochodnych tiosemikarbazonu acetylopirydyny [16, 17]

W innych badaniach [18] zaobserwowano także, że glukonian antymonu(V) sodu efektywnie hamuje replikację wirusa HCV w komórkach wątroby. W leczeniu leishmaniozy stosuje się iniekcje związku antymonu w dziennej dawce 20 mg/kg, co daje stężenie we krwi ok. 400 µg/ml. Natomiast już stężenie 100 µg/ml tego związku skutecznie hamuje rozwój wirusowego zapalenia wątroby typu C. Badania tego typu stwarzają perspektywy dla związków antymonu jako leków alternatywnych dla interferonów, które są obecnie stosowane w terapii anti-HCV, jednak wykazują skuteczność jedynie wobec ok. 50 % pacjentów.

Leishmanioza jest często koinfekcją u pacjentów zarażonych wirusem HIV. Zbadano [19], że związek bimetaliczny antymonu i wolframu o wzorze sumarycznym $[(NH_4)_{17}Na(NaSb_9W_{21}O_{86})_{14}H_2O]$ aktywnie niszczy cząstki wirusa HIV u pacjentów cierpiących na AIDS. Zainicjowało to poszukiwania nowych polioksometalicznych związków antymonu, które mogłyby być potencjalnymi terapeutykami w leczeniu zespołu nabytego niedoboru odporności. Natomiast seria aromatycznych związków antymonu(V) (Rys. 7) wykazała właściwości anti-HIV wobec komórek linii CEM-SS ($EC_{50} = 0,9-8,7 \mu M$) [20]. Mechanizm

działania polega tu prawdopodobnie na przerwaniu interakcji pomiędzy glikoproteiną otoczki wirusowej (gp120) a glikoproteinami receptora CD4 na powierzchni komórek CEM-SS.

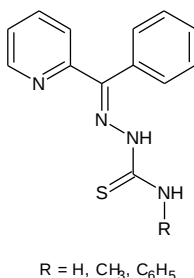


Rys. 7. Wzory strukturalne aromatycznych związków antymonu (V) [20]

5. Kompleksy antymonu jako potencjalne związki antynowotworowe

Większość badań nad aktywnością biologiczną kompleksów antymonu skupia się na właściwościach przeciwpasożytniczych. Jednak w ostatnich latach odkrywa się ich potencjalne właściwości antynowotworowe. Okazało się, że nawet stosunkowo prosty winian antymonu(III) potasu wykazuje znaczącą cytotoksyczność *in vitro* wobec różnych linii komórkowych raka płuc. Osiągnął wskaźnik IC_{50} w zakresie $4,2\div 322$ $\mu\text{g/ml}$, co sprawia że jest nawet skuteczniejszy niż znane chemioterapeutyki, cisplatyna i doksorubicyna [2].

Tiosemikarbazony i ich kompleksy z metalami znane są z cytotoksyczności wobec komórek białaczki. Ligandy te (Rys. 8) przetestowano także w połączeniach z antymonem(III) wobec linii komórkowych – HL-60 (komórki ludzkiej białaczki promielocytowej) i Jurkat (komórki ludzkiej białaczki limfoblastycznej T). Cytotoksyczność kompleksów znacząco wzrosła w porównaniu do wolnych ligandów oraz wyjściowej soli SbCl_3 . Związki te okazały się nawet 10-krotnie skuteczniejsze niż cisplatyna. Badania tego typu udowadniają istotną rolę jonu centralnego kompleksów w tego typu procesach, w tym wypadku jonu Sb^{3+} [21].



Rys. 8. Wzór strukturalny pochodnych tiosemikarbazonu 2-fenylopyridyny [21]

Związki antymonu(III) są już nawet obecnie proponowane jako nowe chemioterapeutyki w leczeniu ostrej białaczki promielocytowej (APL). Postuluje się, że wpływają na homeostazę glutationu, stres oksydacyjny i apoptozę komórek nowotworowych [13].

6. Podsumowanie

Przedstawione fakty dowodzą, że współczesne prowadzone badania nad wykorzystaniem związków antymonu w celach terapeutycznych dają pozytywne rezultaty. Połączenia chemiczne antymonu były stosowane w medycynie już od dawna, jednak mechanizmy ich działania są poznawane dopiero w ostatnich latach. W dalszym ciągu istotną kwestią jest poszukiwanie nowych biologicznie aktywnych połączeń koordynacyjnych tego metalu, chociażby z powodu nabywania odporności przez mikroorganizmy na obecnie stosowane leki. Bada się np. rolę jonów antymonu w modulowaniu cytotoksyczności ligandów, które same ją wykazują. Poszukuje się zależności struktura-aktywność, co w przypadku antymonu nie jest łatwe, gdyż wchodzi on w reakcje koordynacji dosyć trudno, a otrzymywane związki charakteryzują się różnorodnością struktur. Duże nadzieje wiąże się ostatnio z wykorzystaniem kompleksów antymonu przeciwko wirusom HCV i HIV, a także w terapii antynowotworowej. Badane związki same wykazują cytotoksyczność, ale dodatkowo kojarzy się je również z obecnie stosowanymi lekami, np. interferonami [22].

Literatura

1. Vatsa C., Pawar A.S., Garje S.S., *Synthesis and characterization of antimony carboxylates*, International Journal of Chemical Studies, 2013, 1, 73-81;
2. Sun H. (ed.), *Biological Chemistry of arsenic, antimony and bismuth*, John Wiley & Sons, West Sussex, 2011;
3. Hansen H. R., Pergantis S. A., *Mass spectrometric identification and characterization of antimony complexes with ribose-containing biomolecules and an RNA oligomer*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2006, 385, 821-833;
4. Klüfers P., Mayer P., *Polyol metal complexes. Part 54 Multiply deprotonated purine nucleosides as ligands in bismutates and antimonates*, Zeitschrift für Anorganische und Allgemeine Chemie, 2007, 633, 903-907;
5. Sun H., Yan S., Cheng W.S., *Interaction of antimony tartrate with the tripeptide glutathione*, European Journal of Biochemistry, 2000, 267, 5450-5457;
6. Yan S., Ding K., Zhang L., Sun H., *Complexation of antimony(III) by trypanothione*, Angewandte Chemie International Edition, 2000, 39, 4260-4262;
7. Shaapan R.M., Elmahallawy E.K.A.E., Nassar A.Y.A., Alvar J., Röder, Stachura M., Gottberg A., Martin M., Herden C., Becker K.D., *Metals in medicine project: Investigation of the treatment of leishmaniasis with antimony containing drug compounds using perturbed angular correlation spectroscopy with parent isotopes ^{116}Sb , ^{118}Sb , ^{120}Sb , (^{128}Sb), ^{130}Sb* , European Organization for Nuclear Research, 06/01/2012;
8. Herwaldt B.L., *Leishmaniasis*, The Lancet, 1999, 354, 1191-1199;

9. Palenik R.C., Abboud K.A., Palenik G.J., *Bond valence sums and structural studies of antimony complexes containing Sb bonded only to O ligands*, *Inorganica Chimica Acta*, 2005, 358, 1034-1040;
10. Gielen M. (ed.), Tiekink E.R.T. (ed.), *Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents*, John Wiley & Sons, Chichester, 2005;
11. Tiekink E.R.T., *Antimony and bismuth compounds in oncology*, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2002, 42, 217-224;
12. Hadjikakou S.K., Antoniadis D., Hadjiliadis N., Kubicki M., Binolis J., Karkabounas S., Charalabopoulos K., *Synthesis and characterization of new water stable antimony(III) complex with pyrimidine-2-thione and in vitro biological study*, *Inorganica Chimica Acta*, 2005, 358, 2861-2866;
13. Wyllie S., Fairlamb A.H., *Differential toxicity of antimonial compounds and their effects on glutathione homeostasis in human leukaemia monocytic cell line*, *Biochemical Pharmacology*, 2006, 71, 257-267;
14. Yarbuh A.L., Anez N., Pena Y.P., Burguera J.R., Burguera M., *Antimony determination in tissues and serum of hamsters infected with meglumine antimoniate*, *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 1994, 88, 37-41;
15. Demicheli C., Frezard F., Lecouvey M., Garnier-Suillerot A., *Antimony(V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, 1570, 192-198;
16. Lessa J.A., Reis D.C., Mendes I.C., Speziali N.L., Rocha L.F., Pereira V.R.A., Melo C.M.L., Beraldo H., *Antimony(III) complexes with pyridine-derived thiosemicarbazones: Structural studies and investigation on the antitrypanosomal activity*, *Polyhedron*, 2011, 30, 372-380;
17. Parrilha G.L., Dias R.P., Rocha W.R., Mendes I.C., Benitez D., Varela J., Cerecetto H., Gonzalez M., Melo C.M.L., Neves J.K.A.L., Pereira V.R.A., Beraldo H., *2-Acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones and their antimony(III) complexes exhibit high anti-trypanosomal activity*, *Polyhedron*, 2012, 31, 614-621;
18. Yeh C.-T., Hwang D.-R., Lai H.-Y., Hsu J.T.A., *Inhibition of authentic hepatitis C virus replication by sodium stibogluconate*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 310, 537-541;
19. Rozenbaum W., Dormont D., Spire B., Vilmer E., Gentilini M., Griscelli C., Montagnier L., Barre-Sinoussi F., Chermann J.C., *Antimoniotungstate (HPA 23) treatment of three patients with AIDS and one with prodrome*, *The Lancet*, 1985, 325, 450-451;
20. Yang Q., Stephen A.G., Adelsberger J.W., Roberts P.E., Zhu W., Currens M.J., Feng Y., Crise B.J., Gorelicko R.J., Rein A.R., Fisher R.J., Shoemaker R.H., Seil S., *Discovery of small-molecule Human Immunodeficiency Virus type 1 entry inhibitors that target the gp120-binding domain of CD4*, *Journal of Virology*, 2005, 79, 6122-6133;
21. Reis D.C., Pinto M.C.X., Souza-Fagundes E.M., Wardell S.M.S.V., Wardell J.L., Beraldo H., *Antimony(III) complexes with 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones: Cytotoxicity against human leukemia cell lines*, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2010, 45, 3904-3910;
22. Dzamitika S.A., Falcao C.A.B., Oliveira F.B., Marbeuf C., Garnier-Suillerot A., Demicheli C., Rossi-Bergmann B., Frezard F., *Role of residual Sb(III) in meglumine antimoniate cytotoxicity and MRP1-mediated resistance*, *Chemico-Biological Interactions*, 2006, 160, 217-224;

Kompleksy antymonu z bioligandami stosowane w medycynie

Streszczenie:

Związki antymonu stosowane były w medycynie już od dawna, jednak dopiero w ostatnich latach poszukuje się mechanizmów ich biologicznej aktywności. Jednocześnie prowadzi się poszukiwania nowych cytotoksycznych związków kompleksowych, co w przypadku antymonu nie jest łatwe, gdyż jon antymonu słabo ulega reakcjom koordynacji. W pracy przedstawiono przykłady wykorzystania związków antymonu w celu udowodnienia ich potencjału terapeutycznego. Scharakteryzowano chorobę – leishmaniozę i przedyskutowano w jaki sposób kompleksy antymonu ją zwalczają. Podano przykłady innych związków antymonu przeciwpasożytniczych i przeciwwirusowych jak również zaproponowano możliwe mechanizmy ich działania. Dodatkowo przedstawiono możliwości zastosowań związków antymonu w terapii antynowotworowej.

Słowa kluczowe: kompleksy antymonu, leishmanioza, właściwości antynowotworowe

Antimony complexes with bioligands used in medicine

Antimony compounds have been used in medicine for a long time, but just in recent years the mechanisms of their biological activity are discovered. Simultaneously is carry out research into new cytotoxic compounds, which in the case of antimony is not easy, because it is weakly reactive in coordination reactions. This paper presents examples of the use of antimony compounds in order to prove their therapeutic potential. Leishmaniasis disease has been characterized and way in which antimony complexes can work was discussed. It also provides examples of other antiparasitic and antiviral compounds and proposed their mechanism of action. Antimony also shows potential in anticancer therapy.

Keywords: antimony complexes, leishmaniasis, anticancer properties

NOWA METODA WALKI Z WIRUSEM EBOLA I WIRUSEM WŚCIEKLIZNY

1. Wstęp

Wirusy są to małe, potencjalnie patogenne nukleoproteidy, wywołujące liczne choroby u ludzi, zwierząt i roślin. Za jeden z najgroźniejszych wirusowych patogenów człowieka uważany jest wirus Ebola. Spowodowane jest to głównie jego łatwą transmisją pomiędzy ludźmi oraz bardzo wysoką śmiertelnością, wahającą się w granicach 50-90%. Ponadto nie ma obecnie dostępnej żadnej efektywnie działającej szczepionki przeciwko temu zabójczemu wirusowi [1].

Wirus Ebola stanowi szczególne zagrożenie na terenach krajów rozwijających się, głównie północnej i środkowej Afryki, gdzie wywołuje liczne epidemie. Wirus ten jest odpowiedzialny za występowanie na tych terenach gorączki krwotocznej Ebola – choroby wywołującej szybko i bolesną śmierć. Innym wirusem stwarzającym duży problem szczególnie w Północnych i Środkowych rejonach Afryki oraz także w Azji Południowo-Zachodniej jest wirus wścieklizny. Choć występuje on niemal na całym świecie, to właśnie na tych szerokościach geograficznych wywołuje on największe spustoszenie. Szacuje się, że około 99% śmiertelnych przypadków zakażenia wirusem wścieklizny ma miejsce w Afryce, Azji i Ameryce Południowej [2,3].

Wirus wścieklizny i wirus Ebola co roku zbierają śmiertelne żniwo w ludzkiej populacji i to pomimo nowych, skuteczniejszych metod diagnostycznych. Co roku z powodu wirusa wścieklizny umiera ponad 55 000 osób [4], a wirus Ebola zabija kolejne kilkaset do kilku tysięcy ludzi. Coraz większe obawy wzbudza również fakt, że co roku przybywa zakażeń wywołanych zarówno jednym jak i drugim wirusem.

Wydawać by się mogło, że liczba osób umierających z powodu zakażenia wirusem Ebola jest stosunkowo niska, należy jednak brać pod uwagę brak skutecznego leczenia oraz szczepionki. W połączeniu z łatwym przenoszeniem i wysoką zakaźnością wirus ten staje się niezwykle niebezpieczny i pozostawia nas niemal bezbronnymi w walce z nim. Dodatkowym problemem jest brak rejestrowania wszystkich przypadków zakażeń wirusami Ebola i wścieklizny w niektórych krajach rozwijających się, przez co realna liczba zachorowań jest mocno niedoszacowana.

¹ starosielec.m@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe Biotechnologów *Mikron*, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, www.umcs.pl/pl/biologia-i-biotechnologia.htm

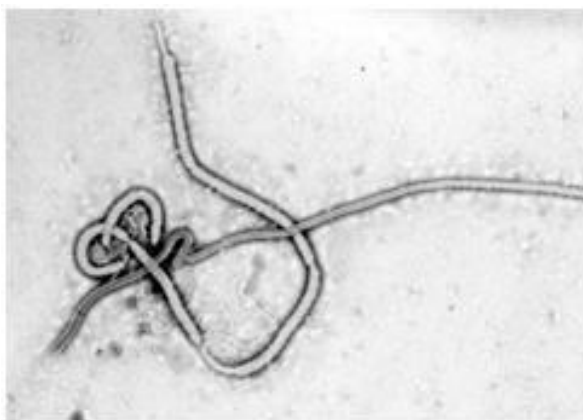
² mateusz_smyk@o2.pl, Studenckie Koło Naukowe Biotechnologów *Mikron*, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, www.umcs.pl/pl/biologia-i-biotechnologia.htm

Pomimo istnienia dostępnej i skutecznej szczepionki, wirus wścieklizny może być równie niebezpieczny. Wynika to z powszechności jego występowania, dużego rezerwuaru zwierzęcego oraz śmiertelności, która po wystąpieniu objawów zakażenia osiąga praktycznie 100% przypadków [5]. Ponadto dużym problemem jest mała dostępność i wysoki koszt tych szczepionek w krajach afrykańskich i azjatyckich, tam więc gdzie są one najbardziej potrzebne.

Rozwijająca się popularność turystyki dodatkowo zwiększa i tak już duże zagrożenie wywołane opisanymi wirusami. W dzisiejszych czasach coraz większe staje się niebezpieczeństwo zetknięcia się z tymi groźnymi wirusami, a powszechność i częstotliwość transportu lotniczego umożliwia i ułatwia ich szybkie rozprzestrzenianie na niemal wszystkie kontynenty. Coraz istotniejsze staje się zatem opracowanie skutecznych metod obrony i walki, przede wszystkim z wirusem Ebola, ale także z wirusem wścieklizny. Czy istnieje jakiś sposób ochrony przed tak zabójczymi patogenami? Czy możliwe jest znalezienie rozwiązania, które będzie nie tylko skuteczne, ale również tanie i łatwo dostępne nawet dla ubogich rejonów Afryki i Azji?

2. Wirus Ebola

Wirus Ebola jest wirusem otoczkowym, należącym do rodziny Filoviridae, którego materiał genetyczny tworzy jednoniciowa, niesegmentowana, ujemna nić RNA. Częsteczka wirusa ma charakterystyczny nitkowaty kształt o średnicy mierzącej 80 nm, a długości różniącej się pomiędzy poszczególnymi przedstawicielami gatunku, dochodzącej nawet do 14000 nm. W skład genomu wirusa wchodzi 7 genów, jeden z nich koduje rozpuszczalną glikoproteinę, która jest wydzielana w dużych ilościach z zainfekowanych komórek [6].

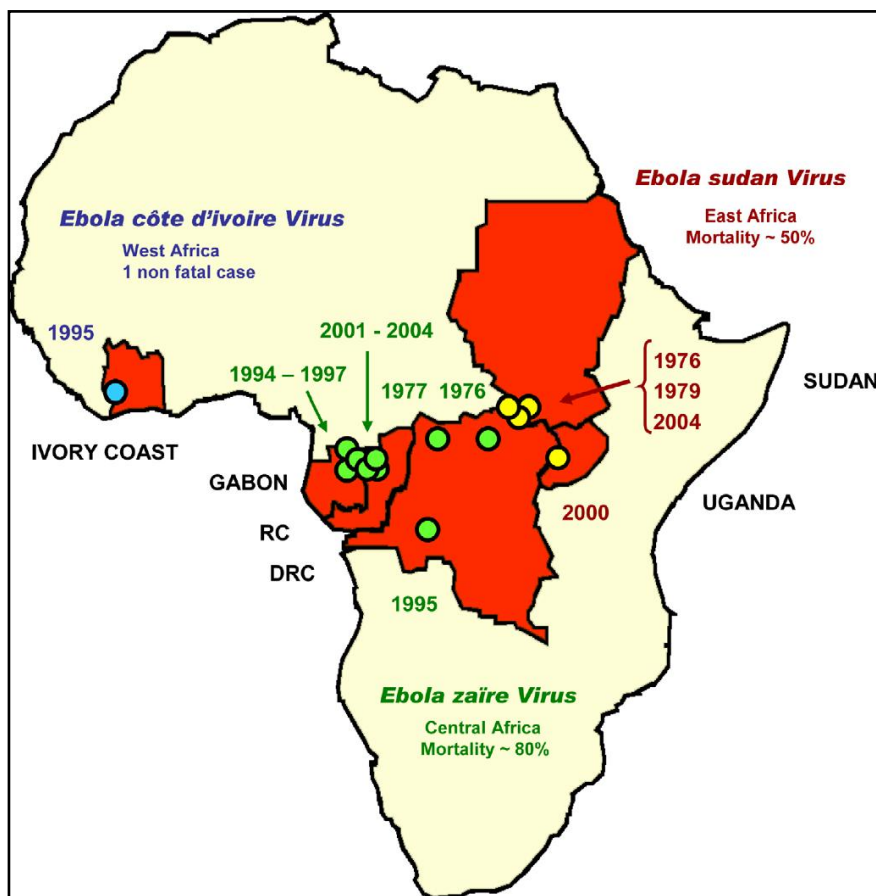


Rys.1. Wirus Ebola [7]

2.1. Rys historyczny

Wirus Ebola został odkryty w 1976 roku na terenie Afryki Centralnej, w Sudanie i Zairze, gdzie odnotowano pierwsze epidemie wywołane przez ten patogen. Nazwa wirusa pochodzi od rzeki Ebola, przepływającej przez Zair, w pobliżu której miała miejsce jedna z pierwszych epidemii [8]. Sekwencjonowanie genetyczne pozwoliło na wyróżnienie podtypów wirusa, początkowo czterech, nazwanych w zależności od miejsca jego izolacji: Ebola Zair, Ebola Sudan, Ebola Wybrzeże Kości Słoniowej oraz Ebola Reston. W odróżnieniu od pozostałych podtyp Reston, wyizolowany w Reston w stanie Wirginia (USA), nie wywołuje objawów chorobowych u ludzi. Przeciwciała przeciwko temu podtypowi wirusa wykryto u ludzi w Stanach Zjednoczonych, na Filipinach i we Włoszech. Pozostałe podtypy, występujące głównie na kontynencie afrykańskim, charakteryzują się patogennością dla człowieka i wywołują gorączkę krwotoczną Ebola – groźną, śmiertelną chorobę zakaźną. Najbardziej niebezpieczny jest podtyp Zair – cechuje go śmiertelność sięgająca nawet 80% zakażonych [9]. W 2007 roku odkryto nowy podtyp wirusa Ebola – Bundibugyo, który wywołał epidemię w dystrykcie Bundibugyo w zachodniej Ugandzie [6].

Pomijając pierwsze przypadki z 1976 roku największe epidemie miały miejsce w 1995 roku oraz w latach 2000-2003. Pierwsza z nich wystąpiła w pobliżu miasta Kikwit w Zairze, natomiast druga obejmowała tereny Ugandy, Gabonu oraz Kongo i wywołana była zarówno przez podtyp Zair, jak i Sudan. W obu przypadkach odnotowano około 250 zgonów. Epidemie wirusa Ebola nie należą jednak do przeszłości. Obecnie ponownie istnieje problem z szybko wzrastającą liczbą zachorowań, tym razem jednak mamy do czynienia z największą jak dotąd epidemią tego wirusa w historii. Zaczęła się ona w Gwinei, państwie w Afryce Zachodniej, w lutym 2014 roku i stopniowo rozprzestrzeniła się na kraje sąsiednie. Pod koniec czerwca w samej Gwinei odnotowano 386 przypadków zachorowań, w tym 280 śmiertelnych, natomiast ogólna liczba zakażeń wzrosła do prawie 600 (w tym około 350 zgonów) [10]. Epidemia nadal trwa, nie można więc przewidzieć jaka będzie ostateczna liczba zachorowań.



Rys. 2. Epidemie wirusa Ebola w Afryce [9]

2.2. Transmisja

Zagrożenie epidemii wynika głównie z łatwości z jaką wirus Ebola się rozprzestrzenia oraz jego wysokiej zakaźności. Sprawy nie ułatwia też fakt, że nie znamy dokładnie rezerwuaru zwierzęcego wirusa, chociaż podejrzewa się, że mogą nim być owocożerne nietoperze, ponieważ są one jedynym znanym gatunkiem zwierząt, u którego wirus ten występuje, lecz nie powoduje wystąpienia żadnych klinicznych objawów [6]. Wirus Ebola powoduje dużą śmiertelność nie tylko u ludzi, lecz także u szympanów i goryli. Poza kręgowcami jego występowanie potwierdzono również u niektórych gatunków roślin, stawonogów oraz ptaków. U ludzi głównymi drogami zakażenia są kontakt bezpośredni oraz zakażenia szpitalne. Wirus przenosi się szczególnie przez krew, nasienie oraz inne wydzieliny i tkanki chorego człowieka czy zwierzęcia [11]. Duże zagrożenie stanowią popularne w niektórych rejonach Afryki polowania na szympansy i goryle, gdyż występowanie wirusa Ebola

u tych zwierząt jest bardzo częste. Znaczną rolę w rozprzestrzenianiu się wirusa odgrywają również ceremonie pogrzebowe, w których żałobnicy mają bezpośredni kontakt z ciałem zmarłego. Warto jednak dodać, że zakaźność wirusa pojawia się dopiero po wystąpieniu objawów chorobowych, nie występuje natomiast we wczesnej fazie zakażenia.

2.3. Przebieg choroby

Choroba wywoływana przez wirus Ebola, nazwana gorączką krwotoczną Ebola, powoduje szybką i bolesną śmierć. Okres inkubacji wirusa wynosi około 4-10 dni (choć może też być dłuższy, nawet do 21 dni), po którym pojawia się wysoka gorączka (powyżej 38°C) oraz inne, niespecyficzne objawy, takie jak: dreszcze, bóle mięśni, mdłości, wymioty, bóle brzucha i biegunka. Dodatkowo może wystąpić obrzęk węzłów chłonnych, nerek oraz mózgu, a także nekroza wątroby, organów limfatycznych, nerek, jąder i jajników. Ponadto obserwuje się zapalenie mięśnia sercowego, trzustki oraz płuc. U wszystkich pacjentów występują też w różnym stopniu zaburzenia koagulacji, mogące objawiać się m. in. przez krwotok spojówkowy, zmniejszoną krzepliwość krwi, siniaki czy obecność krwi w moczu i kale. Często w czasie przebiegu choroby pojawia się też charakterystyczna, plamkowo-grudkowa wysypka. Kolejnymi, bardziej tragicznymi w skutkach objawami są obfite krwawienia z jam ciała, krwotoki wewnętrzne oraz niewydolność wielonarządowa. Jak dotąd nie zostały opracowane żadne skuteczne sposoby leczenia, chorzy są więc poddawani jedynie leczeniu objawowemu. Śmierć następuje zwykle w przeciągu 6-16 dni od czasu wystąpienia pierwszych objawów. Śmiertelność waha się w zakresie 50-90% i zależy głównie od podtypu wirusa którym został zakażony organizm. U ocalałych osób następuje wydłużony okres rekonwalescencji [6, 11].

2.4. Zagrożenie bioterrorystyczne

Ze względu na duże niebezpieczeństwo stwarzane przez wirus Ebola, został on zaklasyfikowany do 4 poziomu bezpieczeństwa biologicznego [1]. Poziom ten zarezerwowany jest dla patogenów stwarzających wysokie ryzyko zakażeń laboratoryjnych i wywołujących u ludzi choroby o poważnych lub śmiertelnych skutkach.

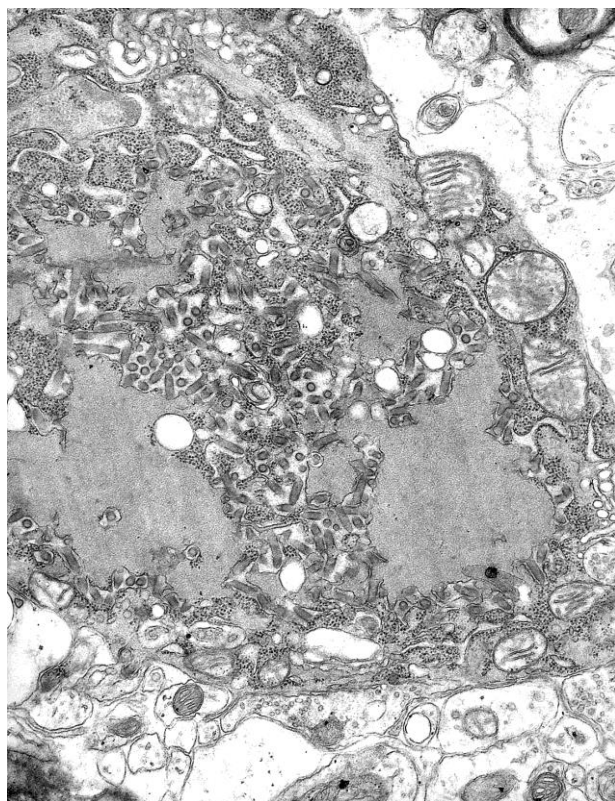
Biorąc pod uwagę jak wysoką śmiertelnością charakteryzują się zakażenia wirusem Ebola, nic dziwnego, że istnieje obawa wykorzystania tego wirusa jako broni biologicznej. Został on nawet zaklasyfikowany jako broń biologiczna kategorii A, w której znajdują się patogeny o największym stopniu ryzyka. Ponadto znane są badania nad wykorzystaniem wirusa Ebola jako broni biologicznej, które były prowadzone przez Związek Radziecki. Używając jako modelu doświadczalnego małp badacze wykazali, że nawet wdychanie powietrza z niewielką ilością zakaźnych cząstek wirusowych może być

skuteczną drogą transmisji i prowadzić do zakażenia. Wirus może również rozprzestrzeniać się przez skażone nim powierzchnie, jedzenie oraz napoje [8]. Tym bardziej zwiększa to potrzebę stworzenia skutecznej ochrony przed tym niebezpiecznym patogenem, czy to w postaci szczepionki, czy też leków przeciwwirusowych.

Obecnie wciąż nie ma dostępnej szczepionki przeciwko wirusowi Ebola, choć od dawna trwają badania nad jej opracowaniem [1].

3. Wirus wścieklizny

Do rodzaju *Lysavirus* należy 12 gatunków wirusów, w tym wirus wścieklizny, zaliczający się do rodziny *Rabdoviridae* [12]. Jego materiał genetyczny stanowi podobnie jak u wirusa Ebola jednoniciowa, niesegmentowana, ujemna nić RNA. Cząsteczka wirusa ma podłużny, walcowaty kształt, średnicę około 75 nm, a średnia długość wynosi około 180 nm. Wirus wścieklizny jest wirusem otoczkowym, a jego genom zbudowany jest z pięciu białek kodujących: nukleoproteinę, fosfoproteinę, białko macierzy, glikoproteinę i polimerazę zależną od RNA [2,12].



Rys. 3. Komórka zarażona wirusem wścieklizny [13]

3.1. Szczepionka przeciwko wirusowi wścieklizny

Wirus wścieklizny jest znany ludzkości już od kilku tysięcy lat [2], lecz prace nad opracowaniem i zastosowaniem skutecznej szczepionki rozpoczął dopiero Ludwik Pasteur. Pierwszy raz skutecznie zastosował ją w 1855 roku, ratując życie dziewięcioletniego chłopca [14]. Szczepionkę podaje się w sześciu dawkach – 0, 3, 7, 14, 30 i 90 dni po ekspozycji, w mięsień naramienny lub podskórnice. Pomimo tak długiego czasu od wynalezienia pierwszej szczepionki, choroba pozostaje w dalszym ciągu jedną z najbardziej śmiertelnych na świecie. Co roku umiera na nią ponad 50 000 ludzi na całym świecie [15], a jest to tylko szacunkowa liczba, ponieważ wiele krajów nie prowadzi spisu osób które chorują i umierają z powodu tego wirusa [3]. Dodatkowo w krajach trzeciego świata szczepionka jest podawana nieprawidłowo lub też jest źle przechowywana, co znacznie wpływa na jej wartość użytkową. Do tej pory wprowadzano wiele programów walki z tą chorobą, lecz nigdy nie udało się jej skutecznie eradykować. W walce z wirusem wścieklizny próbowano zastosować m.in. pozajelitowe szczepienia psów, co zmniejszało ryzyko zachorowań w regionie, jednak nie przyniosło tak dobrych efektów jak się spodziewano. Próbowano także masowo uśmiercać stada psów lecz również to rozwiązanie nie przyniosło wymiernych efektów [15].

3.2. Transmisja wirusa

U ludzi zakażenie wirusem wścieklizny jest śmiertelne w skutkach, powodując zapalenie mózgu oraz rdzenia kręgowego. Drogami rozprzestrzeniania się wirusa są: kontakt ze śliną zarażonego zwierzęcia oraz przez błony śluzowe lub otwarte rany. Istnieje również możliwość przeniesienia wirusa bezpośrednio z człowieka na człowieka, lecz do tej pory jedynym takim znanym przypadkiem było przeszczepienie wirusa wraz z narządem podczas transplantacji. Pośrednią drogą zakażenia może być też inhalacja w jaskiniach aerozolem z odchodów nietoperzy [4]. Wirus zwiększył szybkość swojego rozprzestrzeniania się między kontynentami poprzez transport przypadkowych dzikich zwierząt zarażonych tą chorobą. Przykładem jest nietoperz złapany w luku transportowym statku w Honolulu w 1991 roku. Po jego zbadaniu okazało się, że jest on nosicielem tej groźnej choroby [4]. Dodatkowo wirus rozprzestrzenia się poprzez handel egzotycznymi zwierzętami oraz hodowlę rzadkich ras psów w obszarach niekontrolowanych pod kątem tego wirusa, z których następnie zwierzęta te są eksportowane na inne kontynenty. Wirus wścieklizny występuje powszechnie w obu Amerykach, środkowo-wschodniej Europie, Afryce oraz Azji [2].

Wirus wścieklizny posiada duży rezerwuuar zwierzęcy. Podatne na niego są właściwie wszystkie ssaki, przy czym najliczniejsze grupy stanowią zarówno zwierzęta domowe, takie jak psy czy koty, jak i zwierzęta dzikie, takie jak skunksy, lisy, kojoty i nietoperze. Największym rezerwuarem wirusa wścieklizny jest rodzina zajęczaków [4].

3.3. Diagnostyka i przebieg choroby

Wykrywanie wirusa wścieklizny nie jest łatwe. Do tego celu służą RT-PCR, testy proteomiczne oraz technologia rekombinowanego DNA [12]. Dodatkowo przyżyciowo można badać preparaty odciskowe, przeciwciała sprzężone z fluoresceiną, a pośmiertnie wykrywanie ciałek wtrętowych Negriego w komórkach nerwowych hipokampu.

Wirus wścieklizny zaliczany jest do wirusów neurotropowych, ponieważ po проникnięciu do organizmu i krótkim okresie namnożenia w tkance mięśniowej mięśni oddechowych wędruje do centralnego układu nerwowego, wzdłuż nerwów obwodowego układu nerwowego. Szybkość migracji określa się na około 3 mm na dobę. Z tego powodu, szybkość wystąpienia objawów, jak i możliwość skutecznego leczenia jest skorelowana z odległością ugryzienia od centralnego układu nerwowego [16].

Każdy nie leczony przypadek wirusa wścieklizny prowadzi do zgonu [3]. Występują dwie różne postaci tej choroby: porażenna i pobudzeniowa (zwana klasyczną). Większość przypadków zachorowania na wściekliznę kończy się postacią pobudzeniową, a tylko niewielka część osób, które zachorują ma objawy wścieklizny porażennej. Poparciem tego są badania, które zostały przeprowadzone w latach 198-2004 na Tajlandii. W tym okresie zachorowało 115 ludzi, z czego u 80 wystąpiła postać klasyczna, a u 35 porażenna [16]. W obu przypadkach wścieklizny występują charakterystyczne fazy: inkubacja, okres prodromalny, okres objawów właściwych, śpiączka i śmierć. Pomimo tego występują liczne różnice w objawach klinicznych tych dwóch postaci wścieklizny, pozwalające je odróżnić. W postaci porażennej występuje apatia i zubożenie na bodźce zewnętrzne, a w postaci pobudzeniowej silny światłowstręt, wodowstręt oraz ogólne pobudzenie [16]. Dodatkowym problemem okazuje się długi czas inkubacji, oraz niespecyficzne objawy w okresie prodromalnym. Do tej pory chorobę tę przeżyło tylko kilkanaścioro pacjentów, ale prawie wszyscy borykają się teraz z problemami zdrowotnymi: zapaleniem mózgu, zaburzeniami mowy oraz chodu [3].

Istnieje także możliwość leczenia ludzi, u których wystąpiły już pierwsze objawy choroby. Zastosowane w tym przypadku leczenie nazwano „protokołem z Milwakue”. Polega ono na wprowadzeniu pacjenta w stan śpiączki fizjologicznej, podawanie immunoglobulin, ketaminy oraz przeciwciał przeciwko wirusowi wścieklizny. Skuteczność takiej terapii jest znikoma, lecz daje niewielkie szanse przeżycia pacjentom w późniejszych fazach choroby [5].

4. Biwalentna szczepionka przeciwko wirusowi wścieklizny oraz wirusowi Ebola

Zarówno wirus wścieklizny, jak i wirus Ebola są śmiertelnymi patogenami, stwarzającymi duże zagrożenie na całym świecie. Jednak największe problemy wywołują przede wszystkim w krajach afrykańskich i azjatyckich, gdzie dostęp do odpowiedniej opieki medycznej jest dla wielu ludzi ograniczony. Ze względu na równoległe występowanie obu wirusów na tych obszarach najbardziej korzystnym rozwiązaniem byłoby opracowanie metody radzącej sobie z dwoma problemami jednocześnie. Rozwiązaniem takim może być podwójna szczepionka, skierowana zarówno przeciw wirusowi Ebola jak i wścieklizny. Podobne rozwiązania sprawdziły się już w przeszłości w odniesieniu do innych wirusów, czego przykładem może być triwalentna szczepionka przeciwko śwince, ospie i różyczce [17].

Taki właśnie sposób opracowali naukowcy z Uniwersytetu Thomasa Jeffersona w Filadelfii we współpracy z badaczami z amerykańskiego Instytutu Alergii i Chorób Zakaźnych [18,19]. Stworzyli oni kilka wariantów biwalentnej szczepionki, wywołującej odporność zarówno przeciwko wirusowi wścieklizny, jak i wirusowi Ebola. Badaniom poddane zostały szczepionki: z wirusem wścieklizny replikującym się, pozbawione możliwości replikacji oraz chemicznie inaktywowane [18]. Skonstruowana przez badaczy szczepionka nie jest pierwszą próbą znalezienia sposobu walki z wirusem Ebola [20]. Od dłuższego czasu naukowcy próbują stworzyć skuteczną szczepionkę przeciwko temu wirusowi. Dowiedziono, że immunizacja glikoproteiną wirusa Ebola, która odpowiada za przyłączenie i wniknięcie wirusa do komórki gospodarza, wywołuje odporność na wirusy homologiczne do wirusa Ebola u innych naczelnych, u których przebieg zakażenia przypomina ten obserwowany u ludzi. Z tego względu uważa się, że są one dobrym modelem badawczym, a testowane na nich szczepionki powinny odznaczać się dobrą efektywnością także u ludzi. Mimo pozytywnych wyników badań przedklinicznych tych szczepionek wciąż pozostają co do nich pewne obawy, dotyczące m.in. bezpieczeństwa stosowania, wytwarzania czy też odpowiedniej dawki. Z tego powodu, wciąż bardzo istotne są nowe badania w kierunku opracowania jak najbardziej skutecznej i bezpiecznej szczepionki przeciwko wirusowi Ebola [18].

Opracowana przez badaczy z Filadelfii nowa, biwalentna szczepionka oparta jest na rekombinacji standardowej szczepionki przeciwko wściekliznie. Szczepionka na wściekliznę z wirusem inaktywowanym za pomocą beta-propiolaktonu jest stosowana na ludziach od 1978 roku i odznacza się bardzo wysokim bezpieczeństwem stosowania [21]. Ponadto znana jest z wydajnej replikacji, wywoływania odpowiedzi komórkowej i humoralnej oraz stabilności genetycznej wstawianych genów [22]. Nowa, biwalentna szczepionka inaktywowana jest tą samą metodą. Dodatkowo, pomimo tego, że wirus wścieklizny

w formie dzikiej wywołuje bardzo poważne objawy, w formie atenuowanej okazał się być dobrym i popularnym wektorem do tworzenia szczepionek rekombinowanych. Przykładem tego może być rekombinowana szczepionka z atenuowanym wirusem wścieklizny oraz antygenami HIV-1, która wywołuje odpowiedź humoralną i komórkową w modelach zwierzęcych i nie jest zjadliwa po podaniu obwodowym [23].

Szczepionkę oparto na szczepionce przeciwko wściekliznie również dlatego, że pozwala ona na szybkie i proste stworzenie zarówno szczepionek z wirusem replikującym się, wirusem pozbawionym możliwości replikacji oraz wirusem chemicznie inaktywowanym. Zastosowanie w badaniach tych trzech wariantów zwiększa prawdopodobieństwo znalezienia odpowiedniej równowagi pomiędzy immunogennością szczepionki a jej zdolnością do wywoływania objawów chorobowych [19].

Do opracowania szczepionki wykorzystano szczep SAD B19 wirusa wścieklizny, który jest powszechnie stosowany w Europie do produkcji żywej, doustnej szczepionki dla dzikich zwierząt. Z tego względu szczepionki z żywym, atenuowanym wirusem były badane pod kątem zastosowania do szczepienia dzikich zwierząt w Afryce, zarówno żeby ochronić je przed wirusem wścieklizny, jak i wirusem Ebola. Oba wirusy z łatwością przenoszą się ze zwierząt na ludzi, dlatego też zmniejszenie liczby chorych zwierząt ułatwiłoby zapobieganie wybuchom epidemii i zmniejszyło liczbę zakażeń odzwierzęcych [19].

Chociaż wspomniana żywa szczepionka zawiera pewien potencjał wykorzystania u ludzi to jednak główne zainteresowanie i dalsze badania będą raczej skupiały się na szczepionkach inaktywowanych, ze względu na potencjalnie największe bezpieczeństwo ich stosowania. Początkowo, w hodowli *in vitro*, zbadano efekt jaki wywołuje ekspresja glikoproteiny wirusa Ebola typu Zair na replikację wirusa wścieklizny zawartego w szczepionce. Szybka replikacja w odpowiednio dobranej hodowli komórkowej jest jednym z kluczowych czynników decydujących o opłacalności produkowanej szczepionki. Replikacja wirusa została zbadana w hodowli komórek Vero – linii komórkowej pochodzącej z tkanki nabłonkowej, stosowanej do produkcji szczepionek wirusowych. W wyniku badania dowiedziono, że ekspresja glikoproteiny wirusa Ebola nie wpływa na zmniejszenie stopnia replikacji wirusa wścieklizny [19].

Skuteczność wszystkich trzech wariantów szczepionek badana była na modelach mysich. Porównano ekspresję glikoproteiny wirusa Ebola Zair, bezpieczeństwo stosowania, immunogenność oraz efektywność wywoływania odporności. Zarówno szczepionka z wirusem replikującym się, jak i z wirusem niereplikującym (która pozbawiona była genu kodującego glikoproteinę wirusa wścieklizny) okazały się pozbawione zjadliwości. Natomiast każdy z wariantów biwalentnej szczepionki indukował silną odpowiedź humoralną oraz ochronę zarówno przed wirusem Ebola, jak i wirusem wścieklizny. Ponadto szczepionki wykazują się wysoką immunogennością już po podaniu jednej dawki, co jest dużą zaletą w porównaniu do obecnie stosowanych szczepionek, które podawać

trzeba w kilku dawkach. Zaskakującym odkryciem było zaobserwowanie, że szczepionka inaktywowana indukowała produkcję większej ilości specyficznych przeciwciał, niż szczepionka zawierająca żywy wirus. Nie wiadomo dokładnie dlaczego tak się dzieje, jest to jednak duża zaleta tej szczepionki, ze względu na większe szanse dopuszczenia do użytku szczepionek inaktywowanych, charakteryzujących się większym bezpieczeństwem stosowania [18].

W związku z tym, że szczepionka chroni przed dwoma śmiertelnymi chorobami jednocześnie istnieje ogromny potencjał jej zastosowania. Mogłaby znacznie zmniejszyć koszty szczepień ludzi na terenach zagrożonych, przez co stałaby się łatwiej dostępna dla większej liczby osób. Ograniczyłoby to z pewnością rozprzestrzenianie się epidemii. Dodatkowo szczepionka mogłaby znaleźć zastosowanie w szczepieniu zwierząt na terenach endemicznych, np. niektórych zagrożonych wyginięciem gatunków goryli, co na pewno spotkałoby się z aprobatą aktywistów działających na rzecz ochrony środowiska. Ponadto mniejsza liczba chorych zwierząt ograniczyłaby również liczbę przypadków przeniesienia choroby ze zwierząt na człowieka.

Wciąż potrzebne są dalsze badania nad przedstawionymi wariantami szczepionek, jednak jak na razie wykazują one duży potencjał praktycznego zastosowania. Ponadto, jeżeli szczepionki te okażą się skuteczne w szczepieniu ludzi, istnieje możliwość wzbogacenia ich w przyszłości w glikoproteiny innych typów wirusa Ebola, czy też innych wirusów gorączek krwotocznych i stworzenie szczepionek multiwalentnych, chroniących przed większą liczbą wirusów jednocześnie.

5. Podsumowanie

Na świecie istnieją tysiące rodzajów wirusów. Dla wielu z nich gospodarzami są rośliny lub zwierzęta, lecz istnieje także duża grupa mająca negatywny wpływ na życie i zdrowie człowieka. Jednymi z najbardziej niebezpiecznych i śmiertelnych wirusów zagrażających człowiekowi są wirus Ebola oraz wirus wścieklizny. Wysoka śmiertelność tych wirusów jest spowodowana przez różne czynniki. Dla wirusa Ebola jest to brak możliwości leczenia, a dla wirusa wścieklizny powszechność występowania, często nieprawidłowe podawanie szczepionki, bądź jej niedostępność [2].

Oba wirusy stwarzają największy problem przede wszystkim w krajach afrykańskich, a więc w miejscach gdzie dostęp do odpowiednich środków opieki medycznej jest bardzo często ograniczony lub też brakuje go zupełnie. Z tego powodu ważne jest, aby koszt potencjalnego leczenia lub sposobu zapobiegania zakażeniom był jak najniższy. Zapewnić to może biwalentna szczepionka opracowana przez naukowców z Uniwersytetu Thomasa Jeffersona w Filadelfii [18,19]. Używając jako bazy wyjściowej powszechnie stosowanej szczepionki przeciwko wściekliźnie stworzyli szczepionkę chroniącą także przed wirusem Ebola. Dokonali tego poprzez wbudowanie do genomu wirusa wścieklizny genu

kodującego glikoproteinę wirusa Ebola. Otrzymana szczepionka indukuje skuteczną odporność przeciwko obu wirusom, dzięki czemu posiada ogromny potencjał do wykorzystania jej w przyszłości w szczepieniach ludzi zagrożonych zakażeniem tymi śmiertelnymi wirusami, przede wszystkim mieszkańców terenów endemicznych oraz pracowników służby zdrowia. W świetle wciąż powracających epidemii wirusa Ebola niezmiernie ważne jest opracowanie skutecznej ochrony oraz metody walki z tym groźnym patogenem.

Literatura

1. Takada A., Kawaoka Y., *The pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever*, TRENDS in Microbiology, 2001, 9(10): 506-511
2. Warrell M. J., Warrell D. A., *Rabies and other lyssavirus diseases*, Lancet, 2004, 363: 959-69
3. Hemachudha T., Laothamatas J., Rupprecht C. E., *Human rabies: a disease of complex neuropathogenetic mechanisms and diagnostic challenges*, Lancet Neurology 2002, 1: 101-09
4. Lankau E. W., Cohen N. J., Jentes E. S., Adams L. E., Bel T. R., Blanton J. D., Buttke D., Galland G. G., Maxted A. M., Tack D. M., Waterman S. H., Rupprecht C. E., Marano N., *Prevention and Control of Rabies in an Age of Global Travel: A Review of Travel- and Trade-Associated Rabies Events – United States, 1986-2012*, Zoonoses and Public Health, 2014, 61: 305-316
5. Jackson A. C., *Current and future approaches to the therapy of human rabies*, Antiviral Research, 2013, 99: 61-67
6. Feldmann H., Geisbert T.W., *Ebola haemorrhagic fever*, Lancet, 2011, 377: 849-862
7. "Ebola virus em" by CDC/ Dr. Frederick A. Murphy - This media comes from the Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library (PHIL), with identification number #1833. Licensed under Public domain via Wikimedia Commons - http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ebola_virus_em.png#mediaviewer/Plik:Ebola_virus_em.png
8. Ascenzi P., Bocedi A., Heptonstall J., Capobianchi M.R., Di Caro A., Mastrangelo E., Bolognesi M., Ippolito G., *Ebolavirus and Marburgvirus: Insight the Filoviridae family*, Molecular Aspects of Medicine, 2008, 29: 151-185
9. Pourrut X., Kumulungui B., Wittmann T., Moussavou G., Délicat A., Yaba P., Nkoghe D., Gonzalez J.P., Leroy E.M., *The natural history of Ebola virus in Africa*, Microbes and Infection, 2005, 7: 1005-1014
10. West Africa: Ebola Outbreak 'Not Out of Hand', UN Health Agency Says Readying Response (ang.). W: UN News Service - allAfrica.com [on-line]. 2014-06-27
11. Hoenen T., Groseth A., Falzarano D., Feldmann H., *Ebola virus: unravelling pathogenesis to combat a deadly disease*, TRENDS in Molecular Medicine, 2006, 12(5): 206-215
12. Silva S.R, Katz I.S.S, Mori E., Carnieli P. Jr., Vieira L.F.P, Batista H.B.C.R., Chaves L.B., Scheffer K.C., *Biotechnology advances: A perspective on the diagnosis and research of Rabies Virus*, Biologicals, 2013, 41:217-223
13. "Rabies Virus EM PHIL 1876" by Brak informacji o autorze tego pliku. - http://phil.cdc.gov/PHIL/Images/03082002/00012/PHIL_1876_lores.jpg high res.:

- Licensed under Public domain via Wikimedia Commons -
http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Rabies_Virus_EM_PHIL_1876.JPG#mediaviewer/Plik:Rabies_Virus_EM_PHIL_1876.JPG
14. Gel F., *Pogromca niewidzialnych drapieżników*, Wydawnictwo „Śląsk”, Katowice, 1986
 15. Franka R., Smith T. G., Dyer J. L., Wu X., Niezgoda M., Rupprecht C. E., *Current and future tools for global canine rabies elimination*, Antiviral Research, 2013, 100: 220-225
 16. Hemachudha T., Ugolini G., Wacharapluesadee S., Sungkarat W., Shuangshoti S., Laothamatas J., *Human rabies: neuropathogenesis, diagnosis, and management*, Lancet Neurol, 2013, 12: 498-513
 17. Davidkin I., Kontio M., Paunio M., Peltola H., *MMR vaccination and disease elimination: the Finnish experience*, Expert Rev Vaccines, 2010, 9(9): 1045-1053
 18. Blaney J.E., Wirblich C., Papaneri A.B., Johnson R.F., Myers C.J., Juelich T.L., Holbrook M.R., Freiberg A.N., Bernbaum J.G., Jahrling P.B., Paragas J., Schnell M.J., *Inactivated or Live-Attenuated Bivalent Vaccines That Confer Protection against Rabies and Ebola Viruses*, Journal of Virology, 2011, 85(20): 10605-10616
 19. Papaneri A.B., Wirblich C., Cann J.A., Cooper K., Jahrling P.B., Schnell M.J., Blaney J.E., *A replication-deficient rabies virus vaccine expressing Ebola virus glycoprotein is highly attenuated for neurovirulence*, Virology, 2012, 434: 18-26
 20. Hensley L.E., Mulangu S., Asiedu C., Johnson J., Honko A.N., Stanley D., Fabozzi G., Nichol S.T., Ksiazek T.G., Rollin P.E., Wahl-Jensen V., Bailey M., Jahrling P.B., Roederer M., Koup R.A., Sullivan N.J., *Demonstration of cross-protective vaccine immunity against an emerging pathogenic Ebola virus species*, PLoS Pathog., 2010, 6(5): e1000904
 21. Plotkin S.A., 1980. *Rabies vaccine prepared in human cell cultures: progress and perspectives*, Reviews of Infectious Diseases, 1980, 2: 433-448
 22. Gomme E.A., Wanjalla C.N., Wirblich C., Schnell M.J., 2011. *Rabies virus as a research tool and viral vaccine vector*, Advances in Virus Research, 2011, 79: 139-164
 23. McKenna P.M., Koser M.L., Carlson K.L., Montefiori D.C., Letvin N.L., Papaneri A.B., Pomerantz R.J., Dietzschold B., Silvera P., McGettigan J.P., Schnell M.J., *Highly Attenuated Rabies Virus-Based Vaccine Vectors Expressing Simian-Human Immunodeficiency Virus_{89-6P} Env and Simian Immunodeficiency Virus_{mac239} Gag Are Safe in Rhesus Macaques and Protect from an AIDS-Like Disease*, The Journal of Infectious Diseases, 2007, 195(7): 980-988

Nowa metoda walki z wirusem Ebola i wirusem wścieklizny

Streszczenie

Wirus wścieklizny jest neurotropowym wirusem z rodziny *Rhabdoviridae*, wywołującym groźną chorobę zakaźną, powodującym szczególne zagrożenie w rejonach krajów rozwijających się. Szacuje się, że liczba zgonów wywołanych zakażeniem wirusem wścieklizny wynosi około 55.000 rocznie. Skuteczną ochronę przed rozwinięciem się choroby zapewnia szczepionka podana profilaktycznie lub przed wystąpieniem objawów choroby. Badacze z Uniwersytetu Thomasa Jeffersona opracowali szczepionkę, która chroni nie tylko przed wirusem wścieklizny, ale ponadto jest także skuteczna w przypadku wirusa Ebola, dla którego jak dotąd nie jest dostępna żadna szczepionka. Wirus Ebola uważany jest za jeden z najgroźniejszych wirusowych patogenów człowieka, z powodu łatwej transmisji oraz bardzo wysokiej śmiertelności, sięgającej 70-90%. Wirus ten jest odpowiedzialny za występowanie na terenie Afryki licznych epidemii gorączki krwotocznej Ebola – choroby wywołującej szybką i bolesną śmierć. Zastosowanie efektywnie działającej szczepionki przeciwko dwóm wirusom jednocześnie zapewniłoby większy dostęp do skutecznej ochrony na terenach najbardziej narażonych na ich występowanie. Ponadto szczepionka mogłaby też znaleźć zastosowanie do szczepienia dzikich zwierząt na terenach endemicznych. Opracowana biwalentna szczepionka indukuje skuteczną odpowiedź immunologiczną przeciwko obu wirusom, a także charakteryzuje się wysoką immunogennością już po podaniu jednej dawki.

Słowa kluczowe: Ebola, wścieklizna, szczepionka, epidemia

New prevention method for Ebola virus and rabies virus

Abstract

Rabies virus is a neurotropic virus classified in *Rhabdoviridae* family, causing a dangerous infectious disease, especially threatening in developing areas. It is estimated that the death rate related to rabies virus infection amounts to approximately 55.000 annually. Effective protection against the disease might be caused by vaccination, either preventive or injected before the symptoms appearance. Researchers from Thomas Jefferson University developed a vaccine protecting not only against the rabies virus, but effective against Ebola virus as well. Ebola virus is regarded to be one of the most dangerous viral human pathogens, due to its easy transmission and very high lethality, which amounts to 70-90%. The virus is responsible for numerous cases of Ebola hemorrhagic fever epidemics in Africa. A single effective vaccine against both viruses might enable better access to disease protection for many people in endemic areas. Moreover, the vaccine would find an application also in wild animals' vaccination on endemic areas. Developed bivalent vaccine induces efficient immunological response against both viruses and is characterized by high immunogenicity after only one dosage.

Keywords Ebola, rabies, vaccine, epidemic

SORTER MOFLO JAKO NOWOCZESNE NARZĘDZIE SELEKCJI KOMÓREK I CHROMOSOMÓW

1. Chromosomy, komórki macierzyste oraz komórki krwi

1.1. Chromosomy

W trakcie podziału mitotycznego oraz meiotycznego w wyniku kondensacji chromatyny jądrowej dochodzi do uwidocznienia się struktur zwanych chromosomami. Zbudowane są z linowej cząsteczki DNA oraz białek histonowych. Chromosomy poszczególnych gatunków różnią się między sobą wielkością i budową. Charakterystycznym dla każdego z gatunków jest ich ilość. Wszystkie chromosomy danego gatunku tworzą genom, a genomowe DNA zawiera zarówno sekwencje kodujące jak i niekodujące. Regiony chromosomów odpowiadające heterochromatynie zawierają dużo par AT oraz sekwencje powtarzalne, natomiast odpowiadające euchromatynie – dużo par CG oraz sekwencje unikatowe [1, 2].

1.2. Komórki macierzyste

Komórki macierzyste są niewyspecjalizowanymi komórkami multipotencjalnymi, które – w zależności od sygnałów przekazywanych z mikrośrodowiska tzw. niszy – mogą różnicować się w poszczególne komórki tworzące tkanki. Mają zdolność samoodnawiania oraz proliferacji. Komórki macierzyste pozyskiwane są głównie ze: szpiku, pępowiny, naskórka, miazgi zębowej, tkanki tłuszczowej. Charakterystyczny jest dla nich antygen CD 34+ [3, 4, 5].

1.3. Komórki krwi

Krwiotwórcze komórki macierzyste (KKM) wyglądem przypominają limfocyt, występują nielicznie we krwi obwodowej (mniej niż 1% mononuklearów) i szpiku (do 5% mononuklearów), ich niszę stanowi zrąb szpiku, którego komórki eksponują na swojej powierzchni czynniki wzrostowe i proliferacyjne. W wyniku procesu zwanego hematopoezą z krwiotwórczych komórek macierzystych dochodzi do powstania wszystkich linii rozwojowych komórek krwi, które są ukierunkowane na rozwój erytrocytów, leukocytów (granulocytów, limfocytów, monocytów) oraz trombocytów. Komórki te –

¹ mfilas@onet.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, www.umlub.pl

z wyjątkiem erytrocytów są jądrazste, różnią się między sobą zarówno pod względem morfologicznym – wielkością i złożonością jak i też czynnościowym. Jako formy dojrzałe wykazują ekspresję następujących antygenów: erytrocyty: CD35+, CD44+ oraz glikoforyna A; leukocyty CD45+; limfocyty T CD3+ oraz CD4+ lub CD8+; limfocyty B: CD19+, CD20+; monocyty: CD14+; granulocyty: CD13+, CD15+; płytki krwi: CD41+, CD42+. Poznano wiele metod izolacji danych cząsteczek – najczęściej stosowane jest wirowanie różnicowe w gradiencie gęstości [6, 7].

2. Przeciwciała i barwniki fluorescencyjne

Antygenowość danego białka determinowana jest przez miejsce zwane epitopem – determinantą. Wykazuje ono wysokie powinowactwo wobec swoistego przeciwciała, a w zasadzie konkretnej jego części - paratopu, dzięki czemu możliwe jest powstanie kompleksu antygen- przeciwciało. Przeciwciałami są najczęściej immunoglobuliny klasy G, zbudowane z dwóch takich samych łańcuchów ciężkich oraz dwóch identycznych łańcuchów lekkich. Charakteryzują się określoną swoistością. Są syntetyzowane przez układ immunologiczny jako odpowiedź na działanie bodźca jakim jest antygen. Przeciwciała dzielimy na: poliklonalne – które stanowi mieszanina przeciwciał o różnym powinowactwie oraz swoistości i monoklonalne, które są wytwarzane przez pojedyncze klony komórek- wykazują lepszą czułość i swoistość. Przeciwciała w celu ich identyfikacji znakowane są różnymi substancjami, takimi jak radioizotopy, biotyna, enzymy czy fluorochromy. Fluorochromy po wzbudzeniu światłem o konkretnej długości fali emitują światło o innej długości fali – ten proces jest to zjawisko fluorescencji [8,9]. Dzięki różnicom w widmie absorpcyjnym i emisyjnym niektóre z nich mogą być stosowane w kombinacjach [9]. Najczęściej koniugowanymi z przeciwciałem są: FITC (izotiocyanian fikoerytryny), PE (fikoerytryna), PI (jodek propidyny), APC (allofikocyjanina), Texas Red, Alexa Fluor, a także Chromomycyna A i Hoechst oraz wiele innych. [9,10]. W zależności od lokalizacji antygeny stosuje się dwie różne techniki barwienia. Barwienie powierzchniowych antygenów polega na inkubacji zawiesiny komórek ze swoistym, wyznakowanym przeciwciałem (w ciemności), natomiast w trakcie barwienia antygenów cytoplazmatycznych ważne jest uprzednie utrwalenie komórki, np. formaldehydem, prostaglandyną E1 lub obniżeniem pH do 6.5 i permabilizacją błony [9].

3. Cytometria przepływowa

Cytometria przepływowa jest techniką umożliwiającą ocenę ilościową, jakościową oraz czynnościową dzięki identyfikacji antygenów cytoplazmatycznych oraz powierzchniowych badanych populacji komórkowych.

Identyfikacja ta jest możliwa poprzez skoniugowanie swoistych przeciwciał monoklonalnych z odpowiednimi fluorochromami. Każdy cytometr przepływowy zbudowany jest z trzech współpracujących układów: hydrodynamicznego, optycznego oraz elektronicznego. Zawiesina pojedynczych, wyznakowanych przeciwciałami koniugowanymi z fluoro-chromem komórek jest wprowadzana do komory przepływu przez układ hydrodynamiczny [7, 11, 12, 13]. Na skutek ogniskowania hydrodynamicznego próbka, a w zasadzie pojedyncze komórki o wielkości rzędu 0,2-150 mikronów, płyną ze stałą szybkością (10^3 komórek /sekundę) [12]. Komórki przepływają pod kątem prostym w stosunku do zogniskowanej, padającej na nie wiązki światła lasera. Światło ulega ugięciu i rozproszeniu w różnych kierunkach – zgodnie z kierunkiem padania pod kątem nie większym niż 10 stopni, które jest wyłapywane przez detektor FSC (*Foreward Angle light Scatter*) oraz pod kątem prostym w stosunku do kierunku padania, które jest wyłapywane przez detektor SSC (*Side Scatter*).

Oprócz informacji na temat wielkości (FSC) i złożoności komórek (SSC) dzięki zastosowaniu fluorochromów uzyskiwane są dane na temat antygenów powierzchniowych i cytoplazmatycznych przepływających komórek. Sygnał fluorescencji proporcjonalny jest do ilości barwnika, a więc do ilości komórek [7,9,11,12,13]. Każdy z fluorochromów posiada inne widma emisji i absorpcji co z jednej strony umożliwia analizę z zastosowaniem kilku fluorochromów na raz, a z drugiej niesie pewne ograniczenia – nie wszystkie z nich wzbudzone są przez każdy laser [9]. Obecnie w cytometrach przepływowych stosowane są lasery gazowe: argonowy, argonowo-kryptonowy, kryptonowy oraz helowo-neonowy [12, 13, 14]. Emitowane przez fluorochromy światło przechodzi przez system filtrów, soczewek oraz lusterek dichromicznych i trafia do detektorów. Detektory zmieniają impulsy świetlne na elektryczne oraz wzmacniają sygnał. Przy wzmocnieniu sygnałów dochodzi do pojawienia się niespecyficznych sygnałów tła – ich korekcy można dokonać poprzez ustawienie dyskryminatora czyli minimalnej wielkości impulsu dla jednego z sygnałów (zarówno dla FSC jak i fluorescencji). Impulsy powyżej wartości progowej dyskryminatora konwertowane są w kanały – zakresy długości fal w których spodziewamy się sygnału barwnika. Liczba kanałów mówi o rozdzielczości danego cytometru. Wyniki przedstawiane są w postaci cytogramów, histogramów oraz danych liczbowych. W sytuacji gdy dochodzi do nakładania się widm emisji dwóch barwników fluorescencyjnych konieczne jest zastosowanie kompensacji. Wykonuje się ją na cytogramie, gdzie na jednej osi jest fluorescencja 1 barwnika a na drugiej – drugiego. Niekorzystna jest zarówno zbyt niska jak i zbyt wysoka kompensacja [12, 13, 14]. Na cytogramie możliwe jest też bramkowanie konkretnych populacji komórkowych w celu ich ilościowej oceny oraz wyliczenia wielkości statystycznych. Ogromną zaletą cytometrii przepływowej jest niewielka ilość materiału potrzeba do analizy oraz szybki, precyzyjny i powtarzalny pomiar badanych parametrów [14].

4. Sortery kropłowe – Sorter MoFlo

Podstawą działania sorterów kropłowych są drgania kryształu piezo elektrycznego, których częstotliwość może dochodzić do 200 kHz. Powoduje to podzielenie strumienia komórek wypływającego z komory przepływu na krople. Sortery kropłowe dzielimy na typu *low speed sorters* – o niskiej szybkości sortowania (do 10-15 tys. kom./s) oraz *high speed sorters* – o wysokiej szybkości sortowania (powyżej 20.000 komórek/s), której osiągnięcie jest możliwe dzięki wysokiemu ciśnieniu płynu okrywowego – do 100 psi (funtów na cal kwadratowy). Tak wysokie ciśnienie może okazać się szkodliwe dla komórek [15, 16].

Sorter MoFlo (*Modular Flow Cytometr*) zaliczany jest do grupy sorterów kropłowych typu *high speed* działających na zasadzie cytometru przepływowego z dodatkową funkcją selekcji interesujących nas populacji komórkowych oraz innych cząstek biologicznych. Jest otwartym, maksymalnie trójlaserowym systemem. Zastosowanie panelu przeciwciał monoklonalnych wyznakowanych odpowiednimi fluorochromami umożliwia zbieranie i analizę danych dotyczących przepływających cząsteczek. Akwizycja i analiza danych odbywa się w programie Summit, pracującym w środowisku Windows NT. Kompensacji fluorescencji można dokonać w czasie akwizycji jak i przy obróbce danych. Dzięki drganiom kryształu piezoelektrycznego o częstotliwości rzędu 15-200 kHz strumień cieczy wypływający z komory przepływu ulega podzieleniu na pojedyncze krople zawierające cząsteczki, które następnie są sortowane (z szybkością dochodzącą nawet do 70 000 komórek /s) - odchylane w polu elektromagnetycznym zgodnie z różnicą ich potencjału elektrycznego. System Inteli Sort kontroluje przebieg procesu sortowania oraz dostosowuje drop delay do optymalnej wartości. Początkowo sorter MoFlo był przeznaczony do sortowania chromosomów. Obecnie cząsteczkami, które również mogą być sortowane są: m.in. komórki macierzyste, komórki nowotworowe czy erytrocyty płodu [15].

5. Przygotowanie próbek do sortera

5.1. Przygotowanie chromosomów

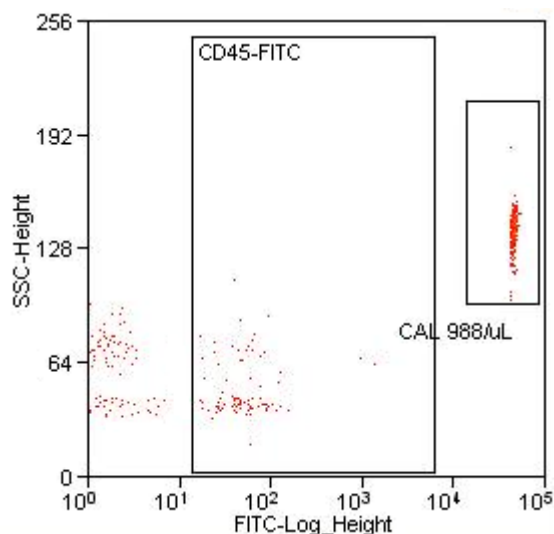
Analiza i selekcja chromosomów metafazowych komórek ulegających podziałowi mitotycznemu jest możliwa dzięki technice zwanej sortowaniem. Komórki stanowiące przedmiot badania hodowane są w ściśle określonych warunkach w specjalnych mediach hodowlanych. W celu zakończenia hodowli dodawany jest kolcemid. Istnieją różne metody uwalniania metafazowe chromosomów do buforu stabilizującego. Uwolnione chromosomy wybarwia się przy użyciu dwóch barwników: Hoechst 33258 (barwnik wykazujący specyficzne powinowactwo do fragmentów DNA bogatych w połączenia zasad AT) oraz Chromomycyny A3 (mającego swoiste powinowactwo do bogatych w połączenia zasad GC fragmentów DNA) [10, 17, 18].

5.2. Przygotowanie komórek

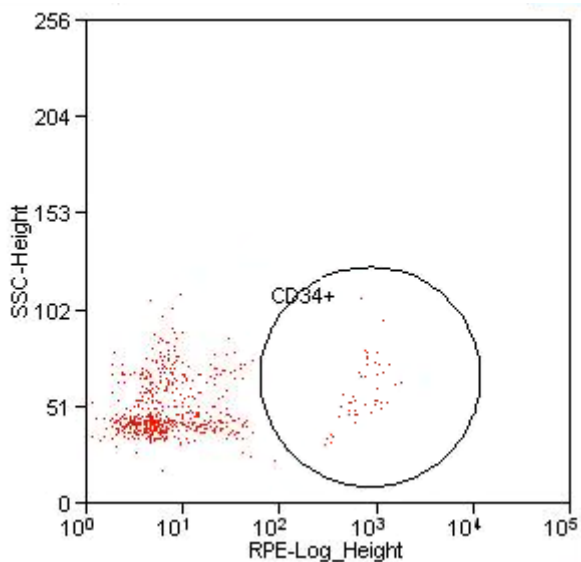
Analizie i selekcji za pomocą sortowania mogą być poddane komórki pochodzące zarówno z płynów ustrojowych (krew, szpik, płyn mózgowo-rdzeniowy) jak i z tkanek litych. W celu przygotowania z tkanki litej zawiesiny komórkowej niezbędna jest jej homogenizacja oraz filtracja. Krew i szpik w celu zachowania żywotności komórek wymagają pobrania na antykoagulant (EDTA, cytrynian sodowy, sole heparyny) [9,14,19]. Tak pobrana próbka powinna zostać niezwłocznie poddana analizie. Maksymalny czas przechowywania wynosi 4 h w 4 stopniach C. Szczególny przypadek stanowią zawiesiny uprzednio utrwalone- można je przechowywać do tygodnia czasu. Dalsze przygotowanie polega na inkubacji ściśle określonej objętości próbki ze swoistym przeciwciałem skoniugowanym z fluorochromem. Inkubacja powinna zachodzić bez dostępu światła w temperaturze pokojowej, wg zaleceń producenta przeciwciał. Niekiedy koniecznym jest po inkubacji odpłukanie nie przyłączonego przeciwciała oraz liza erytrocytów- najczęściej poprzez zastosowanie NH_4Cl . Czas inkubacji wpływa na żywotność komórek, reakcję antygen- przeciwciało oraz intensywność fluorescencji [9, 14].

6. Analiza i selekcja populacji komórkowych na sorterze MoFlo

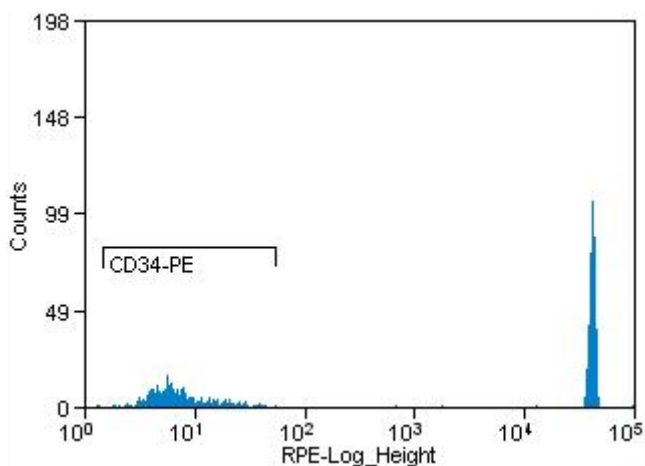
W celu dokonania analizy i selekcji konkretnych populacji komórkowych konieczne jest ustawienie właściwych protokołów. Po umieszczeniu próbki w autosamplerze aparatu oraz włączeniu akwizycji otrzymujemy kompletne cytogramy oraz histogramy. Cytogramy dostarczają informacji o ilości komórek, a po zabrakowaniu konkretnych populacji komórkowych o odsetku tych populacji oraz ich statystyce (Rys.1, Rys.2). Dzięki zastosowaniu jodku propidyny możliwe jest również oznaczanie żywotności poszczególnych typów komórek, oraz otrzymanie informacji o stosunku komórek żywych do martwych. Histogramy natomiast przedstawiają fluorescencję emitowaną przez dany fluorochrom w wyniku wzbudzenia go światłem lasera (Rys.3.) [9, 12, 14, 16].



Rys. 1. Przykładowy cytogram przedstawiający populację CD 45+ oraz kulki Steam Count Fluorospheres [opracowanie własne]

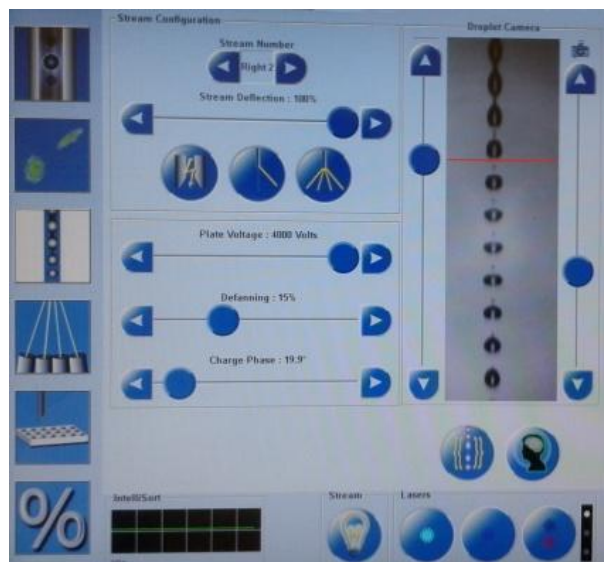


Rys. 2. Populacja CD 34+ - komórki macierzyste połączone z przeciwciałem wyznakowanym fikoerytryną [opracowanie własne]



Rys. 3. Histogram przedstawiający fluorescencję pochodzącą od fikoerytryny połączonej z komórkami CD34+ [opracowanie własne]

W celu wysortowania konkretnej populacji komórkowej ważne jest odpowiednie ustawienie strumienia: jego odchylenia, włączenie drgań kryształu piezoelektrycznego i elektrod, a także podjęcie „decyzji o sortowaniu” czyli zabrakowanie – wybranie konkretnej populacji komórkowej, a także przypisanie jej konkretnego numeru strumienia po odchyleniu od strumienia „głównego” w polu elektrycznym wytwarzanym przez elektrody (Rys.4.).



Rys. 4. Panel dotykowy sortera MoFlo – przygotowanie strumienia komórek do sortowania [opracowanie własne]

W czasie sortowania na ekranie dotykowym sortera wyświetlają się informacje o szybkości i wydajności sortowania, która może sięgać nawet do 99% dzięki wysokiej częstotliwości generowania kropli (Rys.5.) [15].

	Left 2	Left 1	Right 1	Right 2
Sort Mode	none	none	Purify(1)	none
Sort #	0	0	111	0
Sort Rate	0	0	0	0
Abort #	0	0	11	0
Abort Rate	0	0	0	0
% Total	0	0	0	0
Efficiency	N/A	N/A	90	N/A
Σ Sort #	0	0	111	3.00 K
Σ Abort #	0	0	47	54
Event Count: 1.08 M				

Rys. 5. Informacje na temat sortowania wyświetlające się na panelu dotykowym sortera [opracowanie własne]

7. Podsumowanie

Selekcja komórek przy użyciu Sortera MoFlo skutkuje wysoką wydajnością, szybkością i znakomitą czystością otrzymanych populacji. Wyselekcjonowane komórki mogą być następnie poddane analizie ekspresji genów, a także mogą stanowić materiał do prowadzenia hodowli komórkowych. Powyższa metoda selekcji komórek ma istotne znaczenie w przypadku rzadkich populacji komórkowych lub populacji nietypowych, których pozyskanie technikami klasycznymi nastręcza wiele trudności.

Literatura

1. J. Małuszyńska J., *Zobaczyć gen, chromosom i genom – czyli badania cytogenetyki molekularnej*, Nauka 2007; 4: 107-115;
2. Bal J., *Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej*, Wydawnictwo Naukowe PWN 2010;
3. Wieczorek K., Niewiarowska J., *Nowotworowe komórki macierzyste*, Postępy Higieny Medycyny Doświadczalnej, 2012, 66: 629-636;
4. Roda B., Lanzoni G., Alviano F., Zattoni A., Costa R., Di Carlo A., Marchionni C., Franchina M., Ricci F., Tazzari P., Pagliaro P., Scalinci S Z, Bonsi L., Rechiglian P., Bagnara G. P., *A novel stem cell Tag – less sorting metod*, NSTI- Nanotech, 2010; 3:195-198;
5. Drukała J., Majka M., Ratajczak M., *Postępy w metodach izolacji i namnażania komórek macierzystych naskórka ludzkiego*, Postępy biologii komórki, 2003; 30: 37-48;
6. Myśliwski A., Szpik kostny. Rozwój krwi. [w] *Podstawy Cytofizjologii i Histofizjologii*, Akademia Medyczna w Gdańsku 2007, 130-137;

7. Kaczmarek A., Osawa T., Leporowska E., Mackiewicz A., *Rola i miejsce cytometrii przepływowej w diagnostyce*, Współczesna onkologia, 2012; 6: 366-373;
8. Sztefko K., *Wykłady monograficzne z diagnostyki laboratoryjnej*, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, 2002, 89-140;
9. Sędek Ł., Mazur B., *Przeciwciała monoklonalne i poliklonalne i ich zastosowanie w cytometrii przepływowej*, Postępy biologii komórki, 2008 ; 35: 17-34;
10. Nigel P., Bivariate C., *Chromosome Analysis Using a Commercial Flow Cytometer Methods in Molecular Biology* 1994; 187-204;
11. Burchardt D., Machowska L., Derwich K., Samara H., Dworacki G., *Cytometria przepływowa – możliwości zastosowania w diagnostyce klinicznej zmian w obrębie jamy ustnej*, Nowiny lekarskie, 2008; 4: 324-329;
12. Skotny A., Pucińska J. *Współczesna cytometria przepływowa*, Acta bio-optica et Informatica Medica, Inżynieria Biomedyczna, 2013; 19: 3-11;
13. Sędek Ł., Sonsala A., Szczepański T., Mazur B., *Techniczne aspekty cytometrii przepływowej*, Juornal of Laboratory Diagnostic, 2010; 46: 415-420;
14. Lisiecka U., Kostro K., Jarosz Ł., *Cytometria przepływowa jako nowoczesna metoda w diagnostyce i prognozowaniu chorób*, Medycyna Weterynaryjna, 2006; 62: 998-1001;
15. Baran J., *Nowa Epoka cytometrii przepływowej – przewodnik po współczesnych cytometrach i ich zastosowanie*, Postępy Biologii Komórki, 2008; 35: 3-15;
16. Baran J., *Cytometria przepływowa- istota metody i jej wykorzystanie*, Mikrobiologia, 1996; 3:33;
17. Fantes JA, Green DK, Sharkey A., *Chromosome sorting by flow cytometry. Production of DNA libraries and gene mapping*, Methods Mol Biol, 1994; 29: 205-219;
18. Gray JW, Lucas J., Peters D., Pinkel D., Trask B, Van den Engh G., Van Dilla M., *Flow karyotyping and sorting of human chromosomes*, Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986; 51: 141-149;
19. Żeromski J., Dworacki G., *Ocena immunofenotypu komórek limfoidalnych przy pomocy cytometrii przepływowej – uwagi praktyczne i zastosowanie kliniczne*, Centr. Eur journal immunolog, 1996; 21: 99-106;

Sorter MoFlo jako nowoczesne narzędzie selekcji komórek i chromosomów

Streszczenie

Sorter MoFlo (Modular Flow Cytometr) zaliczany jest do grupy sorterów kroplowych typu high speed działających na zasadzie cytometru przepływowego z dodatkową funkcją selekcji interesujących nas populacji komórkowych oraz chromosomów. Poszczególne typy cząstek biologicznych (w tym komórek) różnią się między sobą nie tylko właściwościami biologicznymi, ale także cechami morfologicznymi takimi jak wielkość i złożoność. Możliwe jest ich różnicowanie poprzez pomiar ugięcia światła FSC oraz SSC emitowanego przez laser. Każdy rodzaj komórek posiada koekspresję charakterystycznych antygenów powierzchniowych jak również cytoplazmatycznych. Do identyfikacji każdego z antygenów używane są swoiste przeciwciała. Zastosowanie panelu przeciwciał monoklonalnych wyznakowanych odpowiednimi fluorochromami umożliwia zbieranie i analizę danych dotyczących przepływających cząsteczek. Dzięki drganiom kryształu piezoelektrycznego o częstotliwości rzędu 15-200 kHz strumień cieczy wypływający z komory przepływu ulega podzieleniu na pojedyncze krople zawierające cząsteczki, które następnie są sortowane - odchylane w polu elektromagnetycznym zgodnie z różnicą ich potencjału elektrycznego. Wysoka częstotliwość generowania kropli wpływa na wydajność oraz czystość wysortowanych populacji, która sięga 99 %.

Wyselekcjonowane komórki mogą być następnie poddane analizie ekspresji genów, a także mogą stanowić materiał do prowadzenia hodowli komórkowych. Początkowo sorter MoFlo był przeznaczony do sortowania chromosomów. Obecnie cząsteczkami, które również mogą być sortowane są: m.in. komórki macierzyste, komórki nowotworowe czy erytrocyty płodu. Powyższa metoda selekcji komórek ma istotne znaczenie w przypadku rzadkich populacji komórkowych lub populacji nietypowych, których pozyskanie technikami klasycznymi nastręcza wiele trudności.

Słowa kluczowe : Sorter MoFlo, cytometria przepływowa, chromosomy

The MoFlo sorter as a modern tool for selection of cells and chromosomes

Abstract

The MoFlo sorter (Modular Flow Cytometer) is classified as a high speed sorter. It works on the principles of a flow cytometer with an additional ability to select the particular cell or the particular chromosome. The individual types of biological particles, including cells, differ not only in biological properties, but also in morphological characteristics, such as size or complexity. Their distinction is based on a measure of the scatter of light emitted by laser: FSC (forward scatter) and SSC (side scatter). Each type of cells is characterized by coexpression of a cell surface antigen as well as cytoplasmic antigens. Identification of a particular antigen is done with a specific antibodies. The particular monoclonal antibody, conjugated with an appropriate fluorochrome, binds to the corresponding antigen. Data obtained from a fluorescence measurement of flowing cells is analysed using summit software. Thanks to vibrations of a piezoelectric crystal at a frequency between 15 and 200 kHz, the stream of a liquid exiting from a flow chamber is splitted into single drops, which contain biological particles. Then, drops are sorted as a result of deflection in an electric field according to an electrical potential difference. The high frequency of a drop generation affects the efficiency and purity (up to 99%) of the sorted particles. The selected cells can be analysed for a gene expression or become the base for a cell culture. Initially, the MoFlo sorter was intended for chromosome sorting only. Nowadays, its application is broader and those sorters may also be used to select other biological particles, e.g. stem cells, tumor cells or fetal erythrocytes. The sorting method mentioned above may play an important role in isolating rare or unusual cell populations, which are difficult to obtain using classical techniques.

Keywords : MoFlo sorter, flow cytometry, chromosomes.

Paweł Binko¹, Anna Szajerska², Milena Karpiarz³, Joanna Horbaczewska⁴, Adam Iwaniuk⁵, Karolina Gasińska⁶, Elżbieta Mazur-Stążka⁷

WPLYW ALKOHOLU, PAPIEROSÓW I KAWY NA UKŁAD SERCOWO-NACZYNIOWY

1. Wstęp

Alkohol, papierosy, kawa to dosyć popularne używki mocno zakorzenione w naszej kulturze. Choroby układu sercowo-naczyniowego są główną przyczyną zgonów zarówno w Polsce i na świecie. Dlatego też wpływ jaki alkohol, papierosy i kawa wywierają na układ krążenia stanowi niezwykle interesujący aspekt badań. O ile negatywne skutki palenia tytoniu nie podlegają dyskusji, to w przypadku alkoholu i kawy efekty ich działania nie są oceniane już tak jednoznacznie.

2. Cel pracy

Praca ta ma na celu przedstawienie wpływu alkoholu, kawy oraz papierosów na ryzyko wystąpienia chorób układu krążenia.

3. Wpływ alkoholu na układ krążenia

Wpływ alkoholu etylowego na organizm człowieka jest przedmiotem wielu badań. Niejednokrotnie wykazano jego niekorzystny związek z licznymi zaburzeniami w funkcjonowaniu ludzkiego organizmu. Spożycie alkoholu jest jedną z głównych przyczyn występowania niedoborów pokarmowych, przede wszystkim witaminy A, pirydoksyny, kwasu foliowego, tiaminy, cynku. Stwierdzono, że konsumpcja alkoholu zwiększa możliwość wystąpienia choroby nowotworowej, szczególnie układu pokarmowego, jednocześnie może doprowadzić do stłuszczenia jak również marskości wątroby. Dodatkowo etanol

¹ pawele90@gmail.com, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Klinice Kardiologii

² anna.szajerska@onet.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Klinice Kardiologii

³ milenakarpiarz@wp.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Klinice Kardiologii

⁴ joanna.horbaczewska@gmail.com, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Klinice Kardiologii

⁵ iwaniuk.adam@gmail.com, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Klinice Kardiologii

⁶ karolina.gasinska@onet.eu, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Studenckie Koło Naukowe przy Klinice i Katedrze Kardiologii

⁷ estazka@o2.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Katedra i Klinika Kardiologii

oddziałuje niekorzystnie na funkcjonowanie ośrodkowego układu nerwowego poprzez toksyczny wpływ na neurony oraz działanie uzależniające [1, 2]. Na podstawie badań epidemiologicznych przeprowadzanych w wielu różnych krajach, korelację pomiędzy spożyciem alkoholu etylowego a ogólną umieralnością można przedstawić na wykresie w kształcie litery J. Oznacza to, że wraz ze wzrostem spożycia alkoholu, rośnie również umieralność wśród badanych [1].

W przypadku układu sercowo - naczyniowego zależności te nie są już takie proste. Wykazywano zarówno korzystny jak i niekorzystny wpływ etanolu na umieralność z powodu chorób sercowo-naczyniowych. Jednocześnie stwierdzono, że zależność pomiędzy spożyciem alkoholu etylowego a częstotliwością występowania chorób układu krążenia może być przedstawiona na wykresie jako litera U [3]. Interpretacja wykresu wskazuje nam, że u całkowitych abstynentów oraz osób nadużywających alkoholu umieralność z powodu chorób układu sercowo-naczyniowego jest większa niż u osób, które spożywają alkohol w umiarkowanych ilościach [1, 2]. Jednakże wpływ alkoholu nie zależy tylko od samej dawki. Ważne są również częstość, rodzaj spożywanego alkoholu, czas stosowania, wiek, płeć [1, 4].

3.1. Korzyści z picia alkoholu

Badania prowadzone przez niektóre zespoły badawcze wskazują na korzystny wpływ alkoholu etylowego na układ krążenia. Sugeruje się, że obniża on ryzyko rozwoju choroby wieńcowej serca, zawału serca, nadciśnienia tętniczego zależnego od wieku [4]. W trakcie badań prowadzonych w ramach programu Pol-MONICA w Warszawie, które były częścią międzynarodowego badania WHO MONICA wykazano, iż ryzyko zgonów z powodu chorób układu sercowo-naczyniowego było istotnie niższe u osób spożywających alkohol niż u całkowitych abstynentów. W przypadku mężczyzn ryzyko to było niższe o około 40%, natomiast w przypadku kobiet ryzyko zmniejszało się o około 40-70%. Wyniki tych badań korelują z wynikami uzyskanymi przez innych badaczy [5]. Interesujące wydają się badania prowadzone w Hiszpanii. Na podstawie 10-letniej obserwacji wyciągnięto wnioski o zmniejszaniu zachorowalności na choroby układu krążenia u mężczyzn wraz ze wzrostem spożycia alkoholu. W przypadku kobiet nie zaobserwowano jednak takiego efektu [6]. Podobne wnioski wyciągnął Klatsky, który uważa, że ryzyko rozwoju choroby niedokrwiennej serca jest niższe przy wszystkich poziomach spożycia alkoholu, jednakże ogólna umieralność z przyczyn sercowo-naczyniowych wzrasta przy spożyciu więcej niż 3 „drinków” dziennie (1 drink= 12-15g alkoholu, 30-40 ml wódki, 100-150 ml wina lub 300-350 ml piwa) [1, 7]. Ciekawe obserwacje poczyniono również we Francji, gdzie badania wykazały istnienie tzw. „paradoксу francuskiego”. Polega on na zmniejszonym występowaniu miażdżycy wśród mieszkańców tych

regionów, gdzie regularnie spożywa się czerwone wino w porównaniu z mieszkańcami regionów, w których spożycie wina było mniejsze przy ogólnym spożyciu alkoholu na podobnym poziomie [8]. Powyższe wyniki stara się tłumaczyć poza wpływem samego alkoholu na układ krążenia również wpływem innych substancji występujących w czerwonym winie takich jak związki polifenolowe czy naturalne flawonoidy. Sugeruje się również wpływ diety śródziemnomorskiej [1, 2]. Znacznie większa ilość badań stwierdza jednak, że jedynie umiarkowane spożycie alkoholu (kobiety 1 drink, mężczyźni 2 drinki dziennie) wpływa korzystnie na układ sercowo-naczyniowy [1, 2, 4, 5].

Protekcynny wpływ alkoholu na układ sercowo-naczyniowy związany jest z kilkoma mechanizmami działania. Jednym z nich wydaje się być jego wpływ na metabolizm lipidów. Wykazano, że alkohol zwiększa stężenie lipoprotein frakcji HDL cholesterolu oraz zmniejsza stężenie frakcji LDL [1, 2, 4]. Już sam ten efekt, może w przybliżeniu tłumaczyć około 50 % korzystnych efektów związanych ze spożywaniem alkoholu [1, 4]. Alkohol bezpośrednio zwiększa wątrobowe wytwarzanie apolipoproteiny klasy A (apo A), która jest głównym białkiem HDL. Wykazano również, że umiarkowane spożycie alkoholu etylowego wpływa na stężenie lipoproteiny (a) –Lp(a), która jest genetycznie uwarunkowanym, niezależnym czynnikiem rozwoju miażdżycy i wystąpienia zawału serca [1].

Istotnym elementem kardioprotekcynnym jest wpływ alkoholu na układ krzepnięcia, związany z jego działaniem antyagregacyjnym i fibrynolitycznym [1, 4]. Etanol hamuje powstawanie zakrzepów poprzez hamowanie agregacji płytek krwi indukowanej przez agonistów: ADP, kolagen, epinefrynę a zależnej od obecności tromboksanu A_2 (TXA₂) [1, 4]. Alkohol etylowy obniża odpowiedź płytek na tromboksan A_2 oraz hamuje jego syntezę i uwalnianie. Dzieje się to najprawdopodobniej poprzez hamowanie fosfolipazy A_2 w płytkach, która jest odpowiedzialna za uwalnianie z fosfolipidów kwasu arachidonowego – prekursora tromboksanu A_2 [1, 2, 4]. Etanol w umiarkowanych dawkach zwiększa syntezę prostacykliny w układzie krwionośnym, która działa antyagregacyjnie i rozkurcza ściany naczyń [1, 2]. Efekt ochronny alkoholu może wynikać również z nasilenia fibrynolizy. Wykazano, że umiarkowane picie alkoholu zwiększa miejscową aktywność tkankowego aktywatora plazminogenu (t-Pa). Efekt ten występuje jednak tylko przy stężeniu alkoholu poniżej 50mg/dl [1, 4]. Sugeruje się również, że po spożyciu alkoholu podwyższa się poziom przedsiorkowego peptydu natriuretycznego (ANP), który ma działanie hipotensyjne [4].

3.2. Szkodliwe efekty picia alkoholu

O ile spożywanie alkoholu regularnie i w umiarkowanych ilościach wykazuje korzystne działanie na układ krążenia, to nikt nie ma wątpliwości, że nadużywanie go ma zdecydowanie niekorzystne efekty [1, 4]. Jak wykazały

badania istnieje związek pomiędzy przewlekłym nadużywaniem alkoholu a rozwojem nadciśnienia. Efekt ten występuje niezależnie od rodzaju spożywanego napoju alkoholowego, zarówno u kobiet i u mężczyzn [4, 9]. Sugeruje się że ma to związek ze zmianami w OUN, wzrostem aktywności układu współczulnego, uszkodzeniem baroreceptorów, pobudzeniem układu RAA, wzrostem poziomu kortyzolu i wapnia, zwiększeniem reaktywności naczyń oraz uwalnianiem endoteliny przez śródbłonek oraz z hamowaniem produkcji tlenu azotu przez śródbłonek [4]. Kolejnym negatywnym skutkiem picia alkoholu jest rozwój kardiomiopatii alkoholowej (ACM). Charakteryzuje się ona zwiększeniem masy serca, poszerzeniem komór i zmniejszeniem grubości ścian serca. Rozwój choroby można zatrzymać, a nawet cofnąć poprzez zaprzestanie picia, jednak nieleczona i postępująca choroba prowadzi do śmierci [4, 10]. Również jednorazowe spożycie dużych ilości alkoholu ma działanie niekorzystne. Metabolity alkoholu pośrednio oddziałują na mięsień sercowy i układ neuroendokrynnym. Mają również silne działanie proarytmiczne prowadząc do powstania arytmii nadkomorowych i komorowych [2, 4].

4. Wpływ palenia na układ krążenia

Palenie tytoniu wywiera wysoce niekorzystny wpływ na organizm człowieka. Jest ono przyczyną zachorowań na nowotwory, choroby płuc i układu krążenia. Sprzyja również wystąpieniu cukrzycy typu 2 oraz jest niezależnym czynnikiem ryzyka udaru mózgu zarówno u kobiet jak i mężczyzn [11, 12]. Negatywny wpływ tytoniu na układ krążenia został potwierdzony licznymi badaniami [12, 13, 14]. Jedne z pierwszych doniesień pochodzą z 1958 roku, kiedy to Hammond zauważył, że wśród palaczy zgony spowodowane chorobami serca występują częściej. Kolejne badania wykazywały podobne wyniki [14]. Jednoznacznych dowodów na to, że palenie tytoniu stanowi istotny czynnik ryzyka sercowo-naczyniowego dostarczyło badanie INTERHEART. Badanie, które zostało przeprowadzone w 52 krajach na wszystkich kontynentach wykazało silną, stopniowo narastającą zależność pomiędzy ilością wypalanych papierosów w ciągu doby a ryzykiem zawału serca [15]. Należy zaznaczyć, iż palenie tytoniu należy do trzech najsilniejszych i teoretycznie odwracalnych czynników ryzyka wystąpienia chorób układu sercowo-naczyniowego [12]. Osoby używające tytoniu w różnej formie mają zwiększone ryzyko zgonu z powodu chorób układu krążenia o 25-40% [13]. Ryzyko wystąpienia choroby niedokrwiennej serca oraz zgonu w jej przebiegu u osób palących jest dwukrotnie wyższe niż u osób niepalących [2, 12], a ryzyko zawału serca jest trzykrotnie wyższe u osób palących niż u niepalących [12]. Dodatkowo palenie tytoniu zwiększa ryzyko rozwoju kardiomiopatii oraz komorowych zaburzeń rytmu serca, a poprzez obniżenie progu migotania komór zwiększa zagrożenie nagłym zgonem sercowym [13, 14]. Wdychanie powietrza zanieczyszczonego dymem tytoniowym, czyli tzw. bierne palenie wpływa również negatywnie na układ sercowo-naczyniowy [2, 11, 12, 13]. Zwiększa ono istotnie ryzyko

sercowo-naczyniowe, a ryzyko zgonu z powodu choroby niedokrwiennej serca jest 1,2-1,7 razy wyższe u biernego palacza niż u osoby nienarażonej na dym tytoniowy. Świadczy to, że bierne palenie jest w podobnym stopniu szkodliwe jak palenie czynne [12].

Mechanizmów odpowiadających za szkodliwy wpływ palenia tytoniu na układ krążenia jest kilka. Za najbardziej szkodliwe składniki dymu tytoniowego uważa się nikotynę, tlenek węgla, wolne rodniki tlenowe [2, 12, 14]. Już wypalenie jednego papierosa działa na układ krążenia. Nikotyna i jej metabolity pobudzają układ RAA oraz wydzielanie adrenaliny, noradrenaliny i endoteliny-1. Skutkuje to przyspieszeniem akcji serca, zwiększeniem pojemności minutowej, podniesieniem ciśnienia tętniczego krwi, a w następstwie zwiększonym zapotrzebowaniem mięśnia sercowego na tlen. Jednocześnie dochodzi do skurczu tętnic wieńcowych, wzrostu ich oporu i spadku prędkości przepływu wieńcowego. Skurcz naczyń wieńcowych oraz zwiększone zapotrzebowanie na tlen mogą być przyczyną wystąpienia zawału serca nawet przypadkach stosunkowo niewielkich zmian miażdżycowych w naczyniach wieńcowych [12, 13, 14]. Skurcz naczyń tętniczych zmniejsza skuteczność leczenia hipotensyjnego oraz przyspiesza rozwój powikłań narządowych nadciśnienia tętniczego [12].

Tlenek węgla zawarty w dymie tytoniowym zmniejsza zdolność hemoglobiny do przenoszenia tlenu w organizmie poprzez tworzenie karboksyhemoglobiny. W następstwie tego dochodzi do niedotlenienia serca oraz całego organizmu, a reakcją ogólnoustrojową na hipoksemię jest wzrost liczby krwinek czerwonych, wzrost lepkości i krzepliwości krwi. Skutkuje to zwiększeniem częstości tworzenia zakrzepów [2, 11, 12, 14]. Tlenek węgla także bezpośrednio działa na serce upośledzając jego kurczliwość [12].

Dym tytoniowy, a przede wszystkim zawarte w nim wolne rodniki tlenowe (WRT) prowadzą do powstania dyslipidemii i rozwoju miażdżycy. Wolne rodniki tlenowe powodują utlenianie frakcji LDL i HDL cholesterolu. Utlenienie cząsteczek LDL sprawia, że są one dużo łatwiej wychwytywane przez makrofagi, które są następnie przekształcane do komórek piankowatych. Komórki te biorą zaś udział w rozwoju miażdżycy. Natomiast utlenienie frakcji HDL sprawia, że traci ona swoje właściwości przeciwmiażdżycowe [2, 10, 11, 13, 14].

Substancje zawarte w dymie tytoniowym wpływają również niekorzystnie na śródbłonek. Powodują one uszkodzenie i proliferację błon komórkowych i ich zmiany ultrastrukturalne, co prowadzi do usztywnienia ścian naczyń [11, 12, 14]. Jednocześnie zmniejszają one odpowiedź komórek na acetylocholinę oraz syntezę tlenu azotu – związku silnie rozszerzającego naczynia krwionośne [2, 11, 13]. Palenie papierosów wpływa również niekorzystnie na układ krzepnięcia poprzez zwiększenie syntezy tromboksanu A_2 z jednoczesnym zmniejszeniem syntezy prostacykliny. Efektem tego jest zwiększona aktywacja płytek krwi oraz zwiększenie właściwości krzepawczych osocza [2, 11, 12, 13, 14].

5. Wpływ picia kawy na układ krążenia

Picie kawy wywiera różnorakie efekty na organizm człowieka, zarówno pozytywne jak i negatywne. Na pytanie, które efekty przeważają, prowadzone badania nie dają jednoznacznej odpowiedzi [16, 17]. Pewne natomiast jest to, że kawa działa pobudzająco na ośrodkowy układ nerwowy, poprawia wydolność umysłową i fizyczną, zdolność koncentracji, zmniejsza zmęczenie i senność. Nasila ona lipolizę w tkance tłuszczowej, działa rozkurczowo na mięśnie gładkie oskrzeli, zwiększa diurezę, pobudza sekrecję soku żołądkowego, sprzyja wydalaniu magnezu i wapnia z organizmu. Kawę można również przedawkować a następstwem tego jest nadmierna pobudliwość, bezsenność, niepokój, problemy żołądkowe, przyspieszone oddychanie [16, 17].

Wpływ picia kawy na układ krążenia również nie jest jednoznacznie wyjaśniony, a prowadzone badania dają różne, czasami przeciwstawne wyniki [16, 17, 18]. Część badań dowodzi, że spożywanie kawy nie ma statystycznie istotnego związku ze zwiększonym ryzykiem chorób układu sercowo-naczyniowego [18]. Badania nad wpływem kawy na rozwój choroby wieńcowej dały wynik negatywny, a dodatkowo wykazały, iż spożycie ponad 6 filiżanek kawy dziennie zmniejszało ryzyko zgonu z powodu choroby wieńcowej serca [18]. Podobnie badania oceniające wpływ picia kawy na ryzyko rozwoju nadciśnienia tętniczego dały wyniki negatywne [18]. Jednakże badaniom tym przeciwstawiają się inne, które donoszą o zwiększonej częstości występowania zawału mięśnia sercowego u mężczyzn i kobiet pijących duże ilości kawy. Kolejne badanie dowodzi, że regularne picie kawy nieznacznie podnosi ciśnienie tętnicze oraz wykazuje niekorzystny wpływ na śródbłonek naczyń oceniany za pomocą rozszerzalności naczyń zależnej od śródbłonka (EFD- *endothelium-dependent flow-mediated dilatation*) [16, 17, 18].

Kawa oddziałuje na układ krążenia poprzez wielorakie mechanizmy. Zależne są one od substancji w niej zawartych, z których najważniejsza jest kofeina. Istotne wydają się również być diterpeny, czyli związki lipidowe kawy [16, 17, 18]. Niekorzystny wpływ kawy na układ sercowo-naczyniowy może być w znacznym stopniu związany z jej wpływem na wzrost stężenia homocysteiny w osoczu. Hiperhomocysteinemia stanowiąca niezależny czynnik ryzyka chorób układu krążenia oraz żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej, przyczynia się do rozwoju miażdżycy oraz powoduje zwiększoną krzepliwość krwi [16, 17]. Kofeina zawarta w kawie powoduje przyspieszenie akcji serca, zwiększenie pojemności minutowej, wzrost ciśnienia tętniczego. Sugeruje się jednak, że z czasem powstaje tolerancja na efekt presyjny kofeiny, która sprawia, że regularnie spożywana ma niewielki wpływ na zachowanie się ciśnienia tętniczego. Kofeina rozszerza naczynia wieńcowe zwiększając tym samym przepływ wieńcowy, jednak równocześnie rośnie zapotrzebowanie mięśnia sercowego na tlen, czego skutkiem mogą być zwiększone dolegliwości wieńcowe. Natomiast wypicie zbyt mocnej kawy może indukować zaburzenia

rytmu serca. Kofeina wpływa również niekorzystnie na stężenia Mg^{2+} , Ca^{2+} i K^+ w osoczu wzmagając ich wydalanie z moczem. Skutkiem tego może być indukcja lub nasilenie zaburzeń rytmu serca [17]. Picie kawy wpływa również na profil lipidowy osocza. Powoduje ono wzrost stężenia cholesterolu całkowitego, frakcji LDL oraz spadek frakcji HDL. Może się to przyczyniać do rozwoju chorób sercowo-naczyniowych, a głównie miażdżycy [16, 17, 18]. Jednak część badań dowodzi, że picie kawy ma zgoła odmienny wpływ powodując obniżenie stężenia cholesterolu całkowitego, frakcji LDL oraz zmniejszając utlenienie frakcji HDL. Świadczyłoby to o możliwości działania ochronnego kawy na układ sercowo-naczyniowy [16, 17, 18]. Powyższe rozbieżności starano się tłumaczyć zmienną obecnością diterpenów w kawie. Sugeruje się, że to właśnie te substancje obecne w znacznej ilości w kawie niefiltrowanej, natomiast w znikomej ilości w kawie filtrowanej odpowiadają za efekt hipercholesterolemiczny [16, 17, 18]. Teorii tej nie potwierdzają badania prowadzone przez Strendhagen i wsp., które wykazały wzrost poziomu cholesterolu również w przypadku picia kawy filtrowanej [16]. Postuluje się, że za zróżnicowany wpływ picia kawy na poziom cholesterolu i homocysteiny odpowiadają czynniki genetyczne. Również zmienny wpływ kawy na ryzyko sercowo-naczyniowe może zależeć od osobniczej zmienności genetycznej [17, 18].

6. Podsumowanie

Alkohol, papierosy i kawa to jedne z najpopularniejszych używek człowieka. Dlatego też niezmiernie istotny wydaje się wpływ jaki mają one na układ sercowo-naczyniowy. W przypadku alkoholu wydają się dominować jego efekty pozytywne. Jednak to, jakie będą skutki jego spożywania zależy od dawki. Umiarkowane spożywanie alkoholu ma efekt kardioprotekcyjny i prowadzi do zmniejszenia ryzyka zgonu z przyczyn sercowych. Natomiast duże dawki alkoholu zwiększają śmiertelność spowodowaną chorobami układu krążenia. Palenie papierosów ma wyraźnie negatywny wpływ na układ sercowo-naczyniowy. Zwiększa ryzyko wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych, zawału serca a także zgonu z powodu chorób układu krążenia. Na niekorzystne efekty dymu tytoniowego narażeni są zarówno czynni jak i bierni palacze. Wpływ picia kawy na układ krążenia nie jest natomiast jednoznacznie określony. Kawa może zwiększać ryzyko rozwoju chorób sercowo-naczyniowych poprzez wzrost stężenia cholesterolu i homocysteiny. Istnieją jednak badania dowodzące że picie kawy nie ma wpływu na układ krążenia, a może nawet wykazywać właściwości protekcyjne. Te odmienne rezultaty mogą być uwarunkowane czynnikami genetycznymi.

Literatura

1. Jelski W., Alizade Sani T., Szmitkowski M., *Wpływ alkoholu etylowego na układ krążenia*, Pol. Merk. Lek. 2006, 21 (123), 299-302;
2. Rapacka E., Dyrła P., Dyrła W., Błaszczyk J., *Spożywanie alkoholu, kawy, palenie tytoniu jako czynniki ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego*, Żyw. Człow. 2003, 30 (3/4), 790-794;
3. Manttari M., Tenkanen L., Alikoski T., *Alcohol an coronary heart disease: the role of HDL cholesterol and smoking*, J. Int. Med., 1997, 241, 157-163;
4. Górska D., Górska M., *Alkohol etylowy a układ krążenia*, Farm. Pol., 2003, 59 (20), 932-936;
5. Waśkiewicz M., Sygnowska E., Drygas W., *Spożywanie alkoholu a umieralność z powodu chorób układu krążenia*, Program Pol-MONICA Warszawa, Kardiol. Pol., 2004, 60 (6), 552-563;
6. Arriola L., Martinez-Cambor P., Larrañaga N., *Alcohol intake and the risk of coronary heart disease in the Spanish EPIC cohort study*, Heart. Published Online 19 November 2009;
7. Klatsky A.L., *Epidemiology of coronary heart disease –influence of alcohol*, Alcohol, Clin. Exp. Res., 1994, 18, 88-96;
8. Renaud S., De Lorgeril M., *Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease*, Epidemiology, 1992, 339, 1523-1526;
9. Beilin L.J., Puddey I. B., Bruke V., *Alcohol and hypertension –kill or cure?*, J. Hum. Hyperten., 1996, 10, 1-5;
10. Szczeklik A., *Interna Szczeklika. Podręcznik chorób wewnętrznych 2012*, Medycyna Praktyczna, 2012, 362;
11. Chelkowska M., Laskowska –Klita T., *Zaburzenia sercowo –naczyniowe i płucne związane z paleniem tytoniu*, Bromatol. Chem. Toksykol., 2003, 36 (3), 269-276;
12. Kobus G., Sudnik U., Bachórzewska –Gajewska H., Dobrzycki S., *Palenie papierosów jako ważny czynnik ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. Jak pomóc pacjentowi w zaprzestaniu palenia tytoniu?*, Terapia, 2009, 17 (4), 76-81;
13. Stasiołek D., Kwaśniewska M., Drygas W., *Palenie tytoniu jako czynnik ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego*, Czyn. Ryz., 2000 (4), 62-68;
14. Nikodemowicz M., *Wpływ palenia tytoniu na układ krążenia*, Prz. Lek., 2007, 64 supl. 4, 42-44;
15. Yusuf S. i wsp., *Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case control study*, Lancet, 2004, 364, 937;
16. Wierzejska R., *Kofeina –powszechny składnik diety i jej wpływ na zdrowie*, Rocz. Państw. Zakł. Hig., 2012, 63 (2), 141-147;
17. Kosicka T., Kara-Perz H., Głuszek J., *Kawa –zagrożenie czy ochrona*, Przew. Lek., 2004, (9), 78-83;
18. Dominiak M., Kasprzak J. D., *Spożycie kawy a choroby układu sercowo-naczyniowego. Ochrona czy ryzyko?*, Pol. Prz. Kardiol., 2006, 8 (6), 433-436;

Wpływ alkoholu, papierosów i kawy na układ sercowo-naczyniowy

Streszczenie

Alkohol, papierosy, kawa to dosyć popularne używki mocno zakorzenione w naszej kulturze. Choroby układu sercowo-naczyniowego stanowią natomiast główną przyczynę zgonów zarówno w Polsce jak i na świecie. Dlatego też wpływ jaki alkohol, papierosy i kawa wywierają na układ krążenia stanowi interesujący aspekt badań. Wpływ alkoholu na układ krążenia jest dwójaki. Spożywanie umiarkowanych ilości zmniejsza ryzyko choroby niedokrwiennej serca, miażdżycy, zmniejsza ryzyko zawału jak również zgonu z powodu chorób sercowo-naczyniowych. Natomiast przewlekłe picie alkoholu zwiększa śmiertelność z powodu chorób układu krążenia. Palenie papierosów ma wyraźnie negatywny wpływ na układ krążenia. Zwiększa ono ryzyko wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych, a także zgonu z ich powodu. Substancje zawarte w dymie tytoniowym powodują dyslipidemię, upośledzają kurczliwość mięśnia sercowego jednocześnie powodując skurcz naczyń wieńcowych oraz wzrost zapotrzebowania serca na tlen. Upośledzają one funkcje śródbłonna naczyń oraz zwiększają aktywację płytek krwi i właściwości zakrzepowe osocza. Wpływ picia kawy na układ sercowo-naczyniowy nie jest jednoznacznie określony. Część badań dowodzi negatywnego wpływu picia kawy, inne wykazały, że kawa ma neutralne, a czasami wręcz protekcyjne działanie na układ krążenia. Różnice te próbuje się tłumaczyć różnym składem kawy zależnym od sposobu przyrządzania, a także uwarunkowaniami genetycznymi.

Słowa kluczowe: alkohol, papierosy, kawa, układ sercowo-naczyniowy, choroby serca

Effects of alcohol, cigarettes and coffee on the cardiovascular system

Abstract

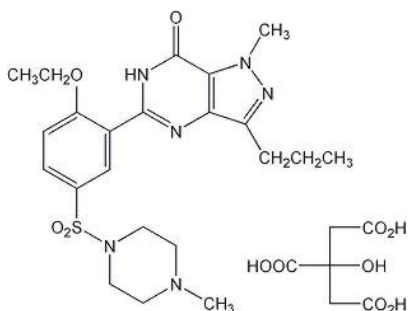
Alcohol, coffee and cigarettes belong to the most popular drugs deeply ingrained in our culture. Diseases of the cardiovascular system are the main cause of deceases both in Poland and worldwide. That is why the influence of alcohol, drugs and cigarettes on the cardiovascular system is an highly interesting aspect of the research. There is a twofold effect of alcohol on the cardiovascular system. The consumption of moderate doses of alcohol reduces the risk of ischemic heart disease, arteriosclerosis and decreases the chance of heart infarct. On the other hand, persistent drinking rises the mortality by causing the cardiovascular diseases. Cigarette smoking has clearly harmful effect on the cardiovascular system. It enhances the risk cardiovascular diseases and mortality occur. The substances contained in the cigarette smoke induce dyslipidemia, impair the contractibility of the heart muscle and cause contraction of coronary vessels as well as growth of the oxygen demand. The function of the endothelium is impaired, platelets activation and protrombotic features of plasma are increased by these substances. There is no clear-cut evidence proving the impact of drinking coffee on the cardiovascular system. The part of research proves the negative role of drinking coffee. However, there are also evidences that the influence of drinking coffee is neutral or even protective on the cardiovascular system. These differences are sometimes explained by floating composition of chosen coffee or genetic predispositions.

Keywords: alcohol, cigarettes, coffee, heart disease, the cardiovascular system

WPLYW ETANOLU I SILDENAFILU NA WĄTROBE

1. Wprowadzenie

Cytrynian sildenafilu (sildenafil, ang. *sildenafil citrate*) [1-[[3-(6,7-dihydro-1-metylo-7-okso-3-propylo-1H-pirazolo[4,3-d]pirymidyn-5-ylo)-4-etoksyfenylo]sulfonylo]-4-metylopiperazyno cytrynian] (Rys. 1), znany jest pod handlową nazwą Viagra® [1]. Związek ten został opatentowany przez firmę Pfizer w 1996 roku, a na rynku po raz pierwszy ukazał się w 1998 [2].



Rys. 1. Wzór strukturalny cytrynianu sildenafilu [1, 3]

Cytrynian sildenafilu (*Viagra*®) jest pierwszym inhibitorem fosfodiesterazy-5 (PDE5, ang. *phosphodiesterase type 5*) zatwierdzonym do leczenia zaburzeń erekcji [4]. Odkrycie tego leku w 1989 roku było wynikiem obszernych badań w zakresie związków chemicznych, które mogłyby być użytecznymi w leczeniu choroby wieńcowej serca. Wstępne badania kliniczne sildenafilu na początku lat 90-tych nie były obiecujące w odniesieniu do właściwości przeciwdławicowych. Jednakże w trakcie tych badań odkryto, że sildenafil może wzmacniać erekcję, co stało się głównym przedmiotem dalszych badań. Od debiutu rynkowego

¹ semeniukjustyna0804@gmail.com, Uniwersytet Marii Curie Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Biotechnologii, Zakład Wirusologii i Immunologii, http://biolbiot.umcs.lublin.pl/zaklad_wirusologii_i_immunologii

² olgaslabczynska@gmail.com, Uniwersytet Marii Curie Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Biotechnologii, Zakład Wirusologii i Immunologii, http://biolbiot.umcs.lublin.pl/zaklad_wirusologii_i_immunologii

³ karolinaokla@gmail.com, Uniwersytet Marii Curie Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Biotechnologii, Zakład Wirusologii i Immunologii, http://biolbiot.umcs.lublin.pl/zaklad_wirusologii_i_immunologii

⁴ a.anisiewicz@gmail.com, Uniwersytet Marii Curie Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Biotechnologii, Zakład Wirusologii i Immunologii, http://biolbiot.umcs.lublin.pl/zaklad_wirusologii_i_immunologii

w 1998 roku ponad 10 milionów mężczyzn na całym świecie było leczonych z użyciem sildenafilu [2], przy czym już tylko przez pierwsze półrocze sprzedaży, odnotowano, że lek ten przypisano 5,3 miliona razy. Początkowo był on stosowany w leczeniu zaburzeń erekcji, które występują u około 10% mężczyzn na całym świecie (w Polsce dotyczy to 3,5 miliona mężczyzn). Około 60% tych zaburzeń występuje pomiędzy 40 a 60 rokiem życia. Ponadto od 2005 roku sildenafil stosowany jest także u osób z wrodzonym i nabytym tętniczym nadciśnieniem płucnym (PAH, ang. *pulmonary arterial hypertension*) [5].

W niniejszym artykule omówione zostało zastosowanie, mechanizm działania i metabolizm leku oraz jego wpływ na wątrobę. Zwrócono również uwagę na rolę sildenafilu w sytuacjach nadużywania alkoholu oraz w warunkach stresu oksydacyjnego.

2. Zastosowanie sildenafilu

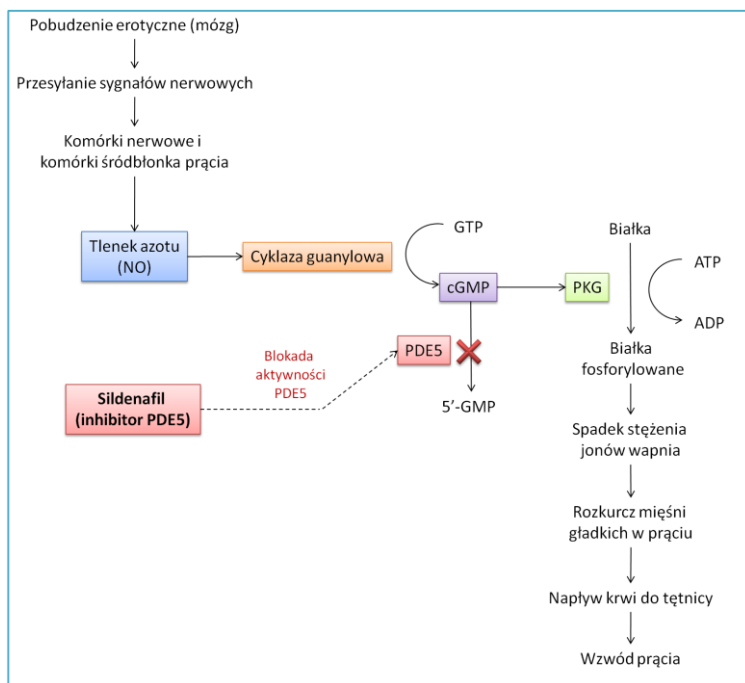
Lek ten jest powszechnie stosowany w leczeniu zaburzeń erekcji [6] oraz w ostrym i przewlekłym tętniczym nadciśnieniu płucnym PAH (w tym schorzeniu pod nazwą Revatio®) [7, 8]. Cytrynian sildenafilu poprzez inhibicję PDE5 powoduje rozluźnienie mięśni gładkich, w szczególności w naczyniach płucnych i ciałach jamistych prącia. Rozszerzanie naczyń płucnych u osób z nadciśnieniem płucnym jest związane z poprawą średniego ciśnienia w tętnicy płucnej (PAP, ang. *pulmonary artery pressure*) oraz płucnego oporu naczyniowego (PVR, ang. *pulmonary vascular resistance*), a w niektórych badaniach także wskaźnika sercowego [8].

Udowodniono, że cytrynian sildenafilu wpływa na rozszerzanie naczyń krwionośnych śródbłonna u pacjentów z wadami serca, pozwala na akumulację czynnika rozluźniającego cGMP (cykliczny monofosforan guanozyny) w naczyniach mięśni gładkich poprzez hamowanie rozkładu cGMP przez PDE5. Ponadto może on umiarkowanie obniżać skurczowe i rozkurczowe ciśnienie w łóżyskach naczyń komórek mięśni gładkich poprzez blokowanie PDE5 [7]. Prowadzone w ostatnich latach doświadczenia wskazują, że sildenafil wywiera znaczące zmiany neuroprotektoryjne w stwardnieniu rozsianym, poprawie pamięci, neurogenezie, bólu i udarze mózgu, co sugeruje potencjalną rolę tego związku w zapobieganiu lub leczeniu chorób centralnego systemu nerwowego (CNS, ang. *central nervous system*), mimo że jego zasadniczy mechanizm działania nie był dobrze poznany [6].

Ponadto ostatnie badania wskazują, że sildenafil będący inhibitorem PDE5 zwiększa okres półtrwania cGMP generowanego w odpowiedzi na uwalnianie tlenu azotu (NO) i zapewnia ochronę przed wywołanymi przez alkohol uszkodzeniami żołądka, prawdopodobnie przez aktywację zależnych od ATP kanałów potasowych. Wydaje się zatem, że sildenafil poza leczeniem zaburzeń erekcji może także zmniejszać uszkodzenia żołądka wywołane przyjmowaniem niesteroidowych leków przeciwzapalnych i alkoholowe uszkodzenia błon śluzowych poprzez aktywację szlaku NO/cGMP/KATP [9].

3. Mechanizm działania sildenafilu

Fosfodiesteraza-5 (PDE5) jest głównym enzymem posiadającym aktywność hydrolizy cGMP w ciałach jamistych prącia. Erekcja jest procesem regulowanym przez napięcie naczyniowe i przepływ krwi w prąciu, a stężenie cGMP jest czynnikiem modulującym to napięcie naczyniowe. W wyniku pobudzenia seksualnego komórki nerwowe, jak również komórki śródbłónka prącia wytwarzają tlenek azotu (NO). Tlenek azotu dyfunduje do komórek, w których aktywuje cyklazę guanylową, enzym odpowiedzialny za przekształcenie GTP do cGMP, który następnie stymuluje aktywację kinazy białkowej G (PKG, ang. *protein kinase G*). PKG indukuje kaskadę fosforylacji kilku białek. Powoduje to zmniejszenie wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia, rozluźnienie mięśni gładkich i rozszerzenie tętnic, co pozwala na zwiększenie napływu krwi do ciał jamistych prącia i wzwodu. Odpowiednie stężenie cGMP odgrywa kluczową rolę w procesie erekcji (Rys. 2) [10, 2].



Rys. 2. Mechanizm hamowania aktywności PDE5 [opracowanie własne]

Sildenafil jest selektywnym inhibitorem specyficznej dla cGMP fosfodiesterazy-5 (PDE5) [11]. Związek ten nasila aktywność NO poprzez blokowanie rozpadu cGMP wywołanego PDE5, wskutek czego dochodzi do zwiększenia relaksacji mięśni gładkich naczyń [12]. PDE5 jest enzymem przekształcającym cGMP do 5'-GMP [13]. Lek ten ma podobną strukturę

chemiczną do cGMP i hamuje PDE5 przez wiązanie się do centrum aktywnego cGMP umożliwiając w ten sposób gromadzenie się w tkankach cGMP. W klasie tej dostępne są dwa inne związki: tadalafil (Cialis®) i vardenafil (Levitra®), które wykazują podobny do sildenafilu mechanizm działania [2].

Ponadto, oprócz inhibicji PDE5 sildenafil wykazuje także powinowactwo do PDE6 i PDE1. Przy czym jest ono 10-krotnie słabsze w stosunku do PDE6 niż w przypadku PDE5. Wzmoczoną aktywność PDE1 odnotowano w nadciśnieniu płucnym, zaś PDE6 jest izoenzymem siatkówki związanym z procesem fototransdukcji, a blokowanie jego aktywności przejawia się zahamowaniem aktywności rodopsyny oraz zaburzeniami widzenia. Osoby przyjmujące ten lek są także bardziej narażone na niezależne od zmian naczyniowych niedokrwienie nerwu wzrokowego (NAION, ang. *non-arteritic anterior ischemic optic neuropathy*) [5].

Sildenafil nasila działanie NO, dlatego też istnieje bezwzględny zakaz podawania go osobom przyjmującym azotany i różnego rodzaju donory tlenu azotu, gdyż synergistyczne działanie tych związków może doprowadzić do nadmiernego rozszerzenia naczyń krwionośnych i hipotensji [12, 14].

4. Metabolizm sildenafilu

Sildenafil jest szybko wchłaniany, a jego maksymalne stężenie w surowicy występuje po około 1 godzinie po doustnym podaniu na czczo, przy czym jego średnia całkowita biodostępność osiąga 41%. Zarówno sildenafil jak i jego główny N-demetylowany metabolit wiążą się w 96% z białkami osocza [8]. Przyjmowanie leku podczas posiłku opóźnia jego działanie. Lek ten występuje w dawkach 25 mg, 50 mg, 100 mg [5], a wartości C_{max} (największe stężenie leku obserwowane we krwi natychmiast po dożylnym podaniu lub po pewnym czasie od chwili pozanaczyniowego podania leku) i AUC (miara ilości leku jaka dociera do krążenia ogólnego w postaci niezmienionej, ang. *area under the curve*) wzrastają proporcjonalnie do dawki [8]. Średnie stężenie sildenafilu w osoczu mierzone po podaniu pojedynczej dawki doustnej 100 mg wynosi u zdrowego mężczyzny około 440-450 ng/ml [1].

Podczas badania sildenafilu u osób z marskością wątroby (skala Child Pugh klasa A i B), odnotowano zmniejszony klirens tego związku, co powodowało wzrost AUC (85%) i C_{max} (47%) w porównaniu do osób bez zaburzeń wątroby. Nie zbadano farmakokinetyki sildenafilu u osób z ciężkimi zaburzeniami wątroby (skala Child Pugh klasa C). Dlatego też wiek powyżej 65 roku życia, niewydolność wątroby czy ciężka niewydolność nerek związane są ze zwiększonym stężeniem sildenafilu w osoczu, i u takich pacjentów należy rozpatrywać podawanie doustnych dawek 25 mg/kg [1].

Sildenafil jest głównie metabolizowany przez wątrobowe izoenzymy układu mikrosomalnego cytochromu P450, w tym przez CYP3A4 i w mniejszym stopniu przez CYP2C9, a jego główny metabolit powstaje w wyniku N-

demetylacji i charakteryzuje się mniejszą o około 50% siłą działania w porównaniu do sildenafilu [8]. Główny N-demetylowany metabolit sildenafilu – UK-103,320 wykazuje podobną do sildenafilu selektywność w stosunku do PDE [15]. Całkowity klirens sildenafilu osiąga wartość 41 L/h, zaś okres półtrwania około 3-5 godzin. Jest on wydalany w postaci metabolitów głównie z kałem (80%) oraz z moczem (13%) [8].

5. Wpływ sildenafilu na wątrobę

Cytrynian sildenafilu stosuje się zarówno u osób cierpiących na chorobę alkoholową jak i inne schorzenia wątroby, gdyż u osób z chorobami wątroby odnotowano wyższy wskaźnik zaburzeń erekcji [7].

Tlenek azotu odgrywa kluczową rolę w wątrobowym mikrokrazeniu w warunkach fizjologicznych. Opór naczyniowy wątroby regulowany jest z jednej strony przez skurcz lub rozkurcz mięśni gładkich w tętniczkach końcowych, z drugiej zaś strony przez komórki gwiaździste (HSC, ang. *hepatic stellate cells*) regulujące napięcie naczyń zatokowych w zależności od stężenia NO syntetyzowanego przez komórki śródbłonna. NO jest wytwarzany przez komórki śródbłonna i uaktywnia cyklazę guanylanową komórek gwiaździstych, co prowadzi do powstania cGMP regulującego napięcie HSC i sinusoid. PDE5 przekształca cGMP do 5'GMP [13, 16]. Tlenek azotu odgrywa bardzo ważną rolę w regulacji przepływu zatokowego krwi oraz napięcia naczyniowego, co jest istotne przy transplantacji wątroby, uszkodzeniu niedokrwienno-reperfuzyjnym, zwłóknieniu oraz marskości. Ponadto NO ma znaczny wpływ na funkcjonowanie i regenerację wątroby [7].

Ji i współpracownicy zauważyli, że sildenafil u szczurów niekarmionych alkoholem wykazuje tendencje do poprawy funkcjonowania wątroby po częściowej hepatektomii (PHx, ang. *partial hepatectomy*). Natomiast stężenie 5 mg/kg tego związku znacznie zmniejsza aktywność regeneracyjną tego organu po PHx [7].

Ponadto badania przeprowadzone przez De Souza Leão i współpracowników wykazały, że sildenafil przyczynia się do pogorszenia funkcji wątroby w modelu niedokrwienno-reperfuzyjnym [17].

W marskości wątroby aktywność systemu NO-cGMP jest zaburzona, a nadciśnienie wrotne spowodowane jest zwiększeniem oporu naczyniowego. W związku ze zmniejszoną aktywnością śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS, ang. *endothelial nitric synthase*) w komórkach wątroby, maleje poziom NO, a HSC przekształcają się do kurczliwych miofibroblastów. Te czynniki i wzrost aktywności PDE5 powodują skurcz sinusoid w marskości wątroby [13]. Lee i współpracownicy wykazali, że doustne podawanie 50 mg sildenafilu powoduje znaczny wzrost produkcji NO i cGMP ze znacznym obniżeniem oporu przepływu krwi sinusoid, nie pogarszając jednocześnie nadciśnienia wrotnego u osób z marskością [18].

6. Stosowanie sildenafilu i alkoholu etylowego

Mężczyźni nadużywający alkoholu często cierpią na zaburzenia erekcji i odwrotnie, zaburzenia erekcji są wielokrotnie przyczyną spożywania alkoholu w nadmiernych ilościach. Wyniki badań Grinshpoon'a i współpracowników wykazały, że sildenafil jako suplement w standardowym leczeniu mężczyzn z alkoholizmem, znacząco poprawiał erekcję oraz inne składniki funkcji seksualnych, a także w istotny sposób polepszył zadowolenie z jakości życia oraz znacznie obniżał obciążenie psychiczne [19].

Doświadczenie przeprowadzone przez Leslie'go i współpracowników nie wykazało hemodynamicznych interakcji pomiędzy sildenafilem a czerwonym winem, nie odnotowano także zmian w farmakokinetyce leku i alkoholu przy ich jednoczesnym przyjmowaniu. Przy czym zaobserwowano, że alkohol zmniejsza zależny od sildenafilu wzrost stężenia cGMP w osoczu [12].

Ji i jego współpracownicy wykazali, że sildenafil nie wpływa na funkcjonowanie i regenerację wątroby u szczurów pojęonych alkoholem. Zauważyli, że cytrynian sildenafilu nie powodował znaczących zmian w funkcjonowaniu i regeneracji wątroby po częściowej hepatektomii zarówno w przypadku szczurów karmionych jak i niekarmionych alkoholem, z wyjątkiem stężenia 5 mg/kg sildenafilu, który znacząco hamował regenerację narządu u szczurów niekarmionych alkoholem [7].

Badania przeprowadzone przez Li i współpracowników wykazały, że Viagra® ułatwia przywrócenie poziomu O_2 w wątrobie po chwilowym niedokrwieniu u szczurów karmionych alkoholem, prawdopodobnie przez obniżenie zużycia O_2 wskutek zahamowania aktywności mitochondrialnej oksydazy cytochromu c przez NO. Z drugiej strony, jednoczesne stosowanie Viagry® i alkoholu może powodować zmiany patologiczne, przejawiające się zwiększeniem ilości tłuszczu, ogniskowym stanem zapalnym i ogniskową nekrozą. Podsumowując, Viagra® może z jednej strony chronić przed uszkodzeniami występującymi po niedokrwieniu u szczurów karmionych alkoholem, z drugiej zaś - zwiększać uszkodzenia wątroby spowodowane przez etanol [11].

7. Sildenafil i stres oksydacyjny

Cytrynian sildenafilu hamuje produkcję rodników ponadtlenukowych w mitochondriach poprzez zwiększenie poziomu cGMP i blokowanie ekspresji oksydazy NADPH. Regulowanie stężenia cGMP we krwi przez leczenie cytrynianem sildenafilu może obniżyć produkcję ROS (reaktywne formy tlenu, ang. *reactive oxygen species*) w mitochondriach. Dawka 100 mg cytrynianu sildenafilu chroni przed stresem oksydacyjnym poprzez hamowanie wytwarzania wolnych rodników oraz przez wspieranie antyoksydacyjnych układów redox [20]. Ponadto sildenafil jest pomocny w leczeniu chorób

zapalnych jelit (IBD, ang. *inflammatory bowel disease*), co prawdopodobnie zależy od jego właściwości antyoksydacyjnych związanych ze zwiększeniem poziomu cGMP [21].

Dane przedstawione przez Taibi i współpracowników sugerują, że sildenafil ma ochronny wpływ na komórki nabłonka, co jest skutkiem hamowania oksydazy ksantynowej (XO, ang. *xanthine oxidase*) i wynikiem obniżenia produkcji wolnych rodników, które mogą wpływać na ekspresję oksydazy NADPH i PDE5 [22].

8. Podsumowanie

Sildenafil jest lekiem powszechnie stosowanym m.in. w leczeniu zaburzeń erekcji oraz w nadciśnieniu płucnym. Nie mniej jednak wyniki niektórych badań wskazują, że związek ten posiada właściwości, które mogłyby być skuteczne w leczeniu włóknienia lub poprawie funkcjonowania i regeneracji wątroby, stąd sildenafil może stać obiecującym lekiem także w terapii chorób wątroby o różnej etiologii.

Literatura

1. Ulotka Pfizer, Viagra® (sildenafil citrate) Tablets, 2011, 1-30;
2. Kukreja R. C., Salloum F., Das A., Ockaili R., Yin C., Bremer Y. A., Fisher P. W., Wittkamp M., Hawkins J., Chou E., Kukreja A. K., Wang X., Marwaha V. R., Xi L., *Pharmalogical preconditioning with sildenafil: Basic mechanisms and clinical implications*, Vascular Pharmacology, 2005, 42: 219-232;
3. <http://pl.wikipedia.org/wiki/Sildenafil>;
4. Inan M., Uz Y. H., Kizilay G., Topcu-Tarlacalisir Y., Sapmoz-Metin M., Akpolat M., Aydogdu N., *Protective effect of sildenafil on liver injury induced by intestinal ischemia /reperfusion*, Journal of Pediatric Surgery, 2013, 48: 1707-1715;
5. Dworzański W., Jaskólska A., Szumiło M., Świtalska A., Burdan F., *Powikłania sercowo-naczyniowe inhibitorów fosfodiesterazy-5*, Polski Merkuriusz Lekarski XXX, 2011, 176: 139-142;
6. Zhao S., Zhang L., Lian G., Wang X., Zhang H., Yao X., Yang J., Wu C., *Sildenafil attenuates LPS-induced pro-inflammatory responses through down-regulation of intracellular ROS-related MAPK/NF-κB signaling pathways in N9 microglia*, International Immunopharmacology, 2011, 11: 468-474;
7. Ji H., Shen H., Uhanova J., Zhang M., Minuk G. Y., Gong Y., *Effects of sildenafil citrate on hepatic function and regeneration in normal and alcohol – fed rats*, Liver International, 2005, 25: 913-919;
8. Croom K. F., Curran M. P., *Sildenafil: a review of its use in pulmonary arterial hypertension*, Drugs, 2008, vol. 68, 3, s. 383-397;
9. Duffin R., Shaw C. A., Rossi A. G., *Sildenafil reduces alcohol-induced gastric damage: just say 'NO'*, British Journal of Pharmacology, 2008, 153: 623-624;
10. Corbin J. D., *Mechanisms of action of PDE5 inhibition in erectile dysfunction*, International Journal of Impotence Research, 2004, 16: S4-S7;

11. Li J., Fu M., De Leon M., French B. A., French S. W., *The effect of Viagra (sildenafil citrate) on liver injury caused by chronic ethanol intragastric feeding in rats*, *Experimental and Molecular Pathology*, 2005, 78: 101-108;
12. Leslie S. J., Atkins G., Oliver J. J., Webb D. J., *No adverse hemodynamic interaction between sildenafil and red wine*, *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2004, 76(4): 365-70;
13. Halverscheid L., Deibert P., Schmidt R., Blum H. E., Dunkern T., Pannen B. H. J., Kreisel W., *Phosphodiesterase-5 inhibitors have distinct effects on the hemodynamics of the liver*, *BMC Gastroenterology*, 2009, 9(69): 1-10;
14. Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H. K., Schäfer-Korting M., *Farmakologia i toksykologia* (wydanie I polskie pod redakcją A. Danysza), Wrocław, Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, 2004, 611;
15. Muirhead G. J., Wilner K., Colburn W., Haug-Pihale G., Rouvieux B., *The effects of age and renal and hepatic impairment on the pharmacokinetics of sildenafil citrate*, Blackwell Science, 2002, 53: 21S-30S;
16. Yardimci A., Bostanci E. B., Ozer I., Dalgic T., Surmelioglu A., Aydog G., Akoglu M., *Sildenafil accelerates liver regeneration after partial hepatectomy in rats*, *Transplantation Proceedings*, 2012, 44: 1747-1750;
17. De Souza Leão L. R., De Souza Medeiros Lima H. C., De Rêgo A. C. M., Azevedo I. M., Filho A. M. D., Medeiros A. C., *Sildenafil in the prevention of hepatic ischemia/reperfusion injury in rats*, *Journal of Surgical Research*, 2010, 1(1): 66-74;
18. Lee K. C., Yang Y. Y., Wang Y. W., Hou M. C., Lee F. Y., Lin H. C., Lee S. D., *Acute administration of sildenafil enhances hepatic cyclic guanosine monophosphate production and reduces hepatic sinusoid resistance in cirrhotic patients*, *Hepatology Research*, 2008, 38: 1186-1193;
19. Grinspoon A., Margolis A., Weizman A., Ponizovsky A. M., *Sildenafil citrate in the treatment of sexual dysfunction and its effect on quality of life in alcohol dependent men: preliminary findings*, *Alcohol and Alcoholism*, 2007, 42(4): 340-6;
20. Perk H., Armagan A., Naziroğlu M., Soyupek S., Hoscan M., B., Sütcü§ R., Ozorak A., Delibas§ N., *Sildenafil citrate as a phosphodiesterase inhibitor has an antioxidant effect in the blood of men*, *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 2008, 33: 635-640;
21. Khoshakhlagh P., Bahrololoumi-Shapourabadi M., Mohammadirad A., Ashtaral-Nakhai L., Minaie B., Abdollahi M., *Beneficial Effect of Phosphodiesterase-5 Inhibitor in Experimental Inflammatory Bowel Disease; Molecular Evidence for Involvement of Oxidative Stress*, *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2007, 17(5): 281-288;
22. Taibi G., Carruba G., Miceli V., Cocciadiferro L., Cucchiara A., Nicotra C. M. A., *Sildenafil protects epithelial cell through the inhibition of xanthine oxidase and the impairment of ROS production*, *Free Radical Research*, 2010, 44(2): 232-239;

Wpływ etanolu i sildenafilu na wątrobę

Streszczenie

Cytrynian sildenafilu (Viagra®) jest pierwszym i powszechnie stosowanym inhibitorem fosfodiesterazy 5 (PDE5) zatwierdzonym do leczenia zaburzeń erekcji. Lek ten jest także stosowany w leczeniu ostrego i przewlekłego tętniczego nadciśnienia płucnego PAH. Cytrynian sildenafilu nasila aktywność tlenku azotu (NO) poprzez blokowanie rozpadu cGMP do 5'-GMP wywołanego przez PDE5, co skutkuje rozluźnieniem mięśni gładkich, w szczególności w naczyniach płucnych i ciałach jamistych prącia. Tlenek azotu odgrywa ważną rolę w regulacji przepływu zatokowego krwi oraz napięcia naczyniowego, co jest istotne w transplantacji wątroby, uszkodzeniu niedokrwienno-reperfuzyjnym, zwłóknieniu oraz marskości. Ponadto NO ma znaczny wpływ na prawidłowe funkcjonowanie i regenerację wątroby. W niniejszym artykule omówione zostało zastosowanie, mechanizm działania i metabolizm leku oraz jego wpływ na wątrobę. Zwrócono również uwagę na rolę sildenafilu w sytuacjach nadużywania alkoholu oraz w warunkach stresu oksydacyjnego.

Słowa kluczowe: Viagra®, cytrynian sildenafilu, wątroba, NO, PDE5, cGMP

Influence of ethanol and sildenafil on the liver

Abstract

Sildenafil citrate (Viagra®) is first and commonly used phosphodiesterase-5 (PDE5) inhibitor, approved for the treatment of erectile dysfunction. This drug is also used in treatment of acute and chronic pulmonary arterial hypertension PAH. It enhances the effects of nitric oxide (NO) by selectively inhibiting the breakdown of cGMP to 5'-GMP by PDE5, resulting in enhanced vascular smooth muscle relaxation, in particular in the pulmonary vessels and corpus cavernosum. Nitric oxide plays an important role in regulation of sinusoidal blood flow and vascular tone, which are significant in liver transplantation, ischemia-reperfusion injury, liver fibrosis and cirrhosis. Moreover, it has been demonstrated that NO plays an important role in the proper function and regeneration of the liver. In this paper we discussed the application, mechanism and metabolism of the drug and its effects on the liver. We also paid attention to the role of sildenafil during alcohol abusing and oxidative stress.

Keywords: Viagra®, sildenafil citrate, liver, NO, PDE5, cGMP

INDEKS AUTORÓW

Amarowicz Magdalena	27, 53	Michalski Tomasz.....	17
Anisiewicz Artur	7, 107	Mulawka Dominika	27, 53
Binko Paweł.....	17, 97	Mulawka Paulina	27, 53
Chomik Piotr.....	87	Okła Karolina.....	7, 107
Chwil Paulina.....	27, 53	Pińkowski Roman	87
Czop Marcin	87	Roman Tomasz	37
Filas Małgorzata	87	Schab Katarzyna	27, 53
Gasińska Karolina.....	17, 97	Semeniuk Justyna	107
Gorący Aneta	87	Słabczyńska Olga.....	107
Grywalska Ewelina	37	Smyk Mateusz	73
Horbaczewska Joanna.....	17, 97	Sobstyl Jan	27, 53
Iwaniuk Adam.....	97	Sobstyl Paulina	27, 53
Karpiarz Milena	17, 97	Starosielec Magdalena	73
Kocki Janusz	87	Szajerska Anna	17, 97
Kotuła Lidia	17, 27, 53	Szymczyk Agnieszka	37
Kowalik Mateusz	63	Terlecki Karol.....	27, 53
Król Sylwia Katarzyna.....	7	Urbańczuk Marcin	27, 53
Macheta Arkadiusz	37	Wawruszak Anna.....	7
Markowicz Justyna	37	Wiliński Mateusz	87
Mazur-Stążka Elżbieta	97	Wojcieszek Agnieszka.....	87