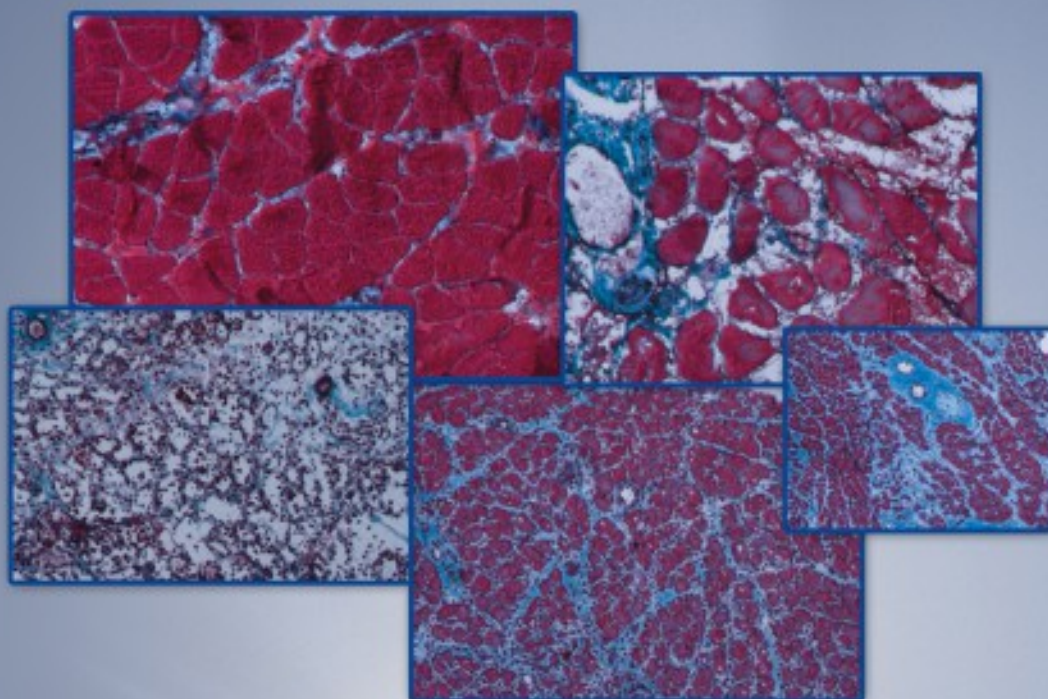


Tom 2 / Nr 1 / 2012 ISSN 2082-8470

POSTĘPY POLSKIEJ MEDYCYNY I FARMACJI

Zeszyty Naukowej Fundacji Polpharmy



Słowo wstępne

*Prof. dr hab. n. med. Zbigniew Gaciong
Przewodniczący Rady Naukowej
Postępów Polskiej Medycyny i Farmacji,
Redaktor Naczelny*



Szanowni Państwo,

Bieżący numer zeszytów otwiera wspomnienie o prof. Andrzeju Szczekliku – wybitnym lekarzu i wielkiej postaci nauki, człowieku wielu talentów. Napisany przez bliskiego przyjaciela tekst pokazuje postać Profesora z bliska, opisuje zdarzenia, których nie mieli okazji znać czytelnicy jego znakomitych prac naukowych czy podręczników, przez co Jego postać zyskuje dodatkowy wymiar. Profesor Szczekliki był związany z Fundacją Naukową Polpharmy był laureatem II edycji konkursu i wielokrotnie wspierał jej działalność i promował idee w wystąpieniach publicznych.

Prace naukowe zamieszczone w tym numerze powstały w wyniku kilku konkursów zorganizowanych i finansowanych przez Fundację. W roku 2007 wiodącym tematem dla projektów badawczych był problem współpracy z pacjentem w leczeniu i profilaktyce chorób przewlekłych. Brak systematyczności (*compliance*) ze strony pacjenta i ciągłości (*persistence*) w stosowaniu się do zaleceń lekarskich stanowią główny powód małej skuteczności terapii wielu chorób przewlekłych. Prof. Ewa Sewerynek – jedna z dwóch laureatów tamtego konkursu, oceniała odmienne strategie, które mogą zwiększyć stopień współpracy chorych. Wyniki wskazują, że aktywny udział pielęgniarek w terapii może znacząco poprawić wyniki leczenia.

W większości konkursów Fundacji, Rada Naukowa nie określała tematyki, umożliwiając uzyskanie finansowania dla projektów z różnych obszarów medycyny i farmacji. W takim konkursie w roku 2003 został nagrodzony projekt prof. Janusza Kasperczyka (wówczas jeszcze docenta) nad wykorzystaniem polimerów do tworzenia mikrosfer dostarczających cytostatyki i ulegających następnie rozkładowi (biodegradacji). Dzięki realizacji projektu Autorzy

stworzyli nowy oryginalny nośnik dla często stosowanych cytostatyków, który przechodzi do dalszego etapu badań mogących doprowadzić do powstania nowej, bardziej skutecznej i bezpiecznej metody leczenia złośliwych nowotworów mózgu.

Z biologią nowotworów wiąże się także projekt dr Edyty Brzóska-Wójtowicz – laureatki konkursu w formule „otwartej” w roku 2008. W publikacji Autorzy omawiają możliwość wykorzystania SDF-1 (zrębowego czynnika wzrostu) w regeneracji mięśni szkieletowych. We własnych pracach wykazali, że możliwa jest stymulacja wytwarzania endogennego SDF-1, który aktywuje komórki macierzyste dla mioblastów.

W tej samej edycji konkursu, prof. Agnieszka Słowik zgłosiła, nagrodzony następnie projekt, który ma za cel poszukiwanie czynników genetycznych związanych z wystąpieniem niedokrwinnego udaru mózgu – drugiej przyczyny zgonu z powodów sercowo-naczyniowych w populacji. Jednym z mechanizmów tłumaczących związek znalezionego polimorfizmu rs2200732 z udarem może być kodowana przez ten gen skłonność do występowania migotania przedsionków. Wiadomo bowiem, że co najmniej kilkanaście procent udarów niedokrwiniowych jest powikłaniem tej najczęstszej tachyarytmii. We własnych badaniach Autorzy nie znaleźli zależności pomiędzy analizowanym polimorfizmem a ryzykiem migotania przedsionków, jednak kontynuacja prac może doprowadzić do wykrycia nowego mechanizmu związanego w udarem niedokrwinnym, stwarzając tym samym lepsze możliwości prewencji czy terapii.

Z tego samego ośrodka, Katedry Neurologii *Collegium Medicum* Uniwersytetu Jagiellońskiego, pochodzi projekt dr Joanny Pery, nagrodzony w konkursie w 2009 roku. Autorzy poszukują wskaźników,

które pozwolą na wykrycie osób szczególnie zagrożonych istnieniem tętniaka wewnątrzczaszkowego o wysokim prawdopodobieństwie pęknięcia i krwotoku podpajęczynówkowego. W badaniach Autorzy wykorzystali nowoczesną metodę jednoczasowej analizy wielu genów w krążących komórkach krwi z wykorzystaniem mikromacierzy. Wyniki sugerują istnienie odrębnych profili ekspresji dla chorych szczególnie zagrożonych.

Współcześnie u chorych z udarem niedokrwionym jedyną szansą uniknięcia trwałego kalectwa jest wczesne zastosowanie leków fibrynolitycznych, obarczonych jednak dużym ryzykiem poważnych powikłań, dotyczących nawet 10% poddanych terapii. Nadzieje na lepsze preparaty wiąże się z rozwojem biotechnologii. Rozwój metod diagnostyki i terapii opartych na biotechnologii należy do wiodących zadań Fundacji i był także tematem konkursu w roku 2006. Nagrodzony wówczas zespół – kierowany przez prof. Janusza Szemraja, opracował drogą inżynierii genetycznej nowe białka o właściwościach trombolitycznych, oparte na cząsteczce stafilokinazy i wykazujące zwiększone powinowactwo do białek skrzepu. Nowy produkt przeszedł pomyślnie pierwsze badania w modelu zwierzęcym

i można mieć nadzieję, że znajduje się na ścieżce prowadzącej do kliniki.

Receptory dla serotoniny stanowią miejsce uchwytu wielu leków stosowanych w psychiatrii. W 2002 roku Fundacja nagrodziła projekt poszukiwania nowych cząsteczek wiążących się z receptorem dla serotoniny. Zespół kierowany przez Prof. Andrzeja Bojarskiego przebadał 39 związków pochodzących z własnej biblioteki Instytutu Farmacji, wykazując w badaniach na zwierzętach, że posiadają właściwości przeciwdepresyjne. Autorzy przeprowadzili też modelowanie komputerowe interakcji ligand-receptor, identyfikując struktury istotne dla działania nowych leków.

Ostatnia praca w tym numerze, także pochodzi z konkursu o otwartej formule ogłoszonego w roku 2009. Zespół Prof. Marka Jagielskiego z Państwowego Zakładu Higieny wykazał, że stosowana przez nich metoda genotypowania stanowi przydatne narzędzie do analizy zmienności szczepów bakterii błonicy, która nadal stanowi zagrożenie epidemiczne, także w naszym kraju.

Zapraszam do lektury.



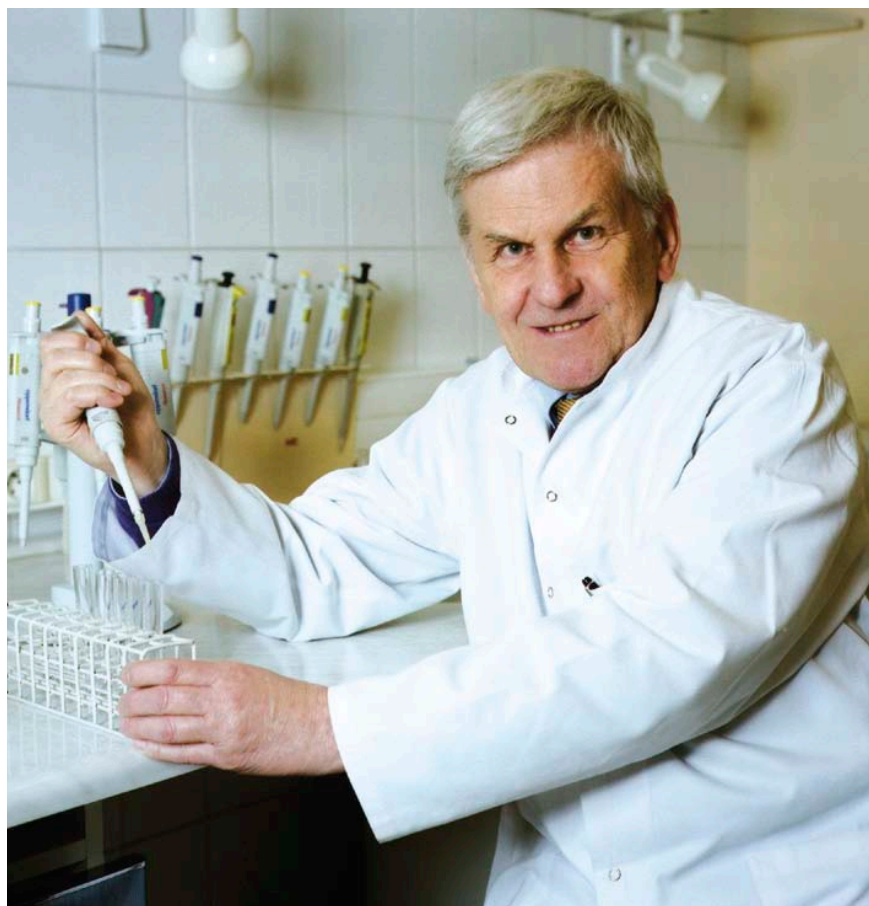
Wspomnienie o prof. dr hab. Andrzeju Szczekliku

In memory of Professor Andrzej Szczeklik

Jacek Spławiński

Nad cmentarzem Salwatorskim unosiła się lekka mgiełka, każdy oddech porażał zimnem. W temperaturze minus 18 stopni zmarznęta ziemia nie chciała przyjąć Andrzeja, my stojący nad grobem też chcielibyśmy zatrzymać Andrzeja wśród żywych. Słońce, chociaż rozmyte przez mgłę, dawało odrobinę ciepła. Razem z Jasiem Ciećkiewiczem wysunęliśmy się do przodu tak aby nas nikt nie zasłaniał i staliśmy wyprostowani, zastygli w zimnie, w niewyraźnych promieniach ciepła, oświeceni nagłą śmiercią Andrzeja.

Wydawało się, że jeszcze wczoraj siedzieliśmy razem z Andrzejem, dwoma kolegami i koleżankami z grupy u Jasia w jego „pracowni”, czyli pokoju oddzielonym klatką schodową od kuchni, w Szarej Kamienicy przy Rynku. Kuchnia była połączona z mieszkaniem Jasia i gabinetem jego ojca, lekarza. Na biurku u Jasia stało kilka butelek wina, które można było łatwo schować za tapczanem, bo drzwi od kuchni skrzypiały, podest schodów był szeroki no i drzwi do „pracowni” otwierały się ciężko. Ani u Andrzeja, ani u mnie nie mieliśmy tak dogodnych warunków. Ojciec Jasia, w przeciwieństwie do ojca Andrzeja, który pracował we Wrocławiu, czy mojego, który był daleko w Zakopanym, prawie zawsze stawiał butelkę wina na pustym biurku – oparcie tapczanu zasłaniało inne butelki – a po godzinie przychodził sprawdzić czy zbyt szybko tej butelki nie opróżnimy. Kłopot polegał na tym aby nie pomylić pustych butelek i na biurku trzymać tę, która została ofiarowana. Nasze rozmowy – w towarzystwie koleżanek – dotyczyły asystentów, profesorów i egzaminów, a także gór, ponieważ w trójkę fascynowaliśmy się Tatrami. Właściwie to była dwójka, Andrzej i Jasiu, do których dołączyłem na pierwszym roku medycyny. O górach mogliśmy



Profesor Andrzej Szczeklik.

rozmawiać w nieskończoność, kłócąc się o drogi dojścia i ścieżki, o szczegóły takie jak czy mostek przez strumień był przed czy za kapliczką i kto z nas szybciej przeszedł po oszronionym smreku leżącym nad potokiem. Od czasu do czasu Andrzej próbował skierować rozmowę na genetykę. Właśnie dowiedzieliśmy się – było to już przecież po śmierci Ojca Narodów – że pan Łysenko nie ma racji i że jakiś duchowny z Moraw krzyżując groszek odkrył geny. Dla Andrzeja było to fascynujące odkrycie (choć dokonane przed laty) i usiłował nam po wielu kieliszkach wytłumaczyć jakie to może mieć znaczenie dla medycyny. Nas bardziej fascynowało to, że nasi partyjni profesorowie osobiście wycofywali z księgarni swoje podręczniki skażone Łysenką. Niepotrzebnie, ich próba zaszczepienia w nas nauk Miczurina i Łysenki nigdy się nie powiodła z przyczyn, mówiąc oględnie, dość rozmaitych.

W czerwcu następnego roku na skuterze marki Peugeot wyruszyliśmy z Andrzejem do Belgradu na dwumiesięczne praktyki studenckie. Andrzej był zawsze prymusem (prawie zawsze, przez nasze posiadły w Szarej Kamienicy nie zdał farmakologii) i z tej racji pierwszym kandydatem na praktyki. Po dwutygodniowej jeździe – Peugeot pod górę nie chciał jechać i trzeba było go przepchać przez całe Niżne Tatry – wjechaliśmy z dużym opóźnieniem do Belgradu. Po drodze nie mieliśmy przygód, bo w wieku 19 lat nie jest niczym specjalnym spanie na sianie lub po prostu w polu na terenie Czechosłowacji czy – to jednak była przygoda – w luksusowych hotelach na terenie Węgier. W luksusowych dlatego, że był rok 1957 i absolutnie wszyscy napotkani Węgrzy chcieli się nam zrewanżować za pomoc Polski w ich batalii z komunizmem. Obcy nam ludzie przyjmowali nas wystawnymi kolacjami, książd z zakrystianem mył nam skuter, orkiestry w różnych lokalach grały specjalnie dla nas hymn narodowy, w którym Andrzej (student konserwatorium ze słuchem absolutnym) nieodmien- nie rozpoznawał „Szła dziewczeczka do laseczka”. Prawdziwą przeszkodą okazało się dopiero przejście pierwszej w naszym życiu granicy pomiędzy naro- dami robotniczo-chłopskimi a krajami skazanymi na kapitalizm, czyli granicy węgiersko-jugosło- wiańskiej. Ponad godzinę przed kantorem celników naradzaliśmy się z Andrzejem jak wypełnić otrzy- mane formularze. Na górze każdego z nich była informacja, że wszystkie rubryki należy wypełnić zgodnie z prawdą, a poniżej, dwukrotnie większą czcionką i drukowanymi, pogrubionymi, czarnymi literami: „SMRT FASZISTIMA”. Zastanawialiśmy się czy będą zabijać za każdą próbę przewiezienia niedozwolonego towaru i baliśmy się, że odnalezienie przemytu może oznaczać „SMRT”, szczególnie, że obaj byliśmy wrogami komunistów. Kiedy więc w końcu obyło się bez kontroli i z olbrzymią ulgą przeszliśmy na stronę jugosłowiańską postanowiłem zapytać – chociaż Andrzej prosił: „Nie pytaj o nic, błagam, jedźmy już!” – celników, którzy rozkręcali śrubka po śrubce samochód „Moskwicz” z węgier- ską rejestracją, dlaczego ów Węgier jest tak sprawdzany. Celnik wyprostował się spod „Moskwicza”, jak się okazało był wysoki i postawny. Z powagą, głębokim basem powiedział „To arcymistrz Szabo wraca z turnieju szachowego gdzie wygrał 100 000 dolarów i nie deklaruje ani centa”. Spojrzał na An- drzeja, który już wsiadał na skuter, mnie także zlu- strował wzrokiem i dodał: „Twój kolega ma aparat fotograficzny w wiatrówce a ty przemycasz „sza- rotkę”, ale wy jesteście studenci i musicie z czegoś żyć”. W tym momencie, ku wielkiej radości celnika, Andrzej spadł z siodła a ja osunąłem się na próg urzędu – tak rażąca była wizja śmierci za kłamliwe wypełnienie formularza „SMRT FASZISTIMA”.

W Belgradzie wszystkie praktyki były już zajęte, przyjmowano po 4 studentów na oddział i po 2 ty- godniach wolne miejsca były wyłącznie na gruźlicy. Z rozpaczy za ostatnie dinary poszliśmy napić się wina, było jasne, że na nic zdała się troska naszych matek w czasie okupacji by nas uchronić przed gruź- licą. Spóźnieni i na lekkim rauszu zgłosiliśmy się do profesora Grujica odpowiedzialnego za praktykan- tów z Polski. Ku naszej rozpaczy profesor nie znał angielskiego, ale biegle posługiwał się francuskim – językiem, w którym Andrzej był perfekcjonistą. Chociaż Andrzej spędził później wiele lat w Stanach i w Anglii to czuło się, że jego prawdziwą miłością była Francja, francuski i Paryż. Francuski Andrze- ja uratował nas, a szczególnie mnie, który nie znał ani słowa w tym języku. Profesor był zachwycony Andrzejem oraz jego wiedzą i zaproponował nam udział w akcji szczepień przeciwgruźliczych, któ- ra obejmowała całą Jugosławię. Dostaliśmy auto, opiekuna i kiedy chcieliśmy ruszyć za amerykańską sanitarką wiozącą szczepionki, profesor na odjezd- nym powiedział „Nie musicie asystować przy szczep- ieniach. W ogóle nie musicie oglądać szczepień”. W ten sposób ani Andrzej ani ja nigdy nie dowie- dzieliśmy się jak należy szczepić.

Zwiedzając Jugosławię mieliśmy dużo czasu na dys- kusje. Takie to były czasy, że nasze dyskusje – na pewno naiwne – nie koncentrowały się na samocho- dach, dziewczynach i piłce nożnej, ale dotyczyły wy- łącznie sensu życia i pytań o istnienie Boga. Andrzej był bardzo wierzący i zbijał moje argumenty o ewo- lucji. „Chcesz powiedzieć” mówił „że wszystkie two- je posunięcia, każdy nieomal ruch, wybór studiów, miłość..., że nie masz żadnej woli i małe cząsteczki chemiczne decydują za ciebie o wszystkim?!” Rze- czywiście, trudno było pogodzić się z poglądem, że nie robię tego co chcę, ale dokładnie to, co chciały moje geny. „Chcesz powiedzieć” dobijał mnie Andrzej „że gdyby nie doszło do odpowiedniego połączenia pomiędzy grupą aminową i karboksylową, robiłbyś w życiu dokładnie coś przeciwnego? Czy mógłbyś mieć poglądy nacjonalistyczne, faszystowskie? Twój gen, mała niteczka w jądrze komórkowym, nawle- czona na histony, uczyniła z ciebie człowieka?”

Pchając skuter przez Niżne i Wysokie Tatry wrócili- śmy w połowie września do Zakopanego. Wykończy- ły nas te praktyki i podróże. Portier szpitala, gdzie pracował mój ojciec, nie tylko nas nie rozpoznał, ale jeszcze poszczuł zakopiańskimi owczarkami. Po- tem Andrzej, który był niewiarygodnie ambitny, na- mówił mnie do zdawania ECFMG, ponieważ tylko w ten sposób student bez „słusznych” znajomości mógł dostać się na praktykę szpitalną w Ameryce. Andrzej pracował tam ciężko ponad rok, przy czym słowo „ciężko” jest eufemizmem – cały tydzień

w szpitalu, tylko w środy szedł przespać się do domu i codziennie prowadził konsultacje z rezydentem, co oznaczało kolokwia z każdego działu medycyny, bo absolwent w Stanach musi znać świetnie radiologię i mieć pojęcie o praktycznej okulistyce i laryngologii. Ciężka szkoła amerykańska i przykład ojca, który ściągnął Andrzeja do swojej kliniki, wyrobiły w Andrzeju wielką odpowiedzialność, pracowitość i zdolność do koncentracji, bo we Wrocławiu trzeba było szybko i celnie badać pacjentów, opisywać badania, prowadzić historie choroby i przygotowywać referaty aby nie „podpaść” profesorowi lub innym Lwowiakom, choćby profesorowi Falkiewiczowi, który prowadził swoją klinikę o piętro wyżej. Równocześnie Andrzej prowadził doświadczenia w laboratorium nad alfa1 antytrypsyną.

Jednakże najważniejszym odkryciem Andrzeja była Wrocławianka, którą kiedyś przywiózł do Krakowa, umożliwiając Jasiowi i mnie poznanie jego przyszłej żony. Wrocław spowodował, że oddaliliśmy się od siebie. Już bardzo rzadko spotykaliśmy się na ulicy Świętego Tomasza – zwykle wtedy, kiedy nikogo nie było w domu – Andrzej siadał przy fortepianie i grał stare melodie, mniej lub bardziej ambitne, takie jak: „Muskrat Ramble”, „St. Louis Blues”, „The Memphis Blues”, „C'est Si Bon”, „Blueberry Hill”, „Mack the Knife” i „Savoy Blues”. My z Jasiem dostarczaliśmy wino i wspominaliśmy różne młodzieńcze akcje z czasów studiów, nie wszystkie, niestety, napawające nas dumą i nadające się do powtórzenia. Nie wiem jak Jaś, ale ja na pewno właśnie takiego Andrzeja będę pamiętał i kochał: nie tego z pomnika i nie tego opromienionego sławą

naukowca i lekarza, ale Andrzeja zwykłego, który dygoce z zimna na łące pod Balatonem (skuter znowu nawalił) i który przy kieliszku znowu rozpoczyna rozmowę na temat „Powiedz co za tym wszystkim stoi? Czy istnieje coś, co jest stałe i niezmiennie? Jeśli takiej rzeczy nie ma, to czy wszystko co nazywamy nie jest pustym dźwiękiem?”

Jego zainteresowanie światem doprowadziło do połączenia nauki eksperymentatora-specjalisty i wiedzy dyletanta-filozofa. Andrzej był chyba ostatnim naukowcem, korzeniami tkwiącym w XIX wieku, który nie należał do mądro-głupich współczesnych uczonych (definicja Ortegi Y. Gasseta) i starał się swoją wiedzę przeniknąć dziedziny, w których jego koledzy należeli do ignorantów. Olbrzymia erudycja i znajomość antyku pozwoliły mu w swoich esejach (szczególnie w „Katharsis”) połączyć specjalizację z najwyższej półki z pytaniami, które zadają wyłącznie filozofowie i których uczeni XXI wieku nie potrafią zadać. Dzisiejsi naukowcy wyspecjalizowali się tak bardzo, że potrafią się porozumieć wyłącznie przy pomocy impact factor i nie rozumieją sedna swoich prac. Nie wolno ich pytać o istotę duszy – nie zrozumieją pytania. Tymczasem Andrzej, napędzany swoją młodzieńczą wrażliwością postawił to pytanie. Może nie dał na nie odpowiedzi, ale jak to w filozofii najważniejsze, potrafił zapytać i pozostawić nas poszukujących odpowiedzi.

*Prof. Jacek Splawiński,
pierwszy przewodniczący
Rady Naukowej Fundacji,
a obecnie jej członek honorowy*

Profesor Andrzej Szczekliki (1938–2012) wybitny lekarz, naukowiec, humanista. Był twórcą, organizatorem i kierownikiem II Katedry Chorób Wewnętrznych Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego. W pracy naukowej szczególnie interesował się chorobami układu krążenia i oddechowego.

Profesor Andrzej Szczekliki był laureatem II edycji konkursu Naukowej Fundacji Polpharmy na najlepszy projekt badawczy. W 2003 roku otrzymał od Fundacji grant w wysokości 390 000 zł na realizację projektu badawczego pt. *Anafilaktoidalne reakcje na niesteroidowe leki przeciwzapalne*.

Opieka pielęgniarska i częsty sposób monitorowania wpływa na poprawę przestrzegania zaleceń lekarskich w trakcie terapii pacjentek z osteoporozą pomenopauzalną alendronianem 70

Nursing care and frequent monitoring improve the compliance of postmenopausal osteoporotic patients with prescribed alendronate 70 therapy

Ewa Sewerynek^{1,2},
Wanda Horst-Sikorska³,
Wioletta Stępień-Kłós¹,
Agnieszka Antkowiak¹,
Małgorzata Janik¹,
Karol Cieślak¹,
Magdalena
Marcinkowska³,
Bogdan Małkowski⁴,
Ewa Karzewnik^{2,5},
Agnieszka Cegłowska^{1,2},
Maria Tabaszewska⁶,
Marek Lasota⁷,
Grażyna Krupińska⁸,
Anna Gładalska¹,
Michał Stuss^{1,2}

¹ Zakład Zaburzeń Endokrynnych i Metabolizmu Kostnego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Łódź

² Regionalny Ośrodek Menopauzy i Osteoporozy Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego im. WAM „Szpital Weteranów”, Łódź

³ Zakład Medycyny Rodzinnej Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, Poznań

⁴ Instytut Onkologii, Bydgoszcz

⁵ Poradnia Endokrynologiczna Samodzielnego Szpitala Wojewódzkiego, Piotrków Trybunalski

⁶ Poradnia Reumatologiczna Szpitala im. Kopernika, Łódź

⁷ Oddział Ortopedii Szpitala im. Jonschera, Łódź

⁸ NZOZ Poradnia Medycyny Rodzinnej, Łódź

Naukowa Fundacja Polpharmy w 2007 roku przyznała zespołowi pracującemu pod kierunkiem prof. Ewy Sewerynek grant na realizację projektu badawczego pt. *Ocena przestrzegania zaleceń lekarskich (adherence) w leczeniu osteoporozy – określenie czynników mogących wpływać na brak ciągłości i systematyczności terapii.*

Streszczenie

Wstęp. Wykazano iż ponad 50% pacjentów leczonych z powodu chorób przewlekłych, w tym osteoporozy, przerywa terapię w ciągu pierwszego roku jej stosowania. Problem ten narasta wraz z wydłużaniem czasu trwania obserwacji.

Celem pracy była 12 miesięczna ocena stopnia przestrzegania zaleceń terapii preparatem alendronian 70 (ALE70) przez pacjentki leczone z powodu osteoporozy w trakcie monitorowania co 2 miesiące (I etap) i co 6 miesięcy (II etap). Ponadto, w II etapie oceniono udział dodatkowego czynnika motywacyjnego, tj. opieki pielęgniarskiej, edukacji czy wykonywania badań biochemicznych w poprawie przestrzegania terapii.

Materiał i Metody. W I etapie, w badaniu prospektywnym poddano analizie przestrzeganie leczenia w grupie 150 pacjentek leczonych ALE70. W II etapie 123 pacjentki podlegały dodatkowym czynnikom motywacyjnym, tj.: edukacji, opiece pielęgniarskiej z dodatkowym kontaktem telefonicznym w 3 i 9 miesiącu leczenia oraz w kolejnej grupie wykonywano badania biochemiczne informując pacjentki o ich wynikach.

Wyniki. Podczas trwania I etapu systematyczność po roku utrzymało 95,08±1,39% (średnia ±SEM), a średnia długość przyjmowania leków wyniosła 347,05±5,07 dni. W grupie pacjentek, które przerwały leczenie średni okres stosowania się do zaleceń wyniósł 212,44 dni. Najgorsze wyniki uzyskano w grupie pacjentek z rozpoznaniem osteoporozy dłuższym niż 5 lat, szczególnie w podgrupie, u której włączono ALE70 pierwszy raz lub podjęto leczenie po przerwie. W II etapie badania w trakcie rutynowego monitorowania bez wzmocnienia motywacji (Grupa kontrolna) tylko 54,03% pacjentek przestrzegało systematyczności brania leku, w tym tylko 37,5% przyjęło powyżej 80%

Wpłynęło: 20-03-2012
Zaakceptowano: 03-04-2012
Opublikowano: 10-08-2012

Adres do korespondencji:

prof. dr hab. med.
Ewa Sewerynek, Zakład
Zaburzeń Endokrynnych
i Metabolizmu Kostnego,
Katedry Endokrynologii
Uniwersytetu Medycznego
w Łodzi, ul. Żeligowskiego 7/9,
90-752 Łódź,
e-mail: ewa.sewerynek@wp.pl

zaplanowanych dawek, a wytrzymało w terapii rocznej 43,75% pacjentek. Średnia długość przyjmowania leku w tej grupie wyniosła 197 dni. W pozostałych grupach z czynnikiem motywacyjnym zarówno *compliance*, jak i *persistence* uległy poprawie i były lepiej wyrażone w grupie pacjentek poddanych opiece pielęgniarskiej.

Wnioski. Im dłuższe przerwy w monitorowaniu tym większy jest odsetek pacjentów przerywających terapię. Każda dodatkowa forma motywacji wpływa na poprawę przestrzegania terapii, choć wydaje się, że dominujące znaczenie ma opieka pielęgniarska.

Słowa kluczowe: osteoporoza • przestrzeganie zaleceń lekarskich • alendronian 70 • przyczyny przerwania terapii • opieka pielęgniarska • edukacja • badania biochemiczne

Summary

Introduction. It has been demonstrated that over 50% of patients treated for chronic diseases, including osteoporosis, withdraw from prescribed therapy during the first year from its onset. The longer the observation period, the bigger the problem.

The goal of this study was a 12-month evaluation of the compliance degree with recommended alendronate 70 (ALE70) therapy prescribed to female patients with osteoporosis. The observation period included two stages: stage I with monitoring frequency of every 2nd month and stage II with 6-month intervals between subsequent monitoring time points. Moreover, in the latter group, the role of a motivation co-factor was taken into account for compliance improvement, such as nursing care, patient's education level or repeated biochemical assays.

Material and methods. In Stage I, a prospective analysis focused on the compliance with ALE70 therapy recommendations in a group of 150 female patients. In Stage II, 123 female patients, were referred to additional motivation factors, including education level, nursing care with telephone enquiries in the 3rd and 9th month of therapy; in another group, out of 123 patients, biochemical assays were performed, informing the patients of laboratory test results.

Results. In Stage I, the general compliance degree was $95.08 \pm 1.39\%$ (mean $\pm$ SEM) and the average length of drug intake of 347.05 ± 5.07 days. In turn, in the withdrawal group, the average time period of compliance with prescribed recommendations was 212.44 days. The worst results were found in the group of patients with osteoporosis diagnosed earlier than 5 years before therapy onset. In Stage II, a routine observation of an unmotivated (control) group revealed only 54.03% of the patients with systematic drug intake, including 37.5%, who received more than 80% of the scheduled doses and 43.75% of the patients who persisted in therapy for the whole year; the average length of drug intake in that group was 197 days. In the groups with motivation bias, both compliance and persistence of the patients improved, with evidently higher scores in those with nursing assistance.

Conclusions. The longer the intervals between subsequent monitoring visits, the higher the percent of therapy discontinuing patients. Any additional sign of interest in the treated patient is a therapy compliance improving factor, with nursing care considered to be of dominating significance.

Key words: osteoporosis • compliance • alendronate 70 • reason for discontinuation • nurse care • counseling • biochemical examinations

Osteoporoza stanowi poważny światowy problem zdrowotny przełomu XX/XXI wieku, w tym także w Polsce [1]. Obecnie stosowane formy terapii zwiększają gęstość mineralną kości i obniżają ryzyko złamań [2–7]. Dla uzyskania największej skuteczności leczenia wskazane jest utrzymanie optymalnej systematyczności (ang. *compliance*) i ciągłości terapii (*persistence*) [8,9]. W anglojęzycznej literaturze istnieje jeszcze określenie sumy dwóch powyższych pojęć obrazujące stopień przestrzegania terapii (ang. *adherence*) [10–13].

Efektywność leczenia zależy od systematyczności i wytrwałości przyjmowania leku. Wykazano, iż 50% pacjentów leczonych z powodu innych chorób przewlekłych o przebiegu subklinicznym, tj.: hipercholesterolemia czy nadciśnienie tętnicze przestrzega zasad terapii długoterminowej [14], a 1/5 pacjentów w ogóle nie realizuje recept [15]. Problem ten dotyczy także pacjentów leczonych z powodu osteoporozy. Wykazano, iż ok. 50% pacjentów przerywa terapię osteoporozy w ciągu pierwszego roku [16], ok. 20% pacjentów w ciągu pierwszych 4 miesięcy, a 13% w ogóle nie podejmuje leczenia preparatem alendronian podawanym doustnie codziennie [17,18]. Ten problem jest niezależny od formy stosowanego leku [11]. W 2011 r. ukazała się praca Lin Li i wsp. [19], w której przeanalizowano 66 tys. pacjentek leczonych z powodu osteoporozy w latach 1995–2008. Wykazano, iż bez względu na formę terapii osteoporozy, najwięcej incydentów przerw w leczeniu występuje w pierwszym roku (ok. 44%), w porównaniu z rokiem trzecim (ok. 16%) i piątym (ok. 9%). Zwrócono uwagę iż na przestrzeni 5 lat obserwacji zmieniły się formy terapii z codziennej na co-tygodniową, co między innymi wynikało z poszukiwania leku o coraz większej skuteczności przeciwzłamaniowej i lepszej tolerancji zwłaszcza w grupie bisfosfonianów. Nie bez znaczenia było także stosowanie takiej formy leku by utrzymać jak najlepszą *compliance*. Prawidłowy sposób przyjmowania leków jest istotny, gdyż wykazano, iż u pacjentów przestrzegających leczenia preparatem alendronian w ciągu 4 lat stwierdzono obniżenie ryzyka złamania szyjki kości udowej o 70% [20].

Dla wielu lekarzy, problemem o rosnącej wadze staje się kwestia przestrzegania zaleceń lekarskich przez pacjentów cierpiących na choroby przewlekłe. Problem, został zaproponowany w VI edycji konkursu Fundacji [13]. Coraz liczniejsze badania wskazują, że w porę przeprowadzone rozpoznanie i szybkie włączenie leczenia nie zawsze przynoszą oczekiwane rezultaty. Wyjaśnienie tego zjawiska kryje się w następującym fakcie: pacjenci jako wykonawcy zaleceń sformułowanych przez lekarza często w dowolny sposób je modyfikują.

O skali zjawiska mogą świadczyć wnioski z badania IPSOS Health UK Study przeprowadzonego w 2005 r. w pięciu europejskich krajach [21]. Badaniem objęto 500 lekarzy (reumatologów, jak i lekarzy rodzinnych) oraz 502 kobiety z rozpoznaną postmenopauzalną osteoporozą. Badane pacjentki były w trakcie lub po leczeniu bisfosfonianami. Celem badania było poznanie różnic w spostrzeganiu czynników warunkujących wypełnianie zaleceń oraz przerwanie terapii – w ocenie pacjentek i lekarzy, oraz rozpoznanie czynników zwiększających motywację pacjentek do poddania się reżimowi terapii.

Wyniki w pełni uzasadniają rosnące zainteresowanie tym zagadnieniem: 60% pacjentek przyjmujących bisfosfoniany raz w tygodniu oraz blisko 80% przyjmujących lek codziennie przerywa leczenie przed upływem roku. Siedmiu na 10 lekarzy nie zna przyczyn, dla których pacjentka przerywała terapię. Wśród przyczyn przerwania terapii podawanych przez lekarzy pierwsze miejsce zajęło niedostateczne zrozumienie zasadności farmakoterapii. Pacjentki wskazywały z kolei na następujące przyczyny przerwania leczenia: przymus pozostawania w pozycji wyprostowanej, efekty uboczne, przybieranie na wadze oraz zapominanie.

Między lekarzami a pacjentkami brakuje zrozumienia (właściwej komunikacji, sprzężenia zwrotnego) – mimo tego, że 82% lekarzy zaleca swoim pacjentom leczenie bisfosfonianami przez okres minimum jednego roku lub dłużej to aż 51% pacjentek nie przypomina sobie tego, żeby lekarz informował je o czasie trwania terapii.

Wśród strategii motywowania pacjentek wykorzystywanych przez lekarzy przeważają te opierające się na przekazywaniu wyczerpującej informacji oraz wskazywaniu zagrożeń. Tylko jeden na dziesięciu lekarzy motywuje pacjentki przypominając o korzyściach płynących z leczenia. Pacjentki wymieniły następujące motywacje: ponad połowa kobiet kieruje się motywacją pozytywną (korzyści), jedna trzecia wskazuje na wymiar pragmatyczny terapii (pomaganie sobie) i tylko 15% kobiet wskazało na rolę lęku przed złamaniem jako czynnika motywującego do przestrzegania reżimu terapii.

Powyższe wyniki stały się podstawą do sformułowania ogólnych zaleceń w zakresie motywowania pacjentów, oraz wyznaczenia obszarów poszukiwań metod poprawiających przestrzeganie zaleceń lekarskich.

Jednym ze sposobów poprawy współpracy pacjenta jest uczynienie terapii możliwie najwygodniejszą. Jest to widoczne w staraniach skupiających się na poszukiwaniu leków złożonych czy też takich,

które podaje się raz na długi czas (np. bisfosfoniany w dawce raz na tydzień, miesiąc, rok). Badania dotyczące tych metod świadczą o skuteczności takich schematów [21,22].

Równocześnie istnieją także analizy, które wskazują, że pacjenci wypełniając zalecenia w określony sposób nie kierują się jedynie własną wygodą, ale także przywiązują dużą wagę do oczekiwanych i pożądaných efektów terapii [23].

Fakt ten jest podstawą do badań metod opartych na istnieniu związku lekarz-pacjent oraz autonomii pacjenta. Polecana metoda opiera się na przeprowadzeniu w trakcie rozmowy z pacjentem trzech kroków:

1. Rozpoznanie u pacjenta motywów, którymi się kieruje – dla ustalenia możliwych kontrymtywów.
2. Jasne przedstawienie celów terapii i środków do ich osiągnięcia – przy zachowaniu dbałości o utrzymanie informacyjnego sprzężenia zwrotnego.
3. Dyskusja z pacjentem, w czasie której należy wskazać na istnienie związków pomiędzy motywami pacjenta i celami terapii.

Zdaniem autorów badania przepis na zadowalającą lekarzy współpracę pacjenta jest możliwy i zaskakująco prosty. Kluczowymi pozostają kwestie motywowania poprzez podkreślanie korzyści płynących z terapii i nawiązywanie do pozytywnej motywacji i potrzeb pacjentów, oraz poprawa komunikacji.

W każdym wypadku wysiłki lekarza powinny zmierzać w kierunku oddania części odpowiedzialności za leczenie pacjentowi.

Celem przeprowadzonego grantu Fundacji była odpowiedź na pytanie: Czy i w jakim zakresie różne formy motywacji (edukacja, opieka pielęgniarska + kontakt telefoniczny, badania biochemiczne) wpływają na poprawę systematyczności i wytrwałości w leczeniu osteoporozy. Określenie udziału czynników socjoekonomicznych (wiek, miejsce zamieszkania, wykształcenie, status finansowy) w procesie edukacji. Czy przestrzeganie zaleceń lekarskich jest zależne od ilości przyjmowanych leków i częstości ich podawania?

Osteoporoza dotyczy populacji pacjentów w starszym wieku, którzy częstokrotnie oprócz typowego leczenia zaburzeń metabolizmu kostnego stosują inne leki. Problem polipragmatyzacji odgrywa istotną rolę w utrzymaniu terapii ze względu na fakt, iż zarówno ilość tabletek przyjmowanych dziennie, jak i ich sumaryczna cena może wpływać na przerywanie terapii lub selektywną eliminację leków lub ich dawek. W praktyce lekarskiej obok leczenia różnych

schorzeń coraz częściej spotykamy się ze stosowaniem leków także w aspekcie profilaktycznym (np. kwas acetylosalicylowy, statyny). Istotną rolę upatruje się również w przyjmowaniu leków które mogą wchodzić w interakcję z lekami antyresorpcyjnymi lub zaburzać ich wchłanianie (np. inhibitory pompy protonowej).

Dla uzyskania pożądaných wyników leczenia preparaty stosowane w leczeniu osteoporozy wymagają od pacjenta zarówno dyscypliny w sensie wytrwałości, jak i spełniania określonego sposobu przyjmowania leku.

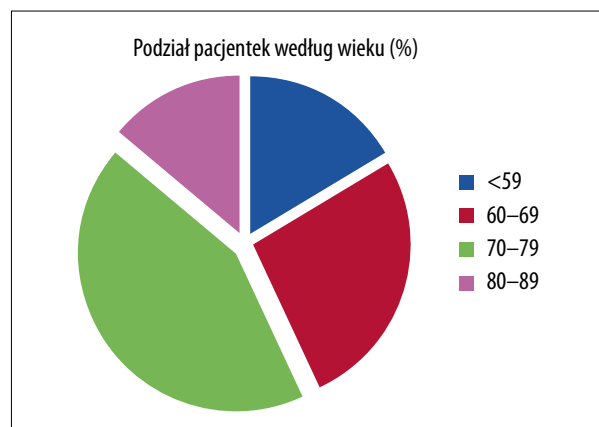
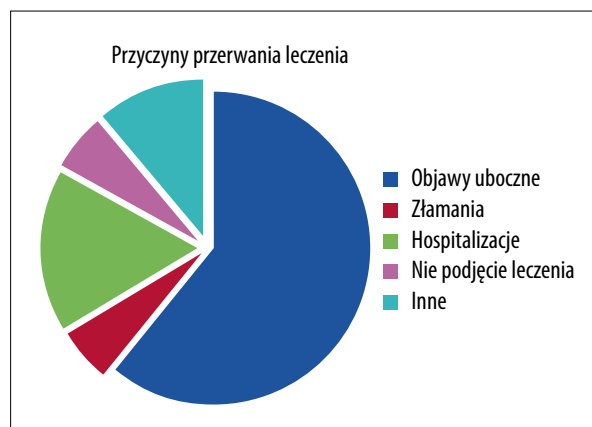
Oryginalność projektu wynikała z faktu, iż A. dzięki badaniu, w grupie „kontrolnej” czyli bez wzmocnienia motywacji uzyskany wynik będzie można uznać za „wzorzec” zachowań polskich pacjentów; B. zostało przeprowadzone porównanie skuteczności kilku sposobów stosowanej motywacji: 1. motywacja negatywna (rutynowo przeprowadzone badanie i kwalifikacja do leczenia) z monitorowaniem co pół roku; 2. motywacja pozytywna (edukacja pacjentów w oparciu o własne materiały + materiały firmowe – omówienie roli diety i aktywności fizycznej); 3. motywacja negatywna + kontakt telefoniczny + kontrola personelu pielęgniarskiego (dwie dodatkowe wizyty telefoniczne); 4. motywacja negatywna + dodatkowe kontrole biochemiczne.

Badanie przeprowadzono 2-etapowo. W pierwszym etapie w badaniu prospektywnym zanalizowano przestrzeganie terapii preparatem alendronian 70 monitorując pacjentki co 2 miesiące przez okres roku. W drugim badaniu prospektywnym przeprowadzono badania ankietowe przed włączeniem leczenia preparatem alendronian 70, oraz po 6 i 12 miesiącach stosowania kwalifikując pacjentki do jednej z 4 grup w zależności od zaproponowanych czynników motywujących. Kwalifikacja pacjentów leczonych alendronianem 70 do grup: I – wizyta rutynowa (grupa kontrolna); II – motywacja wzmocniona (grupa edukacyjna); III – wizyta rutynowa + opieka pielęgniarska + kontakt telefoniczny; IV: wizyta rutynowa + badania biochemiczne. W grupie III przeprowadzono rozmowy telefoniczne w celu wykonania wizyty ankietowej w czasie 3 i 9 miesięcy po wdrożeniu leczenia oraz pacjentki miały możliwość ciągłego kontaktu z pielęgniarką.

W I etapie ocena przyjmowania alendronianu 70 opierała się na częstym monitorowaniu pacjentek co 2 miesiące i ku naszemu zdziwieniu wskazała na znaczną poprawę zasad terapii [24]. Z kolei, w drugim etapie badania ocena przestrzegania przyjmowania leków co 6 miesięcy, lepiej naśladowała realne warunki opieki ambulatoryjnej [25].

Tabela 1. Systematyczność i ciągłość terapii w grupach wiekowych w trakcie monitorowania co 2 miesiące.

Podział grup według wieku	Ilość pacjentów	Systematyczność (compliance) w % (średnia $\pm$ SEM)	Ciągłość (persistence) (ilość dni przyjmowania leków w ciągu roku) (średnia $\pm$ SEM)
<59	25	94,25 $\pm$ 3,04	344,00 $\pm$ 11,1
60–69	41	99,60 $\pm$ 0,28	363,54 $\pm$ 1,02
70–79	66	92,73 $\pm$ 2,64*	338,45 $\pm$ 9,63*
80–89	21	94,66 $\pm$ 4,43	345,52 $\pm$ 16,16
Razem	153	95,08 $\pm$ 1,39	347,05 $\pm$ 5,08

* $p < 0,05$ w porównaniu do grupy wiekowej 60–69 lat.**Rycina 1.** Podział pacjentek na grupy wiekowe (%) w badaniu I etapu.**Rycina 2.** Przyczyny przerywania terapii prep. alendronian 70 w trakcie monitorowania co 2 miesiące.**Tabela 2.** Systematyczność i ciągłość terapii po roku leczenia w zależności od czasu rozpoznania osteoporozy.

Długość okresu włączenia do badania w stosunku do rozpoznania osteoporozy	Liczba pacjentów	Systematyczność (compliance) w % (średnia $\pm$ SEM)	Ciągłość (persistence) (ilość dni przyjmowania leków w ciągu roku) (średnia $\pm$ SEM)
1. Jeden miesiąc	27	95,33 $\pm$ 3,06	347,96 $\pm$ 11,15
2. Jeden rok	21	97,98 $\pm$ 1,66	357,62 $\pm$ 6,05
3. 2–5 lat	72	97,03 $\pm$ 1,62	354,15 $\pm$ 5,86
4. ≥ 5 lat	33	88,79 $\pm$ 4,60*	324,10 $\pm$ 16,79*
Razem	153	95,08 $\pm$ 1,39	347,05 $\pm$ 5,08

* $p < 0,05$ w porównaniu do grupy 3.

Dzięki badaniu II-etapu, w grupie „kontrolnej” czyli bez wzmocnienia motywacji (standardowa wizyta co pół roku) uzyskany wynik uznano za „wzorzec” zachowań polskich pacjentów i relacji pacjent-lekarz w warunkach poradni oraz zróżnicowania tego wzorca zachowań i relacji w zależności od statusu społeczno-ekonomicznego pacjenta.

Ta część pracy oceniła rolę włączenia czynnika motywacyjnego w postaci edukacji, opieki pielęgniarskiej czy badań biochemicznych na przestrzeganie terapii alendronianem 70 oraz na podstawie grupy pacjentów poddanej opiece pielęgniarskiej (wizyty co 3 miesiące włączając kontakt telefoniczny

i możliwość kontaktu z pielęgniarką) oceniła czy dominującego pozytywnego wpływu nie mają mimo wszystko krótsze przedziały czasowe między wizytami. Bardzo istotnym elementem analizy była ocena wpływu opieki pielęgniarskiej pogłębionej o dodatkowe wizyty telefoniczne, które rozszerzały częstość monitorowania, na przestrzeganie zasad terapii.

W 2011 r. opublikowano, w ramach projektu, pierwszą pracę dotyczącą *compliance* przy terapii alendronianem 70 w trakcie monitorowania pacjentek co 2 miesiące uzyskując bardzo dobry stopień przestrzegania leczenia [24]. Do badania włączono

Tabela 3. Systematyczność i ciągłość terapii w zależności od poziomu wykształcenia.

Poziom wykształcenia	Ilość pacjentów	Systematyczność (compliance) w % (średnia $\pm$ SEM)	Ciągłość (persistence) (ilość dni przyjmowania leków w ciągu roku) (średnia $\pm$ SEM)
Podstawowe	36	97,34 $\pm$ 1,94	355,31 $\pm$ 7,07
Zawodowe	40	92,73 $\pm$ 3,14	338,47 $\pm$ 11,46
Ogólnokształcące	47	93,99 $\pm$ 3,16	343,06 $\pm$ 11,52
Wyższe	30	97,21 $\pm$ 1,77	354,83 $\pm$ 6,48
Razem	153	95,08 $\pm$ 1,39	347,05 $\pm$ 5,08

Tabela 4. Systematyczność i ciągłość terapii z podziałem na lekarzy pracujących w Poradni Uniwersyteckiej lub Poradni Regionalnej.

Miejsce pracy lekarza prowadzącego	Liczba pacjentek	Pacjenci przyjmujący ALE 70 pierwszy raz lub po co najmniej rocznej przerwie	Systematyczność (compliance) w % (średnia $\pm$ SEM)	Ciągłość (persistence) (ilość dni przyjmowania leków w ciągu roku) (średnia $\pm$ SEM)
Uniwersytet Medyczny	77	32	91,55 $\pm$ 2,59	334,14 $\pm$ 9,46
Poradnie Rejonowe	76	29	98,67 $\pm$ 0,81*	360,13 $\pm$ 2,96*

* p<0,05.

153 pacjentki w wieku 48–89 lat. Obserwacja w tym badaniu prospektywnym trwała rok w czasie którego monitorowano pacjentki co 2 miesiące. Spośród pacjentek biorących udział w obserwacji 61 nigdy wcześniej nie było leczonych antyresorpcyjnie lub przerwa w terapii była dłuższa niż rok. Kryterium włączenia była gęstość mineralna kości – 2,5 SD w kręgosłupie i/lub szyjce kości udowej i/lub złamanie osteoporotyczne zdiagnozowane lub w wywiadzie.

W cytowanej pracy aż 95,08 $\pm$ 1,39% (średnia $\pm$ SEM) pacjentek systematycznie przyjmowało lek w czasie rocznej obserwacji; średnia długość przyjmowania leków w tej grupie wyniosła 347,05 $\pm$ 5,07 dni. W grupie pacjentek, które przerwały leczenie średnia długość przyjmowania alendronianu 70 wyniosła 212,44 dni. Jedna pacjentka w ogóle nie zrealizowała recepty, a kolejne dwie przerwały leczenie w okresie pierwszych 30–60 dni co, jak podkreślają także inni autorzy, jest najczęstszym okresem dyskontynuacji terapii [26]. Najgorsze przestrzeganie terapii zaobserwowano w grupie wiekowej 70–79 lat (Tabela 1, Rycina 1), co może mieć różne przyczyny: 1. objawy uboczne, 2. współistniejące choroby, 3. zapominanie, 4. liczba przyjmowanych leków, 5. cena leków, 6. hospitalizacje. Najczęściej przerywała terapię grupa pacjentek z 5 letnim okresem od rozpoznania choroby (Tabela 2).

Stosowanie alendronianu 70 nie wiąże się z dużym ryzykiem objawów ubocznych, a objawy nietolerancji z przewodu pokarmowego nie są większe niż w grupie placebo [23,27,28]. Mimo tego, w naszym badaniu najczęstszą przyczyną przerwania leczenia zgłaszanego przez pacjentki były objawy

niepożądane stosowanego preparatu (Rycina 2), podobnie jak obserwowaliśmy w badaniu dotyczącym alendronianu 10 podawanego codziennie [29]. Wykształcenie (Tabela 3) nie miało wpływu na przestrzeganie terapii. Analizując grupy lekarzy opiekujących się pacjentami zwrócono uwagę, iż mimo bardzo dobrego *compliance* ogółem lekarze pracujący poza ośrodkami akademickimi dłużej utrzymywali pacjentów w leczeniu co może wynikać z większego zaangażowania tej grupy w proces diagnostyczno-terapeutyczny w ramach udziału w badaniu klinicznym i chęć sprostania zadaniu (Tabela 4).

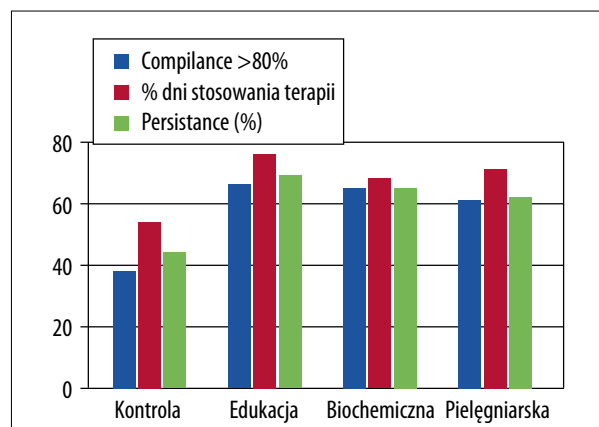
W kolejnej pracy, *compliance* i *persistence* w trakcie terapii preparatem alendronian 70 oceniono w badaniu prospektywnym w grupie 123 kobiet monitorowanych co 6 miesięcy przez okres roku. Uwzględniono wcześniej wymienione grupy motywacyjne, a za optymalny uznano wskaźnik przyjmowania leków powyżej 80% dawki zaplanowanej.

Na podstawie analizy monitorowania pacjentek co pół roku można przypuszczać, iż czas monitorowania (Grupa z opieką pielęgniarską), edukacja czy badania biochemiczne mogą odgrywać istotną rolę w utrzymaniu zarówno właściwej systematyczności, jak i długości terapii [25].

W trakcie rutynowego monitorowania co 6 miesięcy bez wzmocnienia motywacji (Grupa kontrolna) w Ośrodku Łódzkim tylko 54,03% pacjentek przestrzegało systematyczności brania leku, w tym 37,5% przyjęło powyżej 80% zaplanowanych dawek, a wytrzymało w terapii rocznej 43,75% pacjentek (Tabela 5). Średnia długość przyjmowania leku w tej

Tabela 5. Compliance, persistence i czas do dyskontynuacji terapii: Grupa Kontrolna, Grupa Edukacyjna, Grupa Biochemiczna, Grupa z Opieką Pielęgniarską.

	Compliance > 80% (% ±SEM)	Procent dni stosowania leku w ciągu roku (% ±SEM)	Persistence (liczba dni±SEM)	Persistence (%) – % pacjentów pozo- stających w terapii przez rok (%±SEM)	Czas do dyskontynuacji powyżej 30 dni (liczba dni ±SEM)
Kontrola (n=32)	37,50±8,7	54,03±7,36	197,00±26,91	43,75±8,9	185,43±27,03
Edukacyjna (n=29)	65,52±9,0	75,71±7,00	269,72±26,95	68,97±8,7	269,79±26,25
Biochemiczna (n=31)	64,51±8,7	68,29±7,95	249,19±29,04	64,51±8,7	249,19±29,04
Pielęgniarska (n=31)	61,29±9,0	71,18±6,87	259,71±25,10	61,29±6,82	259,71±25,10

**Rycina 3.** Compliance i persistence po roku obserwacji w poszczególnych grupach monitorowanych co 6 miesięcy.

grupie wyniosła 197 dni. W pozostałych grupach zarówno *compliance*, jak i *persistence* było lepsze wskazując, iż jakakolwiek oznaka zainteresowania pacjentem (edukacja, opieka pielęgniarska, czy oznaczanie parametrów biochemicznych) poprawiało przestrzeganie zasad terapii (Tabela 5, Rycina 3).

Mimo zauważalnej różnicy poprawa zarówno *compliance*, jak i *persistence* nie była znamienna statystycznie, prawdopodobnie ze względu na wielkość grup.

Analizując grupy wiekowe powyżej i poniżej 65 rż. nie stwierdzono różnic znamiennych statystycznie (Tabela 6).

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, iż u podstaw nieprzestrzegania zasad terapii było palenie papierosów i pojawienie się objawów niepożądanych (Tabela 7, Ryciny 4 i 5).

Na podstawie uzyskanych wyników nie stwierdzono zależności stopnia przestrzegania terapii od wieku, ilości przyjmowanych leków, aktywności fizycznej, wykształcenia, miejsca zamieszkania, ilości osób w rodzinie, złamań, rodzinnej historii złamań, BMI i złamań w trakcie terapii (Tabela 7).

Także w badaniu II-etapu najczęstszą przyczyną przerwania leczenia były objawy niepożądane (20,3%) (Tabela 7, Rycina 6). Z innych przyczyn dyskontynuacji warto podkreślić zmianę na inny bisfosfonian (20,3%), nie podjęcie leczenia w ogóle (18,8%), brak kontaktu z pacjentem (11,6%), hospitalizacje (5,8%), czy brak zainteresowania udziałem w badaniu (2,9%).

Podsumowując pracę dwóch ośrodków biorących udział w badaniu (w sumie 212 pacjentek – dane nieopublikowane) uzyskano znaczną poprawę przestrzegania terapii (*compliance* i *persistence*) w grupie z lepszym monitorowaniem (opieka pielęgniarska) w porównaniu do Grupy Kontrolnej. W Grupie z opieką pielęgniarską (79 pacjentek) 82% przestrzegało *compliance*, a średnia długość przyjmowania leku wyniosła 297 dni. Uzyskane wyniki są zbliżone do naszych obserwacji dotyczących pacjentek

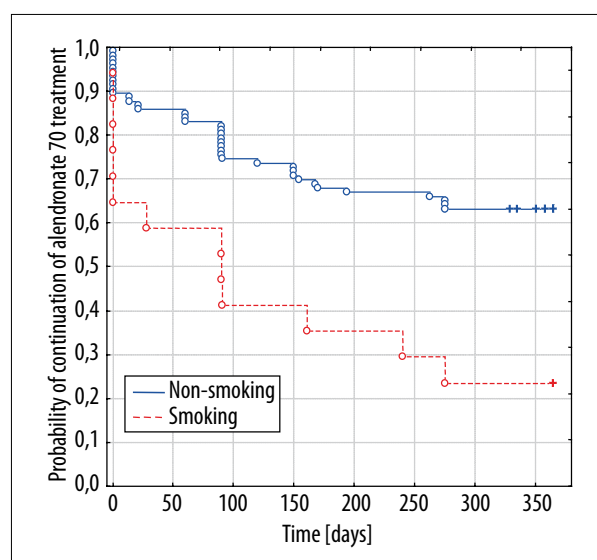
Tabela 6. Porównanie compliance i persistence pacjentek z grupy wiekowej >65 lat życia z grupą kobiet młodszych ≤65 lat.

Podział pacjentów	N	Średnia	SEM	P
>65 lat życia	55	69,8273	5,5464	0,402718
≤65 lat życia				
>65 lat życia	55	254,8727	20,2613	0,409906
≤65 lat życia				
>65 lat życia	55	248,1455	20,6812	0,462315
≤65 lat życia				

Tabela 7. Ocena ryzyka dyskontynuacji terapii alendronianem 70 przez różne czynniki (Multivariate Cox proportional hazard model).

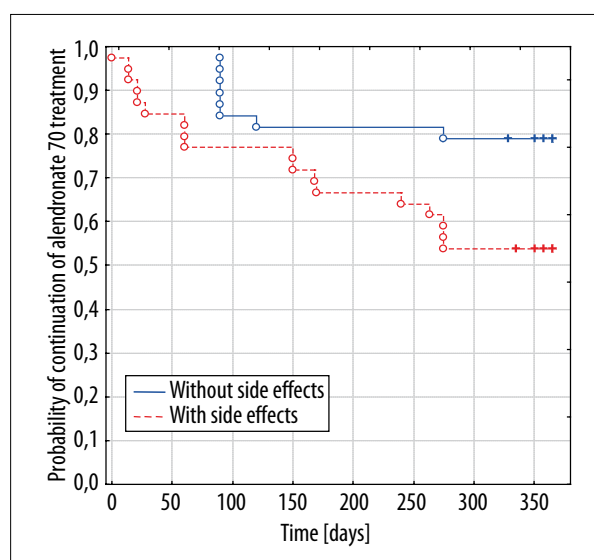
	Współczynnik ryzyka	p*
Wiek	1,008536	0,532710
Ilość leków przyjmowanych dziennie	0,994382	0,326860
Przychód miesięczny	0,921415	0,593187
Aktywność fizyczna	0,976699	0,909567
Wyształcenie	1,097516	0,431359
Miejsce zamieszkania (miasto, wieś)	0,981950	0,933932
Ilość osób w rodzinie	1,019563	0,168210
Złamanie kręgosłupa	0,988031	0,957117
Złamanie przedramienia	0,814733	0,399684
Inne złamania	1,336043	0,380929
Historia rodzinna złamań	1,283044	0,516960
BMI	1,042536	0,218693
Złamania w trakcie leczenia	1,730916	0,357085
Palenie tytoniu	2,838837	0,001213
Objawy uboczne	1,969754	0,048407

* p – znamienność statystyczna.

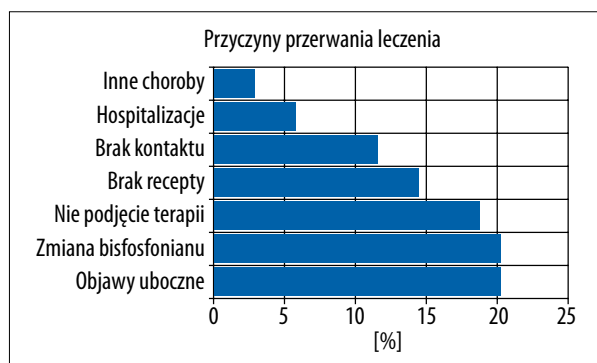
**Rycina 4.** Test Kaplana-Meiera prawdopodobieństwa dyskontynuacji terapii alendronianem 70 w grupie pacjentów palących i niepalących (p=0,0018 – log-rank test).

przyjmujących alendronian 70 monitorowanych co 2 miesiące [24] oraz pracy grupy kanadyjskiej [30].

Nie wszystkie wyniki prac dotyczących przestrzegania terapii z użyciem czynników motywacyjnych są optymistyczne. W badaniu ankietowym 219 kobiet z osteoporozą wykazano, iż mimo przeprowadzonej edukacji, 1/4 nie przestrzegała zaleconego dawkowania [31]. W kolejnej pracy, u 812 kobiet leczonych codzienną formą alendronianu, mimo kontaktu telefonicznego w ciągu 13 miesięcy obserwacji, 56% nie utrzymało systematyczności leczenia [32].

**Rycina 5.** Test Kaplana-Meiera prawdopodobieństwa dyskontynuacji terapii alendronianem 70 w grupie pacjentów z objawami ubocznymi lub bez objawów niepożądanych. (p=0,0174 – log-rank test).

Wydaje się, iż preferencje pacjenta do wyboru formy terapii mogą poprawić przestrzeganie leczenia [33]. Z punktu widzenia klinicznego, *compliance* mniejszy niż 66% ma suboptymalny wpływ na poprawę gęstości mineralnej kości [34] i zmniejszenie ryzyka złamań [35]. Ponadto, wykazano iż pacjenci nieprzestrzegający terapii są częściej hospitalizowani (53,4%) w porównaniu do przyjmujących leki (42,6%), to przekłada się na wzrost kosztów opieki medycznej o 14% [36].



Rycina 6. Przyczyny przerwania leczenia w trakcie monitorowania co 6 miesięcy.

Podsumowując wyniki naszych badań, wydaje się, że każda forma zainteresowania sprzyja polepszeniu relacji pomiędzy pacjentem a leczącym go lekarzem. Podstawą jest nawiązanie dobrego kontaktu

z chorym, wzbudzenie jego zaufania i odpowiednie zmotywowanie do podjęcia długiego leczenia, bowiem poprawa zarówno *compliance*, jak i *persistence* znajduje odpowiedź w skuteczności zastosowanego schematu postępowania terapeutycznego. Dominującym czynnikiem poprawiającym *adherence* w trakcie terapii alendronianem 70 wydaje się mieć częstsze monitorowanie (co wykazaliśmy dla wizyt co 2 miesiące i 3 miesiące + opieka pielęgniarska). W obecnych realiach opieki ambulatoryjnej jest to trudne, należy się więc zastanowić nad możliwością co najmniej 2 pierwszych wizyt w odstęпах nie rzadszych niż 3 miesiące, a następnie dodatkowym motywowaniem np. poprzez ciągłą edukację pacjentów poprzez zaplanowanie wykładów, przygotowanie broszur, informatorów i dostęp do odpowiednio zaplanowanej opieki pielęgniarskiej, która na podstawie naszych wyników wydaje się mieć dominujący wpływ.

Piśmiennictwo:

- Jaworski M, Lorenc RS: Risk of hip fracture in Poland. *Med Sci Monit*, 2007; 13(4): CR206–10
- Cranney A, Guyatt G, Griffith L i wsp.: Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. IX: Summary of meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. *Endocr Rev*, 2002; 23(4): 570–8
- Cranney A, Tugwell P, Zytaruk N i wsp.: Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. IV. Meta-analysis of raloxifene for the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *Endocr Rev*, 2002; 23(4): 524–28
- Cranney A, Wells G, Willan A i wsp.: Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. II. Meta-analysis of alendronate for the treatment of postmenopausal women. *Endocr Rev*, 2002; 23(4): 508–16
- Cranney A, Papaioannou A, Zytaruk N i wsp.: Parathyroid hormone for the treatment of osteoporosis: a systematic review. *CMAJ*, 2006; 175(1): 52–9
- Papadimitropoulos E, Wells G, Shea B i wsp.: Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. VIII: Meta-analysis of the efficacy of vitamin D treatment in preventing osteoporosis in postmenopausal women. *Endocr Rev*, 2002; 23(4): 560–9
- Shea B, Wells G, Cranney A i wsp.: Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. VII. Meta-analysis of calcium supplementation for the prevention of postmenopausal osteoporosis. *Endocr Rev*, 2002; 23(4): 552–9
- Gold DT: Medication adherence: a challenge for patients with postmenopausal osteoporosis and other chronic illnesses. *J Manag Care Pharm*, 2006; 12(6 Suppl A): S20–5
- Gold DT, Martin BC, Frytak JR i wsp.: A claims database analysis of persistence with alendronate therapy and fracture risk in post-menopausal women with osteoporosis. *Curr Med Res Opin*, 2007; 23(3): 585–94
- Gold DT, Safi W, Trinh H: Patient preference and adherence: comparative US studies between two bisphosphonates, weekly risedronate and monthly ibandronate. *Curr Med Res, Opin* 2006; 22(12): 2383–91
- Cramer JA, Gold DT, Silverman SL, Lewiecki EM: A systematic review of persistence and *compliance* with bisphosphonates for osteoporosis. *Osteoporos Int*, 2007; 18(8): 1023–31
- Sewerynek E: Wpływ współpracy lekarza z pacjentem na efektywność leczenia osteoporozy. *Terapia*, 2006; 3: 43–6
- Sewerynek E: Czynniki wpływające na przestrzeganie zasad terapii i efektywność leczenia osteoporozy – rola współpracy lekarza z pacjentem. *Medycyna po Dyplomie*, 2008; 3(Suppl.): 39–41
- Sung JC, Nichol MB, Venturini F i wsp.: Factors affecting patient compliance with antihyperlipidemic medications in an HMO population. *Am J Manag Care*, 1998; 4(10): 1421–30
- Giuffrida A, Torgerson DJ: Should we pay the patient? Review of financial incentives to enhance patient compliance. *BMJ*, 1997; 315(7110): 703–7
- Lombas C: Compliance with alendronate treatment in an osteoporosis clinic. *J Bone Miner Res*, 2001; 15: S529–M406
- Bandeira F i wsp.: Patients' clinical features and compliance associated with raloxifene or alendronate after a six-month observational Brazilian Study. *J Bone Miner Res*, 2003; 18(Suppl.2): M352–S379
- Negri AL: Short-term compliance with alendronate 70 mg in patients with osteoporosis: The ECMO Trial. *Bone*, 2003; 23(Suppl.): P487
- Li L, Roddam A, Gitlin M i wsp.: Persistence with osteoporosis medications among postmenopausal women in the UK General Practice Research Database. *Menopause*, 2012; 19(1): 33–40
- Lin TC, Yang CY, Yang YH, Lin SJ: Alendronate adherence and its impact on hip-fracture risk in patients with established osteoporosis in Taiwan. *Clin Pharmacol Ther*, 2011; 90(1): 109–16
- IPSOS UK: The Adherence Gap: Why Osteoporosis Patients Don't Continue With Treatment. IPSOS Health, European Survey of Physicians and Women with Osteoporosis, January–April 2005

22. Payer J, Killinger Z, Ivana S, Celec P: Therapeutic adherence to bisphosphonates. *Biomed Pharmacother*, 2007; 61(4): 191–93
23. Keen R, Jodar E, Iolascon G i wsp.: European women's preference for osteoporosis treatment: influence of clinical effectiveness and dosing frequency. *Curr Med Res Opin*, 2006; 22(12): 2375–81
24. Sewerynek E, Malkowski B, Karzewnik E i wsp.: Alendronate 70 therapy in elderly women with post-menopausal osteoporosis: the problem of compliance. *Endokrynol Pol* 2011; 62(1): 24–9 *Publikacja powstała w wyniku realizacji grantu Naukowej Fundacji Popharmy*
25. Sewerynek E, Horst-Sikorska W, Stepień-Kłos W i wsp.: The role of Counselling and other factors in compliance of postmenopausal osteoporosis patients treated with alendronate 70. *Arch Med Sci*, 2012; w druku *Publikacja powstała w wyniku realizacji grantu Naukowej Fundacji Popharmy*
26. Solomon DH, Avorn J, Katz JN i wsp.: Compliance with osteoporosis medications. *Arch Intern Med*, 2005; 165(20): 2414–9
27. Eisman JA, Rizzoli R, Roman-Ivorra J i wsp.: Upper gastrointestinal and overall tolerability of alendronate once weekly in patients with osteoporosis: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Curr Med Res Opin*, 2004; 20(5): 699–705
28. Lanza F, Sahba B, Schwartz H i wsp.: The upper GI safety and tolerability of oral alendronate at a dose of 70 milligrams once weekly: a placebo-controlled endoscopy study. *Am J Gastroenterol*, 2002; 97(1): 58–64
29. Sewerynek E, Dabrowska K, Skowronska-Jozwiak E: Compliance with alendronate 10 treatment in elderly women with postmenopausal osteoporosis. *Endokrynol Pol*, 2009; 60(2): 76–81
30. Papaioannou A, Ioannidis G, Adachi JD i wsp.: Adherence to bisphosphonates and hormone replacement therapy in a tertiary care setting of patients in the CANDOO database. *Osteoporos Int*, 2003; 14(10): 808–13
31. Hamilton B, McCoy K, Taggart H: Tolerability and compliance with risedronate in clinical practice. *Osteoporos Int*, 2003; 14(3): 259–62
32. Ettinger B i wsp.: Alendronate use among 812 women: prevalence of gastrointestinal complaints, non-compliance with patients instructions and discontinuation. *J Managed Care Pharm*, 1998; 488–92
33. Weiss TW, McHorney CA: Osteoporosis medication profile preference: results from the PREFER-US study. *Health Expect*, 2007; 10(3): 211–23
34. Yood RA, Emani S, Reed JI i wsp.: Compliance with pharmacologic therapy for osteoporosis. *Osteoporos Int*, 2003; 14(12): 965–8
35. Caro JJ, Ishak KJ, Huybrechts KF i wsp.: The impact of compliance with osteoporosis therapy on fracture rates in actual practice. *Osteoporos Int*, 2004; 15(12): 1003–8
36. Caro JJ IKKFeal: Clinical and economic impact of adherence to osteoporosis medication. *Osteoporos. Int*, 2003; 14(Suppl.7): Abstract PL6

Systemy polimerowe w leczeniu glejaka mózgu

Polymeric systems in brain glioma treatment

Janusz Kasperczyk^{1,2},
Katarzyna Stokłosa¹

¹ Katedra i Zakład Biofarmacji, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Sosnowiec

² Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych Polskiej Akademii Nauk, Zabrze

Naukowa Fundacja Polpharmy w 2003 roku przyznała zespołowi pracującemu pod kierunkiem prof. Janusza Kasperczyka grant na realizację projektu badawczego pt. *Opracowanie możliwości wykorzystania biodegradowalnych mikrosfer polimerowych zawierających lek cytostatyczny w leczeniu nowotworów mózgu.*

Streszczenie

Celem projektu finansowanego częściowo przez Naukową Fundację Polpharmy było opracowanie nowej generacji bioresorbowalnych systemów kontrolowanego uwalniania substancji antynowotworowej do leczenia glejaka mózgu. Do badań wybrano dokсорubicynę i bardziej hydrofobową idarubicynę. Zastosowanie biodegradowalnych materiałów polimerowych o ściśle zaprojektowanej strukturze pozwoliło uzyskać stałe uwalnianie cytostatyka w odpowiednim przedziale czasowym i w konsekwencji zmniejszenie toksyczności cytostatyków. Zaprojektowane o odpowiednim kształcie matryce zawierające cytostatyki umożliwiają podawanie systemu bezpośrednio do mózgu na tkankę nowotworową lub do łoża pooperacyjnej. Pozwala to na ominięcie bariery krew-mózg w dostarczeniu terapeutycznych dawek cytostatyka oraz zapobiega przenikaniu antracyklin do tkanek nie objętych zmianą nowotworową. Zmniejszenie początkowego wyrzutu dokсорubicyny z matrycy („burst effect”) uzyskano poprzez skonstruowanie matryc wielowarstwowych o odpowiedniej strukturze łańcuchów polimerowych.

Słowa kluczowe: bariera krew – mózg • bioresorbowalne systemy terapeutyczne • antracykliny • struktura łańcuchów polimerowych

Summary

The aim of the project supported in part by Polpharma Scientific Foundation was development of new generation of bioresorbable systems for controlled anticancer drugs release in brain glioma treatment. Doxorubicin and more hydrophobic idarubicin were chosen for investigation. The application of biodegradable polymer materials with strictly defined chain microstructure allows to obtain stable release of cytostatic drugs in appropriate time interval and in consequence decrease of toxicity of cytostatic drugs. Designed matrices with appropriate shape containing cytostatic drug enable the administration of such system directly into brain cancer tissue or postoperative lodge. This allows the bypass of brain-blood barrier in delivery of therapeutic doses of cytostatic drug and prevents the penetration of anthracycline molecules into the tissue without neoplastic changes. Reduction of burst effect of doxorubicin from matrix was achieved by construction of multi-layered matrices with a suitable structure of polymeric chains.

Key words: blood-brain-barrier • bioresorbable therapeutic systems • anthracyclines • polymer chain microstructure

Wpłynęło: 15-12-2011
Zaakceptowano: 20-12-2011
Opublikowano: 10-08-2012

Adres do korespondencji:

prof. dr hab. Janusz Kasperczyk
Katedra i Zakład Biofarmacji
Śląski Uniwersytet Medyczny
w Katowicach, ul. Narcyzów 1,
41-200 Sosnowiec, e-mail:
jkasperczyk@cmpw-pan.edu.pl

WPROWADZENIE

W farmacji coraz częściej wykorzystywane są materiały polimerowe do konstrukcji postaci leków o przedłużonym działaniu. Polimerowe systemy uwalniania substancji cytostatycznych mogą być w postaci mikrosfer, nanosfer, liposomów, implantowanych matryc lub koniugatów, w których substancja lecznicza związana jest z łańcuchem polimerowym. W terapii glejaka badano dotychczas możliwość zastosowania mikrosfer kopolimeru glikolidu z D,L-laktydem (PGDLA) do uwalniania temozolomidu. Profil uwalniania cytostatyka miał przebieg dwufazowy, najpierw początkowy wyrzut cytostatyka (ang. burst effect) następnie stabilny przyrost uwalniania przez miesiąc. Optymalne uwalnianie substancji z mikrosfer PGDLA obserwowano przy 10% zawartości substancji leczniczej. Badania w hodowli szczurzych komórek gliomy po podaniu mikrosfer z temozolomidem potwierdziły ich zwiększoną cytotoksyczność w porównaniu do postaci proszkowej [1]. Temozolomid spełnia kryteria penetracji przez barierę krew – mózg (BBB) ze względu na niski ciężar cząsteczkowy i lipofilowość jednakże istnieje możliwość wystąpienia oporności związanej z ekspresją genu (metylotransferazy O⁶-metyloguaniny) MGMT podczas chemioterapii.

Mikrosfery PGDLA zawierające doksorubicynę badano *in vitro* w celu określenia stopnia kardiotoksyczności i oporności komórek gliomy (C6) po enkapsulacji w polimerowym nośniku. Cytostatyk został wybrany na podstawie badań klinicznych, które potwierdzają zmniejszenie proliferacji komórek glejaka, a badania w hodowli komórkowej zwiększoną cytotoksyczność postaci mikrosferowej. Podanie do hodowli komórek gliomy mikrosfer PDLGA (85/15) opłaszczonych PLLA w proporcji 30/70 z 3% zawartością cytostatyka powoduje 3-krotny wzrost przeżywalności komórek w porównaniu do doksorubicyny wolnej. Natomiast ze względu na niski „wyrzut” cytostatyka z powierzchni opłaszczonych mikrosfer (24%) istnieje ryzyko wystąpienia oporności gliomy. Dlatego lepszym rozwiązaniem wydaje się zastosowanie mikrosfer PDLGA (65/35), w których początkowa ilość uwolnionej doksorubicyny wynosi 70% [2].

Nanocząstki policyjanoakrylanu butylu z doksorubicyną były badane pod kątem możliwości wywołania efektu terapeutycznego w mózgu po podaniu dożylnym. Cytostatyk podany w dawce 5 mg/kg może penetrować BBB osiągając wysokie stężenie w mózgu (6 µg/g tkanki mózgowej), jeśli nanocząstka zostanie pokryta surfaktantem zwiększającym przepuszczalność substancji leczniczej – Tween® 80. Ponadto opłaszczenie nanocząstki powoduje

zmniejszenie stężenia doksorubicyny w obrębie mięśnia sercowego do wartości 0,1 µg/g. Badania na zwierzętach, którym zaimplantowano komórki glejaka wskazują na przedłużenie czasu życia o pół roku w porównaniu do iniekcji nieopłaszczonych nanocząstek (50 dni). Badania histopatologiczne tkanki mózgowej udowodniły brak obecności działania neurotoksycznego doksorubicyny i ustąpienie objawów choroby [3].

Glejaka mózgu można również leczyć stosując magnetyczne nanocząstki, które nie zawierają cytostatyka. Budowa nanocząstki jest warstwowa, na zewnątrz znajduje się otoczka z amino silanu lub dekstranu w rdzeniu znajduje się tlenek żelaza (II lub III). Po iniekcji do guza magnetycznych nanocząstek pod wpływem promieniowania elektromagnetycznego dochodzi do wzrostu temperatury w obrębie zmiany nowotworowej i jej zniszczenia. Stwierdzono zwiększoną 4,5-krotnie przeżywalność szczurów, gdy podano nanocząstki opłaszczone amino silanem w porównaniu z dekstranem [4]. Innym materiałem, który można wykorzystać do otrzymania nanocząstek stosowanych w terapii gliomy jest blokowy kopolimer tlenku etylenu i metakryloksypropylotrimetylosilanu (PEO-b-PMPS). Nośnik ten zapewnia prewencję przed adsorpcją biomolekuł rozpoznawanych przez układ siateczkowo-śródbłonkowy, dzięki czemu po podaniu dożylnym będzie możliwe wywołanie efektu terapeutycznego. Dodatkowo przyłączenie do nanocząstek cyklicznego peptydu rozpoznawanego przez integriny zapewnia docelowe dostarczenie nanocząstki do komórek gliomy (U87MG) [5].

W przypadku nowotworów mózgu nie tylko oporność na chemioterapię czy penetrację przez barierę krew – mózg są czynnikami determinującymi skuteczność leczenia. Zwiększenie przepuszczalności naczyniowej, dzięki której możliwe jest wynacznienie guza jest równie istotne i może przyczynić się do rozwiązania problemu konwencjonalnych terapii. Liposomy zawierające w podwójnej warstwie lipidowej distearylolecytinę (DSPC), cholesterol i koniugat distearynylofosfatydyloetanalaminy z glikolem polietylenowym (DSPE-PEG) a w warstwie wodnej doksorubicynę badano *in vivo* w glejakomiesaku (9L). Potwierdzono zwiększenie przeżycia szczurów (89%) po podaniu *in vivo* liposomalnej doksorubicyny w trzech dawkach (17 mg/kg/3 tygodnie) w porównaniu do roztworu doksorubicyny (23%). Wystąpił jednak problem z optymalizacją dawki, gdyż po podaniu drugiej doszło do wynacznienia guza bez zmniejszenia jego wzrostu. W badaniach histopatologicznych tkanki mózgowej potwierdzono nekrozę i obecność komórek apoptotycznych w obrębie miejsca krwotoku [6].

W leczeniu gliomy doksorubicynę w postaci liposomów można nie tylko podać dożylnie, ale także śródczaszkowo jako infuzja metodą zwiększonej konwekcyjnie podaży leków (CED). W przypadku dystrybucji liposomów podanych do mózgu istotny jest skład podwójnej warstwy lipidowej. Bardziej preferowane są liposomy obojętne, w których 10% składnika fosfolipidowego to DSPC, gdyż zmniejsza się wtedy powinowactwo tkankowe. Porównano stopień dystrybucji podczas infuzji metodą CED doksorubicyny wolnej i liposomalnej podanej szczurom z przeszczepionym glejakiem. Stwierdzono zwiększenie penetracji cytostatyka z postaci liposomalnej do przestrzeni międzykomórkowej, co dobrze rokuje w przypadku zastosowania w guzach mózgu posiadających zdolność do naciekania sąsiadujących tkanek [7]. Innym sposobem poprawy dystrybucji doksorubicyny jest podanie dożylne w skojarzeniu z immunosupresantem – cyklosporyną A. Iniekcja cytostatyka w postaci liposomalnej w dawce 5 mg/kg i cyklosporyny A w dawce 10 mg/kg umożliwiła dostarczenie doksorubicyny w najwyższym stężeniu do mózgdzku ($0.22 \mu\text{g/ml}$), a lokalizacja glejaka obejmuje ten region mózgu [8]. Jeśli jest wymagane dostarczenie doksorubicyny wyłącznie do guza, dwuwarstwa lipidowa powinna zawierać glikosfingolipid i 1,2-dioleilo-glicerol-3-fosfoetanoloaminę w określonej proporcji (sulfatyd/DOPE=30/70). Badania ksenografu komórek ludzkiego glejaka zaimplantowanego myszom udowodniły zwiększenie efektu cytotoksycznego, inhibicję wzrostu guza i przedłużenie życia liposomów doksorubicyny z sulfatydem w porównaniu do roztworu cytostatyku i liposomalnej doksorubicyny (Doxil®) [9].

Ułatwienie penetracji BBB jest także możliwe przez iniekcję warstwowego liposomu zawierającego w warstwie wodnej epirubicynę, w dwuwarstwie lipidowej tamoksifen oraz transferynę przyłączoną do łańcucha polietylenoglikolu (PEG). Wybór składników liposomu związany był z faktem, iż receptory transferyny znajdują się w BBB oraz na powierzchni glejaka, a antyestrogen oddziałuje na glikoproteinę P należącą do protein oporności wielolekowej. Ilość cytostatyku jaka przeniknęła przez BBB z wieloskładnikowego liposomu (52,2%) była dwukrotnie większa w porównaniu do wolnej epirubicyny. Podanie dożylne liposomów warstwowych o 92% zawartości cytostatyku, 34 mg tamoksifenu/mmol lipidów, 123 mg transferyny/mmol lipidów w dawce 5 mg/kg wywołało zwiększenie mediany przeżycia do 23 dnia, podczas gdy dla epirubicyny wolnej 15 dni [10].

We wznowie gliomy można stosować terapię skojarzoną obejmującą Doxil® i topotekan. W takim

układzie cytostatyków możliwy jest synergizm działania, obydwa wykazują ten sam mechanizm działania polegający na inhibicji odpowiednio topotekanu (0,3 mg/m² 2 razy dziennie, doustnie) w trzech cyklach zapewnił brak progresji guza. Obserwowano toksyczność: hematologiczną, żołądkowo-jelitową, zapalenie jamy ustnej i skóry [11].

Istnieje możliwość koniugowania doksorubicyny przez wiązanie amidowe pierścienia cukrowego poprzez pegylowaną pochodną witaminy E, co pozwala zwiększyć lipofilowość doksorubicyny. TPGS (bursztynian glikolu polietylenowego D- α -tokoferolu) jest także inhibitorem transporterów oporności wielolekowej (glikoproteina P), dzięki czemu można zwiększyć wychwyt komórkowy i poprawić dystrybucję wewnątrz komórek gliomy (C6). Zastosowanie linkera pH-wrażliwego i wykazującego właściwości antyoksydacyjne zapewnia hydrolizę wiązań estrowych wewnątrz komórki nowotworowej (pH=3–5) oraz wyższą cytotoksyczność w porównaniu do formy niekoniugowanej. Aplikacja dożylna koniugatu doksorubicyny z TPGS w dawce 5 mg/kg spowodowała 4,5-krotny wzrost czasu cyrkulacji i 24-krotną poprawę biodostępności i obniżone działanie niepożądane (2–3 krotnie) w sercu, żołądku i jelitach w porównaniu do wolnej doksorubicyny [12]. Do koniugatu doksorubicyny można przyłączyć przeciwciało monoklonalne celem poprawy dążenia do komórek glejaka cząsteczek cytostatyku. Stosowanie immunokoniugatu BR96-DOX (SGN-15) powoduje redukcję guza, a cytotoksyczność jest niewielka w tkance otaczającej. W zależności od sposobu podania można wpływać na wartości przeżywalności szczurów, którym zaimplantowano śródczaszkowo komórki ludzkiego raka płuc. Wzrost przeżycia obserwuje się w przypadku podania do tętnicy szyjnej immunokoniugatu z mannitołem pozwalającym na czasowe otwarcie BBB. Natomiast skojarzenie z radioterapią zapewnia największą efektywność, gdy przed naświetleniem zostanie podany BR96-DOX [13].

Jedynym jak dotąd komercyjnie dostępnym systemem terapeutycznym stosowanym w leczeniu nowo zdiagnozowanego glejaka wielopostaciowego jest Gliadel®. Jako nośnik polimerowy stosuje się kopolimer bis-(p-karboksyfenoksy)propanu i kwasu sebacynowego 20/80 (polifeprosan 20®) o budowie statystycznej łańcucha. Ten rodzaj materiału polimerowego zaliczany jest do polibezwodników, które degradują powierzchniowo i w związku z tym substancja lecznicza jest uwalniania stosunkowo szybko. Jako cytostatyk w płatku Gliadel® występuje pochodna nitrozomocznika – karmustyna (7,7 mg).

Dawka maksymalnie tolerowana to implantacja 8 płatków do łoża pooperacyjnej co odpowiada ilości 61,6 mg. Z przeprowadzonych badań klinicznych III fazy wynika, że stosowanie płatków z karmustyną powoduje przedłużenie czasu przeżycia o około rok. Ze względu na możliwość dyfundowania karmustyny w obszary mózgu nie objęte procesem nowotworzenia prowadzono badania *in vitro* i *in vivo* modyfikacji płatka Gliadel®. Otrzymano implant wykonany z kopolimeru bis-(p-karboksyfenoksy) propanu i kwasu sebacynowego 10/90 zawierający od 1 do 10% doksorubicyny. W przypadku zawartości 5-procentowej stwierdzono optymalny profil uwalniania leku, a w badaniach *in vivo* płatek z tą zawartością implantowany do łoża pooperacyjnej zapewnił medianę przeżycia na poziomie 45 dni w porównaniu do 21 dni dla płatka bez leku (placebo). Stosowany nośnik polimerowy jest właściwy do krótkoterminowego uwalniania cytostatyka, natomiast nie jest możliwe inkorporowanie dużych zawartości procentowych (10%), gdyż obserwuje się krwawienie w odległości 5 mm od miejsca implantacji powodujące niedowład [14].

MATERIAŁY I METODY

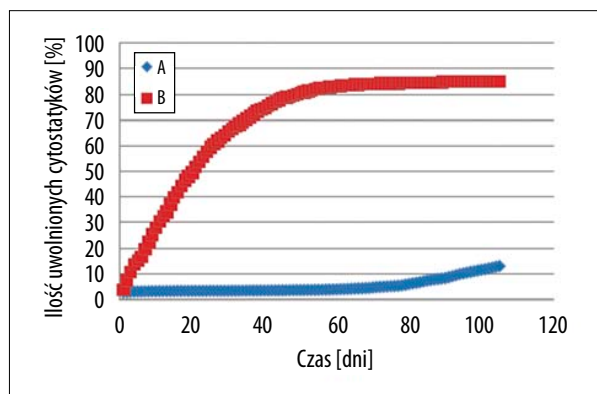
Zastosowano 3 rodzaje kopolimerów: kopolimer glikolidu z L-laktydem (PLGA), kopolimer glikolidu z D,L-laktydem (PGDLA) oraz kopolimer glikolidu z ϵ -kaprolaktonem (PGCL) o różnej mikrostrukturze łańcucha poliestrowego i zawartości jednostek komonomerycznych do wykonania implantacyjnego systemu terapeutycznego zawierającego doksorubicynę i idarubicynę. Kopolimery zostały otrzymane w masie w temperaturze 100–130°C, a jako inicjator zastosowano obojętny dla organizmu acetyloacetonian cyrkonu. W celu usunięcia śladów nieprzereagowanych monomerów, kopolimery rozpuszczono w chloroformie i wytrącono w metanolu a następnie suszono pod próżnią. Materiały poliestrowe scharakteryzowano pod kątem ilości jednostek komonomerycznych, mikrostruktury łańcucha przy pomocy ^1H i ^{13}C NMR. Określono również ciężary cząsteczkowe metodą GPC i temperatury: topnienia i zeszklenia metodą DSC. Metodyka otrzymania monowarstwowych matryc z doksorubicyną i idarubicyną polegała na rozpuszczeniu polimeru w dichlorometanie a cytostatyka w heksafluoro-2-propanolu, następnie połączeniu i wylaniu do formy o określonej grubości. Z folii z cytostatykami wycięto krążki o średnicy 1 cm i umieszczono w sztucznym płynie mózgowo-rdzeniowym (aCFS), natomiast system wielowarstwowy otrzymano poddając sprasowaniu pod naciskiem 3,4 T w 40°C przez 5 minut dwóch krążków PGCL, pomiędzy które wprowadzono krążek PGDLA z doksorubicyną. Próbę kontrolną stanowiły pojedyncze

krążki kopolimeru PGDLA i doksorubicyny. Badania uwalniania cytostatyku i degradacji matryc monowarstwowych doksorubicyny i idarubicyny oraz wielowarstwowych doksorubicyny prowadzono w układzie dynamicznym poprzez inkubację z wytrząsaniem w temperaturze 37°C przez 105 dni. Absorbancje uwolnionej doksorubicyny i idarubicyny oznaczono metodą UV-VIS przy długości fali odpowiednio $\lambda=482$ nm i $\lambda=485$ nm, a z równania krzywej wzorcowej określono stężenia uwolnionych cytostatyków.

REZULTATY

Przeprowadzone w ramach projektu badania potwierdzają możliwość zastosowania alifatycznych poliestrów jako nośników do długoterminowego uwalniania doksorubicyny w leczeniu glejaka mózgu. Optymalnymi okazały się matryce wykonane z kopolimeru L-laktydu z glikolidem (PLGA) w proporcji komonomerów 85/15 oraz z kopolimeru glikolidu z ϵ -kaprolaktonem 10/90. Budowa łańcuchów polimerowych, rodzaj i udział jednostek komonomerycznych oraz ich rozkład wzdłuż łańcucha wpływają na kinetykę uwalniania cytostatyków. Najbardziej równomierne uwalnianie cytostatyków zaobserwowano dla matrycy wykonanej z kopolimeru glikolidu z ϵ -kaprolaktonem z 5% zawartością substancji. Matryce otrzymane z PLGA wykazały inhibicję uwalniania doksorubicyny do 50 dnia eksperymentu. Spektroskopia w podczerwieni potwierdziła obecność wiązań wodorowych między cząsteczką doksorubicyny a łańcuchem polilaktydu, co jest prawdopodobnie główną przyczyną zahamowania uwalniania cytostatyka z PLGA. Różnice w profilu uwalniania cytostatyka wynikające z różnej mikrostruktury łańcuchów polimerowych można wykorzystać do sterowania kinetyką jego uwalniania poprzez konstrukcje matryc wielowarstwowych. Technologia otrzymania alifatycznych poliestrów w oparciu o określone inicjatory obojętne dla organizmu (cyrkon, magnez, wapń) pozwala projektować matryce o różnej mikrostrukturze łańcucha a tym samym różnym czasie degradacji. Przeprowadzono również badania idarubicyny, antracykliny o mniejszej hydrofilowości niż doksorubicyna jako potencjalny cytostatyk do zastosowania w terapii gliomy. Uwalnianie *in vitro* idarubicyny do aCFS z matrycą PLGA przebiega liniowo na poziomie ok. 80% przez 40 dni. Nie zaobserwowano inhibicji uwalniania jak to ma miejsce dla doksorubicyny. Przyczyną różnic w profilu uwalniania między doksorubicyną i idarubicyną może być różnica w strukturze polegająca na obecności grupy hydroksyacetylowej w cząsteczce doksorubicyny w miejscu gdzie w cząsteczce idarubicyny znajduje się grupa acetylowa i tym samym uniemożliwione jest powstanie wiązań wodorowych

między cząsteczkami idarubicyny a łańcuchem polilaktydowym (Rycina 1) [15,16].



Rycina 1. Kumulacyjne uwalnianie doksorubicyny i idarubicyny do aCFS, (A) matryca PLGA (85/15) z 10% wag. zawartością doksorubicyny, (B) matryca PLGA (85/15) z 10% wag. zawartością idarubicyny.

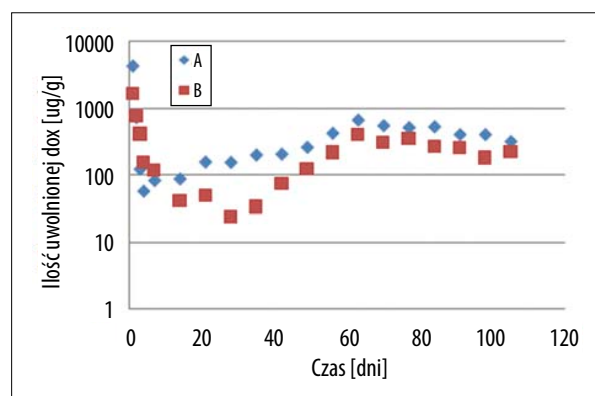
Jak na razie nie stwierdzono skuteczności idarubicyny w glejaku mózgu, natomiast stosowano ją w metastatycznym raku piersi mogącym generować przerzut do mózgu. W implantacyjnym systemie terapeutycznym antracyklin jest możliwe zmniejszenie wyrzutu cytostatyka z powierzchni polimerowego nośnika przez zastosowanie matryc wielowarstwowych. Budowa warstwowa matrycy zakłada wewnętrzną warstwę zawierającą doksorubicynę (10%) wykonaną z kopolimeru glikolidu z DL-laktydem (30/70) i zewnętrzne warstwy wykonane z kopolimeru glikolidu z ϵ -kaprolaktonem (10/90). W przypadku matryc jednowarstwowych PLGA (15/85) z doksorubicyną (Rycina 2) występują międzycząsteczkowe oddziaływania grup hydroksylowych cytostatyka z grupą karbonylową kopolimeru. W efekcie uwalnianie doksorubicyny jest spowolnione do 50 dnia [17].



Rycina 2. Zdjęcie matrycy PDLGA (70/30) z doksorubicyną (10% wag.).

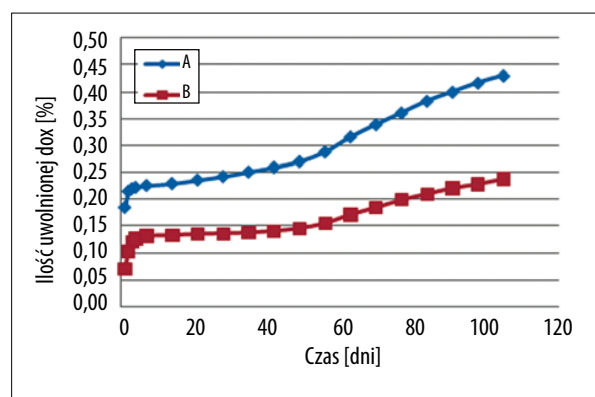
Pięciokrotne zmniejszenie inhibicji uwalniania w jednowarstwowych matrycach jest możliwe

przez dwukrotne zwiększenie jednostek glikolidylowych, zamianę L-laktydu na D-laktyd, co prowadzi do zmiany mikrostruktury tzn. zmniejszenia długości średnich długości bloków laktydylowych (Rycina 3). Badania degradacji wielowarstwowego systemu terapeutycznego w porównaniu do jednowarstwowego wykazały zwiększenie udziału jednostek glikolidylowych w pierwszym tygodniu degradacji w wyniku wymycia oligomerycznych cząstek kwasu mlekowego z masy materiału polimerowego.



Rycina 3. Dawka dzienna uwolnionej doksorubicyny z systemu terapeutycznego: (A) matryca monowarstwowa, (B) matryca wielowarstwowa, zawartość cytostatyka w systemie terapeutycznym – 10% wag., jako nośnik polimerowy zastosowano PDLGA (70/30).

Zastosowanie trójwarstwowego systemu terapeutycznego doksorubicyny umożliwia dwukrotne zmniejszenie „wyrzutu” cytostatyka z powierzchni matrycy, co potwierdza wykres kumulacyjnego uwalniania (Rycina 4) [18].



Rycina 4. Kumulacyjne uwalnianie doksorubicyny z systemu terapeutycznego: (A) matryca monowarstwowa, (B) matryca wielowarstwowa, zawartość cytostatyka w systemie terapeutycznym – 10% wag., jako nośnik polimerowy zastosowano PDLGA (70/30).

WNIOSKI

Zastosowanie biodegradowalnych materiałów polimerowych opartych o poliestry alifatyczne,

a szczególnie o kopolimery laktydu, glikolidu i kaprolaktonu pozwala na uzyskanie systemów terapeutycznych, których mikrostruktura pozwala na sterowanie stężeniem uwalnianych substancji leczniczych. Jednakże dla każdej substancji leczniczej konieczne jest opracowanie indywidualnej optymalnej mikrostruktury łańcuchów polimerowych gdyż istotne znaczenie na kinetykę uwalniania substancji leczniczej ma jej struktura, zwłaszcza obecność grup funkcyjnych, które mogą oddziaływać z łańcuchami polimerowymi.

PODZIĘKOWANIA

Badania dotyczące jednowarstwowych systemów terapeutycznych dokсорubicyny były finansowane ze środków projektu badawczego Naukowej Fundacji Polpharmy.

STAN WIEDZY W CHWILI ROZPOCZĘCIA PROJEKTU

Konwencjonalne metody leczenia w oparciu o chemioterapię cytostatykami zdolnymi do przejścia BBB oraz terapie skojarzone z radioterapią nie są wystarczająco skuteczne. Nowym rozwiązaniem mającym zapewnić odpowiedni efekt terapeutyczny tzn. zwiększyć czas przeżycia chorych, zmniejszyć

toksyczność cytostatyków alkilujących DNA oraz zapewnić odpowiednio wysoką dawkę leczniczą w obrębie guza mózgu jest płatek Gliadel®.

CO PRZYNIOSŁA REALIZACJA GRANTU POLPHARMY

W ramach badań określono rodzaj nośnika polimerowego, który zapewni kontrolowane uwalnianie dokсорubicyny oraz optymalną zawartość procentową cytostatyka w matrycy. Hydrofilowy lek przeciwnowotworowy wykazujący skuteczność przeciw komórkom gliomy wprowadzony do nośnika polimerowego o określonej mikrostrukturze łańcucha, będącej czynnikiem kontrolującym uwalnianie dokсорubicyny jest konkurencyjnym rozwiązaniem w stosunku do płatka Gliadel®.

DALSZE KIERUNKI BADAŃ

Kontynuowane są badania nad otrzymywaniem wielowarstwowych systemów matrycowych w celu optymalizacji „wyrzutu” dokсорubicyny z powierzchni nośników poliestrowych. W następnych etapach niezbędne jest przeprowadzenie skuteczności działania otrzymanych płatków z dokсорubicyną w hodowlach komórkowych oraz na modelu zwierzęcym.

Piśmiennictwo:

1. Zhang H, Gao S: Temozolomide/PLGA microparticles and antitumor activity against Glioma C6 cancer cells *in vitro*. *Int J Pharm*, 2007; 329: 122–8
2. Lin R, Ng LS, Wang Ch-H: *In vitro* study of anticancer drug doxorubicin in PLGA-based microparticles. *Biomaterials*, 2005; 26: 4476–85
3. Kreuter J: Application of nanoparticles for the delivery of drugs to the brain. *International Congress Series*, 2005; 1277: 85–94
4. Jordan A, Scholz R, Maier-Hauff K i wsp.: The effect of thermotherapy using magnetic nanoparticles on rat malignant glioma. *J Neurooncol*, 2006; 78: 7–14
5. Chen H, Wang L, Yeh J i wsp.: Reducing non-specific binding and uptake of nanoparticles and improving cell targeting with an antifouling PEO-b-PgMPS copolymer coating. *Biomaterials*, 2010; 31: 5397–407
6. Zhou R, Mazurchuk R, Straubinger RM: Antivascular effects of doxorubicin-containing liposomes in an intracranial rat brain tumor model. *Cancer Research*, 2002; 62: 2561–6
7. Saito R, Krauze MT, Noble ChO i wsp.: Tissue affinity of the infusate affects the distribution volume during convection-enhanced delivery into rodent brains: Implications for local drug delivery. *J Neurosci Methods*, 2006; 154: 225–32
8. Hsieh H-J, Chang Ch-H, Huang S-P i wsp.: Effect of cyclosporin A on the brain regional distribution of doxorubicin in rats *Int J Pharm*, 2008; 350: 265–71
9. Shao K, Hou Q, Duan W i wsp.: Intracellular drug delivery by sulfate-mediated liposomes to gliomas. *J Control Release*, 2006; 115: 150–7
10. Tiana W, Ying X, Dua J: Enhanced efficacy of functionalized epirubicin liposomes in treating brain glioma-bearing rats. *Eur J Pharm Sci*, 2010; 41: 232–43
11. Wagner S, Peters O, Fels Ch i wsp.: Pegylated-liposomal doxorubicin and oral topotecan in eight children with relapsed high-grade malignant brain tumors. *J Neurooncol*, 2008; 86: 175–81
12. Cao N, Feng S-S: Doxorubicin conjugated to D-a-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS): Conjugation chemistry, characterization, *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Biomaterials*, 2008; 29: 3856–65
13. Muldoon LL, Neuwelt EA: BR96–DOX immunoconjugate targeting of chemotherapy in brain tumor models. *J. Neurooncol*, 2003; 65: 49–62
14. Lesniak MS, Upadhyay U, Goodwin R i wsp.: Local delivery of doxorubicin for the treatment of malignant brain tumors in rats. *Anticancer Res*, 2005; 25: 3825–31
15. Stokłosa K, Kasperczyk J, Dobrzyński P, Kaczmarczyk B: Various release profiles of anthracyclines as a result of interactions between drug and biodegradable polymer matrix. *Engineering of Biomaterials*, 2006; 58–60: 203–6

16. Kasperczyk J, Dobrzyński P, Bero M i wsp.: Patent, Nowa postać farmaceutyczna leku, zwłaszcza wieloskładnikowego, opartego na wielowarstwowych nośnikach polimerowych oraz sposób wytwarzania farmaceutycznej postaci leków. Zgłosz. nr 3770; 85 z 15.09.2005. Opubl. w Biuletynie Urzędu Patentowego, 2007 nr 6 z dnia 19.03.2007
17. Kasperczyk J, Stokłosa K, Dobrzyński P i wsp.: Designing bioresorbable poliesther matrices for controlled doxorubicin release in glioma therapy. *Int J Pharm*, 2009; 382: 124–9
18. Stokłosa K, Kasperczyk J, Dobrzyński P, Smola A: Elaboration of bioresorbable multilayered polymeric carriers for controlled doxorubicin release. *Engineering of Biomaterials*, 2010; 99–101: 64–7

Rola SDF-1 w procesach regeneracji i nowotworzenia

The role of SDF-1 in regeneration and cancerogenesis process

Kamil Kowalski¹,
Agnieszka Markowska-
-Zagrajek¹,
Izabela Plaskota¹,
Magdalena Kowalewska²,
Rafał Archacki³,
Karolina Archacka¹,
Areta M. Czerwińska¹,
Iwona Grabowska¹,
Małgorzata Zimowska¹,
Katarzyna Jańczyk-
-Ilach¹,
Władysława Stremińska¹,
Maria A. Ciemerych¹,
Edyta Brzóska-
-Wójtowicz¹

¹ Zakład Cytologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa

² Zakład Biologii Molekularnej, Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa

³ Zakład Biologii Molekularnej Roślin, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa

Naukowa Fundacja Polpharmy w 2008 roku przyznała zespołowi pracującemu pod kierunkiem dr Edyty Brzóska-Wójtowicz grant na realizację projektu badawczego pt. *Stymulacja regeneracji mięśni szkieletowych – potencjalna rola cytokiny SDF-1.*

Streszczenie

SDF-1 (zrębowy czynnik wzrostu) należy do rodziny chemokin. Jego związanie z receptorem CXCR4 lub CXCR7 aktywuje szereg ścieżek sygnałowych w komórkach docelowych. SDF-1 odgrywa istotną rolę w mobilizacji komórek macierzystych ze szpiku kostnego do krwi obwodowej. Ponadto w wyniku uszkodzenia tkanki dochodzi do lokalnego wzrostu poziomu SDF-1. Na drodze zależnej od SDF-1 przeszczepione komórki macierzyste są mobilizowane do uszkodzonej tkanki, gdzie mogą uczestniczyć w jej rekonstrukcji. W projekcie finansowanym przez Naukową Fundację Polpharmy podjęliśmy próbę manipulacji poziomem SDF-1 w celu mobilizacji endogennych komórek macierzystych i prekursorowych do uszkodzonych mięśni.

Słowa kluczowe: SDF-1 • regeneracja • mięśnie szkieletowe • mięsak mięśni poprzecznie prążkowanych • CXCR4 • CXCR7

Summary

SDF-1 (stromal derived factor) belongs to the family of chemokines. Its binding to CXCR4 or CXCR7 receptor activates several signaling pathways in target cells. SDF-1 plays an important role in stem cells mobilization from bone marrow to the peripheral blood. Importantly, the level of SDF-1 increases as a result of tissue injury. Moreover, transplanted stem cells are mobilized to the damaged tissue in the SDF-1 dependent manner and then participate in the process of reconstruction. Research grant awarded by Polpharma Scientific Foundation allowed us to study mobilization of endogenous stem and precursor cells to injured muscle mediated by the manipulation of SDF-1 level.

Key words: SDF-1 • regeneration • skeletal muscle • rhabdomyosarcoma • CXCR4 • CXCR7

Wpłynęło: 12-03-2012
Zaakceptowano: 14-03-2012
Opublikowano: 10-08-2012

Adres do korespondencji:
dr Edyta Brzóska-Wójtowicz,
Zakład Cytologii, Wydział
Biologii, Uniwersytet
Warszawski, ul. Miecznikowa 1,
02-096 Warszawa, e-mail:
edbrzoska@biol.uw.edu.pl

WSTĘP

Czynnik pochodzenia zrębowego-1 (SDF-1, ang. stromal derived factor-1, CXCL12) należy do rodziny chemokin CXC, a więc takich, w których cząsteczce pomiędzy dwoma pierwszymi resztami cysteiny (C) występuje dowolny aminokwas (X). Białko SDF-1 po raz pierwszy wyizolowano w 1993 roku z ludzkich komórek zrębu szpiku [1,2]. Rok później dowiedziono, że czynnik ten w obecności interleukiny 7 bierze udział w aktywacji proliferacji progenitorowych limfocytów B [3]. Głównym źródłem SDF-1 w dorosłych organizmach jest szpik kostny [4]. Czynnik ten jest również produkowany w uszkodzonych tkankach takich jak serce oraz mięśnie szkieletowe [5,6], a także w wątrobie, płucach, węzłach chłonnych, czy śledzionie [7,8]. SDF-1 występuje w dwóch formach: SDF-1 α (CXCL12a) i SDF-1 β (CXCL12b), które powstają w wyniku alternatywnego splicingu mRNA syntetyzowanego na matrycy tego samego genu. Sekwencja aminokwasowa ludzkiego SDF-1 w porównaniu z białkiem mysim wykazuje 93% homologii w przypadku SDF-1 α oraz 92% w przypadku SDF-1 β . Mysie formy α i β różnią się między sobą jedynie 4 dodatkowymi aminokwasami na C-końcu formy β [8].

RECEPTORY WIĄŻĄCE SDF-1: CXCR4 I CXCR7

Receptory chemokin należą do dużej grupy receptorów metabotropowych, współpracujących z białkami G [9]. Wszystkie receptory tej grupy mają bardzo podobną strukturę, w której pojedynczy łańcuch polipeptydowy przechodzi siedmiokrotnie przez dwuwarstwą lipidową błony komórkowej. Dwa receptory - CXCR4 i CXCR7 opisane zostały jako wiążące SDF-1. Przez długi czas sądzono, że CXCR4 jest jedynym receptorem SDF-1, co dla chemokin stanowiłoby unikatowy szlak. Istnienie tego niezwykle interesującego układu potwierdziła zbieżność fenotypu myszy pozbawionych funkcjonalnych kopii genu SDF-1 oraz CXCR4. Jednakże później zaobserwowano, że komórki wątroby zarodka myszy pozbawionej obu alleli genu kodującego CXCR4 nadal wiążą SDF-1, a zatem muszą posiadać na swojej powierzchni jego receptor. Dalsze badania wykazały, że zarówno SDF-1 α jak i SDF-1 β wykazują powinowactwo do receptora CXCR7 [10]. Receptor ten poza SDF-1 wiąże również chemokinę I-TAC (ang. interferon-inducible T-cell α chemoattractant, CXCL11).

Receptor CXCR4 wykryto na powierzchni ludzkich hematopoetycznych komórek progenitorowych (HPC, ang. hematopoietic progenitor cells) [11], ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych

[12], mysich komórek macierzystych/progenitorowych neuronów i hepatocytów [13], komórek satelitowych (mięśniowych komórek prekursorowych) [14], komórek progenitorowych śródbłonna [15] i mezangioblastów [16]. CXCR4 znajduje się również na powierzchni kilku rodzajów ludzkich komórek nowotworowych, np. komórek nowotworowych z guzów trzustki, prostaty, płuc i sutka [17–21]. Obecność obu receptorów – CXCR4 i CXCR7 wykazano między innymi na mysich mioblastach [22], astrocytach i komórkach Schwanna [23], a także na komórkach ludzkiego mięsaka mięśni poprzecznie prążkowanych (RMS, ang. rhabdomyosarcoma) [24]. Udowodniono, że receptory te zaangażowane są w nabywanie przez komórki RMS potencjału do przerzutowania, bowiem CXCR7 uczestniczy w procesach związanych z ich adhezją, natomiast CXCR4 pośredniczy w przekazywaniu sygnałów związanych z migracją [24,25].

Stosunkowo dobrze scharakteryzowano molekularny mechanizm działania receptora CXCR4. Po połączeniu z SDF-1 ulega on dimeryzacji, a następnie aktywacji [26]. Przekłada się to na zmiany w konformacji przestrzennej receptora prowadzące m.in. do przyłączenia białka G α i [27], co prowadzi do aktywacji wielu ścieżek sygnałowych. Przykładem odpowiedzi komórki na aktywację CXCR4 jest: i) fosforylacja i asocjacja białek zaangażowanych w tworzenie płytek przylegania, czyli miejsc kontaktu komórek z macierzą zewnątrzkomórkową zaangażowanych w migrację komórek, m.in. białek RAFTK, Crk oraz paksyliny [27], ii) aktywacja białkowych kinaz C (PKC, ang. protein kinase C), z których najważniejszymi wydają się być izoformy PKC- γ oraz PKC- ξ [28], iii) aktywacja kinaz białkowych aktywowanych mitogenem (MAP, ang. mitogen activated protein) p42/p44 oraz kinazy AKT [24–27]. Ponadto, w odpowiedzi na SDF-1 komórki hematopoetyczne wydzielają czynniki angiopetyczne takie jak czynnik wzrostu naczyńnicowych komórek śródbłonna (VEGF, ang. vascular endothelial growth factor) oraz metaloproteazy modyfikujące macierz zewnątrzkomórkową (MMP, ang. matrix metalloproteinases) [29,30].

SPOSOBY REGULACJI SZLAKU SYGNAŁOWEGO SDF-1–CXCR4 LUB CXCR7

Działanie szlaku sygnałowego SDF-1–CXCR4 lub CXCR7 może być regulowane na trzech poziomach: lokalnego stężenia SDF-1, liczby receptorów oraz modulacji możliwości łączenia SDF-1 z receptorem. Poziom SDF-1 jest również regulowany wielopoziomowo – na poziomie transkrypcji oraz translacji, a także jego degradacji katalizowanej przez produkowane przez neutrofile enzymy proteolityczne

takie jak elastaza oraz katepsyna [31] lub proteazy CD26 (ang. dipeptidyl-peptidase IV). Zahamowanie aktywności CD26 za pomocą diprotinu chroni SDF-1 przed degradacją [32]. Wykorzystywanym w praktyce klinicznej sposobem obniżania poziomu SDF-1 w szpiku kostnym jest podanie czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów (G-CSF, ang. granulocyte colony-stimulating factor). G-CSF powoduje spadek ekspresji mRNA kodującego SDF-1, przez co obniża się ilość tego białka [33]. Taka strategia ma zastosowanie praktyczne, gdyż podanie G-CSF powoduje mobilizację hematopoetycznych komórek macierzystych i progenitorowych (HSPC, ang. hematopoietic stem and progenitor cells) do krwi obwodowej, z której można je pobrać do przeszczepu. Ekspresja SDF-1 jest również hamowana przez transformujący czynnik wzrostowy typu b (TGF- β 1, ang. transforming growth factor β 1) [34] oraz steroidy takie jak 17 β -estradiol [35]. Zwiększona ekspresja SDF-1 może natomiast zachodzić pod wpływem czynnika transkrypcyjnego odpowiedzi na hipoksję -1 α (HIF-1 α , ang. hypoxia-inducible factor-1 α), którego ekspresja wzrasta w wyniku niedotlenienia, będącego konsekwencją na przykład uszkodzenia tkanki [36]. HIF-1 α reguluje również ekspresję wielu innych genów, w tym VEGF oraz czynnika wzrostowego hepatocytów (HGF, ang. hepatocyte growth factor) [37–39].

Na działanie szlaku sygnalizacyjnego SDF-1-CXCR4 lub CXCR7 wpływa również poziom ekspresji i aktywność jego receptorów. Ekspresja CXCR4 i CXCR7, podobnie jak SDF-1, pozostaje pod kontrolą HIF-1, jest zatem zależna od stanu niedotlenienia tkanki. W odpowiedzi na hipoksję wzrasta ekspresja CXCR4 [40], natomiast poziom mRNA kodującego CXCR7 obniża się [24]. Ponadto ekspresję CXCR4 reguluje także czynnik transkrypcyjny NF-kb (ang. nuclear factor kb) [40,41].

Obniżenie poziomu białka CXCR4 może być również wynikiem działania proteaz takich jak katepsyna G i dipeptidyllopeptydaza, które degradują receptor zanim ulegnie on aktywacji w błonie komórkowej [42]. Wrażliwość komórki na SDF-1 zapewniają tylko receptory wyeksponowane na powierzchni błony komórkowej. Dlatego jednym z mechanizmów regulujących oddziaływanie SDF-1-CXCR4 może być internalizacja, czyli endocytoza receptora z powierzchni komórki do cytoplazmy [43]. Po internalizacji receptor może zostać zdegradowany lub przetransportowany na powierzchnię, co jest mechanizmem regulującym wrażliwość komórki na ligandy CXCR4, wśród nich SDF-1 [44]. Dodatkowo aktywność receptora CXCR4 może być zwiększona poprzez jego włączenie w tzw. tratwy lipidowe, czyli

rejony błony komórkowej charakteryzujące się wyższą zawartością steroli i sfingolipidów [45].

Do metod pozwalających na specyficzne blokowanie interakcji SDF-1-CXCR4 lub CXCR7 można zaliczyć opierające się na inhibicji receptora. Znane są małowzrostkowe inhibitory CXCR4 takie jak T140 i AMD3100 [46,47] oraz inhibitory CXCR7, do których należą CCX733 i CCX754 [48]. Oczywiście możliwe jest także zahamowanie translacji cząsteczek mRNA kodującego albo SDF-1 albo jego receptory poprzez zastosowanie specyficznych siRNA (ang. small interfering RNA) [32,49].

BIOLOGICZNE EFEKTY DZIAŁANIA SDF-1

Oddziaływanie SDF-1-CXCR4 lub CXCR7 zaangażowane jest w regulację wielu procesów zarówno fizjologicznych jak i patologicznych. Zaliczyć do nich można proliferację komórek, ich różnicowanie, adhezję, migrację, jak i przerzutowanie komórek nowotworowych. Reakcja na SDF-1 zależy od rodzaju komórek. SDF-1 stymuluje proliferację i przeżywalność astrocytów i niektórych komórek nowotworowych, takich jak np. komórki glejaka [50,51]. Natomiast nie stwierdzono, by SDF-1 miał wpływ na proliferację i przeżywalność komórek hematopoetycznych [30]. Wydaje się, że główną funkcją SDF-1 jest aktywowanie chemotaksji kompetentnych do odpowiedzi komórek. Udokumentowano to w wielu pracach poświęconych migracji zarówno komórek prawidłowych jak i nowotworowych [52–55]. Ukierunkowana migracja komórek jest procesem bardzo ważnym dla prawidłowego rozwoju, późniejszego funkcjonowania i regeneracji organizmu zwierzęcia, rola SDF-1 jest zatem kluczowa dla przeżycia organizmu. Analiza fenotypu myszy pozbawionych funkcjonalnego genu kodującego CXCR4 lub SDF-1 wykazała, że zwierzęta takie umierają *in utero*. Charakteryzują je zaburzenia rozwoju serca, mózgu i dużych naczyń krwionośnych oraz, co niezwykle istotne, kolonizacji szpiku kostnego przez hematopoetyczne komórki macierzyste [56]. Badania prowadzone z wykorzystaniem mysich zarodków pozbawionych SDF-1 lub CXCR4 wykazały, że rola tych czynników polega na regulacji migracji HSPC między szpikiem kostnym a krwią obwodową [2,56,57]. Oddziaływanie SDF-1 na HSPC szczególnie dobrze wyraża się po transplantacji szpiku kostnego, kiedy to właśnie SDF-1 kieruje komórki macierzyste i progenitorowe z krwi obwodowej pacjenta do szpiku kostnego, wspomagając tym samym jego zasiedlenie [58]. W warunkach fizjologicznych populacje komórek ekspresujących CXCR4 obecne w szpiku kostnym i krwi obwodowej charakteryzuje stan równowagi. Natomiast po uszkodzeniu tkanki następuje kaskada zdarzeń prowadząca do

miejscowego wzrostu stężenia SDF-1, co w konsekwencji wywołuje migrację komórek HSPC ze szpiku kostnego.

ROLA SDF-1 W FORMOWANIU MIĘŚNI SZKIELETOWYCH

Mięśnie szkieletowe kręgowców powstają z komórek wywodzących się z dermomiotomu, a więc części somitu. Komórki obecne w brzusznej części dermomiotomu tracą swoją nabłonkową morfologię, tworzą warstwy, a następnie sukcesywnie migrują, tworząc mięśnie podosiowe kończyn, języka i przepony [59]. Rola SDF-1 i CXCR4 w powstawaniu mięśni została bardzo dobrze scharakteryzowana w organizmie modelowym jakim jest ryba - *Danio rerio*. Wczesna miogeneza u *Danio rerio* zależy od obecności CXCR4 i SDF-1. Brak tych czynników powoduje nieprawidłowy rozwój mięśni szkieletowych, które nie osiągają stanu pełnego zróżnicowania [59,60].

Rola SDF-1 w miogenezie była również analizowana podczas rozwoju zarodkowego ptaków, poprzez ektopowo umieszczone źródło SDF-1 w rozwijającym się zarodku kury [61]. Stymulowało to chemotaksję komórek progenitorowych mięśni w kierunku źródła cytokiny. Ponadto wpływało na obniżenie w tych komórkach poziomu MyoD i Myf5 – charakterystycznych dla mięśni czynników transkrypcyjnych należących do rodziny białek regulujących proces miogenezy (MRF, ang. myogenic regulatory factor) – powodując zahamowanie różnicowania tychże komórek progenitorowych [62]. Potwierdzeniem faktu, że SDF-1 jest atraktantem dla komórek progenitorowych mięśni są także wyniki doświadczeń wykazujące, że po zablokowaniu aktywności szlaku zależnego od SDF-1 spadała liczba komórek progenitorowych w zawiązkach kończyn zarodka kury. Osiągnięto to blokując CXCR4 inhibitorem T140 lub jego analogiem TN140033 [47].

CXCR4 jest również jednym z markerów komórek progenitorowych mięśni w zarodku myszy. Obecny jest na powierzchni komórek miogenicznych od wyodrębnienia się ich z somitu, aż do zasiedlenia przez nie zawiązków kończyn. Myszy pozbawione genu *CXCR4* wykazują zaburzenia liczebności i lokalizacji komórek progenitorowych mięśni kończyn. Ponadto, SDF-1 ekspresjonowany jest w tkance mezenchymalnej zlokalizowanej wzdłuż trasy migracji tych komórek do zawiązków kończyn [62].

Poza regulowaniem migracji komórek progenitorowych mięśni szkieletowych SDF-1 bierze również udział w promowaniu przeżywania tych, które syntetyzują CXCR4 [63]. Istnieje hipoteza

mówiąca o tym, że funkcjonowanie ścieżki sygnałowej SDF-1-CXCR4 jest konieczne do zachowania stanu niezróżnicowania bipotentnych komórek prekursorowych wywodzących się z dermomiotomu. Początkowo komórki te są zdolne do rozpoczęcia zarówno miogenezy jak i angiogenezy. Brak funkcjonalnego szlaku SDF-1 powoduje jednak, że komórki, które powinny stać się pierwotnymi mioblastami wzbogacają pulę komórek zaangażowanych w angiogenezę [47].

ROLA SDF-1 W REGENERACJI MIĘŚNI SZKIELETOWYCH

SDF-1 odgrywa bardzo istotną rolę w mobilizacji komórek macierzystych ze szpiku kostnego do krwi obwodowej [64,65]. Zarówno w mysie HPSC, jak również obecne w szpiku kostnym komórki wykazujące ekspresję mRNA czynników charakterystycznych dla komórek macierzystych i prekursorowych mięśni, wątroby i neuronów mobilizowane są do krwi obwodowej na drodze zależnej od SDF-1 [13]. Komórki te zdolne są do opuszczenia szpiku kostnego w odpowiedzi na uszkodzenie tkanek, które prowadzi do wzrostu stężenia SDF-1 [13]. Wzrost poziomu mRNA kodującego SDF-1 zaobserwowano po uszkodzeniu serca, mięśni szkieletowych, czy wątroby [66]. Komórki mobilizowane przez SDF-1 zasiedlając uszkodzoną tkankę mogłyby brać udział w jej naprawie [67]. Hipoteza ta weryfikowana jest z wykorzystaniem różnych modeli badawczych. Wykazano, że przeszczepiane różnego rodzaju komórki macierzyste i progenitorowe z powodzeniem zasiedlają na drodze zależnej od SDF-1 uszkodzony mięsień sercowy [68,69], wątrobę [70], nerki [71], trzustkę [72] i płuca [73].

Uszkodzenie mięśni szkieletowych wywołane chorobą, urazem mechanicznym, a w warunkach doświadczalnych zmiażdżeniem lub podaniem kardiotoksyny, inicjuje kaskadę zdarzeń prowadzących do regeneracji. Odbudowa uszkodzonej tkanki rozpoczyna się od degradacji włókien mięśniowych [74]. Następnym etapem jest ich rekonstrukcja zależna od związanych z włóknami mięśniowymi komórek prekursorowych tej tkanki – komórek satelitowych. Aktywowane komórki satelitarne dzielą się, różnicują w mioblasty, które fuzują ze sobą tworząc syncytialne miotuby, ostatecznie stając się funkcjonalnymi włóknami mięśniowymi [75,76]. Licznym rodzajem komórek macierzystych i prekursorowych, które nie są komórkami satelitowymi udowodniono, że posiadają potencjał miogeniczny *in vitro*, a także, że są zdolne do zasiedlania tkanki mięśniowej i uczestniczenia w regeneracji po przeszczepieniu do uszkodzonego mięśnia *in vivo* [77,78]. Do komórek takich należą komórki mSP (ang. muscle

side population) [79], obecne w przestrzeni śródmięśniowej mięśni szkieletowych komórki PICs (ang. PW1+/Pax7-interstitial cells) [80], perycyty [81], komórki ekspresujące marker CD133 [82–84], mezenchymalne komórki macierzyste [85], multipotentne komórki macierzyste izolowane z dorosłych organizmów (MASC, ang. multipotent adult stem cell) [86], komórki macierzyste tkanki tłuszczowej [87], neuronalne komórki macierzyste [88], hematopoetyczne komórki macierzyste i komórki macierzyste izolowane ze szpiku kostnego [89]. Potencjał miogeniczny wykazują również komórki izolowane z krwi pępowinowej [5], tkanki łącznej pępowiny – galarety Whartona [90], a także zarodkowe komórki macierzyste (ESC, ang. embryonic stem cell) [91] i indukowane pluripotentne komórki macierzyste (iPSCs, ang. induced pluripotent stem cells) [92]. Należy jednak pamiętać, że wymienione powyżej populacje komórek testowane były w warunkach eksperymentalnych, to znaczy albo w hodowli *in vitro* albo po ich przeszczepieniu do uszkodzonego mięśnia szkieletowego. Doświadczenia takie nie dają więc odpowiedzi na pytanie, czy w warunkach fizjologicznych komórki te są zdolne do zasiedlania uszkodzonej tkanki i odgrywania istotnej roli w jej naprawie. Jedynie w przypadku komórek macierzystych pochodzących ze szpiku kostnego (BMDC, ang. bone marrow-derived stem cells) wykazano, że w warunkach fizjologicznych są one zdolne do zasiedlania mięśni [93].

Rola SDF-1 w mobilizacji komórek do uszkodzonego mięśnia jest dyskutowana w wielu pracach poświęconych komórkom macierzystym. Prowadzone *in vitro* analizy mysich linii mioblastów uzyskanych z komórek satelitowych – C2C12 i G7 wykazały, że komórki te syntetyzują CXCR4 [14], a więc są w stanie reagować na SDF-1, który wpływa na ich różnicowanie [22,94,95]. Rola SDF-1 w różnicowaniu mioblastów analizowana była także *in vivo*. Podawane dotętniczo myszy komórki populacji SP ekspresujące CXCR4 zasiedlały mięśnie bardziej wydajnie niż komórki niesyntetyzujące tego receptora [96]. Co istotne, przeszczepianie mezenchioblastów [16] oraz mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z galarety Whartona traktowanych SDF-1 poprawia ich zdolność do zasiedlania uszkodzonego mięśnia [90]. SDF-1 zwiększał także zdolność mezenchioblastów do migracji zarówno *in vitro* jak i *in vivo* [16]. Działo się to dzięki zwiększeniu ekspresji metaloproteazy MMP14, białek adhezyjnych NCAM1, NCAM2, ICAM, PECAM, integryny α -V oraz receptora trombospodyny [16].

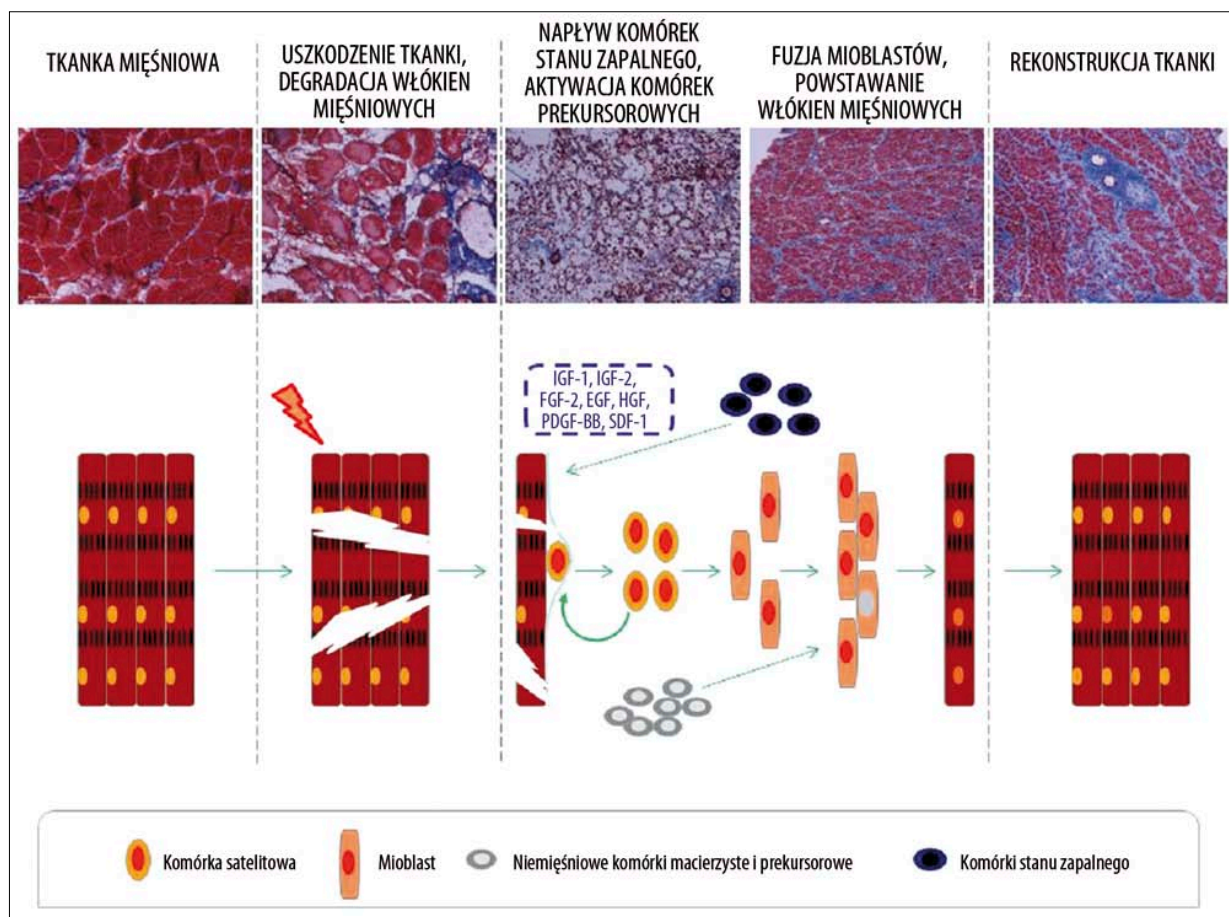
Sposób podawania komórek macierzystych ma bardzo istotne znaczenia dla ich potencjalnego

wykorzystania w terapii. W przypadku chorób, takich jak obejmujące duże partie mięśni dystrofie mięśniowe, ewentualne zastosowanie praktyczne mogą mieć tylko takie komórki, które po podaniu do krwioobiegu zdolne są do zasiedlania uszkodzonej tkanki. Warunek ten stwarza liczne ograniczenia w możliwości wykorzystania różnych rodzajów komórek macierzystych, które mimo iż mają potencjał miogeniczny, nie są zdolne do migracji i przechodzenia przez śródbłonek naczyń krwionośnych, a co za tym idzie do zasiedlenia mięśni [78]. Zatem niezwykle istotne jest poszukiwanie czynników, które aktywują migrację komórek macierzystych do uszkodzonych mięśni. Czynnikiem takim mógłby być SDF-1, którego ekspresja, jak już wspomniano, wzrasta w tkance mięśniowej uszkodzonej zarówno mechanicznie [5] jak i w wyniku urazów towarzyszących dystrofiom, np. dystrofii mięśniowej Duchenne’a [97]. Co istotne, mechanicznemu uszkodzeniu lub niedotlenieniu mięśnia szkieletowego towarzyszy także wzrost liczby komórek progenitorowych śródbłonna (EPC, ang. endothelial progenitor cells) obecnych we krwi obwodowej [98,99]. Transfekcja komórek śródbłonna oraz otaczających naczyń miocytów, w uszkodzonych przez niedokrwienie mięśniach szczurów, wektorem kodującym SDF-1 powoduje, iż przeszczepione dożylnie EPC z większą wydajnością zasiedlają mięsień [100]. U szczurów chorych na cukrzycę obserwuje się zmniejszoną ekspresję SDF-1 w uszkodzonych tkankach, co ogranicza mobilizację EPC. W efekcie gorzej odtwarzane są naczynia włosowate [98]. Tak więc rola SDF-1 w przebiegu regeneracji mięśni szkieletowych jest niezwykle istotna.

ROLA RECEPTORÓW CXCR4 I CXCR7 W PROCESACH NOWOTWORZENIA

Receptory CXCR4 oraz CXCR7 obecne są na powierzchni różnego rodzaju komórek nowotworowych [25]. Przykładowo, ludzkie komórki linii raka płuc i raka piersi syntetyzujące CXCR7 szybciej proliferują, mają większą zdolność do tworzenia przerzutów, a w guzach, które tworzą szybciej rozwijają się naczynia krwionośne. Analiza komórek ludzkiego raka prostaty dowiodła, iż za pośrednictwem receptora CXCR7 regulowana jest ich proliferacja. Obecność tego receptora zwiększała przeżywalność, adhezję i chemotaksję tych komórek [25].

Komórkami, które wykazują na swojej powierzchni obecność receptora CXCR4 i CXCR7 są nowotworowe komórki mięsaka mięśni poprzecznie prążkowanych (RMS, ang. rhabdomyosarcoma). Wyróżnia się dwa podstawowe podtypy histologiczne RMS – pierwszy podtyp, który bardzo często tworzy przerzuty do szpiku kostnego i w przypadku którego



Rycina 1. Regeneracja mięśni szkieletowych. W wyniku uszkodzenia mięśnia dochodzi do degradacji włókien mięśniowych. Odpowiedzialne są za to napływające do miejsca uszkodzenia neutrofile i makrofagi (komórki stanu zapalnego) oraz uwalniane z uszkodzonego włókna proteazy. Lokalnie wzrastający poziom cytokin i czynników wzrostu takich jak IGF-1, IGF-2, FGF-2, EGF, HGF, PDGF-BB oraz SDF-1, których źródłem są uszkodzone włókna mięśniowe, macierz zewnątrzkomórkowa, komórki stanu zapalnego i naczynia krwionośne, prowadzi do aktywacji komórek satelitowych. Komórki te dzielą się i różnicują w mioblasty, które fuzują, tworzą miotuby, a następnie nowe włókna mięśniowe. Cechą charakterystyczną niedojrzałych włókien mięśniowych są centralnie położone jądra komórkowe. Część komórek powstałych w wyniku podziałów komórek satelitowych odtwarza ich populację. Inne niemięśniowe komórki macierzyste i prekursorowe mogą również uczestniczyć w naprawie uszkodzonych włókien. Zdjęcia przedstawiają regenerujący mięsień szczura rasy WAG, od lewej: mięsień nieuszkodzony, regenerujący mięsień w 3, 7 i 14 dniu po uszkodzeniu. Skrawki wybarwiono Trichromem Massona. Włókna mięśniowe wybarwione na czerwono, tkanka łączna na niebiesko, jądra komórkowe na ciemnoniebiesko.

rokowania są gorsze, to typ pęcherzykowy (ARMS, ang. alveolar type rhabdomyosarcoma). Drugi to typ zarodkowy (ERMS, ang. embryonal type rhabdomyosarcoma), częściej występujący (50–60% przypadków RMS) i rzadziej przerzutujący do szpiku, o lepszym rokowaniu u chorych. Różnica skutków aktywacji receptorów CXCR4 i CXCR7 w obu rodzajach RMS wyjaśnia większy odsetek przerzutów do szpiku komórek guzów ARMS. W porównaniu z ERMS komórki ARMS wykazują wyższy poziom ekspresji CXCR4 przy jednocześnie niższym poziomie CXCR7 [24]. Fenotyp komórek ARMS związany jest z obecnością mutacji, która powoduje translokację kluczowych dla regulacji miogenezy genów *PAX3* lub *PAX7* do locus kodującego czynnik transkrypcyjny *FKHR* (ang. forkhead in human rhabdomyosarcoma, *FOXO1a*). W konsekwencji

powstają geny fuzyjne *PAX3-FKHR* lub *PAX7-FKHR*. W komórkach ARMS geny te wykazują zwiększoną ekspresję, co powoduje wzrost poziomu czynników transkrypcyjnych *PAX3* i *PAX7* oraz intensyfikację ruchliwości komórek. Obecność genu fuzyjnego *PAX3-FKHR* lub *PAX7-FKHR* wpływa na wzrost ekspresji receptora CXCR4 przy jednocześnie obniżeniu ekspresji CXCR7. Wprowadzenie genu fuzyjnego *PAX3-FKHR* lub *PAX7-FKHR* do komórek ERMS powoduje wzrost ekspresji CXCR4 [52]. To zjawisko tłumaczy dlaczego komórki ARMS, w porównaniu z komórkami ERMS, charakteryzuje większa liczba cząsteczek CXCR4, a co za tym idzie większa ruchliwość w odpowiedzi na SDF-1. Zarówno komórki ARMS jak i ERMS traktowane SDF-1 zwiększają adhezję do podłoża. W przypadku komórek ERMS efekt ten jest silniej wyrażony.

Jest to skorelowane z wyższym poziomem ekspresji CXCR7, który w większym stopniu niż CXCR4 odpowiada za adhezję. Dodatkowy skutek traktowania komórek SDF-1 to wzrost syntezy metaloproteaz MMP, co wiąże się z większym potencjałem komórek do przerzutowania. Zjawisko to obserwuje się również u chorych z nowotworami w postaci inwazyjnej.

CEL I OPIS PROJEKTU

W pierwszym etapie po uszkodzeniu mięśnia, co ma miejsce w przypadku urazów mechanicznych, ćwiczeń fizycznych, rozciągania, czy chorób takich jak dystrofie mięśniowe, dochodzi do degradacji uszkodzonej tkanki. Do uszkodzonego mięśnia napływają komórki stanu zapalnego takie jak neutrofile i makrofagi. Biorą one udział w fagocytozie uszkodzonych włókien oraz są źródłem licznych cytokin i czynników wzrostu. Czynniki te są również uwalniane z macierzy zewnątrzkomórkowej, wydzielane przez uszkodzone włókno mięśniowe, mięśniowe komórki śródmięzszowe oraz komórki śródbłonna [101]. Ponadto w wyniku wzrastającego w uszkodzonym włóknie poziomu wapnia aktywowane są proteazy odpowiedzialne za degradację białek strukturalnych mięśnia szkieletowego [102]. W drugim etapie regeneracji dochodzi do rekonstrukcji struktury mięśnia. Lokalny wzrost poziomu cytokin i czynników wzrostu w uszkodzonym mięśniu prowadzi do aktywacji komórek satelitowych, a więc wznowienia cyklu komórkowego i ich intensywnych podziałów [103,104]. W efekcie powstaje populacja mioblastów, które łączą się tworząc wielojądrowe miotuby a następnie włókna mięśniowe, rekonstruując uszkodzoną tkankę (Rycina 1) [105]. Jak już wspomniano w tej pracy, potencjał miogeniczny mogą wykazywać także komórki macierzyste

i prekursorowe inne niż komórki satelitowe [78]. Udział SDF-1 w mobilizacji niektórych z nich, np. komórek macierzystych i prekursorowych ze szpiku kostnego do krwi obwodowej jest procesem dobrze poznany [66, 106]. Niemniej jednak rola SDF-1 w mobilizacji komórek endogennych do uszkodzonej tkanki nie została dotychczas wyjaśniona. Celem projektu finansowanego przez Naukową Fundację Polpharmy było sprawdzenie, czy podanie egzogenego SDF-1 do uszkodzonego w wyniku urazu mechanicznego mięśnia szkieletowego wpływa na przebieg procesu jego naprawy. Przeprowadzone badania miały na celu poznanie mechanizmu działania SDF-1 w uszkodzonej tkance oraz jego roli w różnicowaniu napływowych komórek macierzystych i prekursorowych.

PODSUMOWANIE

Badania przeprowadzone podczas realizacji projektu wykazały, że podawanie egzogenego SDF-1 do uszkodzonego mięśnia szkieletowego znacząco poprawia jego regenerację. SDF-1 reguluje także migrację komórek macierzystych oraz wpływa na poziom ekspresji białek zaangażowanych w różnicowanie analizowanych mioblastów. Wyniki uzyskane podczas realizacji projektu finansowanego przez Naukową Fundację Polpharmy stały się częścią dwóch prac licencjackich oraz dwóch magisterskich. Ponadto stały się one podstawą pracy przeglądowej [104] oraz dwóch prac oryginalnych.

PODZIĘKOWANIA

Szczególne podziękowania kierujemy do Pani Prof. dr hab. Katarzyny Koziak za wsparcie i cenne wskazówki podczas realizacji projektu.

Piśmiennictwo:

1. Tashiro K, Tada H, Heilker R i wsp.: Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science*, 1993; 261: 600–3
2. Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M i wsp.: Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*, 1998; 393: 595–9
3. Nagasawa T, Kikutani H, Kishimoto T: Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994; 91: 2305–9
4. Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM i wsp.: A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med*, 1996; 184: 1101–9
5. Brzoska E, Grabowska I, Hoser G i wsp.: Participation of stem cells from human cord blood in skeletal muscle regeneration of SCID mice. *Exp Hematol*, 2006; 34: 1262–70
6. Ratajczak MZ, Kucia M, Reza R i wsp.: Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells 'hide out' in the bone marrow. *Leukemia*, 2004; 18: 29–40
7. Kucia M, Jankowski K, Reza R i wsp.: CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. *J Mol Histol*, 2004; 35: 233–45
8. Shirozu M, Nakano T, Inazawa J i wsp.: Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics*, 1995; 28: 495–500
9. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE i wsp.: HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*, 1996; 272: 872–7
10. Burns JM, Summers BC, Wang Y i wsp.: A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med*, 2006; 203: 2201–13

11. Aiuti A, Webb IJ, Bleul C i wsp.: The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med*, 1997; 185: 111–20
12. Son BR, Marquez-Curtis LA, Kucia M i wsp.: Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells *in vitro* is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases. *Stem Cells*, 2006; 24: 1254–64
13. Kucia M, Wojakowski W, Reza R i wsp.: The migration of bone marrow-derived non-hematopoietic tissue-committed stem cells is regulated in an SDF-1-, HGF-, and LIF-dependent manner. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2006; 54: 121–35
14. Ratajczak MZ, Majka M, Kucia M i wsp.: Expression of functional CXCR4 by muscle satellite cells and secretion of SDF-1 by muscle-derived fibroblasts is associated with the presence of both muscle progenitors in bone marrow and hematopoietic stem/progenitor cells in muscles. *Stem Cells*, 2003; 21: 363–71
15. Moore MA, Hattori K, Heissig B i wsp.: Mobilization of endothelial and hematopoietic stem and progenitor cells by adenovector-mediated elevation of serum levels of SDF-1, VEGF, and angiopoietin-1. *Ann NY Acad Sci*, 2001; 938: 36–45; discussion 45–7
16. Galvez BG, Sampaoli M, Brunelli S i wsp.: Complete repair of dystrophic skeletal muscle by mesoangioblasts with enhanced migration ability. *J Cell Biol*, 2006; 174: 231–43
17. Muller A, Homey B, Soto H i wsp.: Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, 2001; 410: 50–6
18. Matsuo Y, Ochi N, Sawai H i wsp.: CXCL12/SDF-1 α co-operatively promote invasiveness and angiogenesis in pancreatic cancer. *Int J Cancer*, 2009; 124: 853–61
19. Wang J, Shiozawa Y, Wang Y i wsp.: The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer. *J Biol Chem*, 2008; 283: 4283–94
20. Goldmann T, Dromann D, Radtke J i wsp.: CXCR7 transcription in human non-small cell lung cancer and tumor-free lung tissues; possible regulation upon chemotherapy. *Virchows Arch*, 2008; 452: 347–8
21. Miao Z, Luker KE, Summers BC i wsp.: CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth *in vivo* and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007; 104: 15735–40
22. Melchionna R, Di Carlo A, De Mori R i wsp.: Induction of myogenic differentiation by SDF-1 via CXCR4 and CXCR7 receptors. *Muscle Nerve*, 2010; 41: 828–35
23. Odemis V, Boosmann K, Heinen A i wsp.: CXCR7 is an active component of SDF-1 signalling in astrocytes and Schwann cells. *J Cell Sci*, 2010; 123: 1081–8
24. Grymala K, Tarnowski M, Wysoczynski M i wsp.: Overlapping and distinct role of CXCR7-SDF-1/ITAC and CXCR4-SDF-1 axes in regulating metastatic behavior of human rhabdomyosarcomas. *Int J Cancer*, 2010; 127(11): 2554–68
25. Maksym RB, Tarnowski M, Grymala K i wsp.: The role of stromal-derived factor-1 – CXCR7 axis in development and cancer. *Eur J Pharmacol*, 2009; 625: 31–40
26. Vila-Coro AJ, Rodriguez-Frade JM, Martin De Ana A i wsp.: The chemokine SDF-1 α triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *FASEB J*, 1999; 13: 1699–710
27. Ganju RK, Brubaker SA, Meyer J i wsp.: The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1 α , binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. *J Biol Chem*, 1998; 273: 23169–75
28. Petit I, Goichberg P, Spiegel A i wsp.: Atypical PKC-zeta regulates SDF-1-mediated migration and development of human CD34+ progenitor cells. *J Clin Invest*, 2005; 115: 168–76
29. Janowska-Wieczorek A, Marquez LA, Dobrowsky A i wsp.: Differential MMP and TIMP production by human marrow and peripheral blood CD34(+) cells in response to chemokines. *Exp Hematol*, 2000; 28: 1274–1285
30. Kijowski J, Baj-Krzyworzeka M, Majka M i wsp.: The SDF-1-CXCR4 axis stimulates VEGF secretion and activates integrins but does not affect proliferation and survival in lymphohematopoietic cells. *Stem Cells*, 2001; 19: 453–66
31. Lapidot T, Petit I: Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol*, 2002; 30: 973–81
32. Christopherson KW II, Hangoc G, Mantel CR i wsp.: Modulation of hematopoietic stem cell homing and engraftment by CD26. *Science*, 2004; 305: 1000–3
33. Semerad CL, Christopher MJ, Liu F i wsp.: G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow. *Blood*, 2005; 106: 3020–27
34. Wright N, de Lera TL, Garcia-Morujia C i wsp.: Transforming growth factor-beta1 down-regulates expression of chemokine stromal cell-derived factor-1: functional consequences in cell migration and adhesion. *Blood*, 2003; 102: 1978–84
35. Jin C, Fu WX, Xie LP i wsp.: SDF-1 α production is negatively regulated by mouse estrogen enhanced transcript in a mouse thymus epithelial cell line. *Cell Immunol*, 2003; 223: 26–34
36. Wang GL, Jiang BH, Rue EA i wsp.: Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995; 92: 5510–14
37. Tszuzuki Y, Fukumura D, Oosthuysen B i wsp.: Vascular endothelial growth factor (VEGF) modulation by targeting hypoxia-inducible factor-1 α – hypoxia response element – VEGF cascade differentially regulates vascular response and growth rate in tumors. *Cancer Res*, 2000; 60: 6248–52
38. Corpechot C, Barbu V, Wendum D i wsp.: Hepatocyte growth factor and c-Met inhibition by hepatic cell hypoxia: a potential mechanism for liver regeneration failure in experimental cirrhosis. *Am J Pathol*, 2002; 160: 613–20
39. Hitchon C, Wong K, Ma G i wsp.: Hypoxia-induced production of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) and vascular endothelial growth factor by synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*, 2002; 46: 2587–97
40. Schioppa T, Uranchimeg B, Sacconi A i wsp.: Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. *J Exp Med*, 2003; 198: 1391–402

41. Helbig G, Christopherson KW II, Bhat-Nakshatri P i wsp.: NF-kappaB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. *J Biol Chem*, 2003; 278: 21631–8
42. Papayannopoulou T: Current mechanistic scenarios in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Blood*, 2004; 103: 1580–5
43. Zhang XF, Wang JF, Matczak E i wsp.: Janus kinase 2 is involved in stromal cell-derived factor-1alpha-induced tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and migration of hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 2001; 97: 3342–8
44. Orsini MJ, Parent JL, Mundell SJ i wsp.: Trafficking of the HIV coreceptor CXCR4. Role of arrestins and identification of residues in the c-terminal tail that mediate receptor internalization. *J Biol Chem*, 1999; 274: 31076–86
45. Manes S, Lacalle RA, Gomez-Mouton C i wsp.: Membrane raft microdomains in chemokine receptor function. *Semin Immunol*, 2001; 13: 147–57
46. Juarez J, Bradstock KE, Gottlieb DJ i wsp.: Effects of inhibitors of the chemokine receptor CXCR4 on acute lymphoblastic leukemia cells *in vitro*. *Leukemia*, 2003; 17: 1294–300
47. Yusuf F, Rehimi R, Morosan-Puopolo G i wsp.: Inhibitors of CXCR4 affect the migration and fate of CXCR4+ progenitors in the developing limb of chick embryos. *Dev Dyn*, 2006; 235: 3007–15
48. Zabel BA, Wang Y, Lewen S i wsp.: Elucidation of CXCR7-mediated signaling events and inhibition of CXCR4-mediated tumor cell transendothelial migration by CXCR7 ligands. *J Immunol*, 2009; 183: 3204–11
49. Chen Y, Stamatoyannopoulos G, Song CZ: Down-regulation of CXCR4 by inducible small interfering RNA inhibits breast cancer cell invasion *in vitro*. *Cancer Res*, 2003; 63: 4801–4
50. Bonavia R, Bajetto A, Barbero S i wsp.: Chemokines and their receptors in the CNS: expression of CXCL12/SDF-1 and CXCR4 and their role in astrocyte proliferation. *Toxicol Lett*, 2003; 139: 181–9
51. Zhou Y, Larsen PH, Hao C i wsp.: CXCR4 is a major chemokine receptor on glioma cells and mediates their survival. *J Biol Chem*, 2002; 277: 49481–7
52. Libura J, Drukala J, Majka M i wsp.: CXCR4-SDF-1 signaling is active in rhabdomyosarcoma cells and regulates locomotion, chemotaxis, and adhesion. *Blood*, 2002; 100: 2597–606
53. Koshiba T, Hosotani R, Miyamoto Y i wsp.: Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression. *Clin Cancer Res*, 2000; 6: 3530–5
54. Lapidot T, Kollet O: The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. *Leukemia*, 2002; 16: 1992–2003
55. Ma Q, Jones D, Borghesani PR i wsp.: Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998; 95: 9448–53
56. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K i wsp.: Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*, 1996; 382: 635–8
57. Peled A, Petit I, Kollet O i wsp.: Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science*, 1999; 283: 845–8
58. Shen W, Bendall LJ, Gottlieb DJ i wsp.: The chemokine receptor CXCR4 enhances integrin-mediated *in vitro* adhesion and facilitates engraftment of leukemic precursor-B cells in the bone marrow. *Exp Hematol*, 2001; 29: 1439–47
59. Chevallier A, Kieny M, Mauger A: Limb-somite relationship: origin of the limb musculature. *J Embryol Exp Morphol*, 1977; 41: 245–58
60. Chong SW, Nguyet LM, Jiang YJ i wsp.: The chemokine Sdf-1 and its receptor Cxcr4 are required for formation of muscle in zebrafish. *BMC Dev Biol*, 2007; 7: 54
61. Rehimi R, Khalida N, Yusuf F i wsp.: Stromal-derived factor-1 (SDF-1) expression during early chick development. *Int J Dev Biol*, 2008; 52: 87–92
62. Vasyutina E, Stebler J, Brand-Saberi B i wsp.: CXCR4 and Gab1 cooperate to control the development of migrating muscle progenitor cells. *Genes Dev*, 2005; 19: 2187–98
63. Joo EK, Broxmeyer HE, Kwon HJ i wsp.: Enhancement of cell survival by stromal cell-derived factor-1/CXCL12 involves activation of CREB and induction of Mcl-1 and c-Fos in factor-dependent human cell line MO7e. *Stem Cells Dev*, 2004; 13: 563–70
64. Lataillade JJ, Clay D, Dupuy C i wsp.: Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34(+) cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival. *Blood*, 2000; 95: 756–68
65. Wojakowski W, Tendera M, Michalowska A i wsp.: Mobilization of CD34/CXCR4+, CD34/CD117+, c-met+ stem cells, and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*, 2004; 110: 3213–20
66. Kucia M, Ratajczak J, Reza R i wsp.: Tissue-specific muscle, neural and liver stem/progenitor cells reside in the bone marrow, respond to an SDF-1 gradient and are mobilized into peripheral blood during stress and tissue injury. *Blood Cells Mol Dis*, 2004; 32: 52–7
67. Pituch-Noworolska A, Majka M, Janowska-Wieczorek A i wsp.: Circulating CXCR4-positive stem/progenitor cells compete for SDF-1-positive niches in bone marrow, muscle and neural tissues: an alternative hypothesis to stem cell plasticity. *Folia Histochem Cytobiol*, 2003; 41: 13–21
68. Abbott JD, Huang Y, Liu D i wsp.: Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation*, 2004; 110: 3300–5
69. Ghadge SK, Muhlstedt S, Ozcelik C i wsp.: SDF-1alpha as a therapeutic stem cell homing factor in myocardial infarction. *Pharmacol Ther*, 2011; 129: 97–108
70. Kollet O, Shvitiel S, Chen YQ i wsp.: HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest*, 2003; 112: 160–9
71. Togel F, Isaac J, Hu Z i wsp.: Renal SDF-1 signals mobilization and homing of CXCR4-positive cells to the kidney after ischemic injury. *Kidney Int*, 2005; 67: 1772–84
72. Hess D, Li L, Martin M i wsp.: Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nat Biotechnol*, 2003; 21: 763–70

73. Gomperts BN, Belperio JA, Rao PN i wsp.: Circulating progenitor epithelial cells traffic via CXCR4/CXCL12 in response to airway injury. *J Immunol*, 2006; 176: 1916–27
74. Bassaglia Y, Gautron J: Fast and slow rat muscles degenerate and regenerate differently after whole crush injury. *J Muscle Res Cell Motil*, 1995; 16: 420–9
75. Clark WE: An experimental study of the regeneration of mammalian striped muscle. *J Anat*, 1946; 80: 24–36
76. Hess A, Rosner S: The satellite cell bud and myoblast in denervated mammalian muscle fibers. *Am J Anat*, 1970; 129: 21–39
77. Tedesco FS, Dellavalle A, Diaz-Manera J i wsp.: Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *J Clin Invest*, 2010; 120: 11–9
78. Farini A, Razini P, Erratico S i wsp.: Cell based therapy for Duchenne muscular dystrophy. *J Cell Physiol*, 2009; 221: 526–34
79. Tanaka KK, Hall JK, Troy AA i wsp.: Syndecan-4-expressing muscle progenitor cells in the SP engraft as satellite cells during muscle regeneration. *Cell Stem Cell*, 2009; 4: 217–25
80. Mitchell KJ, Pannerec A, Cadot B i wsp.: Identification and characterization of a non-satellite cell muscle resident progenitor during postnatal development. *Nature cell biology*, 2010; 12: 257–66
81. Dellavalle A, Sampaolesi M, Tonlorenzi R i wsp.: Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat Cell Biol*, 2007; 9: 255–67
82. Torrente Y, Belicchi M, Sampaolesi M i wsp.: Human circulating AC133(+) stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. *J Clin Invest*, 2004; 114: 182–95
83. Gavina M, Belicchi M, Rossi B i wsp.: VCAM-1 expression on dystrophic muscle vessels has a critical role in the recruitment of human blood-derived CD133+ stem cells after intra-arterial transplantation. *Blood*, 2006; 108: 2857–66
84. Shi M, Ishikawa M, Kamei N i wsp.: Acceleration of skeletal muscle regeneration in a rat skeletal muscle injury model by local injection of human peripheral blood-derived CD133-positive cells. *Stem Cells*, 2009; 27: 949–60
85. De Bari C, Dell'Accio F, Vandenabeele F i wsp.: Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *J Cell Biol*, 2003; 160: 909–18
86. Schulze M, Belema-Bedada F, Technau A i wsp.: Mesenchymal stem cells are recruited to striated muscle by NFAT/IL-4-mediated cell fusion. *Genes & Development*, 2005; 19: 1787–98
87. Di Rocco G, Iachininoto MG, Tritarelli A i wsp.: Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells. *J Cell Sci*, 2006; 119: 2945–52
88. Galli R, Borello U, Gritti A i wsp.: Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat Neurosci*, 2000; 3: 986–91
89. LaBarge MA, Blau HM: Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell*, 2002; 111: 589–601
90. Grabowska I, Brzoska E, Gawrysiak A i wsp.: Restricted myogenic potential of mesenchymal stromal cells isolated from umbilical cord. *Cell Transplantation*, 2012; [Epub ahead of print]
91. Darabi R, Santos FN, Perlingeiro RC: The therapeutic potential of embryonic and adult stem cells for skeletal muscle regeneration. *Stem Cell Rev*, 2008; 4: 217–25
92. Darabi R, Pan W, Bosnakovski D i wsp.: Functional Myogenic Engraftment from Mouse iPS Cells. *Stem Cell Rev*, 2011; 7(4): 948–57
93. Palermo AT, Labarge MA, Doyonnas R i wsp.: Bone marrow contribution to skeletal muscle: a physiological response to stress. *Dev Biol*, 2005; 279: 336–44
94. Odemis V, Boosmann K, Dieterlen MT i wsp.: The chemokine SDF1 controls multiple steps of myogenesis through atypical PKCzeta. *J Cell Sci*, 2007; 120: 4050–59
95. Griffin CA, Apponi LH, Long KK i wsp.: Chemokine expression and control of muscle cell migration during myogenesis. *J Cell Sci*, 2010; 123: 3052–60
96. Perez AL, Bachrach E, Illigens BM i wsp.: CXCR4 enhances engraftment of muscle progenitor cells. *Muscle Nerve*, 2009; 40: 562–572
97. De Paepe B, Schroder JM, Martin JJ i wsp.: Localization of the alpha-chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in idiopathic inflammatory myopathies. *Neuromuscul Disord*, 2004; 14: 265–73
98. Fadini GP, Sartore S, Schiavon M i wsp.: Diabetes impairs progenitor cell mobilisation after hindlimb ischaemia-reperfusion injury in rats. *Diabetologia*, 2006; 49: 3075–84
99. De Falco E, Porcelli D, Torella AR i wsp.: SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells. *Blood*, 2004; 104: 3472–82
100. Kuliszewski MA, Kobulnik J, Lindner JR i wsp.: Vascular gene transfer of SDF-1 promotes endothelial progenitor cell engraftment and enhances angiogenesis in ischemic muscle. *Mol Ther*, 19: 895–902
101. Christov C, Chretien F, Abou-Khalil R i wsp.: Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners. *Molecular biology of the cell*, 2007; 18: 1397–409
102. Belcastro AN, Shewchuk LD, Raj DA: Exercise-induced muscle injury: a calpain hypothesis. *Mol Cell Biochem*, 1998; 179: 135–45
103. Ciemerych MA, Archacka K, Grabowska I i wsp.: Cell cycle regulation during proliferation and differentiation of mammalian muscle precursor cells. W: Kubiak JZ (red.), *Cell Cycle in Development, Results and Problems in Cell Differentiation*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2011: 498–507
104. Brzoska E, Ciemerych MA, Przewozniak M i wsp.: Regulation of muscle stem cells activation the role of growth factors and extracellular matrix. *Vitam Hormon*, 2011; 87: 239–76 ***Publikacja powstała w wyniku realizacji grantu Naukowej Fundacji Polpharmy***
105. Rochlin K, Yu S, Roy S i wsp.: Myoblast fusion: when it takes more to make one. *Dev Biol*, 2010; 341: 66–83
106. Kucia M, Dawn B, Hunt G i wsp.: Cells expressing early cardiac markers reside in the bone marrow and are mobilized into the peripheral blood after myocardial infarction. *Circ Res*, 2004; 95: 1191–9

Polimorfizmy na chromosomie 4q25 a ryzyko wystąpienia udaru niedokrwiennego mózgu

Polymorphisms on chromosome 4q25 and a risk of ischemic stroke

Agnieszka Słowik^{1,2},
Marcin Wnuk¹

¹ Oddział Udarowy Kliniki Neurologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

² Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Naukowa Fundacja Polpharmy w 2008 roku przyznała zespołowi pracującemu pod kierunkiem dr hab. Agnieszki Słowik grant na realizację projektu badawczego pt: *Czy polimorfizmy na chromosomie 4q25 związane z ryzykiem migotania przedsionków mają wpływ na ryzyko udaru niedokrwiennego mózgu w populacji polskiej?*

Streszczenie

Badania przeszukiwania całego genomu ludzkiego wykazały, że dwa polimorfizmy na chromosomie 4q25 zwiększają ryzyko udaru sercowo-zatorowego i kryptogennego. Badania replikacyjne, w tym badanie wykonane na populacji polskiej potwierdzają jedynie związek tych polimorfizmów z ryzykiem udaru sercowo-zatorowego. 24-godzinne monitorowanie rytmu serca u chorych w ostrym okresie udaru niedokrwiennego mózgu wskazuje na obecność napadowego migotania przedsionków aż u 11,3% chorych bez wcześniejszego wywiadu w kierunku tej arytmii. Badania genetyczne przeprowadzone u tych pacjentów nie wykazały związku badanych polimorfizmów ze świeżo wykrytym migotaniem przedsionków. Nie można jednak wykluczyć, że związek ten potwierdzą badania na odpowiednio licznych grupach chorych.

Słowa kluczowe: polimorfizm • udar mózgu • migotanie przedsionków

Summary

Genome wide association studies showed that two polymorphisms on chromosome 4q25 increased the risk of cardioembolic or cryptogenic stroke. Replication studies, including a study on a Polish population, showed, however, a correlation between the studied polymorphisms and cardioembolic stroke. 24-hour Holter monitoring revealed that 11.3% of acute stroke patients without history of atrial fibrillation presented with paroxysmal atrial fibrillation. Genetic studies in this subgroup did not, however, show a correlation between the studied polymorphisms and newly detected arrhythmia. Larger groups of patients may allow detection of such correlation.

Key words: polymorphism • stroke • atrial fibrillation

Wpłynęło: 16-05-2012
Zaakceptowano: 16-05-2012
Opublikowano: 10-08-2012

Adres do korespondencji:

dr n.med. Marcin Wnuk,
Klinika Neurologii,
Szpital Uniwersytecki,
ul. Botaniczna 3,
31-503 Kraków, e-mail:
marcin.a.wnuk@gmail.com

W 2008 roku w czasopiśmie „Annals of Neurology” ukazały się wyniki badania przeszukiwania genomu ludzkiego z następowymi badaniami replikacyjnymi w grupie 6222 pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu z pięciu różnych populacji europejskich. Autorzy badania wykazali, że dwa polimorfizmy na chromosomie 4q25, a mianowicie rs2200733 i rs10033464, związane z ryzykiem migotania przedsionków [1], zwiększają również prawdopodobieństwo wystąpienia udaru sercowozatorowego (rs2200733-T: OR=1,52, 95%CI: 1,35–1,71; rs10033464-T: OR=1,27, 95%CI: 1,11–1,45). Co ciekawe, polimorfizm rs2200733 był także związany ze zwiększonym ryzykiem udaru niedokrwiennego (OR=1,18, 95%CI: 1,09–1,28), co zdaniem autorów publikacji mogło świadczyć o niedodiagnozowaniu migotania przedsionków u chorych z udarem o nieustalonej etiologii [2].

Badanie to zapoczątkowało serię prac, w których analizie poddano wpływ wariantów genetycznych na chromosomie 4q25 na ryzyko udaru niedokrwiennego mózgu i jego poszczególnych etiologii. Na przykład, w replikacyjnym badaniu kliniczno-kontrolnym w grupie 4199 pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu i 3750 osób z grupy kontrolnej, wywodzących się z pięciu różnych populacji europejskich i jednej australijskiej, potwierdzono związek polimorfizmu rs2200733 na chromosomie 4q25 z udarem sercowozatorowym (meta-analiza dla wszystkich populacji: rs2200733 [$r^2=1$ z rs1906591] – OR=1,48, $p=1,2 \times 10^{-7}$), nie stwierdzając jednocześnie istotności statystycznej w odniesieniu do drugiego wariantu genetycznego – rs10033464 ($p=0,36$) [3]. W badaniu tym uczestniczyła również kohorta polskich pacjentów. W tej grupie chorych niezależnym czynnikiem ryzyka udaru sercowozatorowego był także polimorfizm rs2200733 (OR=1,37, $p=0,01$), nie wykazano natomiast związku tej etiologii udaru niedokrwiennego mózgu z wariantem rs10033464 ($p=0,53$) [3].

Przeprowadzone w 2009 roku badanie w populacji chińskiej wykazało, co prawda, związek polimorfizmu rs2200733 na chromosomie 4q25 z ryzykiem migotania przedsionków, nie potwierdziło jednakże roli tego wariantu genetycznego jako czynnika ryzyka udaru sercowozatorowego [4]. Wnikliwa analiza wykazała jednak związek omawianego polimorfizmu z ryzykiem udaru sercowozatorowego wśród pacjentów młodszych, tj. poniżej 60 roku życia, jednak czynnikiem ryzyka dla populacji chińskiej był wówczas allel C polimorfizmu rs2200733, podczas gdy w populacjach europejskich za allel ryzyka uchodzi allel T. Przypytane wyniki, zdaniem chińskich autorów, sugerują, że omawiany związek wariantu rs2200733 z udarem sercowozatorowym

w grupie pacjentów młodszych jest albo wynikiem fałszywie pozytywnym, albo też dwa allele C i T polimorfizmu rs2200733 pozostają w nierównowadze sprzężeń z innym allelem ryzyka niezidentyfikowanego dotychczas polimorfizmu [4].

W przeprowadzonym ostatnio badaniu na materiale pacjentów leczonych w Oddziale Udarowym Kliniki Neurologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie wykazano, że dwa polimorfizmy na chromosomie 4q25 – rs2200732, synonimiczny do rs2200733, oraz rs13143308 – są czynnikami ryzyka udaru sercowozatorowego. Zależność ta zniknęła jednak po przeprowadzeniu analizy regresji logistycznej, uwzględniającej wpływ wieku, płci i badanych naczyniowych czynników ryzyka, w tym migotania przedsionków. Z kolei, gdy z modelu regresji logistycznej wyłączono migotanie przedsionków, wówczas jedynie polimorfizm rs2200732 był czynnikiem ryzyka udaru sercowozatorowego w modelu addytywnym, przy czym wynik ten nie był istotny statystycznie po uwzględnieniu korekty Bonferroniego. Nie stwierdzono natomiast związku polimorfizmu rs10033464 z udarem sercowozatorowym w żadnym z analizowanych modeli [5].

Przedstawione wyżej wyniki, ukazujące znaczenie pewnych wariantów genetycznych tylko w udarze sercowozatorowym, wpisują się w trend, widoczny ostatnio w literaturze dotyczącej czynników ryzyka udaru mózgu. Okazuje się bowiem, że poszczególne etiologie udaru niedokrwiennego mózgu można rozpatrywać jako odmienne choroby. Wskazują na to:

- odmienny profil konwencjonalnych czynników ryzyka takich, jak np. nadciśnienie tętnicze lub cukrzyca, częściej związanych z udarem mózgu w przebiegu choroby małych naczyń [6,7],
- odmienne uwarunkowania genetyczne klasycznych czynników ryzyka takich, jak choćby migotanie przedsionków [1],
- odmienny profil genetyczny poszczególnych etiologii udaru niedokrwiennego mózgu, np. omawiane warianty ryzyka na chromosomie 4q25 w udarze sercowozatorowym, polimorfizmy ryzyka na chromosomie 9p21 w chorobie dużych naczyń [8],
- odmienne rokowanie, tak krótkoterminowe (najgorsze w odniesieniu do udaru sercowozatorowego [9]), jak i długoterminowe (najgorsze w odniesieniu do choroby małych naczyń [10]),
- odmienna profilaktyka w odniesieniu do poszczególnych etiologii udaru niedokrwiennego mózgu, np. konieczność włączenia leczenia przeciwpłytkowego zamiast przeciwpłytkowego w większości przyczyn udaru sercowozatorowego, wykonanie endarterektomii tętnicy szyjnej wewnętrznej w przypadku choroby dużych naczyń [11,12],

- odmienny profil powikłań, np. częstsze występowanie złośliwego zespołu tętnicy środkowej mózgu wskutek gwałtownie narastającego obrzęku mózgu u pacjentów z udarem sercowozatorowym [13].

We wspomnianym wyżej badaniu przeprowadzonym wśród pacjentów leczonych w Oddziale Udarowym Kliniki Neurologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie po raz pierwszy podzielono niejednorodną kategorię udaru sercowozatorowego, wyodrębniając dwie podgrupy: pacjenci z udarem sercowozatorowym wywołanym migotaniem przedsionków oraz niezwiązanym z tą arytmia mięśnia sercowego [5]. W tak skonstruowanym badaniu wykazano, że spośród polimorfizmów na chromosomie 4q25 poddanych analizie, polimorfizm rs2200732, synonimiczny do rs2200733, oraz polimorfizm rs13143308 są niezależnymi czynnikami ryzyka udaru sercowozatorowego wywołanego migotaniem przedsionków w populacji polskiej. Związek polimorfizmu rs2200732 z udarem sercowozatorowym wywołanym migotaniem przedsionków był pozytywny we wszystkich analizowanych modelach, natomiast związek wariantu rs13143308 wykazano w modelu addytywnym i w modelu regresji logistycznej wykonanym na allelach po uwzględnieniu korekty Bonferroniego. Nie udowodniono natomiast związku żadnego z polimorfizmów na chromosomie 4q25 z udarem sercowozatorowym spowodowanym innym sercowopochodnym źródłem zatorowości niż migotanie przedsionków [5]. Co więcej, różnica pomiędzy dwiema podgrupami udaru sercowozatorowego dotyczyła także dystrybucji konwencjonalnych czynników ryzyka. Okazało się, że pacjenci z udarem sercowozatorowym wywołanym migotaniem przedsionków byli starsi ($p=0,001$), w tej podgrupie więcej było kobiet ($p=0,001$), natomiast chorzy z udarem sercowozatorowym niezwiązanym z tą arytmia częściej przebyli w przeszłości zawału serca ($p=0,001$) i częściej stwierdzano u nich hipercholesterolemię ($p=0,004$) [5].

W dotychczas przeprowadzonych badaniach nad związkiem udaru sercowozatorowego z polimorfizmami na chromosomie 4q25 analizowano tę etiologię udaru niedokrwiennego mózgu jako całość. Być może dlatego nie wykazano związku tych polimorfizmów z udarem sercowozatorowym w populacji chińskiej w przeciwieństwie do populacji europejskich [4]. W przedstawionej wyżej pracy dokonano podziału w obrębie niejednorodnej kategorii udaru sercowozatorowego na dwie podgrupy w kontekście obecności migotania przedsionków jako czynnika sprawczego udaru; wyróżniono udar sercowozatorowy wywołany migotaniem przedsionków oraz niezwiązany z tą arytmia, a spowodowany innym

sercowopochodnym źródłem zatorowości. W niniejszym badaniu wykazano heterogenność w odniesieniu do profilu zarówno naczyniowych, jak i genetycznych czynników ryzyka w obrębie tej jednej etiologii udaru niedokrwiennego mózgu. To odkrycie jasno pokazuje słabość klasyfikacji TOAST w odniesieniu do genetyki i epidemiologii udaru mózgu. Okazuje się bowiem, że pacjenci z poszczególnymi źródłami zatorowości różnią się od siebie profilem naczyniowych i genetycznych czynników ryzyka, co czyni podgrupę udaru sercowozatorowego niejednorodną. Z tego też powodu poszukuje się nowych sposobów klasyfikacji udaru niedokrwiennego mózgu, jak choćby klasyfikacja CCS (ang. Causative Classification of Stroke System) bądź też klasyfikacja ASCO (ang. Atherothrombosis, Small-vessel disease, Cardiac causes, and Other common causes) [14].

W przedstawionej wyżej pracy nie stwierdzono natomiast, aby polimorfizm rs2200732 na chromosomie 4q25 był czynnikiem ryzyka udaru kryptogennego. Uzyskany wynik badania pozostaje w sprzeczności z wcześniejszym doniesieniem badaczy islandzkich z 2008 roku [2]. Autorzy tego badania przypuszczali bowiem, że u części pacjentów, u których nie udaje się ustalić etiologii udaru niedokrwiennego mózgu, przyczyną zachorowania może być napadowe migotanie przedsionków. Jest ono trudne do wykrycia w jednorazowym, a nawet powtarzanym badaniu EKG, dlatego też w znacznej części przypadków pozostaje niewykryte. Polimorfizmy na chromosomie 4q25 są związane z tą arytmia mięśnia sercowego [1], a zatem częstsze występowanie wariantów ryzyka w grupie osób z udarem kryptogennym mogłoby świadczyć o współistniejącym napadowym migotaniu przedsionków u tych chorych, lecz na poziomie subklinicznym – trudnym do wykrycia przy użyciu dostępnych metod diagnostycznych [2]. Przytoczona już jednak analiza pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu autorstwa Lemmensa i wsp. wykazała, że związek polimorfizmów na chromosomie 4q25 ogranicza się wyłącznie do pacjentów z udarem sercowozatorowym [3]. Niemniej jednak istnieją doniesienia, że ok. 9% pacjentów z udarem kryptogennym stanowią osoby z napadowym migotaniem przedsionków, co – w przypadku wykrycia tej arytmii – powinno skutkować przekwalifikowaniem udaru do etiologii sercowozatorowej [15]. W związku z tym w ostatniej przytoczonej pracy podjęto również próbę wykrycia napadowego migotania przedsionków poprzez jednokrotne 24-godzinne monitorowanie Holter EKG u chorych z udarem niedokrwiennym mózgu. W ten sposób wykazano, że aż u 11,3% pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu bez wywiadu w kierunku wcześniejszego migotania przedsionków oraz

u 14,8% chorych z udarem kryptogennym dzięki jednokrotnemu 24-godzinnemu badaniu Holter EKG udało się wykryć niestwierdzone wcześniej napadowe migotanie przedsionków. Szczegółowa analiza genetycznych czynników ryzyka nie wykazała jednak, aby którykolwiek z polimorfizmów na chromosomie 4q25 był związany z nowowykrytym napadowym migotaniem przedsionków. Może to wynikać z faktu, że grupa pacjentów z udarem kryptogennym z potwierdzonym w badaniu Holter EKG migotaniem przedsionków liczyła zaledwie 22 chorych i była prawie sześciokrotnie mniejsza niż grupa pacjentów z udarem kryptogennym z niepotwierdzoną arytmia mięśnia sercowego w badaniu Holter EKG (N=127). Poza tym wydaje się, że istnieją pewne określone cechy kliniczne, z którymi wiąże się ryzyko wystąpienia napadowego migotania przedsionków, jak choćby wiek powyżej 55 roku życia, większa liczba zmian ostrych w badaniach neuroobrazowych, szczególnie o umiejscowieniu korowym [15] oraz lokalizacja udaru w przednim kręgu unaczynienia [16]. W tym miejscu warto wspomnieć, że wyniki przedstawionego badania w populacji polskiej pokrywają się z badaniami Al-hadramy i wsp., a mianowicie średnia wieku chorych z udarem kryptogennym i nowowykrytym migotaniem przedsionków była wyższa (73,8 lat) w porównaniu do wszystkich pozostałych etiologii udaru, znaczna większość tych pacjentów (73,9%) doznawała również udaru z przedniego kręgu unaczynienia [5].

Na zakończenie powyższych rozważań warto dodać, że dotychczas nie są znane patofizjologiczne mechanizmy, poprzez które opisane warianty genetyczne na chromosomie 4q25 zwiększałyby ryzyko wystąpienia migotania przedsionków oraz udaru sercowozatorowego. W obrębie bloku zawierającego polimorfizmy rs2200733, rs10033464 i rs13143308 nie znaleziono dotychczas żadnego genu [1]. Najbliżej omawianych wariantów znajduje się gen PITX2. Białko kodowane przez ten gen, a będące homeodomeną czynnika transkrypcyjnego 2, jest bardzo interesującym kandydatem na czynnik ryzyka migotania bądź trzepotania przedsionków, ponieważ jest zaangażowane w rozwój ontogenetyczny mięśnia sercowego poprzez regulowanie jego asymetrycznej morfogenezy [17]. Mutacje w tym genie zostały również powiązane z zespołem

Axenfeld-Rieger, rzadkim dziedzicznym autosomalnie dominującym zaburzeniem, które objawia się wrodzonymi malformacjami dotyczącymi przedniego odcinka oka [18]. Co więcej, omawiany gen i jego białkowy produkt pełnią kluczową rolę w rozwoju ontogenetycznym miokardium lewego przedsionka oraz żył płucnych [19]. Ten szczególny rejon mięśnia sercowego ma znaczenie w inicjacji i podtrzymaniu arytmii, jaką jest migotanie przedsionków [20]. Jednakże, analiza mutacji w tym genie u pacjentów z migotaniem przedsionków nie wykazała obecności genetycznych wariantów ryzyka w całej kodującej sekwencji [21]. O możliwym znaczeniu wariantów na chromosomie 4q25 w patofizjologii migotania przedsionków może natomiast świadczyć obserwacja, że warianty rs2200733 i rs10033464 modulują ryzyko nawrotu migotania przedsionków po zabiegu ablacji, wykonywanym przy pomocy wewnątrznaczyniowego cewnika [22]. Nie wiadomo jednak nadal, jaką dokładnie rolę odgrywa region z badanymi polimorfizmami, czy jest on np. wzmacniaczem (ang. enhancer) sąsiednich sekwencji [5]. W każdym razie konieczne są dalsze intensywne badania w tym zakresie.

Podsumowując, warianty genetyczne na chromosomie 4q25 są czynnikami ryzyka udaru sercowozatorowego, przy czym ich znaczenie wydaje się ograniczać jedynie do podgrupy udaru sercowozatorowego wywołanego migotaniem przedsionków. Prawdopodobnie żadna inna przyczyna zatorowości sercowo-pochodnej (z wyjątkiem trzepotania przedsionków, które w ok. 75% przypadków współistnieje z migotaniem przedsionków) nie jest związana z częstszym występowaniem alleli ryzyka polimorfizmów na chromosomie 4q25. Dalsze intensywne badania nad znaczeniem tych polimorfizmów u pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu pozwolą zapewne w przyszłości wyodrębnić chorych, u których zaistnieją wskazania do pogłębionej diagnostyki kardiologicznej w celu wykrycia napadowego migotania przedsionków. Stwierdzenie tej arytmii mięśnia sercowego jest bowiem wskazaniem do wprowadzenia leczenia przeciwkrzepliwego doustnymi antykoagulantami jako prewencji wtórnej udaru niedokrwiennego mózgu. Taka forma terapii w porównaniu z leczeniem przeciwplatekowym, stosowanym w pozostałych przypadkach, zmniejsza ryzyko udaru niedokrwiennego mózgu o ok. 40% [23].

Piśmiennictwo:

1. Gudbjartsson DE, Arnar DO, Helgadóttir A i wsp.: Variants conferring risk of atrial fibrillation on chromosome 4q25. *Nature*, 2007; 448: 353–7
2. Gretarsdóttir S, Thorleifsson G, Manolescu A i wsp.: Risk variants for atrial fibrillation on chromosome 4q25 associate with ischemic stroke. *Ann Neurol*, 2008; 64: 402–9

3. Lemmens R, Buysschaert I, Geelen V i wsp.; International Stroke Genetics Consortium: The association of the 4q25 susceptibility variant for atrial fibrillation with stroke is limited to stroke of cardioembolic etiology. *Stroke*, 2010; 41: 1850–7 *Publikacja powstała w wyniku realizacji grantu Naukowej Fundacji Polpharmy*
4. Shi L, Li C, Wang C i wsp.: Assessment of association of rs2200733 on chromosome 4q25 with atrial fibrillation and ischemic stroke in a Chinese Han population. *Hum Genet*, 2009; 126: 843–9
5. Wnuk M: Wpływ polimorfizmów na chromosomie 4q25 związanych z migotaniem przedsionków na ryzyko wystąpienia udaru niedokrwienego mózgu w populacji polskiej. Praca doktorska. Kraków, 2011. Promotor: Prof. dr hab. med. Agnieszka Słowik *Praca zawiera wyniki badań realizowanych dzięki grantowi Naukowej Fundacji Polpharmy*
6. Jackson C, Sudlow C: Are lacunar strokes really different? A systematic review of differences in risk factor profiles between lacunar and nonlacunar infarcts. *Stroke*, 2005; 36: 891–901
7. Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ i wsp.: Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*, 1993; 24: 35–41
8. Gschwendtner A, Bevan S, Cole JW i wsp.; International Stroke Genetics Consortium: Sequence variants on chromosome 9p21.3 confer risk for atherosclerotic stroke. *Ann Neurol*, 2009; 65: 531–9
9. Kolominsky-Rabas PL, Weber M, Gefeller O i wsp.: Epidemiology of ischemic stroke subtypes according to TOAST criteria: incidence, recurrence, and long-term survival in ischemic stroke subtypes: a population-based study. *Stroke*, 2001; 32: 2735–40
10. Melkas S, Putaala J, Oksala NK i wsp.: Small-vessel disease relates to poor poststroke survival in a 12-year follow-up. *Neurology*, 2011; 76: 734–9
11. Ringleb PA, Bousser MG, Ford G i wsp.; European Stroke Organisation (ESO) Executive Committee; ESO Writing Committee: Guidelines for management of ischaemic stroke and transient ischaemic attack 2008. *Cerebrovasc Dis*, 2008; 25: 457–507
12. Furie KL, Kasner SE, Adams RJ i wsp.; American Heart Association Stroke Council, Council on Cardiovascular Nursing, Council on Clinical Cardiology, and Interdisciplinary Council on Quality of Care and Outcomes Research. Guidelines for the prevention of stroke in patients with stroke or transient ischemic attack: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, 2011; 42: 227–76
13. Jaramillo A, Gongora-Rivera F, Labreuche J i wsp.: Predictors for malignant middle cerebral artery infarctions: a postmortem analysis. *Neurology*, 2006; 66: 815–20
14. Ay H: Advances in the diagnosis of etiologic subtypes of ischemic stroke. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2010; 10: 14–20
15. Alhadramy O, Jeerakathil TJ, Majumdar SR i wsp.: Prevalence and predictors of paroxysmal atrial fibrillation on Holter monitor in patients with stroke or transient ischemic attack. *Stroke*, 2010; 41: 2596–600
16. Gaillard N, Deltour S, Vilotijevic B i wsp.: Detection of paroxysmal atrial fibrillation with transtelephonic EKG in TIA or stroke patients. *Neurology*, 2010; 74: 1666–70
17. Franco D, Campione M: The role of Pitx2 during cardiac development. Linking left-right signaling and congenital heart diseases. *Trends Cardiovasc Med*, 2003; 13: 157–63
18. Tümer Z, Bach-Holm D: Axenfeld-Rieger syndrome and spectrum of PITX2 and FOXC1 mutations. *Eur J Hum Genet*, 2009; 17: 1527–39
19. Mommersteeg MT, Brown NA, Prall OW i wsp.: Pitx2c and Nkx2-5 are required for the formation and identity of the pulmonary myocardium. *Circ Res*, 2007; 101: 902–9
20. Haïssaguerre M, Jaïs P, Shah DC i wsp.: Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *N Engl J Med*, 1998; 339: 659–66
21. Boldt LH, Posch MG, Perrot A i wsp.: Mutational analysis of the PITX2 and NKX2-5 genes in patients with idiopathic atrial fibrillation. *Int J Cardiol*, 2010; 145: 316–7
22. Husser D, Adams V, Piorkowski C i wsp.: Chromosome 4q25 variants and atrial fibrillation recurrence after catheter ablation. *J Am Coll Cardiol*, 2010; 55: 747–53
23. Hart RG, Pearce LA, Aguilar MI: Meta-analysis: antithrombotic therapy to prevent stroke in patients who have nonvalvular atrial fibrillation. *Ann Intern Med*, 2007; 146: 857–67

W poszukiwaniu biomarkerów dla tętniaków wewnątrzczaszkowych – rola analizy profili ekspresji genów w komórkach krwi obwodowej

In quest of biomarkers for intracranial aneurysms – role of analysis of gene expression profiles in peripheral blood cells

Joanna Pera

Zakład Neurogenetyki, Katedra Neurologii Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

Naukowa Fundacja Polpharmy w 2009 roku przyznała zespołowi pracującemu pod kierunkiem dr Joanny Pery grant na realizację projektu badawczego pt. *W poszukiwaniu biomarkerów dla tętniaków wewnątrzczaszkowych – analiza profili ekspresji genów w komórkach krwi obwodowej*.

Streszczenie

Pęknięcie tętniaka wewnątrzczaszkowego jest najczęstszą przyczyną nieurazowego krwotoku podpajęczynówkowego. Niestety, krwotok podpajęczynówkowy jest też najgorszą manifestacją kliniczną tętniaka wewnątrzczaszkowego. Biorąc pod uwagę katastrofalne skutki medyczne, społeczne i ekonomiczne krwotoku podpajęczynówkowego, niezwykle ważnym problemem jest możliwość nieinwazyjnej identyfikacji osób posiadających tętniaka wewnątrzczaszkowego, a szczególnie osób zagrożonych pęknięciem tej malformacji, jak również określenia rokowania u chorych z pękniętym tętniakiem. W chwili obecnej nie ma żadnych znanych biomarkerów dostępnych dzięki badaniu krwi, które by temu służyły. Wyniki badań dotyczących innych schorzeń układu naczyniowego i układu nerwowego wskazują, że analiza ekspresji genów w komórkach krwi obwodowej pozwala na określenie specyficznego dla danego schorzenia profilu ekspresji genów. Bardzo użytecznym narzędziem badawczym są mikromacierze DNA. W niniejszej pracy przedstawiono aktualne dane dotyczące roli mikromacierzy w poszukiwaniu biomarkerów chorób układu krążenia i układu nerwowego, w tym tętniaków wewnątrzczaszkowych.

Słowa kluczowe: tętniaki wewnątrzczaszkowe • krew • ekspresja genów • mikromacierze • biomarkery

Summary

Rupture of an intracranial aneurysm is the most common cause of a non-traumatic subarachnoid hemorrhage. Unfortunately, subarachnoid hemorrhage is the worst clinical presentation of an intracranial aneurysm. The medical, social, and economic consequences of the subarachnoid hemorrhage are catastrophic. Thus, it is extremely important to find a non-invasive method to identify persons with an intracranial aneurysm, persons with an increased risk of aneurysm rupture, and to predict the outcome in patients with a ruptured malformation. So far, there are no recognized biomarkers available from a blood test, which would be suitable for these purposes. Results of the studies on cardiovascular and neurological disorders demonstrated that an analysis of gene expression in peripheral blood cells allows identifying gene expression profiles specific for a given disorder. A microarray technique is particularly helpful as a screening tool. This article presents the current data on the role of the microarray method in searching for biomarkers of cardiovascular and neurological disorders including intracranial aneurysms.

Key words: intracranial aneurysms • blood • gene expression • microarrays • biomarkers

Wpłynęło: 14-02-2012
Zaakceptowano: 19-03-2012
Opublikowano: 10-08-2012

Adres do korespondencji:
dr n. med. Joanna Pera,
Zakład Neurogenetyki,
Katedra Neurologii UJ CM,
ul. Botaniczna 3,
31-503 Kraków,
e-mail: pera@su.krakow.pl

WSTĘP

Workowate tętniaki wewnątrzczaszkowe są dość powszechną malformacją naczyniową. Częstość ich występowania w populacji ogólnej wynosi ok. 1–6% [1]. Obraz kliniczny związany z obecnością tętniaków jest bardzo zróżnicowany: od ich całkowicie bezobjawowego charakteru poprzez bóle głowy, objawy związane z efektem masy (objawy porażenia nerwów czaszkowych, zaburzenia mowy, niedowład) aż do najgroźniejszego stanu – krwotoku podpajęczynówkowego będącego skutkiem pęknięcia tętniaka. Ten rodzaj udaru krwotocznego mózgu cechuje się szczególnie poważnym rokowaniem. Roczna zapadalność wynosi ok. 8–10 osób na 100000 osobo-lat. Pomimo znacznego postępu medycyny, śmiertelność w krwotoku podpajęczynówkowym pozostaje bardzo wysoka: 32–67%, a ok. 15% chorych umiera przed przyjęciem do szpitala [2]. Wielu spośród tych, którzy przeżyli, ma neurologiczne objawy ubytkowe (niedowłady, zaburzenia funkcji poznawczych) – według Pritchard i wsp. tylko u niespełna 25% pacjentów można oczekiwać powrotu do dobrego stanu klinicznego [3]. Co równie istotne, nieurazowy krwotok podpajęczynówkowy, którego najczęstszą przyczyną (80%) jest właśnie pęknięcie tętniaka wewnątrzczaszkowego, dotyczy głównie osób w wieku średnim, co dodatkowo zwiększa koszty społeczne i ekonomiczne opieki nad chorymi. Pęka średnio co dziesiąty tętniak, a większość tych malformacji pozostaje bezobjawowa do końca życia. W obecnej chwili nie dysponujemy jednak, żadnymi metodami precyzyjnego przewidywania losów tętniaków już stwierdzonych.

O molekularnych mechanizmach powstawania, wzrostu i pęknięcia tętniaków wewnątrzczaszkowych wiadomo zaskakująco mało. Niewiele jest opublikowanych wyników badań przeprowadzonych na materiale pochodzenia ludzkiego. Nie ma żadnych znanych biomarkerów pozwalających na identyfikację osób z tętniakiem wewnątrzczaszkowym. Nie ma także żadnych biomarkerów pozwalających na określenie, która, spośród osób posiadających tętniaka, jest szczególnie zagrożona pęknięciem tej malformacji. Dotychczas określone czynniki ryzyka wzrostu, czy pęknięcia tętniaka (m.in.: wiek, nadciśnienie tętnicze, palenie papierosów, nadużywanie alkoholu) są w istocie czynnikami ryzyka wspólnymi dla różnych schorzeń układu naczyniowego. Niewiele jest znanych czynników ryzyka bardziej specyficznych dla tętniaków wewnątrzczaszkowych. Są to m.in.: płeć żeńska (ryzyko względne pęknięcia, $RR=2,1$), wiek (>60 r.ż., $RR=1,7$), wielkość tętniaka (>1 cm, $RR=5,5$), lokalizacja w tylnym kręgu unaczynienia mózgu ($RR=4,1$) [1]. Obecnie stwierdzenie obecności tętniaka wewnątrzczaszkowego

jest możliwe albo w momencie jego pęknięcia powodującego krwotok podpajęczynówkowy, albo przypadkowo podczas badania radiologicznego, albo w badaniu *post mortem*. Bardzo rzadko tętniaki niepęknięte dają objawy kliniczne. Samo wykrycie tętniaka, który jest klinicznie niemy, stawia lekarza przed bardzo trudnymi pytaniami: Czy leczyć? Jeżeli tak, to kiedy? Jaką metodą? Statystycznie, pęka 10% tętniaków, ale obecny stan wiedzy nie pozwala w konkretnym przypadku przewidzieć czy i kiedy to nastąpi. Dostępne metody leczenia operacyjnego i wewnątrznaczyniowego są obarczone ryzykiem powikłań, ze zgonem włącznie. Nic więc dziwnego, że pomijając przypadki rodzinnych tętniaków, wykonywanie badań naczynioobrazujących (angiografia rezonansu magnetycznego, tomografii komputerowej, angiografia klasyczna) jako przesiewowych na obecność tętniaka wewnątrzczaszkowego nie jest obecnie akceptowalne. Tak więc, znalezienie biomarkera(ów) obecności i pęknięcia tętniaków miałyby olbrzymie znaczenie praktyczne i dla lekarzy, i dla chorych.

BIOMARKERY TETNIAKÓW

WEWNĄTRZCZASZKOWYCH – STAN OBECNY

Nie ma żadnych uznanych biomarkerów, a w szczególności nie ma żadnych biomarkerów dostępnych dzięki badaniu płynów ustrojowych, w tym krwi, które byłyby pomocne w rozpoznaniu obecności tętniaka wewnątrzczaszkowego, pozwalałyby prognozować jego dalsze losy, czy miały rokownicze znaczenie dla chorych z pękniętym tętniakiem, czyli z krwotokiem podpajęczynówkowym. W pojedynczych doniesieniach dotyczących tętniaków niepękniętych sygnalizowano m.in. wyższy iloraz stężeń dwóch enzymów proteolitycznych elastaza: $\alpha 1$ -antychymotrypsyna (SERPINA3) w surowicy chorych z tętniakami pękniętymi ($n=41$) i niepękniętymi ($n=19$) w porównaniu z grupą kontrolną ($n=27$) [4], czy wyższe stężenie Lp(a) u osób z niepękniętym tętniakiem o rodzinnym występowaniu [5]. Natomiast w pracach poświęconych tętniakom pękniętym dominują dwa kierunki badań: pierwszy – poświęcony markerom uszkodzenia mózgu oraz drugi – koncentrujący się na odpowiedzi zapalnej i roli układu immunologicznego. W pierwszym przypadku, wiele wyników przemawia za przydatnością pomiaru stężenia białka S100B we krwi, którego wzrost związany z uszkodzeniem bariery krew–mózg i uszkodzeniem tkanki nerwowej jest czynnikiem niekorzystnym rokowniczo [6–8]. Również niekorzystne prognostycznie znaczenie wydaje się mieć wzrost stężenia we krwi ufosforylowanej postaci aksonalnej większej podjednostki neurofilamentu NF-H (pNF-H, ang. *phosphorylated axonal form of the major neurofilament subunit*) [9].

Jeśli chodzi o odpowiedź zapalną, to wiadomo, że towarzyszy ona krwotokowi podpajęczynówkowemu, natomiast żadna z cząsteczek biorących udział w zapaleniu, nie zyskała znaczenia jako czynnik o pewnym znaczeniu rokowniczym [10–12]. Niejednoznaczne są na przykład dane dotyczące cząstek adhezyjnych ICAM-1 (ang. *intercellular adhesion molecule-1*) i VCAM-1 (ang. *vascular adhesion molecule-1*), czy selektyn E, P, L jako potencjalnych markerów prognostycznych [13–17]. Co do odpowiedzi immunologicznej, to opublikowane pojedyncze prace wskazują, że w wyniku krwotoku podpajęczynówkowego dochodzi do immunodepresji. Stwierdzono m.in. spadek liczby limfocytów T i zmniejszenie ich proliferacji w odpowiedzi na konkawalinę A, kolagen IV, fibronektynę oraz zmniejszenie produkcji interferonu γ w odpowiedzi na konkawalinę A [18,19].

Porównując te dane z inną patologią dotyczącą dużego naczynia tętniczego, a polegającą również na naruszeniu ciągłości ściany naczyniowej – rozwarstwieniu aorty, wiedza na temat potencjalnych biomarkerów tętniaków wewnątrzczaszkowych jest uboga. Dla rozwarstwienia aorty zostały już bowiem zidentyfikowane pewne biomarkery pomocne w postawieniu rozpoznania i oceny rokowania. I tak, jako markery przydatne w diagnostyce proponuje się pomiar stężeń we krwi: białka C-reaktywnego (CRP), niektórych metaloproteinaz (MMPs), rozpuszczalnych fragmentów elastyny (sELAF), D-dimerów, łańcuchów ciężkich miozyny mięśni gładkich, wielkiej endoteliny-1 (Big ET-1), N-końcowego propeptydu natriuretycznego (NT-proBNP), kalponiny. Z kolei za przydatne w celach prognostycznych uważa się pomiar stężenia we krwi: CRP, NT-proBNP, D-dimerów, Big ET-1 [20].

W POSZUKIWANIU BIOMARKERÓW – ANALIZA EKSPRESJI GENÓW W KOMÓRKACH KRWI OBWODOWEJ

Wyniki dotychczas opublikowanych badań w innych schorzeniach układu naczyniowego czy układu nerwowego wskazują, że analiza ekspresji genów w komórkach krwi obwodowej pozwala na określenie specyficznego, dla danego schorzenia, profilu ekspresji genów. Bardzo użytecznym narzędziem badawczym okazały się tu mikromacierze DNA, które umożliwiają jednoczasową analizę dziesiątek tysięcy transkryptów. Tego rodzaju badania zostały przeprowadzone w m.in.: kardiomiopatii rozstrzeniowej [21], chorobie niedokrwiennej serca [22,23], stwardnieniu rozsianym [24], chorobie Huntingtona [25]. W przypadku udaru niedokrwinnego mózgu badanie ekspresji genów w komórkach krwi obwodowej ujawniło istnienie różnic nie tylko

u chorych z udarem w porównaniu z osobami zdrowymi [26], ale także odmienne profile transkrypcji w przypadku różnych etiologii udaru: miażdżycowo-zakrzepowa vs. sercowo-zatorowa [27], udar lakunarny vs. nie-lakunarny [28].

Jeśli chodzi o analizę globalnych profili ekspresji genów w komórkach krwi obwodowej w tętniakach w ogóle, to opublikowano dotąd wyniki tylko jednego badania dotyczącego tętniaków aorty piersiowej [29] i jednego dotyczącego tętniaków aorty brzusznej [30]. W pierwszej pracy zidentyfikowano 41 genów (w przypadku 17 genów poziom ekspresji był wyższy u chorych z tętniakiem), w oparciu o które stworzono model pozwalający na przewidywanie obecności tętniaka aorty piersiowej u konkretnej osoby. Dla analiz profilu ekspresji za pomocą mikromacierzy dokładność, czułość i specyficzność tego modelu wynosiły odpowiednio: 78%, 72% i 90%, a dla analiz za pomocą ilościowego RT-PCR analogiczne wartości wyniosły: 80%, 71% i 100%. Jeśli chodzi o klasyfikację funkcjonalną wybranego zestawu genów, to odmienną ekspresję stwierdzono dla genów związanych z przekazywaniem (interleukin, czynnika wzrostu fibroblastów [FGF], endoteliny), aktywacją limfocytów T, apoptozą. W drugiej ze wspomnianych prac, różnice ekspresji w stosunku do grupy kontrolnej stwierdzono dla 91 genów, z których 76 miało wyższy poziom transkrypcji u chorych z tętniakami. Porównując geny sygnatrowe dla tętniaków aorty piersiowej i te o odmiennej ekspresji u chorych z tętniakami aorty brzusznej nie stwierdza się żadnych genów wspólnych dla obu tych lokalizacji tętniaków. Jednak w obu badaniach, prowadzonych na różnych populacjach, używano różnych mikromacierzy (Applied Biosystems i Operon Technologies) i nieco odmiennych metod analizy statystycznej, co w konsekwencji utrudnia bezpośrednie porównanie uzyskanych wyników.

Co do badań dotyczących transkryptomiki komórek krwi obwodowej w kontekście wewnątrzczaszkowych malformacji naczyniowych, to jedyne, jak dotąd, opublikowane badanie dotyczy mózgowych malformacji tętniczo-żylnych [31]. W badaniu tym analizowano globalne profile ekspresji genów w komórkach krwi u n=20 chorych z malformacjami niepękniętymi, n=20 chorych z malformacjami pękniętymi oraz n=20 osób stanowiących grupę kontrolną. Przy czym kategoryzacja na malformacje pęknięte i niepęknięte była oparta o obecność albo brak cech świeżego krwawienia w badaniu neuroobrazującym (TK, MRI) w trakcie włączania pacjenta do badania. Nie wiadomo natomiast, by brano pod uwagę dane z przeszłości dotyczące ewentualnego krwawienia. Oznacza to, że część osób spośród chorych zakwalifikowanych jako

Tabela 1. Stan wiedzy w chwili rozpoczęcia projektu – ekspresja genów w komórkach krwi obwodowej u osób z tętniakami.

Rodzaj patologii	Liczność grup (mikromacierze + tylko qPCR)	Ekspresja genów – podsumowanie	Ref.
Tętniaki aorty piersiowej	Z tętniakiem n=58 Kontrolna n=36	41 genów o odmiennej ekspresji w porównaniu z grupą kontrolną (17 genów o wyższej ekspresji); wg analizy funkcjonalnej geny związane z przekazywaniem komórkowym (interleukiny, bFGF, endotelina); aktywacją limfocytów T; apoptozą	29
Tętniaki aorty brzusznej	Z tętniakiem n=10 + 36 Kontrolna n=10 + 36	91 genów o odmiennej ekspresji w porównaniu z grupą kontrolną (76 genów o wyższej ekspresji)	30
Tętniaki wewnątrzczaszkowe	Brak opublikowanych danych		

Ref. oznacza pozycję w piśmiennictwie.

posiadający malformacje niepęknięte mogła kiedyś doświadczyć już krwotoku z malformacji. Przy aktualnym poziomie wiedzy na temat patobiologii malformacji i odpowiedzi systemowej na krwotok z pękniętej malformacji, nie można jednoznacznie ocenić wpływu ewentualnego krwawienia w przeszłości na profile ekspresji genów w komórkach krwi. Porównując malformacje pęknięte z niepękniętymi, stwierdzono różnice w poziomie ekspresji 1490 genów, a po uwzględnieniu innych zmiennych (wiek, płeć, czynnik etniczny) – 493 genów. Dalsza analiza funkcjonalna ujawniła, że wyższa ekspresja w krwawiących czynnie malformacjach dotyczyła genów związanych z cytotoksycznością komórek NK (natural killer), przekazywaniem w limfocytach T, czy obróbką i prezentacją antygenów oraz niektórymi szlakami metabolicznymi. Z kolei porównując osoby z malformacjami niepękniętymi z grupą kontrolną, różnica ekspresji dotyczyła 29 genów, a po uwzględnieniu w analizie innych zmiennych – dla żadnego genu nie stwierdzono znamiennych różnic.

W Tabeli 1 zamieszczono podsumowanie stanu wiedzy na temat transkryptomiki z komórek krwi obwodowej w tętniakach tętnic w chwili rozpoczęcia projektu badawczego finansowanego przez Naukową Fundację Polpharmy. Jak widać, były wtedy opublikowane tylko 2 prace, w dodatku dotyczące tętniaków aorty. Nie było żadnych danych o malformacjach naczyń mózgowych.

MIKROMACIERZE, KREW I ZNACZENIE PRAKTYCZNE

Na ile użyteczne w praktyce klinicznej mogą być informacje uzyskane w badaniach z zastosowaniem mikromacierzy, których analizowane są globalne profile ekspresji genów w komórkach krwi obwodowej? Na pewno atrakcyjna, z praktycznego punktu widzenia, jest próba zidentyfikowania biomarkera(ów) stanów patologicznych we krwi obwodowej – pobranie krwi żyłnej dla wykonywania badań diagnostycznych jest rutyną. Krew, w tym jej

elementy morfotyczne, krążą po całym organizmie. Wiadomo, że komórki krwi posiadają zdolność reagowania na różne bodźce środowiskowe, fizjologiczne, czy patologiczne. Wspomniane powyżej badania są tego jednoznacznym potwierdzeniem. Jednak, ze względów choćby ekonomicznych, nie-realne jest wykonywanie profilowania za pomocą mikromacierzy u każdego pacjenta. Technikę tę należy traktować jako rodzaj badania przesiewowego, które pozwolić może na identyfikację odmienności profili transkryptomicznych w poszczególnych badanych kohortach, na przykład osoby z tętniakiem vs. osoby bez tętniaka. Ale w oparciu o analizy profili globalnych można wybrać zestaw kilkunastu/kilkudziesięciu genów, w przypadku których różnice w poziomie transkrypcji pozwalają na różnicowanie badanych grup. Są już nawet pierwsze zestawy diagnostyczne, zatwierdzone przez amerykańską agencję FDA (*Food and Drug Administration*), oparte właśnie o badanie poziomu ekspresji genów w pełnej krwi: AlloMap przeznaczony do monitorowania chorych po przeszczepie serca i ocenie ryzyka odrzutu (zamiast inwazyjnej biopsji endomiokardium) [32], Corus® CAD przeznaczony do oceny ryzyka choroby niedokrwiennej serca (ryzyka niedrożności naczyń wieńcowych) [33–34]. Z kolei w 10 krajach europejskich zostały dopuszczone do obrotu inne 2 testy: BCtect – dla wczesnego wykrywania raka piersi i ADtect – dla wykrywania wczesnej postaci choroby Alzheimer. Wszystkie te testy były oczywiście walidowane w badaniach wieloośrodkowych [35–37].

GLOBALNE PROFILE EKSPRESJI GENÓW W KOMÓRKACH KRWI A TĘTNIKI WENĄTRZCZASZKOWE

Biorąc pod uwagę, że krążące leukocyty są istotnym elementem odpowiedzi immunologicznej/zapalnej, a miejscowa reakcja zapalna jest jednym z uznanych elementów patofizjologii tętniaków wewnątrzczaszkowych [38], w świetle przedstawionych powyżej wyników badań dotyczących innych schorzeń

układu krążenia i układu nerwowego, można przypuszczać, że analiza globalnych profili ekspresji genów w krwinkach białych z krwi obwodowej przy pomocy mikromacierzy, pozwoli na określenie zmian w transkrypcji specyficznych dla tętniaków wewnątrzczaszkowych.

Wyniki badań własnych, prowadzonych w ścisłej współpracy pomiędzy Kliniką Neurologii UJ CM, Kliniką Neurochirurgii i Neurotraumatologii UJ CM oraz Zakładem Neurofarmakologii Molekularnej IF PAN, a dotyczących analizy globalnych profili ekspresji genów w komórkach krwi obwodowej u osób z tętniakami wewnątrzczaszkowymi z wykorzystaniem techniki mikromacierzy, potwierdzają tę wstępną tezę.

Badanie przeprowadzono na dwóch niezależnych kohortach pacjentów:

- I (mikromacierze i ilościowe RT-PCR) – obejmująca n=43 osób z wewnątrzczaszkowymi tętniakami pękniętymi (RA), n=23 osób z tętniakami niepękniętymi (UA) oraz n=18 osób grupy kontrolnej;
- II (ilościowe RT-PCR) – obejmująca n=15 osób z RA, n=12 osób z UA oraz n=14 osób grupy kontrolnej.

Wszyscy uczestnicy badania byli pacjentami hospitalizowanymi w Klinice Neurologii lub Neurochirurgii i Neurotraumatologii UJ CM w Krakowie. Rozpoznanie tętniaka pękniętego oparte było o rozpoznanie krwotoku podpajęczynówkowego (na podstawie tomografii komputerowej głowy i/lub badania płynu mózgowo-rdzeniowego) oraz stwierdzenia obecności tętniaka wewnątrzczaszkowego w badaniu naczynioobrazującym (angio-TK, angio-MR, cyfrowa angiografia subtrakcyjna). Kwalifikacja do grupy UA – na podstawie stwierdzenia obecności tętniaka w badaniach j/w i negatywnym wywiadzie i wynikach badań w kierunku krwotoku podpajęczynówkowego. Grupa kontrolna rekrutowała się spośród chorych hospitalizowanych z innych przyczyn niż udar mózgu, bez stwierdzonego tętniaka wewnątrzczaszkowego – głównie byli to pacjenci z bólem głowy. Wszyscy badani wyrazili pisemną zgodę na udział w badaniu. Projekt uzyskał zgodę komisji bioetycznej.

Ekspresja genów była mierzona w komórkach krwi obwodowej. W I kohorcie uczestników badania wykonane zostały analizy przy pomocy mikromacierzy oraz – dla wybranej grupy genów za pomocą ilościowej reakcji RT-PCR w czasie rzeczywistym. W II kohorcie pomiary ekspresji zostały wykonane za pomocą tylko ilościowej reakcji RT-PCR (walidacja).

Dane uzyskane w trakcie realizacji projektu można podsumować następująco:

1. Pęknięcie tętniaka zmienia globalne profile ekspresji genów w komórkach krwi obwodowej w relacji do osób grupy kontrolnej. Wzorec tych zmian ma pewne charakterystyczne cechy. W przypadku tętniaków pękniętych (RA) stwierdzono istotny wzrost abundancji poziomów transkryptów charakterystycznych dla monocytów i neutrofilii, przy jednoczesnym spadku poziomów transkryptów charakterystycznych dla limfocytów T. Zmiany te były relatywnie stabilne w czasie, utrzymując się przynajmniej przez kilka dni po pęknięciu tętniaka. Szczególnie wyraźną różnicę kierunków zmian ekspresji pomiędzy ekspresją genów charakterystycznych dla monocytów/neutrofilii a limfocytów obserwowano w przypadku chorych o niekorzystnym rokowaniu. Wyniki te potwierdzają wspomniane wcześniej obserwacje innych badaczy o możliwej immunodepresji w ostrej fazie krwotoku podpajęczynówkowego.
2. W przypadku niepękniętych tętniaków wewnątrzczaszkowych, należy przyjąć, że jest to grupa heterogenna pod względem wzorca ekspresji genów w komórkach krwi obwodowej. Jednak można wyodrębnić wśród nich dwie podgrupy: jedna o profilu ekspresji zbliżonym do osób z pękniętymi tętniakami i druga – podobna do grupy kontrolnej, bez tętniaków. Na tym etapie badań można jedynie przypuszczać, że w grupie z niepękniętymi tętniakami wewnątrzczaszkowymi, te osoby, których profil ekspresji genów jest podobny do profilu osób z pękniętymi tętniakami należą do grupy o wyższym/wysokim ryzyku pęknięcia tętniaka. Szczególną wartość dyskryminacyjną ma tu analiza poziomów ekspresji genów charakterystycznych dla monocytów i limfocytów. Wyższy poziom transkrypcji tych pierwszych, przy równoległym spadku poziomu transkrypcji tych drugich cechował osoby z grupy UA o profilu ekspresji podobnym do grupy RA i być może właśnie zagrożonych pęknięciem tętniaka. Przyjmując taką interpretację można z kolei przypuszczać, że brak istotnych różnic w profilu ekspresji genów w porównaniu z grupą kontrolną może wskazywać na „łagodny” charakter malformacji i niższe ryzyko krwotoku podpajęczynówkowego. Oczywiście na tym etapie badań rozważania te mają charakter spekulacji. Weryfikacja tej hipotezy wymaga prospektywnego badania obserwacyjnego grupy osób z obecnym niepękniętym tętniakiem wewnątrzczaszkowym. Badanie takie powinno obejmować, prócz analizy transkryptomicznej, zaawansowane metody neuroobrazowania i angioobrazowania, analizę histochemiczną i immunohistochemiczną (w przypadku operacyjnego zaopatrzenia tętniaka), a przede

Tabela 2. Co przyniosła realizacja grantu Naukowej Fundacji Polpharmy – ekspresja genów w komórkach krwi obwodowej u osób z tętniakami wewnątrzczaszkowymi.

Rodzaj patologii	Liczebność grup (mikromacierze + tylko qPCR)	Ekspresja genów – podsumowanie
Tętniaki pęknięte vs. grupa kontrolna	n=43 + 15 n=18 + 14	Wyższa ekspresja genów charakterystycznych dla monocytów i neutrofilii, niższa ekspresja genów charakterystycznych dla limfocytów T Wskaźnik LM (lymphocyte to monocyte index) wyliczony w oparciu o poziom ekspresji 14 genów charakterystycznych dla monocytów i limfocytów T istotnie niższy u osób z pękniętymi tętniakami; istotnie niższy u chorych, którzy zmarli
Tętniaki niepęknięte vs. tętniaki pęknięte vs. grupa kontrolna	n=43 + 15 n=23 + 12 n=18 + 14	Heterogenność profili ekspresji genów u osób z tętniakami niepękniętymi – 2 zasadnicze wzorce: (1) podobny do tętniaków pękniętych i (2) podobny do grupy kontrolnej Wskaźnik LM pozwalający na rozróżnienie tych dwóch wzorców ekspresji Hipoteza, że osoby z tętniakiem niepękniętym o profilu ekspresji podobnym do pękniętych malformacji mogą mieć wyższe ryzyko pęknięcia tętniaka

wszystkim długoterminową obserwację dla określenia losów pacjenta [manuskrypty zawierające wyniki uzyskane w trakcie realizacji projektu są w przygotowaniu]. Podsumowanie uzyskanych wyników przedstawiono w Tabeli 2.

WNIOSKI

Reasumując, należy stwierdzić, że analiza ekspresji genów w komórkach krwi obwodowej może dostarczyć cennych informacji o patomechanizmach schorzeń układu krążenia i układu nerwowego. Wykorzystanie do badań techniki mikromacierzy, traktowanej jako metody przesiewowej, jest przydatne w poszukiwaniu biomarkerów tych schorzeń użytecznych w diagnostyce lub określaniu rokowania. O praktycznym znaczeniu tego rodzaju badań świadczy dopuszczenie do obrotu komercyjnych zestawów do analizy ekspresji genów we krwi pomocnych w: i) ocenie ryzyka odrzutu przeszczepu serca; ii) ocenie ryzyka choroby wieńcowej; iii) wczesnego wykrycia raka piersi; iv) wczesnego rozpoznania choroby Alzheimera.

Wyniki uzyskane w trakcie realizacji projektu 3/30/VIII/2009 finansowanego przez Naukową Fundację Polpharmy jednoznacznie wskazują, że obecność i stan (pęknięte vs. niepęknięte vs. zagrożone pęknięciem) tętniaka wewnątrzczaszkowego wpływa na

globalne profile ekspresji genów w komórkach krwi obwodowej. Stwierdzone odmienności w tych profilach ekspresji, które układają się w pewne charakterystyczne wzorce, pozwalają zakładać, że realne jest opracowanie biomarkera(ów), czy też testów przydatnych dla identyfikacji osób z tętniakiem wewnątrzczaszkowym zagrożonych pęknięciem tej malformacji. Natomiast w przypadku chorych z tętniakiem pękniętym realne wydaje się opracowanie testu/biomarkera(ów) o wartości rokowniczej dla tej grupy chorych, pozwalających na identyfikację osób wymagających szczególnego nadzoru. Co szczególnie warto podkreślić, test(y)/biomarker(y) byłyby możliwe do wykonania w oparciu o łatwo dostępny materiał biologiczny – krew żylną.

OSOBY BIORĄCE UDZIAŁ W REALIZACJI PROJEKTU BADAWCZEGO

Dr hab. med. Agnieszka Słowik, dr n. med. Tomasz Dziedzic, prof. dr hab. med. Andrzej Szczudlik z Katedry Neurologii UJ CM, Kraków; dr n. med. Tadeusz Krzyszkowski, dr hab. med. Marek Moskała z Kliniki Neurochirurgii i Neurotraumatologii UJ CM, Kraków; dr Michał Korostyński, mgr Marcin Piechota, dr Sławomir Gołda, mgr Jarosław Dzbek, prof. dr hab. Ryszard Przewłocki z Zakładu Neurofarmakologii Molekularnej, Instytut Farmakologii PAN, Kraków.

Piśmiennictwo:

- White PM, Wardlaw JM: Unruptured intracranial aneurysms. J Neuroradiol, 2003; 30: 336–50
- Hop JW, Rinkel GJ, Algra A i wsp.: Case-fatality rates and functional outcome after subarachnoid hemorrhage: a systematic review. Stroke, 1997; 28: 660–4
- Pritchard C, Foulkes L, Lang DA i wsp.: Psychosocial outcomes for patients and carers after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Br J Neurosurg, 2001; 15: 456–63
- Baker CJ, Fiore A, Connolly ES Jr i wsp.: Serum elastase and alpha-1-antitrypsin levels in patients with ruptured and unruptured cerebral aneurysms. Neurosurgery, 1995; 37: 56–61
- Phillips J, Roberts G, Bolger C i wsp.: Lipoprotein (a): a potential biological marker for unruptured intracranial aneurysms. Neurosurgery, 1997; 40: 1112–5

6. Lewis SB, Wolper R, Chi YY i wsp.: Identification and preliminary characterization of ubiquitin C terminal hydrolase 1 (UCHL1) as a biomarker of neuronal loss in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosci Res*, 2010; 88: 1475–84
7. Moritz S, Wernat J, Bele S i wsp.: The prognostic value of NSE and S100B from serum and cerebrospinal fluid in patients with spontaneous subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg Anesthesiol*, 2010; 22: 21–31
8. Turck N, Vutsits L, Sanchez-Pena P i wsp.: A multiparameter panel method for outcome prediction following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Intensive Care Med*, 2010; 36: 107–15
9. Lewis SB, Wolper RA, Miralía L i wsp.: Detection of phosphorylated NF-H in the cerebrospinal fluid and blood of aneurysmal subarachnoid hemorrhage patients. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2008; 28: 1261–71
10. Yoshimoto Y, Tanaka Y, Hoya K: Acute systemic response syndrome in subarachnoid hemorrhage. *Stroke*, 2001; 32: 1989–93
11. Sercombe R, Dinh YR, Gomis P: Cerebrovascular inflammation following subarachnoid hemorrhage. *Jpn J Pharmacol*, 2002; 88: 227–49
12. Sarrafzadeh A, Schlenk F, Gericke C i wsp.: Relevance of cerebral interleukin-6 after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurocrit Care*, 2010; 13: 339–46
13. Nissen JJ, Mantle D, Gregson B i wsp.: Serum concentration of adhesion molecules in patients with delayed ischemic neurological deficit after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: the immunoglobulin and selectin superfamilies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001; 71: 329–33
14. Mack WJ, Mocco J, Hoh DJ i wsp.: Outcome prediction with serum intracellular adhesion molecule-1 levels after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*, 2002; 96: 71–5
15. Frijns CJ, Fijnheer R, Algra A i wsp.: early circulation levels of endothelial cell activation markers in aneurysmal subarachnoid haemorrhage: associations with cerebral ischemic events and outcome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2006; 77: 77–83
16. Rothoerl RD, Schebesch KM, Kubitz M i wsp.: ICAM-1 and VCAM-1 expression following aneurysmal subarachnoid hemorrhage and their possible role in the pathophysiology of subsequent ischemic deficits. *Cerebrovasc Dis*, 2006; 22: 143–9
17. Witkowska AM, Borawska MH, Socha K i wsp.: TNF- α and sICAM-1 in intracranial aneurysmal rupture. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2009; 57: 137–40
18. Chrapusta SJ, Górski A, Mrowiec T i wsp.: Immune abnormalities in aneurysmal subarachnoid haemorrhage patients: relation to delayed cerebral vasospasm. *Scand J Immunol*, 2000; 51: 400–7
19. Sarrafzadeh A, Schlenk F, Meisel A i wsp.: Immunodepression after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*, 2011; 42: 53–8
20. Wen D, Zhou XL, Li JJ i wsp.: Biomarkers in aortic dissection. *Clin Chim Acta*, 2011; 412: 688–95
21. Yung CK, Halperin VL, Tomaselli GF i wsp.: Gene expression profiles in end-stage human idiopathic dilated cardiomyopathy: altered expression of apoptotic and cytoskeletal genes. *Genomics*, 2004; 83: 281–97
22. Wingrove JA, Daniels SE, Sehnert AJ i wsp.: Correlation of peripheral-blood gene expression with the extent of coronary artery stenosis. *Circ Cardiovasc Genet*, 2008; 1: 31–8
23. Meier P, Antonov J, Zbinden R i wsp.: Noninvasive gene-expression-based detection of well developed collateral function in individuals with and without coronary artery disease. *Heart*, 2009; 95: 900–8
24. Achiron A, Gurevich M, Friedman N i wsp.: Blood transcriptional signatures of multiple sclerosis: unique gene expression of disease activity. *Ann Neurol*, 2004; 55: 410–7
25. Borovecki F, Lovrecic L, Zhou J i wsp.: Genome-wide expression profiling of human blood reveals biomarkers for Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005; 102: 1023–8
26. Moore DE, Li H, Jeffries N i wsp.: Using peripheral blood mononuclear cells to determine a gene expression profile of acute ischemic stroke: a pilot investigation. *Circulation*, 2005; 111: 212–21
27. Xu H, Tang Y, Liu DZ i wsp.: Gene expression in peripheral blood differs after cardioembolic compared with large-vessel atherosclerotic stroke: biomarkers for the etiology of ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2008; 28: 1320–8
28. Jickling GC, Stamova B, Ander BP i wsp.: Profiles of lacunar and non-lacunar stroke. *Ann Neurol*, 2011; 70: 477–85
29. Wang Y, Barbacioru CC, Shiffman D i wsp.: Gene expression signature in peripheral blood detects thoracic aorta aneurysm. *PLoS ONE*, 2007; 2: e1050
30. Giusti B, Rossi L, Lapini I i wsp.: Gene expression profiling of peripheral blood in patients with abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2009; 38: 104–12
31. Weinsheimer SM, Xu H, Achrol AS i wsp.: Gene expression profiling of blood in brain arteriovenous malformation patients. *Transl Stroke Res*, 2011; 2: 575–87
32. Pham MX, Teuteberg JJ, Kfoury AG i wsp.: Gene-expression profiling for rejection surveillance after cardiac transplantation. *N Engl J Med*, 2010; 362: 1890–900
33. Rosenberg S, Elashoff MR, Beineke P i wsp.: Multicenter validation of the diagnostic accuracy of a blood-based gene expression test for assessing obstructive coronary artery disease in nondiabetic patients. *Ann Intern Med*, 2010; 153: 425–34
34. Elashoff MR, Wingrove JA, Beineke P i wsp.: Development of a blood-based gene expression algorithm for assessment of obstructive coronary artery disease in non-diabetic patients. *BMC Med Genomics*, 2011; 4: 26
35. Aarøe J, Lindahl T, Dumeaux V i wsp.: Gene expression profiling of peripheral blood cells for early detection of breast cancer. *Breast Cancer Res*, 2010; 12: R7
36. Mackay J, Szecsei CM: Genetic counselling for hereditary predisposition to ovarian and breast cancer. *Ann Oncol* 2010; 21(Suppl 7): vii334–8
37. Rye PD, Booi BB, Grave G i wsp.: A novel blood test for the early detection of Alzheimer's Disease. *J Alzh Dis*, 2011; 23: 121–9
38. Tulamo R, Frosen J, Hernesniemi J i wsp.: Inflammatory changes in the aneurysmal wall: a review. *J NeuroIntervent Surg*, 2010; 2: 120–30

Aktywność biologiczna rekombinowanych białek, pochodnych stafylokinazy o właściwościach trombolityczno-przeciwzakrzepowych, wykazujących zwiększone powinowactwo do włókniaka

Biological activity of a new recombinant thrombolytic and antithrombotic agent with higher fibrin affinity – a staphylokinase variant

Janusz Szemraj¹,
George Brown¹,
Adrian Stankiewicz²,
Anna Gromotowicz²,
Ewa Chabielska²

¹ Zakład Biochemii Medycznej, Uniwersytet Medyczny, Łódź

² Samodzielna Pracownia Biofarmacji, Uniwersytet Medyczny, Białystok

Naukowa Fundacja Polfarmy w 2006 roku przyznała zespołowi pracującemu pod kierunkiem prof. Janusza Szemraja grant na realizację projektu badawczego pt: *Aktywność biologiczna rekombinowanych białek o właściwościach trombolityczno-przeciwzakrzepowych.*

Streszczenie

Choroby o etiologii zakrzepowo-zatorowej (zawał serca, niedokrwieny udar mózgu, żylna choroba zakrzepowo zatorowa i związany z nią zator tętnicy płucnej) są najczęstszą przyczyną zgonów i inwalidztwa ludzi w najbardziej twórczym okresie ich życia. Uzasadniona jest wielokierunkowość badań mających na celu tworzenie bardziej skutecznych i bezpiecznych leków trombolitycznych. Unikalne cechy rekombinowanej stafylokinazy (rSAK) stały się powodem, dla którego rSAK postrzegana jest jako obiecujący lek trombolityczny. Celem pracy było otrzymanie rekombinowanej stafylokinazy oraz jej pochodnych wykazujących zwiększone powinowactwo do włókniaka. W ramach realizacji grantu otrzymano nowe rekombinowane białko SAK-RGD-K2-Hirul, zbadano jego właściwości biologiczne *in vitro* oraz *in vivo* na modelu zakrzepicy żyłnej i tętniczej szczura. Otrzymane białka mogą potencjalnie zostać zastosowane w leczeniu mięśnia sercowego oraz innych chorób o etiologii zakrzepowo-zatorowej.

Słowa kluczowe: stafylokinaza • zawał serca • tromboliza • model zwierzęcy zakrzepicy żyłnej i tętniczej • białka hybrydowe

Summary

Cardiovascular diseases, such as acute myocardial infarction, stroke and venous thromboembolism, are the major causes of death or disability in the adult population. The intermediate underlying etiology of these conditions is often a thrombolytic obstruction of critically situated blood vessels, causing a loss of blood flow to vital organs. Acute thromboembolic disease may be treated by administration of thrombolytic agents. To improve the fibrin – specific properties of plasminogen activation by staphylokinase we attempted to construct a new recombinant variant of this protein. In this work we focused on the properties of recombinant staphylokinase (rSAK) and its derivatives with higher fibrin affinity. We constructed and examined biological activity of the recombinant protein SAK-RGD-K2-Hirul *in vitro* and *in vivo* in an electrically induced carotid artery thrombosis model and stasis-induced venous model in rats. SAK-RGD-K2-Hirul protein could be used in treatment of acute myocardial infarction and other thromboembolic diseases.

Key words: staphylokinase • myocardial infarction • thrombolysis • arterial thrombosis and stasis induced venous model in rats • hybrid proteins

Wpłynęło: 30-11-2011
Zaakceptowano: 05-12-2011
Opublikowano: 10-08-2012

Adres do korespondencji:
prof. dr hab. Janusz Szemraj,
Zakład Biochemii Medycznej
Uniwersytet Medyczny
w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8,
92-215 Łódź

WSTĘP

Równowaga pomiędzy procesami krzepnięcia i fibrynolizy jest niezbędna do zachowania homeostazy, czyli mechanizmu zapewniającego integralność zamkniętego układu krążenia po przerwaniu ciągłości łożyska naczyniowego. Niezbędne jest do tego oddziaływanie płytek krwi z elementami ściany naczyni krwionośnych oraz obecność różnych substancji rozpuszczonych we krwi. Jest to skomplikowany proces regulowany na wielu poziomach poprzez sprzężenia ujemne i dodatnie. W pewnych warunkach może dojść do zachwiania równowagi między tymi procesami. Lokalna aktywacja układu krzepnięcia w miejscu uszkodzenia ściany naczynia o podłożu zazwyczaj miażdżycowym prowadzić może do zakrzepic, które stanowią zagrożenie dla zdrowia i życia [1]. Choroby o etiologii zakrzepowo-zatorowej (zawał serca, niedokrwieny udar mózgu, żylna choroba zakrzepowo-zatorowa i związany z nią zator tętnicy płucnej) są najczęstszą przyczyną zgonów i inwalidztwa ludzi w najbardziej twórczym okresie ich życia. Uzasadnia to wielokierunkowość badań mających na celu tworzenie bardziej skutecznych i bezpiecznych leków trombolitycznych. W sytuacji, gdy niemożliwe jest wdrożenie PTCA (podskórna wewnątrznaczyniowa angioplastyka wieńcowa) [2], znaczenia nabiera farmakologiczne leczenie trombolityczne. Celem trombolizy jest szybkie przywrócenie przepływu objętościowego krwi w naczyniu przez aktywację układu fibrynolitycznego oraz zapobieganie wczesnej i opóźnionej reokluzji. Niezależnie od podawanego leku trombolitycznego, prawidłowy przepływ wieńcowy (TIMI 3) w ciągu pierwszych godzin leczenia utrzymuje się tylko u 50–70% pacjentów i u 51–58% pacjentów 5–7 dni od rozpoczęcia leczenia [3]. Poza niezadawalającym efektem trombolitycznym stosowanych leków niepełny sukces farmakologicznej trombolizy związany jest z uruchomieniem szeregu reakcji prozakrzepowych w trakcie lizy zakrzepu. Współczesna terapia trombolityczna STEMI polega na łączonym stosowaniu leków trombolitycznych (strepptokinaza – SK, alteplaza-rt – PA, reteplaza – rPA, tenekteplaza – TNK-tPA), przeciwplatek (kwas acetylosalicylowy, kłopidogrel) i antytrombinowych (heparyna niefrakcjonowana, heparyny drobno-cząsteczkowe, bilwalirudyna) [2]. Ten schemat postępowania, poprzez wpływ na różne mechanizmy krzepnięcia i fibrynolizy, prowadzi do zwiększenia ryzyka krwawień, w tym zagrażających życiu pacjenta krwawień śródczaszkowych [4]. Ograniczenia terapii trombolitycznej uzasadniają konieczność badań mających na celu syntezę bardziej skutecznych i bezpiecznych leków trombolitycznych. Unikalne cechy rekombinowanej stafylokinazy (rSAK) stały się powodem, dla którego r-SAK postrzegana

jest jako obiecujący lek trombolityczny. Mechanizm aktywacji plazminogenu przez r-SAK jest odmienny od mechanizmu działania rt-PA, który będąc enzymem proteolitycznym rozczepia cząsteczki plazminogenu do plazminy. Stafylokinaza nie jest enzymem, tworzy z osoczym plazminogenem nieaktywny kompleks r-SAK-plazminogen, a aktywny kompleks z plazminą r-SAK-plazmina. Kompleks rSAK-plazmina aktywuje plazminogen zarówno związany z rSAK jak i wolny. Sama rekombinowana stafylokinaza nie łączy się bezpośrednio z fibryną i nie jest inaktywowana przez α_2 -AP oraz PAI. Niezwiązany z fibryną kompleks rSAK-plazmina jest szybko degradowany przez α_2 -AP. Rekombinowana stafylokinaza uwolniona z kompleksu rSAK-plazmina zachowuje swoją aktywność i może powtórnie łączyć się z plazminą. W 1993 r. podjęto pierwsze próby wykorzystania rSAK (1 mg podany w 2-minutowym bolusie, a następnie 9 mg w 30 minutowym wlewie) u pacjentów ze STEMI [5]. Collen i wsp. potwierdzili angiograficznie reperfuzję w 40 m9n od rozpoczęcia infuzji u 4 z 5 leczonych chorych. Ocena angiograficzna po 20–28 godz. wykazała reoluzję tylko u jednego pacjenta. Równolegle prowadzono badania nad wyznaczeniem optymalnej dawki rSAK podanej tylko w bolusie. Chorzy ze STEMI otrzymywali rSAK w dawce 20 mg w 5 minutowym bolusie. Brak zadawalających wyników stał się powodem rozpoczęcia kolejnego badania w którym rSAK podawano w podwójnym bolusie w dawce 2×15 mg. Przeprowadzone badania wykazały dużą skuteczność trombolityczną stafylokinazy podanej w bolusie. Kolejne serie badań miały na celu wydłużenie okresu półtrwania rekombinowanej stafylokinazy, redukcję jej immunogenności, eliminację efektu prokoagulacyjnego, zmniejszenie ryzyka krwawień (Tabele 1 i 2).

Celem podjętych badań była próba otrzymania rekombinowanych białek o właściwościach trombolityczno-przeciwzakrzepowych łączących w sobie zalety naturalnie występujących białek: stafylokinazy i hirudyny oraz takich ich pochodnych, które wykazują zwiększone powinowactwo do włókniaka poprzez dołączenie domeny K2 tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA) oraz sekwencji RGD w celu zmniejszenia agregacji płytek. Tego rodzaju białko unieruchomione na powierzchni zakrzepu za pośrednictwem domeny K2 i sekwencji RGD poprzez część zawierającą stafylokinazę pełniłoby rolę aktywatora plazminogenu i uruchamiałoby proces rozpuszczania zakrzepu, natomiast domena hirudynowa służyłaby do blokowania uwalnianej z degradowanego włókniaka aktywnej trombiny. Białko takie teoretycznie mogłoby być wykorzystane jako lek trombolityczny, który jednocześnie zapobiegałby reokluzji udrożnionego naczynia i aktywacji

Tabela 1. Rekombinowane pochodne stafylokinazy wzbogacone w domeny typu *kringle* (K), domeny przeciw płytkowe i/lub przeciwzakrzepowe badane *in vivo* przedstawiono w tabeli.

Pochodne stafylokinazy		
Nazwa pochodnej	Efekt modyfikacji	Piśmiennictwo
SakSTAR.M38 SakSTAR.M89	Zmniejszenie immunogenności oraz siły fibrynolitycznego działania na skutek wprowadzenia mutacji punktowej	[6]
SakSTAR (K74)	Zmniejszenie immunogenności, pełne zachowanie zdolności do aktywacji plazminogenu po podstawieniu lizyny z pozycji 74 alaniną	[7]
SY161-P5	Zwiększenie okresu półtrwania do 15 min, a także selektywności działania w wyniku połączenia z pochodną glikolu polietylenowego	[8]
HE-SAKK	Połączenie stafylokinazy z inhibitorem trombiny – hirudyną doprowadziło do powstania czynnika o właściwościach antykoagulacyjnych i fibrynolitycznych	[9]
H6-Sak-Dip-I + II	Stafylokinaza związana z inhibitorem trombiny – dipetaliną to czynnik o właściwościach trombolitycznych i fibrynolitycznych	[10]
DGR i RL1	Połączenie stafylokinazy z sekwencjami RGD (arginina-glicyna-kwas asparaginowy) pozwoliło na uzyskanie czynnika o właściwościach antykoagulacyjnych	[11]
Sak/RGD/K2	Wprowadzenie sekwencji RGD i domeny kringle K2 tkankowego aktywatora plazminogenu doprowadziło do powstania czynnika o właściwościach antyagregacyjnych i zwiększonym powinowactwie do włókniaka	[12]
Sak/RGD/K2/Hir	Modyfikacja wcześniejszej pochodnej zawierająca dodatkowo hirudynę nadająca jej dodatkowo właściwości fibrynolityczne	[12]
Sak/RGD/K2/Hirul	Pochodna posiadająca zamiast hirudyny jej syntetyczny analog – hirulog. Taka modyfikacja zapewniła lepsze właściwości przeciw trombinowe i przeciw płytkowe jak również ochronę przed reokluzją	[13]
SAKM3-L-K1	Wprowadzenie domeny kringle 1 plazminogenu oraz mutacji punktowej doprowadziło do powstania czynnika o właściwościach bezpośredniego wiązania ze skrzepem	[14]
SakHE	Pochodna stafylokinazy z dodatkowymi 36 aminokwasami pochodzącymi z C-końca hirudyny, dwoma sekwencjami RGD i 16 punktowymi mutacjami, charakteryzuje się zmniejszoną immunogennością, zwiększoną termostabilnością, właściwościami przeciwagregacyjnymi i fibrynolitycznymi	[15]
SAK-ANXXI i SAK-ANXV	Połączenie aneksyny I i V z C-końcem stafylokinazy dało pochodne o zdolności do lizy bogato i ubogo-płytkowych skrzepów jak również o właściwościach antykoagulacyjnych	[16]
DGR (K35R)	Wariant stafylokinazy, w którym lizyna w pozycji 35 podstawiona jest argininą o wyższej odporności na wysokie temperatury	[17]
Y1-Sak	Wariant stafylokinazy wykazujący właściwości fibrynolityczne i antyagregacyjne, i charakteryzujący się zmniejszoną immunogennością	[18]

układu krzepnięcia. Otrzymane białko dodatkowo uprościłoby uciążliwą dla pacjenta procedurę podawania czynnika udrażniającego naczynia polegającą na infuzji dożylniej dwóch różnych czynników (np. streptokinazy i heparyny) przez jednorazowy wlew odpowiednio dobranej dawki białka hybrydowego, a z drugiej strony w znacznym stopniu obniżyłoby koszty leczenia. Uzyskane preparaty posłużą również jako narzędzia badawcze do podjęcia próby bliższego poznania roli trombiny uwalnianej ze skrzepu podczas trombolizy w powikłaniach wynikających z tego rodzaju terapii oraz sposób przeciwdziałania tym powikłaniom.

METODYKA I WYNIKI

Konstrukcja, ekspresja rekombinowanych białek. SAK-RGD-K2, SAK-RGD-K2-Hir, SAK-RGD-K2-Hirul

Przygotowanie kasety ekspresyjnej poprzedziła modyfikacja genu stafylokinazy o długości 497 pz otrzymanego z uprzednio wyselekcjonowanego szczepu *Staphylococcus aureus*, charakteryzującego się wysoką aktywnością fibrynolityczną. W celu obniżenia jej immunogenności na drodze mutagenyzy punktowej wprowadzono w genie stafylokinazy

Tabela 2. Rekombinowane pochodne stafilokinazy – badania na modelach zwierzęcych.

Rekombinowana pochodna stafilokinazy	Domeny włączone do rSAK	Model	Efekt
PLATSAK [19]	– RGD, – fragment fibrynopeptydu A – hirudyna	Model zakrzepicy żyłnej i tętniczej u pawiana	– wyższa aktywność trombolityczna vs. kontrola (ekstrakt <i>E. coli</i>) – podwyższone ryzyko krwawień – podwyższone stężenie fibrynogenu vs. kontrola
SAK-RGD-K2-Hir SAK-RGD-K2-Hirul SAK-K2-Hir SAK-RGD-K2 [20,21]	– RGD – K2 – hirudyna – hirulog	Model zakrzepicy tętniczej u szczura Model zakrzepicy żyłnej u szczura	– wyższa aktywność trombolityczna SAK-RGD-K2-Hirul, SAK-RGD-K2-Hir vs. rSAK, rt-PA – wyższa aktywność trombolityczna SAK-RGD-K2-Hirul, SAK-RGD-K2-Hir vs. rSAK, rt-PA – podwyższone ryzyko krwawień po podaniu w dawce 1.0 mg/kg
SFR [22]	– hirudyna	Indukowane karageniną niedokrwienie mysiego ogona Model zakrzepicy żyłnej u szczura	– zwiększenie aktywności trombolitycznej vs. rSAK – zmniejszenie ryzyka krwawień vs. rSAK
RGD-SAK [23]	– RGD	Model I zakrzepicy tętniczej u świnek miniaturowych	– większa skuteczność trombolityczną w upłynnianiu zakrzepu w tętnicach wieńcowych vs. rSAK – brak reokluzji po 30 dniach od podania SAK-RGD, współczynnik reokluzji po podaniu rSAK ok. 67%

sześć mutacji punktowych: SAK-K35A, E65Q, K74R, D82A, K130T, K135R. Muteinę genu stafilokinazy połączono z domeną K2 tkankowego aktywatora plazminogenu o długości 315 pz 20 aminokwasowym łącznikiem zawierającym dwie domeny RGD. Do otrzymanego konstruktu SAK-RGD-K2 dołączono kolejno cDNA dla hirudyny-217 pz. SAK-RGD-K2-Hir, bądź fragment hirudyny zawierający miejsce wiązania trombiny-60 pz SAK-RGD-K2-Hirul. Przygotowane konstrukty SAK-RGD-K2, SAK-RGD-K2-Hir, SAK-RGD-K2-Hirul klonowano w drożdżowym systemie ekspresyjnym pPIC9K *Pichia pastoris*.

Ocena właściwości biologicznych *in vitro* rekombinowanych białek

Badano aktywność biologiczną każdego ze składowych rekombinowanego białka: stafilokinazę- poprzez wyznaczenie wartości K_M , K_{cat} , właściwości fibrynolitycznych, trombolitycznych. Rekombinowane białka SAK-RGD-K2-Hirul, SAK-RGD-K2-Hir posiadają podobną aktywność amidolityczną, polegającą na przekształceniu plazminogenu do plazminy, jak sama rekombinowana stafilokinaza. Dołączenie domeny K2 t-PA do stafilokinazy w znacznym stopniu poprawiło aktywność trombolityczną i fibrynolityczną białek SAK-RGD-K2-Hirul, SAK-RGD-K2-HIR, SAK-RGD-K2. Dawka

rekombinowanego białka potrzebna do rozpuszczenia 50% uformowanego zakrzepu jest znacznie mniejsza. Podobnie czas potrzebny do rozpuszczenia 50% uformowanego skrzepu uległ skróceniu. Białka SAK-RGD-K2-Hirul, SAK-RGD-K2-HIR, SAK-RGD-K2 wykazują zwiększone powinowactwo do włókienka w porównaniu do r-SAK. Aktywność antytrombolityczną białek polegającą na wiązaniu trombiny oznaczano testem amydotrombiny wykorzystując substrat chromogeny dla trombiny S 2238 (Chromogenix). W obecności hirudyny czy rekombinowanego białka SAK-RGD-K2-Hir, SAK-RGD-K2-Hirul zawierającego w swoim składzie hirudynę lub jej aktywną część dochodziło do wiązania trombiny, która nie odcinała p-nitroanilinę od substratu chromogenego. Zdolność hamowania aktywności katalitycznej trombiny przez białka hirudyna, SAK-RGD-K2-Hir, SAK-RGD-K2-Hirul zastosowanych w stężeniu $1,5 \times 10^{-4}$ M pozostawała na tym samym poziomie, co wskazywało na podobną aktywność antytrombolityczną. Sama rekombinowana stafilokinaza takiej aktywności nie wykazywała. Kinetyka hamowania aktywności trombiny w tworzeniu skrzepu była podobna dla obu testowanych białek w trzech badanych stężeniach. Otrzymane dane wskazują na zbliżoną aktywność antytrombolityczną hirudyny w białku SAK-RGD-K2-Hir, SAK-RGD-K2-Hirul w porównaniu z hirudyną. Hirudyna obecna w rekombinowanym białku

SAK-RGD-K2-Hir jest aktywna biologicznie. Podjęto próbę oceny aktywności biologicznej kolejnego składnika konstruktu domeny RGD. Antypłytkowe właściwości rekombinowanych białek SAK-RGD-K2-Hir, SAK-, SAK-RGD-K2-Hirul, K2-Hirul oznaczano metodą turbidometryczną. Przeprowadzone badania wykazały, że dołączenie sekwencji RGD do białka SAK-K2-Hir, SAK-RGD-K2-Hirul w istotny sposób zmniejsza agregację płytek indukowanych trombiną.

Badanie aktywności biologicznej rekombinowanych białek SAK-RGD-K2-Hir, SAK-RGD-K2-Hirul *in vivo*

Oczyszczone rekombinowane białka wykorzystano do badania właściwości biologicznych *in vivo* na modelu zakrzepicy żyłnej i tętniczej szczura. Badania *in vivo* zostały wykonane we współpracy z Zakładem Farmakodynamiki A.M. w Białymstoku.

Zwierzęta

Badania przeprowadzono na szczurach, samcach szczepu Wistar o masie 300–400 g. Zwierzęta przebywały w pomieszczeniu o stałej temperaturze i wilgotności oraz stałym rytmie dobowym (12 godzin dzień/noc). Karmione były standardową dietą, miały nieograniczony dostęp do pożywienia i wody. Dwanaście godzin przed indukcją zakrzepicy szczury pozbawiano pokarmu, zapewniając im jedynie dostęp do wody. Postępowanie i opiekę nad zwierzętami prowadzono zgodnie z wytycznymi wykorzystania zwierząt w badaniach biomedycznych [24]. Na badania uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Białymstoku nr 56/2007.

Dawki rekombinowanych pochodnych SAK dobrze oparciu o znane z literatury dawki r-SAK oraz innych rekombinowanych białek, mających właściwości trombolityczno-przeciwzakrzepowe, w skład których wchodzi SAK. W niniejszych badaniach rekombinowane pochodne SAK oceniano w modelu zakrzepicy tętniczej u szczura w dawkach 1,5 i 3,0 mg/kg. Białka podawano do żyły udowej w pojedynczym, szybkim wstrzyknięciu (bolus). Grupa kontrolna otrzymała dożylnie 0,9% NaCl w bolusie.

Do badań wybrano model zakrzepicy tętniczej wg Guarini'ego [25] w modyfikacji własnej [26], w którym wykonuje się stymulację tętnicy szyjnej wspólnej lewej szczura prądem elektrycznym. Formowanie się wewnątrznaczyniowej skrzepliny, jak również jej lizę, obserwowano wykorzystując aparat do rejestracji przepływu objętościowego krwi w tętnicy. Po 5 minutach stabilizacji przepływu włączono

prąd stały o natężeniu 2 mA, a następnie umieszczono zacisk naczyniowy między elektrodą a sondą. Po kolejnych 5 minutach wyłączano prąd oraz zdejmowano zacisk naczyniowy. Za trwałą okluzję uznawano stan zerowego przepływu objętościowego krwi, trwający minimum 5 minut. Stopień okluzji oceniano na podstawie spadku przepływu objętościowego krwi w porównaniu z przepływem wyjściowym. U wszystkich szczurów kaniulowano lewą żyłę udową celem podawania rekombinowanych białek lub PBS. Po potwierdzeniu okluzji (przepływ=0,0 ml/min. przez minimum 5 min.) rozpoczynano podawanie białek. Po upływie 75 minut od podania badanych substancji wycinano 20 milimetrowy fragment tętnicy szyjnej wspólnej lewej oraz pobierano krew żylną z prawej komory serca do oznaczeń parametrów hemostazy. Z pobranej tętnicy szyjnej wspólnej lewej izolowano zakrzep, który ważono po 24 godzinach suszenia w temperaturze pokojowej.

Efekt trombolityczny rekombinowanych pochodnych SAK oceniano na podstawie pomiaru: szybkości końcowej przepływu objętościowego krwi w tętnicy szyjnej wspólnej lewej szczura; stanu drożności tętnicy zdefiniowanego jako: przetrwała okluzja (PO) – stan, w którym mimo podania rekombinowanych białek nie zaobserwowano przywrócenia przepływu (reperfuzji); przepływ cykliczny (CR) – stan, w którym po podaniu rekombinowanych białek zaobserwowano reperfuzję z następującą po niej wtórną okluzją (reokluzją); przetrwała drożność (PP) – stan pełnej reperfuzji naczynia, któremu nie towarzyszyły incydenty reokluzji; współczynnika reperfuzji – stosunek ilości szczurów, u których obserwowano reperfuzję do wszystkich szczurów danej grupy; redukcji masy zakrzepu tętniczego.

W celu oceny wpływu rekombinowanych pochodnych SAK na układ hemostazy dokonano pomiaru czasu krwawienia (BT) oraz zebrano próbki osocza celem wykonania dalszych pomiarów.

Na podstawie otrzymanych wyników zaobserwowano istotny wzrost objętościowego końcowego przepływu krwi w grupie zwierząt otrzymujących SAK-RGD-K2-Hir w wyższej dawce tj. 3,0 mg/kg, ponadto poprawę stanu drożności tętnicy wyrażonej jako CR – przepływ cykliczny (cyclic reflow) i PP – przetrwała drożność (persistent patency) oraz współczynnik reperfuzji obserwowano w grupach otrzymujących SAK-RGD-K2-Hir w dwóch dawkach (1,5 oraz 3,0 mg/kg) oraz SAK-RGD-K2-Hirul w dawce 3,0 mg/kg. Masa zakrzepu uległa istotnemu zmniejszeniu w grupach zwierząt otrzymujących SAK-RGD-K2-Hir i SAK-RGD-K2-Hirul jedynie w wyższej dawce – 3,0 mg/kg (w porównaniu

do grupy VEH – kontrolnej). Porównując wpływ SAK-RGD-K2-Hir i SAK-RGD-K2-Hirul (w dawce 3,0 mg/kg) vs. SAK (w dawce 3,0 mg/kg) wykazano istotne zmniejszenie masy zakrzepu. Białko SAK-RGD-K2-Hir istotnie silniej redukowało masę zakrzepu vs. SAK-RGD-K2-Hirul w równoważnej dawce. W grupach zwierząt otrzymujących SAK-RGD-K2-Hir (1,5 i 3,0 mg/kg) oraz SAK-RGD-K2-Hirul (1,5 i 3,0 mg/kg) zaobserwowano wydłużenie czasu krwawienia powyżej 5 minut.

WYNIKI BADAŃ A WSTĘPNE WNIOSKI WYCIĄGNIĘTE NA ICH PODSTAWIE

Genetyczna modyfikacja cząsteczki rSAK pozwoliła na uzyskanie pochodnych rSAK o zredukowanej

immunogenności i wydłużonym czasie działania. Badania *in vivo* przeprowadzone na modelu zakrzepicy żylniej i tętniczej wykazało statystycznie istotne różnice w udrożnieniu naczyń w porównaniu z kontrolą (PBS) czy r-SAK

1. Badane białka wykazują zależność od składu i dawki skuteczność trombolityczną w modelu zakrzepicy tętniczej u szczura.
2. Oba białka działają skuteczniej od r-SAK.
3. Białko SAK-RGD-K2-Hir ma silniejsze działanie trombolityczne vs. SAK-RGD-K2-Hirul w równoważnej dawce.
4. Białka działają silniej trombolitycznie w dawce wyższej – jednak wiąże się to ze zwiększeniem skłonności do krwawień.

Piśmiennictwo:

1. Lijnen HR, Collen D: Molecular basis of thrombolytic therapy. *J Nucl Cardiol*, 2000; 7: 373–81
2. Van de Werf f, Bax J, Betriu A i wsp.: management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation: the Task Force on the management of ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*, 2008; 29: 2909–45
3. Fox KA: Have we reached the limit with thrombolytic therapy? *Circovasc Drugs Ther*, 1999; 13: 820–3
4. Patel SC, Mody A: cerebral hemorrhagic complications of thrombolytic therapy. *Prog Cardiovasc Dis*, 1999; 42: 217–33
5. Collen D, Van der Werf: Coronary thrombolysis with recombinant staphylokinase in patients with involving myocardial infarction. *Circulation*, 1993; 87: 1850–3
6. Collen D, Moreau H, Stockx L, Vanderschueren S: Recombinant Staphylokinase Variants With Altered Immunoreactivity II: Thrombolytic Properties and Antibody Induction. *Circulation*, 1996; 94: 207–16
7. Collen D, Cock FD, Demarsin E i wsp.: Recombinant Staphylokinase Variants With Altered Immunoreactivity III: Species Variability of Antibody Binding Patterns. *Circulation*, 1997; 95: 455–62
8. Collen D, Sinnave P, Demarsin E i wsp.: Polyethylene Glycol-Derivatized Cysteine-Substitution Variants of Recombinant Staphylokinase for Single-Bolus Treatment of Acute Myocardial Infarction. *Circulation*, 2000; 102: 1766–72
9. Lian Q, Szarka SJ, Ng KKS, Wong S-L: Engineering of a Staphylokinase-based Fibrinolytic Agent with Antithrombotic Activity and Targeting Capability toward Thrombin-rich Fibrin and Plasma Clots. *J Biol Chem*, 2003; 278: 26677–86
10. Icke C, Schlott B, Ohlenschlager O i wsp.: Fusion Proteins with Anticoagulant and Fibrinolytic Properties: Functional Studies and Structural Considerations. *Mol Pharmacol*, 2002; 62: 203–9
11. Su H-B, Zhang Y-G, He J-T i wsp.: Construction and Characterization of Novel Staphylokinase Variants with Antiplatelet Aggregation Activity and Reduced Immunogenicity. *Biochim Biophys Acta*, 2004; 36(5): 336–42
12. Szemraj J, Walkowiak B, Kawecka I i wsp.: A new recombinant thrombolytic and antithrombotic agent with higher fibrin affinity – a staphylokinase variant. I. *In vitro* study. *J Thromb Haemost*, 2005; 3(10): 2156–65
13. Kowalski M, Brown G, Bieniasz M i wsp.: Cloning and expression of a new recombinant thrombolytic and antithrombotic agent – a staphylokinase variant. *Acta Biochim Pol*, 2009; 56: 41–53 **Publikacja powstała w wyniku realizacji grantu Naukowej Fundacji Polpharmy**
14. Wu S-C, Castellino FJ, Wong S-L: A Fast-acting, Modular-structured Staphylokinase Fusion with Kringle-1 from Human Plasminogen as the Fibrin-targeting Domain Offers Improved Clot Lysis Efficacy. *J Biol Chem*, 2003; 278: 18199–206
15. Kochanowski R, Kotłowski R, Szveda P: Expression and Intein-Mediated Purification of Novel Staphylokinase SakSTAR with Reduced Immunogenicity and Antiplatelet and Antithrombin Activation. *Appl Biochem Biotechnol*, 2007; 141: 321–34
16. Chiou JF, Woon MD, Cheng SN i wsp.: Staphylokinase-annexin XI chimera exhibited efficient *in vitro* thrombolytic activities. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2007; 71: 1122–29
17. He J, Wang G, Li G i wsp.: Purification and characterization of a staphylokinase variant, K35R. *Biotechnol Appl Biochem*, 2006; 45: 43–9
18. He J, G.Wang, Xu R i wsp.: Refolding of a staphylokinase variant y1-Sak by reverse dilution. (Abstract). *Biotechnol Appl Biochem*, 2008; 151: 29–41
19. Van Zyl WB, Pretorius GH, Lamprecht S. PLATSAC: a potent antithrombotic and fibrinolytic protein, inhibits arterial and venous thrombosis in a baboon model. *Thromb Res*, 2000; 98: 435–43
20. Szemraj J, Stankiewicz A, Rozmyslowicz-Szermińska W i wsp.: A new recombinant thrombolytic and antithrombotic agent with higher fibrin affinity – a staphylokinase variant. An *in-vivo* study. *Thromb Haemost*; 2007; 1037–45

21. Szemraj J, Zakrzeska A, Brown G i wsp.: New derivative of staphylokinase SAK-RGD-K2-Hirul exerts thrombolytic effects in the arterial thrombosis model in rats. *Pharmacol Rep*, 2011; 63(5): 1169–79 *Publikacja powstała w wyniku realizacji grantu Naukowej Fundacji Polpharmy*
22. Shi B, Yu A, Liu Y: Locally activity-released bifunctional fusion protein enhances antithrombolysis and alleviates bleeding risk. *J Thromb Thrombolysis*, 2007; 24: 283–92
23. Chen H, Mo W, Zhang Y: Functional properties of a novel mutant of staphylokinase with platelet-targeted fibrinolysis and antiplatelet aggregation activities. *Eur J Pharmacol*, 2007; 566: 137–44
24. Giles AR: Guidelines for the use of Animals In biomedical research. *Thromb. Haemost*, 1987; 58: 1078–84
25. Guarini S: A Highly Reproducible Model of Arterial Thrombosis in Rats. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 1996; 35: 101–5
26. Szemraj J, Stankiewicz A, Rozmysłowicz-Szermińska W i wsp.: A New recombinant thrombolytic and antithrombotic agent with higher fibrin affinity – a staphylokinase variant. An *in-vivo* study. *Thromb Haemost*, 2007; 97: 1037–45
27. Dejana E, Villa S, De Gaetano G: Bleeding time in rats: a comparison of different experimental conditions. *Thromb Haemost*, 1982; 48: 108–11
28. Hollander M, Wolfe DA: Nonparametric statistical methods. New York. Wiley, 1973; 115–23

Potencjał terapeutyczny receptora serotoninowego 5-HT₇. Nowe ligandy i badania modelowania molekularnego

Therapeutic potential of serotonin 5-HT₇ receptor. New ligands and molecular modelling studies

Andrzej J. Bojarski

Zakład Chemii Leków Instytutu Farmakologii PAN, Kraków

Naukowa Fundacja Polpharmy w 2002 roku przyznała zespołowi pracującemu pod kierunkiem dr hab. Andrzeja J. Bojarskiego grant na realizację projektu badawczego pt. *Ligandy receptorów serotoninowych 5-HT₇ – potencjalne zastosowanie terapeutyczne oraz nowe narzędzia farmakologiczne.*

Streszczenie

Receptor serotoninowy typu 5-HT₇, sklonowany w 1993 roku, stanowi atrakcyjny cel badawczy zarówno dla farmakologii jak i dla chemii leków. Ustalono, że zaburzenia jego funkcji mają wpływ na powstawanie chorób psychicznych w tym stanów lękowych, depresji i schizofrenii. Sądzi się zatem, że ligandy tego receptora mogą stanowić nowe źródło potencjalnych leków psychotropowych. W odniesieniu do działania przeciwdepresyjnego, szczególne zainteresowanie wzbudzają substancje wykazujące selektywne działanie blokujące ten podtyp receptora.

Celem zrealizowanego projektu badawczego było poszukiwanie związków charakteryzujących się wysoką aktywnością do receptora 5-HT₇ i sprawdzenie czy będą one posiadały własności przeciwdepresyjne w testach na zwierzętach.

W ramach projektu przebadano pod kątem powinowactwa do receptorów serotoninowych typu 5-HT₇ ponad 150 różnych połączeń w tym 39 nieopisanych wcześniej w literaturze związków. Wśród zsyntezowanych w Zakładzie Chemii Leków IF PAN nowych pochodnych, najaktywniejsze charakteryzowały się znaczącym powinowactwem do receptorów 5-HT₇ jak i 5-HT_{1A} oraz wykazały właściwości przeciwłękowe i przeciwdepresyjne w testach na zwierzętach. Ponadto, opracowano model receptora 5-HT₇ in silico, który został zastosowany do przeprowadzenia procesu automatycznego dokowania 30 antagonistów receptora 5-HT₇. Otrzymane kompleksy ligand-receptor posłużyły do stworzenia dwóch hipotez farmakoforowych: pierwsza, określa cechy ligandów zapewniające powinowactwo do receptora 5-HT₇, a druga wskazuje kluczowe cechy strukturalne zwiększające selektywność w stosunku do innych receptorów monoaminowych. Modele te stanowią cenne narzędzie badawcze wykorzystywane do projektowania nowych, selektywnych antagonistów receptora 5-HT₇.

Słowa kluczowe: receptor 5-HT₇ • ligandy receptora 5-HT₇ • modelowanie homologiczne • modele farmakoforowe

Wpłynęło: 22-03-2012
Zaakceptowano: 22-03-2012
Opublikowano: 10-08-2012

Summary

Cloned in 1993, serotonin 5-HT₇ receptor is an attractive target for both pharmacology and medicinal chemistry research. It was found that its dysfunction may be involved in etymology of several mental diseases including anxiety, depression and schizophrenia. Therefore it is believed, that the 5-HT₇ receptor ligands constitute a new source of potential psychotropic agents. With regard to the antidepressant therapy, special attention is drawn to the substances which can selectively block this receptor subtype.

Adres do korespondencji:

dr hab. Andrzej J. Bojarski,
prof. IF, Instytut Farmakologii
PAN, ul. Smętna 12,
31-343 Kraków, e-mail:
bojarski@if-pan.krakow.pl

The main objective of the project was to search for compounds with high affinity for the 5-HT₇ receptor, and check whether they will have antidepressant properties in behavioural studies.

During the project realization, affinity of more than 150 different compounds (from library of Department of Medicinal Chemistry Institute of Pharmacology PAS) and 39 novel ligands, were examined at 5-HT₇ receptors.

Among newly synthesized original derivatives, the most active were characterized by a significant affinity for both 5-HT₇ and 5-HT_{1A} receptors, and showed anxiolytic and antidepressant properties in animal tests. In addition, an *in silico* model of 5-HT₇ receptor was developed, and used for the automatic docking of 30 antagonists.

Based on the obtained ligand-receptor complexes two pharmacophore hypotheses were generated. The first, provided structural fragments important for high ligand affinity for 5-HT₇ receptor, and the second, highlighted key features for selectivity over other monoamine receptors. These models are valuable research tools which can be used to design new, selective antagonists of 5-HT₇ receptor.

Key words: 5-HT₇ receptor • 5-HT₇ receptor ligands • homology modelling • pharmacophore models

WSTĘP

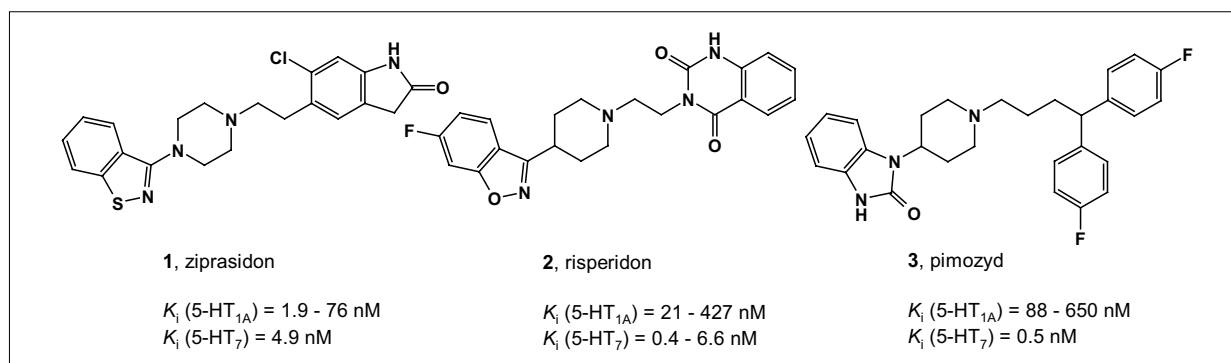
Układ serotoninergiczny to jeden z najbardziej zróżnicowanych systemów neurotransmisyjnych występujących u kręgowców [1], którego neuroprzebieżnik 5-hydroksytryptamina (serotonina, 5-HT) należy do najstarszych ewolucyjnie. Szacuje się, że w organizmach eukariotycznych receptory serotoninowe wykształciły się około 700–800 milionów lat temu, różnicując główne typy dużo wcześniej niż w układach: cholinergicznym, adrenergicznym czy dopaminergicznym [1].

Receptory serotoninowe znajdują się zarówno w obrębie ośrodkowego jak i obwodowego układu nerwowego, dzielą się na 7 typów głównych (5-HT₁–5-HT₇) i 14 podtypów oraz posiadają wiele powiązań z innymi systemami neuroprzebieżnikowymi [1]. Odzwierciedleniem tej różnorodności jest ilość pełnionych przez serotoninę funkcji fizjologicznych i co się z tym wiąże, jej udział w powstawaniu wielu procesów patologicznych. W ośrodkowym układzie nerwowym serotonina reguluje wiele funkcji fizjologicznych takich jak krążenie krwi, praca serca, stany emocjonalne, sen, pamięć, ból, pobieranie pokarmu, zachowania seksualne. Jest również zaangażowana w powstawanie procesów patologicznych leżących u podłoża chorób psychicznych m.in.: depresji, lęku, schizofrenii, zaburzeń łaknienia i snu [1].

Badania nad układem serotoninergicznym trwają już od przeszło 60 lat, w dużej mierze koncentrując

się na farmakologii i terapeutycznym znaczeniu w obrębie ośrodkowego układu nerwowego [2]. Ich rezultatem, oprócz wiedzy dotyczącej mechanizmów podstawowych jest wprowadzenie nowych leków, spośród których wymienić należy głównie związki o działaniu przeciwdepresyjnym (inhibitory wychwyty serotoniny – fluoksetyna, paroksetyna, sertralina), przeciwłękowym (buspiron, tandospiron), przeciwmigrenowym (sumatryptan), a także przeciwpsychotycznym (tzw. atypowe antypsychotyki: ziprasidon i risperidon) [3].

Ostatni z typów w rodzinie receptorów serotoninowych – 5-HT₇ został odkryty przez kilka niezależnych zespołów naukowych, które niemal jednocześnie opisały wyniki swoich badań w 1993 roku [4–6]. Jego struktura pierwszorzędowa i profil farmakologiczny różniły się od znanych już receptorów serotoninowych, stąd też zaklasyfikowano go jako kolejny, główny typ w tej rodzinie. Obecność receptora 5-HT₇ wykazano u człowieka, świni oraz takich gryzoni jak szczur, mysz i świnka morska [7]. Badania autoradiograficzne i analiza dystrybucji mRNA ujawniły, że w mózgu receptory 5-HT₇ zlokalizowane są głównie w obrębie wzgórza, podwzgórza, hipokampa oraz pnia mózgu, natomiast na obwodzie najwyższe ich stężenie znaleziono w naczyniach krwionośnych i niektórych organach wewnętrznych [7,8]. Rozmieszczenie w strukturach limbicznych mózgu oraz fakt, iż wiele znanych leków psychotropowych wykazywało wysokie powinowactwo do miejsc receptorowych 5-HT₇, sugerowały możliwe powiązanie dysfunkcji receptora



Rycina 1. Przykładowe związki posiadające mieszany profil receptorowy 5-HT_{1A}/5-HT₇.¹⁻⁴

z chorobami afektywnymi [7,8]. Z kolei obecność receptorów 5-HT₇ w naczyniach głowy łączono z wpływem na stany migrenowe, a receptorów znajdujących się na obwodzie z ewentualnymi schorzeniami odpowiednich narządów głównie jelit i pęcherza moczowego [8].

W toku prowadzonych badań udało się uzyskać wyniki, które wyraźnie świadczą o zaangażowaniu receptora 5-HT₇ w regulację cyklu dobowego, snu, temperatury ciała, stanów emocjonalnych (nastroju), procesów uczenia się i zapamiętywania oraz funkcje endokrynne [7,8].

Szczególnie interesujące rezultaty otrzymano przy użyciu zwierząt laboratoryjnych z wyłączonym genem 5-HT₇ (ang. knockout) oraz selektywnych antagonistów – związków SB258719 i SB266970 [9,10]. Genetycznie zmodyfikowane myszy jak i zwierzęta niezmienione, którym podano ww. związki, badane były w testach behawioralnych stosowanych do przewidywania aktywności przeciwdepresyjnej tj. w teście zawieszenia za ogon oraz teście wymuszonego pływania (Porsolta). Eksperymenty te, prowadzone w dwóch różnych ośrodkach naukowych, dostarczyły pierwszych, bezpośrednich dowodów na jednoznaczne zaangażowanie receptora 5-HT₇ w depresję, a co za tym idzie, wskazały na konieczność poszukiwań i dalszych badań jego antagonistów jako potencjalnych leków przeciwdepresyjnych [9,10].

LIGANDY RECEPTORA 5-HT₇ – BADANIA PROWADZONE W RAMACH PROJEKTU

Od początku lat 90. jednym z tematów badań prowadzonych w Zakładzie Chemii Leków Instytutu Farmakologii PAN (ZChL IF-PAN), było poszukiwanie związków wykazujących aktywność do receptorów serotoninowych typu 5-HT_{1A} m.in. w grupie tzw. długołańcuchowych arylopipezazyn. Kierując się pojawiającymi się w literaturze wynikami opisującymi powinowactwo do receptora 5-HT₇ znanych

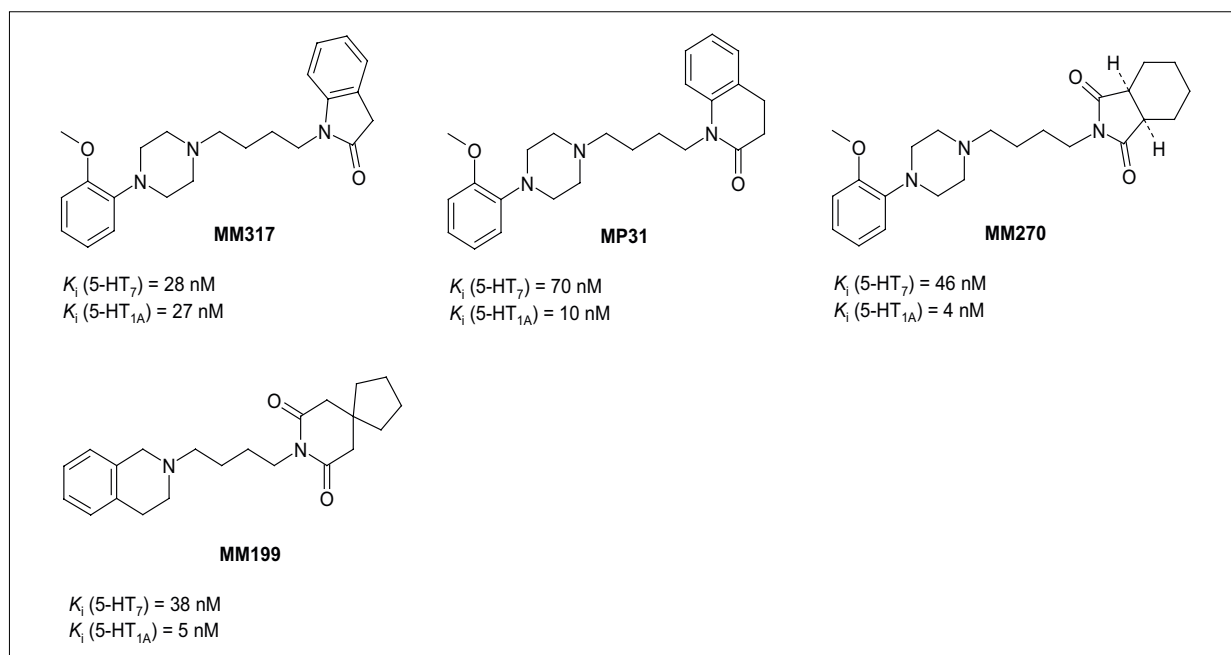
nieselektywnych ligandów układu serotoninowego, a wśród nich pochodnych z grupy długołańcuchowych arylopipezazyn i arylopipezazyn (takich jak: ziprasidon (1), risperidon (2), czy pimozyd (3)) zdecydowano o włączeniu tego nowego celu biologicznego do realizowanej tematyki badawczej zakładu (Rycina 1) [11,12].

Pierwsze prace w tym kierunku prowadzono w ramach projektu pt. „Ligandy receptorów serotoninowych 5-HT₇ – potencjalne zastosowanie terapeutyczne oraz nowe narzędzia farmakologiczne” przyznanego w 2002 roku przez Naukową Fundację Polpharmy (dawniej Fundacja Na Rzecz Rozwoju Polskiej Farmacji i Medycyny). Głównym celem projektu było poszukiwanie związków wykazujących aktywność do receptorów serotoninowych typu 5-HT₇ oraz sprawdzenie ich własności terapeutycznych w zwierzęcych modelach depresji i lęku.

SYNTEZA I BADANIA BIOLOGICZNE

Eksperymenty rozpoczęto od przeprowadzenia przesiewowych testów powinowactwa do receptora 5-HT₇ własnej biblioteki związków, składającej się w znacznej mierze z pochodnych długołańcuchowych arylopipezazyn [13]. W ich wyniku zidentyfikowano szereg pochodnych *o*-metoksyfenylopipezazyny (*o*MeO-FP), które oprócz wysokiego powinowactwa do receptorów 5-HT_{1A} wykazywały znaczącą aktywność względem receptora 5-HT₇ [13]. Wśród tych połączeń szczególnie interesujące okazały się: pochodna *o*-metoksy-fenylopipezazyny (**MM77**; $K_{i(5-HT_7)}$ = 90 nM) oraz 1,2,3,4-tetrahydroizochinolinyl (**MM199**; $K_{i(5-HT_7)}$ = 36 nM) (Rycina 2). Ten ostatni związek będący strukturalnym analogiem buspironu został wcześniej opisany jako selektywny częściowy agonista receptorów 5-HT_{1A} o działaniu przeciwlękowym i przeciwdepresyjnym, które wykazywał w testach na zwierzętach [14].

Dysponując wynikami dla dużej grupy połączeń (w sumie przebadano ponad 150 związków z biblioteki



Rycina 2. Przykłady związków z biblioteki ZChL wykazujących wysokie powinowactwo do receptora 5-HT₇.

ZChL), możliwe było przeprowadzenie analizy struktury – aktywność i na tej podstawie wyodrębnienie w strukturach związków fragmentów imidowych najlepiej tolerowanych przez receptor 5-HT₇. Zostały one użyte do zaprojektowania nowych pochodnych, w których jako ugrupowania aminowe, zastępujące farmakoforową funkcję arylopiiperazyny, wybrano układy: 1,2,3,4-tetrahydroizochinoliny (THIQ), 1,2,3,4-tetrahydro-β-karboliny (THBK) i 1,2,3,4-tetrahydropirazylo[1,2-a]indolu [15].

Spośród zsyntetyzowanych związków jako struktury oryginalne, najaktywniejsze do receptorów 5-HT₇ okazały się: pochodna 1,2,3,4-tetrahydro-β-karboliny – **B991** ($K_{i(5-HT_7)}$ = 70 nM) oraz jej N-acetyloamidowe pochodne: **B1013** ($K_{i(5-HT_7)}$ = 80 nM), **B1019** ($K_{i(5-HT_7)}$ = 91 nM) oraz **B1032** ($K_{i(5-HT_7)}$ = 156 nM). Dla tych związków oprócz stałych wiązań do receptorów 5-HT_{1A} wyznaczono także powinowactwo do receptorów 5-HT_{2A}. Pomimo, iż nie udało się otrzymać związków selektywnie oddziałujących z typem 5-HT₇ (wszystkie pochodne były podwójnymi ligandami 5-HT₇/5-HT_{1A}) wykazano, że modyfikacja strukturalna polegająca na wprowadzeniu podstawnika N-metyloacetamidowego do układu 1,2,3,4-tetrahydro-β-karboliny zwiększa selektywność oddziaływania pomiędzy miejscami wiążącymi 5-HT₇ a 5-HT_{2A} (Tabela 1) [15].

Rozszerzone badania farmakologiczne (pomiar akumulacji cAMP) i elektrofizjologiczne (zewnętrzno-mórkowa rejestracja wyładowań międzynaładowych obszaru CA3 hipokampa) przeprowadzone dla wymienionych związków wykazały, że posiadają one

cechy antagonistów zarówno do receptorów 5-HT₇ jak i 5-HT_{1A}. Potencjalne własności przeciwdepresyjne omawianych związków były badane w testach zawieszenia za ogon u myszy oraz w teście wymuszonego pływania u szczurów. Działanie przeciwdepresyjne zidentyfikowano dla związku **B1019** (w obu testach) oraz dodatkowo dla wzorcowej dla pochodnej **MM77** (w teście wymuszonego pływania), natomiast związki: **B1032**, **B991** oraz **MM199** nie działały przeciwdepresyjnie w teście u myszy. Dodatkowo związek **B991** został przebadany w teście podniesionego labiryntu krzyżowego na szczurach rasy Wistar i w dawce 1,25 mg/kg⁻¹ wykazał własności naśladujące działanie leków przeciwłękowych [16].

W ramach realizowanego projektu badawczego zaplanowano także syntezę pochodnych benzotriazolu i benzimidazolu, jako grupę potencjalnych agonistów receptora 5-HT₇. Niestety żaden spośród otrzymanych związków nie wykazywał istotnej aktywności w stosunku do receptorów 5-HT₇ [15].

MODEL RECEPTORA 5-HT₇

Wśród badań zaplanowanych w projekcie istotną część stanowiły eksperymenty modelowania molekularnego, których celem było stworzenie modelu receptora 5-HT₇ służącego do wspomagania projektowania nowych, selektywnych ligandów o działaniu antagonistycznym.

Model homologiczny receptora serotoninowego typu 5-HT₇ został zbudowany na matrycy rodopsyny wołowej (kod PDB struktury krystalicznej

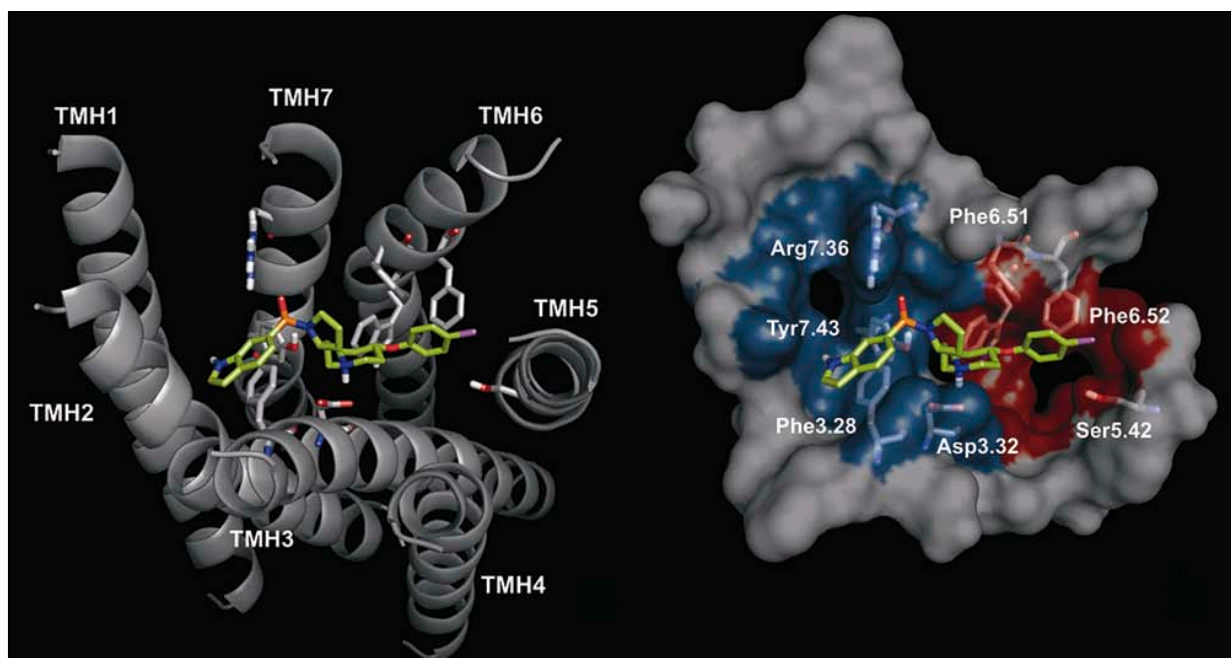
Tabela 1. Struktura i powinowactwo do receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT₇, wybranych ligandów z bazy ZChL oraz zsyntetyzowanych w ramach projektu (szare tło).

K _i 5-HT ₇ nM K _i 5-HT _{1A} nM	R:							
Amina:								
		MM77	NAN190	MM317	MP31	MP44	MP45	
		90	87	28	70	308		
		6.4	0.6	27	10	17	4	
		AK31	AK30	B1011	B1012			MM199
		> 10 000	135	112	209			36
		2920	140	145	120			5
		B986	B981	B988	B989	B982	B983	B991
		160	277	225	200	320	1300	115
		114	28	128	57	139	50	8
		B1024	B1019	B1013	B1014	B1025	B1026	B1032
		2590	117	80	208	963	420	156
		164	55	230	130	382	258	95

– 1F88), wykorzystując nałożenie sekwencji oparte na najbardziej zakonserwowanych aminokwasach w rodzinie receptorów sprzężonych z białkiem G (wg NIH GPCR database). Wstępny etap modelowania obejmował wygenerowanie dużej liczby modeli receptora (100) przy użyciu programu Modeller, dzięki czemu uzyskano dokładne próbkowanie przestrzeni konformacyjnej łańcuchów bocznych białka, szczególnie w obszarze miejsca wiążącego. Następnie przeprowadzono „negatywną selekcję” receptorów przy użyciu liganda o niskim powinowactwie i ograniczonej swobodzie konformacyjnej (usztynwiona pochodna arylopipezynowa). Eksperyment polegał na przeprowadzeniu symulacji automatycznego dokowania liganda do wszystkich modeli z użyciem programu FlexX, a do dalszych badań użyto tylko tych modeli, które nie zaakomodowały testowego liganda. Wyselekcjonowano 63 modele, do których automatycznie zadokowano 30 antagonistów receptora 5-HT₇ należących do 6 różnych klas. Otrzymano ok. 180 000 kompleksów ligand-receptor, które poddano procedurze *consensus scoring*. Dla każdego liganda wybrano kompleks oceniony pozytywnie przez wszystkie 5 funkcji oceniających, oraz posiadający najniższą wartość funkcji PMF. Można więc określić tę procedurę jako dokowanie w pełni fleksyjne (uwzględniające swobodę konformacyjną

tak liganda jak i receptora). Metodyka taka została zastosowana po raz pierwszy w modelowaniu receptora 5-HT₇. Otrzymane kompleksy posłużyły do opisu oddziaływań ligand-receptor dla każdej z klas antagonistów receptora 5-HT₇ oraz do generacji nowych hipotez farmakoforowych. Na podstawie nałożenia ligandów, wygenerowanego automatycznie poprzez dokowanie do modeli receptora, stworzono dwie hipotezy farmakoforowe: pierwszą, określającą cechy ligandów zapewniające powinowactwo do receptora 5-HT₇, bez względu na selektywność oraz drugą, wskazującą na cechy mogące gwarantować selektywność w stosunku do innych receptorów dla monoamin (5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, D₂, α₁). Otrzymane wyniki sugerują rolę specyficznych interakcji ligandów selektywnych z aminokwasami tworzącymi kieszeń receptora pomiędzy helisami 7 a 3. Dobrze dopasowanie liganda do tej kieszeni (zróżnicowanej pomiędzy receptorami) oraz przewaga specyficznych oddziaływań z aminokwasami tam zlokalizowanymi nad oddziaływaniami z zakonserwowaną sekwencyjnie kieszenią, pomiędzy helisami 4 a 6, wpływa na zwiększoną selektywność tych ligandów (Rycina 3).

Wydaje się, że decydująca dla selektywności jest możliwość wystąpienia równoczesnych oddziaływań pomiędzy: układem aromatycznym liganda a Phe3.32



Rycina 3. Przykładowy selektywny antagonist SB-656104 zadenkowany w miejscu wiążącym receptora 5-HT₇ (widok z zewnątrz komórki); z zaznaczonymi aminokwasami uczestniczącymi w specyficznych oddziaływaniach z ligandem. (A) transbłonowe fragmenty helikalne; (B) powierzchnia miejsca wiążącego z kieszeniami między helisami 4–6 (kolor czerwony) i helisami 7–3 (kolor niebieski).

(π - π stacking) i Arg7.36 (ion- π) oraz akceptorem wiązania wodorowego (grupy karbonylowej) i Tyr7.43. Optymalną geometrię tych fragmentów cząsteczki zapewnia połączenie ich poprzez atom w hybrydyzacji sp³ (np. siarka w układzie arylosulfonamidowym). Wyniki tej części prac eksperymentalnych pozwoliły zatem na zdefiniowanie hipotez dotyczących selektywności oddziaływań ligandów, które zostały sformułowane po raz pierwszy w oparciu o analizę bezpośrednich oddziaływań ligand-receptor [17].

PODSUMOWANIE WYNIKÓW I DALSZY ROZWÓJ BADAŃ

W rezultacie przeprowadzonych w ramach projektu badań zsyntetyzowane zostały związki, wśród których najaktywniejsze (charakteryzujące się znaczącym powinowactwem do receptorów 5-HT₇ jak i 5-HT_{1A}) wykazały właściwości przeciwlękowe lub przeciwdepresyjne w testach na zwierzętach. Opracowano także model receptora 5-HT₇ *in silico* i zastosowano go do automatycznego dokowania 30 antagonistów receptora 5-HT₇. Otrzymane kompleksy ligand-receptor posłużyły do stworzenia dwóch hipotez farmakoforowych: pierwsza, określiła cechy ligandów zapewniające powinowactwo do receptora 5-HT₇, a druga, wskazała kluczowe cechy strukturalne zwiększające selektywność w stosunku do innych receptorów monoaminowych.

Wszystkie wyniki stworzyły podstawy do zaprojektowania nowych serii związków, będących tematem

kolejnych projektów badawczych: „Poszukiwanie nowych ligandów receptora serotoninowego 5-HT₇ o potencjalnym działaniu przeciwdepresyjnym” (MNiSW nr 2 P05F 019 30, 24/04/2006–23/04/2009) oraz „Modyfikacje struktury arylopi-perazynowych i arylosulfonamidowych ligandów receptorów serotoninowych 5-HT₇ w poszukiwaniu czynników determinujących selektywność oddziaływań względem podtypu 5-HT_{1A}” (MNiSW nr N405 026 32/1743 22.03.2007–21.03.2008).

Receptor 5-HT₇, w świetle publikowanych wyników, stanowi jeden z punktów uchwytu leków charakteryzujących się działaniem psychotropowym. Poszukiwanie jego ligandów jest wciąż aktualnym tematem badań realizowanych w wielu ośrodkach uniwersyteckich na świecie oraz w firmach farmaceutycznych [2,18]. W Polsce prace w tym kierunku prowadzone są w Zakładzie Chemii Leków Instytutu Farmakologii PAN przy współpracy z Zakładem Chemii Organicznej Politechniki Krakowskiej i Zakładem Chemii Leków Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum UJ [19–22]. Ligandy receptorów 5-HT₇ stanowią także temat badań rozwijanych od kilku lat wspólnie z naukowcami z Instytutu Chemii Organicznej i Analitycznej Uniwersytetu w Orleanie [23–25], a obecnie kontynuowanych w ramach polsko-francuskiego wspólnego projektu badawczego pt.: „Projektowanie, synteza i aktywność biologiczna pochodnych azatetralin jako nowych ligandów receptorów 5-HT₇” w ramach umowy o współpracy naukowej między

Polską Akademią Nauk i Narodowym Ośrodkiem
Badań Naukowych Francji.

PODZIĘKOWANIA

Serdecznie dziękuję wszystkim współrealizatorom
grantu z trzech Zakładów Instytutu Farmakologii
PAN: Chemii Leków, Neurobiologii i Fiziologii.

Stan wiedzy w chwili rozpoczęcia projektu

W rodzinie receptorów serotoninowych wyróżnia się siedem typów głównych – 5-HT₁–5-HT₇. Ostatni w tej klasyfikacji receptor 5-HT₇ został sklonowany w 1993 roku i stanowi bardzo atrakcyjny cel badań ze względu na fakt, że zaburzenia jego funkcji mają wpływ na powstawanie chorób psychicznych takich jak stany lękowe, depresja i schizofrenia.

Intensywne poszukiwania ligandów receptora 5-HT₇ zostały rozpoczęte wkrótce po jego odkryciu, przy czym szczególnie nacisk położono na selektywny antagonizm jako aktywność mogącą prowadzić do ujawnienia własności przeciwdepresyjnych. W literaturze naukowej zaczęły pojawiać się pierwsze doniesienia opisujące przykłady związków o takim działaniu, chociaż większość prac dotyczyła ligandów nieselektywnych. Wśród nich znalazły się także długołańcuchowe pochodne arylopiperazyny, które wśród innych połączeń stanowiły przedmiot badań Zakładu Chemii Leków IF PAN w Krakowie. Dało to podstawy do rozpoczęcia badań w kierunku poszukiwania nowych ligandów receptora 5-HT₇ i oceny ich potencjalnych własności przeciwdepresyjnych w testach na zwierzętach

Co przyniosła realizacja grantu Naukowej Fundacji Polpharmy

Wyniki analizy SAR własnej biblioteki związków (na podstawie badań przesiewowych powinowactwa do receptora 5-HT₇) posłużyły do zaprojektowania nowych serii pochodnych. Wśród zsyntezowanych 39 związków, najaktywniejsze charakteryzowały się znamienym powinowactwem do receptorów 5-HT₇ jak i 5-HT_{1A} oraz wykazały właściwości przeciwlękowe i przeciwdepresyjne w testach na zwierzętach. Ponadto, w części badań teoretycznych, opracowany został *in silico* model receptora 5-HT₇, który zastosowano do przeprowadzenia procesu automatycznego dokowania 30 antagonistów. Otrzymane kompleksy ligand-receptor posłużyły do stworzenia dwóch hipotez farmakoforowych: pierwsza, określiła cechy ligandów zapewniające powinowactwo do receptora 5-HT₇, a druga wskazała kluczowe fragmenty strukturalne decydujące o zwiększeniu selektywności w stosunku do innych receptorów monoaminowych. Modele są nadal wykorzystywane jako narzędzie badawcze do projektowania nowych, selektywnych antagonistów receptora 5-HT₇.

Dalsze kierunki badań

Kierunek poszukiwania antagonistów receptora 5-HT₇ był nadal rozwijany w Zakładzie Chemii Leków, m.in. w ramach polsko norweskiego projektu PNRF-103-AI-1/07 *Creating an academia-based platform to discover substances acting on serotonergic or glutamatergic systems as potential new antidepressant or anxiolytic drugs* finansowanego przez Królestwo Norwegii w ramach Polsko-Norweskiego Funduszu Badań Naukowych.

Obecnie prowadzone są pierwsze prace nad allosterycznym mechanizmem modulacji receptora 5-HT₇.

Piśmiennictwo:

- Hoyer D, Hannon JP, Martin GR: Molecular, Pharmacological and Functional Diversity of 5-HT Receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2002; 71: 533–54
- Matthys A, Haegeman G, Van Craenenbroeck K, Vanhobenacker P: Role of the 5-HT₇ receptor in the central nervous system: from current status to future perspectives. *Mol Neurobiol*, 2011; 43: 228–53
- Jones BJ, Blackburn TP: The Medical Benefit of 5-HT Research. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002; 71: 555–68
- Ruat M, Traiffort E, Leurs R i wsp.: Molecular Cloning, Characterization, and Localization of a High-Affinity Serotonin Receptor (5-HT₇) Activating CAMP Formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993; 90: 8547–51
- Bard JA, Zgombick J, Adham N i wsp.: Cloning of a Novel Human Serotonin Receptor (5-HT₇) Positively Linked to Adenylate Cyclase. *J Biol Chem*, 1993; 268: 23422–6
- Lovenberg TW, Baron BM, de Lecea i wsp.: A novel adenylate cyclase-activating serotonin receptor (5-HT₇) implicated in the regulation of mammalian circadian rhythms. *Neuron*, 1993; 11: 449–58
- Thomas DR, Hagan JJ: 5-HT₇ receptors. *Curr. Drug Targets. CNS. Neurol Disord*, 2004; 3: 81–90
- Hedlund PB, Sutcliffe JG: Functional, molecular and pharmacological advances in 5-HT₇ receptor research. *Trends Pharmacol. Sci.* 2004; 25: 481–86
- Guscott M, Bristow LJ, Hadingham K i wsp.: Genetic knockout and pharmacological blockade studies of the 5-HT₇ receptor suggest therapeutic potential in depression. *Neuropharmacology*, 2005; 48: 492–502
- Hedlund PB, Huitron-Resendiz S, Henriksen SJ, Sutcliffe JG: 5-HT₇ Receptor Inhibition and Inactivation Induce Antidepressantlike Behavior and Sleep Pattern. *Biol Psychiatry*, 2005; 58: 831–7
- Schotte A, Janssen PF, Gommeren W i wsp.: Risperidone compared with new and reference antipsychotic drugs: *in vitro* and *in vivo* receptor binding. *Psychopharmacology (Berl)*, 1996; 124: 57–73
- Roth BL, Craigo SC, Choudhary MS i wsp.: Binding of Typical and Atypical Antipsychotic Agents to 5-Hydroxytryptamine-6 and 5-Hydroxytryptamine-7 Receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994; 268: 1403–10
- Duszyńska B, Nędza K, Wasylewski M, Bojarski AJ: The screening of a library of arylpiperazine derivatives for 5-HT₇ receptor affinity. Polish-Austrian-German-Hungarian-Italian Joint Meeting on Medicinal Chemistry: Kraków, 2003.10.15–18, Book of Abstracts, str. 67 ***Publikacja powstała w wyniku realizacji grantu Naukowej Fundacji Polpharmy***
- Dereń-Wesołek A, Tatarczyńska E, Chojnacka-Wojcik E: The novel buspirone analogue, 8-[4-[2-(1,2,3,4-tetrahydroisoquinolinyl)]butyl]-8-azaspiro [4.5]decane-7,9-dione, with anxiolytic-like and antidepressant-like effects in rats. *J. Psychopharmacol*, 1998; 12: 380–4
- Boksa B, Duszyńska B, Nędza K: Synteza nowych ligandów do receptora 5-HT₇, XLVI Zjazd Naukowy Polskiego Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego. Lublin 15–18 wrzesień 2003, Materiały zjazdowe Tom II, S12: 931 ***Publikacja powstała w wyniku realizacji grantu Naukowej Fundacji Polpharmy***
- Bojarski AJ, Boksa J, Duszyńska B i wsp.: Synthesis and SAR studies of 1,2,3,4-tetrahydro-β-carboline derivatives as new 5-HT₇/5-HT_{1A} receptor ligands. Joint Meeting on Medicinal Chemistry, Vienna, Austria, 20–23 06 2005 ***Publikacja powstała w wyniku realizacji grantu Naukowej Fundacji Polpharmy***
- Kołaczkowski M, Nowak M, Pawłowski M, Bojarski AJ: Receptor-based Pharmacophores for Serotonin 5-HT₇R Antagonists – Implications to Selectivity. *J Med Chem*, 2006; 49(23): 6732–41 ***Publikacja powstała w wyniku realizacji grantu Naukowej Fundacji Polpharmy***
- Leopoldo M, Lacivita E, Berardi F i wsp.: Serotonin 5-HT₇ receptor agents: Structure-activity relationships and potential therapeutic applications in central nervous system disorders. *Pharmacol Ther*, 2011; 129: 120–48
- Bojarski AJ, Duszyńska B, Kołaczkowski M i wsp.: The impact of spacer structure on 5-HT₇ and 5-HT_{1A} receptor affinity in the group of long-chain arylpiperazine ligands. *Bioorg Med Chem Lett*, 2004; 6: 5863–6 ***Publikacja powstała w wyniku realizacji grantu Naukowej Fundacji Polpharmy***
- Zajdel P, Subra G, Bojarski AJ i wsp.: Parallel solid-phase synthesis and characterization of new sulfonamide and carboxamide proline derivatives as potential CNS agents. *Bioorg Med Chem*, 2005; 15: 3029–35
- Zajdel P, Subra G, Verdie P i wsp.: Sulfonamides with the N-alkyl-N'-dialkylguanidine moiety as 5-HT₇ receptor ligands. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009; 19: 4827–31
- Zajdel P, Marciniak K, Maślankiewicz A i wsp.: Arene- and quinoline-sulfonamides as novel 5-HT₇ receptor ligands. *Bioorg Med Chem*, 2011; 19: 6750–9
- Badarau E, Bugno R, Suzenet F i wsp.: SAR studies on new bis-aryls 5-HT₇ ligands: Synthesis and molecular modeling. *Bioorg Med Chem*, 2010; 18: 1958–67
- Badarau E, Putey A, Suzenet F i wsp.: New insights into homopiperazine-based 5-HT_{1A}/5-HT₇R ligands: synthesis and biological evaluation. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2010; 25(3): 301–5
- Badarau E, Suzenet F, Bojarski AJ i wsp.: Benzimidazole-based serotonin 5-HT_{1A} or 5-HT₇R ligands: synthesis and biological evaluation. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009; 19: 1600–3

Porównanie wybranych molekularnych metod typowania *Corynebacterium diphtheriae*

Comparison of selected molecular methods for *Corynebacterium diphtheriae* typing

Aleksandra A. Zasada,
Marek Jagielski

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, Warszawa

Naukowa Fundacja Polpharmy w 2009 roku przyznała zespołowi pracującemu pod kierunkiem prof. Marka Jagielskiego grant na realizację projektu badawczego pt. *Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) jako nowa metoda genotypowania szczepów Corynebacterium diphtheriae*.

Streszczenie

Toksynotwórcze szczepy *Corynebacterium diphtheriae* są czynnikiem etiologicznym błonicy, natomiast szczepy nietoksynotwórcze mogą wywoływać zakażenia miejscowe i inwazyjne. Zakażenia tym drobnoustrojem, chociaż występują sporadycznie w krajach Europy Zachodniej, wciąż stanowią poważny problem w wielu rejonach świata, w tym w sąsiadujących z Polską Rosji, Ukrainie i na Białorusi. Krążące w populacji szczepy *C. diphtheriae* podlegają zmienności genetycznej, a rozwijające się epidemie są przypuszczalnie skutkiem pojawienia się nowych szczepów o zwiększonej zjadliwości bądź też zwiększonej zdolności kolonizacji i rozprzestrzeniania się. Wskazuje to na konieczność monitorowania zmienności i różnorodności genetycznej szczepów izolowanych zarówno od nośników jak też osób chorych w różnych rejonach świata. W prezentowanej pracy dokonano porównania czterech molekularnych metod typowania *C. diphtheriae*: ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR), PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis), MLST (Multilocus Sequence Typing) i MLVA (Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis) z uwzględnieniem kosztów badania, wymaganej aparatury oraz złożoności procedury badania.

Słowa kluczowe: genotypowanie • ERIC-PCR • PFGE • MLST • MLVA • *Corynebacterium diphtheriae*

Summary

Toxinogenic *Corynebacterium diphtheriae* is an etiologic agent of diphtheria, whereas nontoxicogenic strains can cause local and invasive infections. Although *C. diphtheriae* infections are rare in Western Europe, they are still a serious problem in many regions, for example in Poland neighbouring countries – Russia, Ukraine and Belarus. *C. diphtheriae* strains circulating in a population undergo genetic changes. Emerging epidemics could be results of appearance of new more virulent strains that possess higher invasiveness and spread properties. It is therefore apparent that monitoring genetic changes and diversity of strains isolated from patients and carriers in different regions of the world is necessary. In the presented studies four molecular methods – ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR), PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis), MLST (Multilocus Sequence Typing) and MLVA (Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis) – for *C. diphtheriae* typing were compared in respect of costs, equipment required and complexity of the procedure.

Key words: genotyping • ERIC-PCR • PFGE • MLST • MLVA • *Corynebacterium diphtheriae*

Wpłynęło: 16-12-2011
Zaakceptowano: 20-12-2011
Opublikowano: 10-08-2012

Adres do korespondencji:
dr n. med. Aleksandra A.
Zasada, Narodowy Instytut
Zdrowia Publicznego
– Państwowy Zakład Higieny,
Zakład Bakteriologii,
ul. Chocimska 24,
00-791 Warszawa,
e-mail: azasada@pzh.gov.pl

WSTĘP

Corynebacterium diphtheriae jest czynnikiem etiologicznym błonicy, poważnej choroby zakaźnej, której objawy spowodowane są działaniem toksyny bakteryjnej. Toksyna błonicza powoduje między innymi uszkodzenie włókien mięśnia sercowego, demielinizację komórek układu nerwowego oraz zmiany martwicze [1]. Jednakże szczepy *C. diphtheriae* nie wytwarzające toksyny mogą również powodować poważne, w tym zagrażające życiu infekcje, takie jak septyczne zapalenie stawów, ropnie, bakteremia czy zapalenie wsierdza [2–4].

Pomimo powszechnych szczepień przeciwko błonicy choroba ta wciąż występuje w wielu krajach, stanowiąc bardzo poważny problem zdrowotny w wielu rejonach świata np. w Europie wschodniej, południowo-wschodniej Azji, Afryce i Ameryce Południowej. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) zwraca uwagę na poważną sytuację epidemiologiczną błonicy w krajach byłego Związku Radzieckiego, m.in. na sąsiadujące z Polską Białoruś, Rosję i Ukrainę, gdzie rocznie odnotowywanych jest po kilkaset przypadków tej choroby. Zachorowania na błonicę występują również w krajach Europy Zachodniej i są zwykle skutkiem zawleczenia tej choroby [5,6]. Ostatnio odnotowane w Europie przypadki błonicy wystąpiły w Wielkiej Brytanii, Norwegii, we Francji, na Litwie, w Szwecji i na Łotwie [6]. Ponadto, dane piśmiennictwa światowego oraz obserwacje poczynione w Polsce wyraźnie wskazują na wzrost liczby zakażeń powodowanych przez nietoksynotwórcze szczepy *C. diphtheriae*, w tym poważnych zakażeń inwazyjnych [m.in. 7–13].

Wykazano, że krążące w populacji szczepy *C. diphtheriae* podlegają zmienności genetycznej, a rozwijające się epidemie mogą być skutkiem pojawienia się nowych szczepów o zwiększonej zjadliwości bądź też zwiększonej zdolności kolonizacji i rozprzestrzeniania się [14]. Stąd konieczność monitorowania zmienności i różnorodności genetycznej szczepów izolowanych zarówno od nosicieli jak też osób chorych w różnych rejonach świata. Zastosowanie odpowiednich metod genotypowania szczepów pozwala monitorować rozprzestrzenianie się klonów epidemicznych i umożliwia rozróżnianie pomiędzy przypadkami zachorowań epidemicznymi, endemicznymi oraz zawleczonymi. Może również pomóc w zapobieganiu epidemii, szczególnie w przypadku, gdy zastosowane metody genotypowania pozwalają na szybkie uzyskanie wiarygodnego wyniku.

W prezentowanej pracy dokonano porównania czterech metod genotypowania *C. diphtheriae*:

ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR), PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis), MLST (Multilocus Sequence Typing) i MLVA (Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis).

METODYKA BADAŃ

Szczepy bakteryjne

Użyte do badań szczepy *C. diphtheriae* przedstawiono w Tabeli 1, wraz z informacją o biotypie, roku izolacji, materiale klinicznym z jakiego wyizolowano szczep oraz informacją dotyczącą toksynotwórczości.

Izolacja DNA

Z badanych szczepów izolowano DNA stosując zestaw DNeasy Tissue Kit (Qiagen) zgodnie z procedurą dla bakterii gramdodatnich załączoną przez producenta zestawu. Wyizolowane DNA użyto do genotypowania metodami ERIC-PCR, MLST i MLVA.

ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR)

ERIC-PCR wykonano zgodnie z metodyką opisaną przez Steinbruechner i wsp. [15].

PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis)

W celu przygotowania bloczków agarozowych hodowle bakteryjne w bulionie BHI wirowano przez 7 min przy $8\,000 \times g$, a osad zawieszano w 100 μ l TE (Tris-EDTA). Zawiesinę mieszano z 1,2% agarozą SeaKem Gold (BMA, USA) w stosunku 1:1 i formowano bloczki. Uzyskane bloczki agarozowe zawierające komórki bakteryjne inkubowano w 1 ml buforu lizującego I (1M NaCl, 10 mM TrisHCl pH 7,6, 0,5% dezoksycholan sodu, 0,25 M EDTA pH 7,5, 0,5% sarkozyl, 0,5% Brij 58, 1 mg/ml lizozym) w temp. 37°C przez noc. Następnie bufor usuwano a bloczek przepłukiwano 1 ml TE. Dodawano 1 ml buforu II (0,25 M EDTA pH 9–9,5, 1% sarkozyl, 50 μ g/ml proteinaza K) i inkubowano w temp. 50°C przez noc. Po inkubacji bufor usuwano a bloczki płukano kilkakrotnie 1 ml TE (z wytrząsaniem w temperaturze pokojowej). W kolejnym etapie przeprowadzano trawienie DNA wartego w bloczkach enzymem SfiI (Fermentas, Litwa) zgodnie z instrukcją producenta. Elektroforezę pulsacyjną prowadzono w 1% żelu agarozowym (pulsed field certified agarose, BioRad, USA) w buforze 0,5 $\times$ TBE przy użyciu zestawu CHEF-DR II (BioRad, USA). Elektroforezę przeprowadzono

Tabela 1. Szczepy *C. diphtheriae* użyte w prezentowanych badaniach.

Oznaczenie szczepu	Biotyp	Wytwarzanie toksyny	Materiał kliniczny	Rok izolacji
23/E	<i>gravis</i>	–	Wymaz z rany	2008
22/E	<i>gravis</i>	–	Wymaz z gardła	2008
21/E	<i>gravis</i>	–	Krew	2008
20/E	<i>gravis</i>	–	Krew	2008
19/E	<i>gravis</i>	–	Krew	2008
18/E	<i>gravis</i>	–	Krew	2007
17/E	<i>gravis</i>	–	Wymaz z rany	2007
16/E	<i>gravis</i>	–	Wymaz z przetoki	2007
15/E	<i>gravis</i>	–	Wymaz z rany	2007
14/E	<i>gravis</i>	–	Krew	2007
13/E	<i>gravis</i>	–	Krew	2006
12/E	<i>gravis</i>	–	Krew	2004
11/D	<i>belfanti</i>	–	Wymaz z nosa	2001
10/C	<i>belfanti</i>	–	Wymaz z nosa	2000
9/B	<i>mitis</i>	+	Wymaz z gardła	Lata 90.
8/B	<i>intermedius</i>	+	Wymaz z gardła	Lata 90.
7/B	<i>mitis</i>	+	Wymaz z gardła	Lata 90.
6/B	<i>gravis</i>	–	B.d.	1997
5/A	<i>gravis</i>	+	B.d.	Lata 60.
4/A	<i>intermedius</i>	+	B.d.	Lata 60.
3/A	<i>mitis</i>	+	B.d.	Lata 60.
2/A	<i>mitis</i>	+	B.d.	Lata 60.
1/A	<i>mitis</i>	+	B.d.	Lata 60.

B.d. – brak danych.

zgodnie z zaleceniami De Zoysa i wsp. [16]. DNA w żelu wybarwiano bromkiem etydydy i oglądano w świetle UV.

MLST (Multilocus Sequence Typing)

Przeprowadzono analizę siedmiu *loci* – *atpA*, *dnaE*, *dnaK*, *fusA*, *leuA*, *odhA* i *rpoB* – zgodnie z metodą opisaną przez Bolt i wsp. [17].

MLVA (Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis)

Analizę przeprowadzono w oparciu o 8 markerów – v3, v6, v7, v8, v9, v10, v12 oraz v13 – zgodnie z metodą opisaną wcześniej [18].

WYNIKI

Stosując metodę ERIC-PCR uzyskano 11 różnych profili dla badanej grupy 23 szczepów *C. diphtheriae* (dendrogram – opublikowany wcześniej [3]). Wielkość widocznych w żelu prążków DNA wynosiła od <250 pz do 3500 pz. Dla wszystkich

szczepów izolowanych w latach 2004–2008 z wyjątkiem jednego szczepu oznaczonego jako 17/E uzyskano identyczne profile ERIC-PCR (Tabela 1). Również identyczne profile uzyskano dla szczepów należących do biotypu *mitis* izolowanych w latach 60. ubiegłego wieku (1/A, 2/A, 3/A). Dla trzech (7/B, 8/B, 9/B) spośród czterech szczepów izolowanych w latach 90. uzyskano profile różniące się jedynie 1 lub 2 prążkami DNA. Dla pozostałych szczepów (4/A, 5/A, 6/B, 10/C i 11/D) uzyskano bardziej zróżnicowane profile.

W metodzie PFGE uzyskano 12 profili dla badanej grupy szczepów. Wszystkie szczepy izolowane w latach 2004–2008 z wyjątkiem dwóch, należały do pulsotypu A. Pozostałe dwa szczepy z tej grupy zaklasyfikowano do pulsotypów A1 i A2, ponieważ różniły się zaledwie jednym prążkiem DNA. Szczepy 1/A i 3/A zaklasyfikowano do pulsotypu C a szczep 2/A do pulsotypu C1 ponieważ profil tego szczepu różnił się jednym prążkiem DNA. Pozostałe dwa szczepy izolowane w latach 60. należały do pulsotypów G i H. Szczepy izolowane w latach 90. zaklasyfikowano do pulsotypów B i B1 (8/B, 9/B

Tabela 2. Porównanie genotypów badanych szczepów *C. diphtheriae* uzyskanych czterema metodami typowania molekularnego.

Oznaczenie szczepu	Genotyp			
	ERIC-PCR	PFGE	MLST	MLVA
23/E	V	A	ST8	1
22/E	V	A	ST8	1
21/E	V	A	ST8	1
20/E	V	A	ST8	2
19/E	V	A	ST8	1
18/E	V	A	ST8	1
17/E	VI	A1	ST8	2
16/E	V	A	ST8	1
15/E	V	A	ST8	2
14/E	V	A	ST8	1
13/E	V	A	ST8	2
12/E	V	A2	ST8	1
11/D	IX	D	ST65	3
10/C	VIII	E	ST69	5
6/B	VII	F	ST32	4
7/B	I	B1	ST44	6
8/B	III	B	ST44	6
9/B	II	B	ST44	6
5/A	IV	G	ST19	10
4/A	XI	H	ST18	11
1/A	X	C	ST25	12
2/A	X	C1	ST25	12
3/A	X	C	ST25	12

i 7/B) oraz F (6/B). Szczepy 11/D i 10/C zaklasyfikowano odpowiednio do pulsotypów D i E.

Przeprowadzone genotypowanie metodą MLST wykazało 8 genotypów wśród badanej grupy szczepów. Wszystkie szczepy izolowane w latach 2004–2008 należały do typu ST8. Szczepy *mitis* izolowane w latach 60. należały do ST25, a pozostałe dwa szczepy z tego okresu – 4/A i 5/A – odpowiednio do ST18 i ST19. Trzy (7/B, 8/B i 9/B) spośród czterech szczepów izolowanych w latach 90. zaklasyfikowano do ST44, a pozostały szczep 6/B do ST32. Szczepy 11/D i 10/C zaklasyfikowano odpowiednio do ST65 i ST69.

Dla badanej grupy szczepów metodą MLVA uzyskano 9 genotypów. W odróżnieniu od wyników uzyskanych pozostałymi metodami, w przypadku MLVA szczepy izolowane w latach 2004–2008 zostały rozdzielone na dwa genotypy oznaczone jako 1 i 2 różniące się wielkością locus *v9*. Podobnie jak w pozostałych metodach, trzy szczepy *mitis* izolowane w latach 60. zostały zaklasyfikowane do jednego

genotypu oznaczonego liczbą 12, a pozostałe dwa szczepy pochodzące z tego okresu – 4/A i 5/A – odpowiednio do genotypów 11 i 10. Podobnie jak w MLST, trzy szczepy z lat 90. – 7/B, 8/B i 9/B – zaklasyfikowano do jednego genotypu 6, a szczep 6/B, również pochodzący z tego okresu, do genotypu 4. Szczepy 11/D i 10/C zakwalifikowano odpowiednio do genotypu 3 i 5. Porównanie wyników genotypowania badanej grupy 23 szczepów *C. diphtheriae* uzyskanych metodami ERIC-PCR, PFGE, MLST i MLVA przedstawiono w Tabeli 2.

DYSKUSJA

Stosowanie odpowiednich metod typowania drobnoustrojów chorobotwórczych pomaga zrozumieć mechanizmy ich rozprzestrzeniania się i zmienności genetycznej. Pozwala to na identyfikowanie ognisk zakażeń oraz ustalenie ich źródła. Co więcej, niejednokrotnie pozwala zidentyfikować szczepy o zwiększonej zjadliwości. Wybór metody typowania zależy od informacji jakie chce się uzyskać, ale także od wyposażenia i możliwości laboratorium.

W przeprowadzonych badaniach dokonano porównania czterech metod genotypowania różniących się zarówno pod względem wymaganego wyposażenia jak też kosztów i złożoności procedury badawczej. Podstawą w metodach ERIC-PCR, MLST i MLVA jest technika PCR. Oligonukleotydy starterowe użyte w metodzie ERIC-PCR umożliwiają amplifikację krótkich sekwencji powtórzonych rozproszonych w całym genomie [19]. Długość amplifikowanych odcinków DNA odpowiada odległościom, jakie występują pomiędzy powtarzającymi się elementami ERIC w analizowanym genomie bakteryjnym i tym samym odzwierciedlają różnice w położeniu tych sekwencji [20]. Chociaż nazwa elementów ERIC kojarzy się jednoznacznie z gramujemnymi bakteriami jelitowymi, sekwencje tego typu występują u różnych bakterii, a nawet u bakteriofagów i organizmów eukariotycznych [21]. ERIC-PCR jest szybką metodą genotypowania. Ma jednak ograniczoną powtarzalność i wymaga bardzo dokładnej walidacji [3]. Co więcej, w przypadku badania większej liczby szczepów wykazujących zróżnicowanie konieczne jest zastosowanie odpowiedniego oprogramowania generującego dendrogram uwidaczniający podobieństwo genetyczne badanych szczepów.

W przeciwieństwie do ERIC-PCR, metodę MLST charakteryzuje bardzo duża powtarzalność, ponieważ metoda ta opiera się na analizie zmian (mutacji punktowych) w sekwencji nukleotydowej genów metabolizmu podstawowego [22]. Jest jednak metodą kosztowną, ze względu na konieczności wykonania wielu reakcji sekwencjonowania oraz czasochłonną i zdecydowanie bardziej pracochłonną niż ERIC-PCR, ze względu na konieczność dokładnej analizy uzyskanych wyników.

Metoda MLVA opiera się na zmianach zachodzących w sekwencji powtórzeń nukleotydowych, które podlegają dużej zmienności na skutek ślizgania się polimerazy lub rekombinacji, czego skutkiem są zmiany w długości fragmentów DNA zawierających powtórzenia [23,24]. Dobór odpowiednio długich sekwencji powtórzonych umożliwia analizę wyników na podstawie rozdziału elektroforetycznego w żelu agarozowym amplifikatów *loci* zawierających tandemowe sekwencje powtórzone (VNTR – variable number tandem repeat) [18]. Metoda MLVA jest szybka, powtarzalna i łatwa w interpretacji oraz niedroga.

Metoda PFGE, pomimo że jest uznawana za „złoty standard” w genotypowaniu wielu drobnoustrojów, jest niezwykle praco- i czasochłonna. Polega na analizie profili genomowego DNA badanych szczepów uzyskanych po trawieniu odpowiednio dobranym enzymem restrykcyjnym i rozdziale

w zmieniającym się polu elektrycznym [25]. Wymaga zastosowania specjalistycznego wyposażenia do przeprowadzenia elektroforezy pulsacyjnej o ściśle określonych parametrach.

W badanej grupie szczepów najwięcej, bo aż 12 genotypów wyróżniono stosując metodę PFGE. Jednakże trzy genotypy (pulsotypy) – A, A1 i A2 – które wyróżniono wśród szczepów izolowanych w latach 2004–2008, oraz po dwa genotypy – B i B1 oraz C i C1 – wyróżnione wśród szczepów izolowanych w latach 90. i 60. ubiegłego wieku, różniły się zaledwie jednym lub dwoma prążkami DNA. Zgodnie z zaleceniami Tenovera i wsp. [25] szczepy takie należy uznać za blisko spokrewnione i w przypadku zachorowań epidemicznych za przypuszczalnie należące do tego samego ogniska.

Jedenaście genotypów wyróżniono stosując metodę ERIC-PCR, co wynika z zaleceń van Belkum i wsp. [26] dotyczących interpretacji wyników genotypowania uzyskanych metodami opartymi na analizie profili DNA uzyskanych z zastosowaniem techniki PCR. Autorzy ci zalecają, aby izolaty różniące się jednym lub więcej prążkami DNA uznawać za różne genotypy.

Wyniki uzyskane metodami MLST i MLVA w pełni ze sobą korelowały, z jednym wyjątkiem. Szczepy izolowane w latach 2004–2008 należały do jednego genotypu MLST, ale do dwóch genotypów MLVA.

Wszystkie zastosowane w niniejszej pracy metody genotypowania *C. diphtheriae* różnicowały badaną grupę szczepów na podobnym poziomie. Nie zaobserwowano różnic profili DNA pomiędzy szczepami nietoksynotwórczymi izolowanymi z zakażeń inwazyjnych i nieinwazyjnych. Do jednego genotypu należały zarówno szczepy izolowane z krwi jak też z wymazów z gardła i ran. Wysokie podobieństwo genetyczne stwierdzono także pomiędzy szczepami toksynotwórczymi izolowanymi w określonym okresie czasu. Natomiast wyraźne różnice w profilach DNA zaobserwowano pomiędzy poszczególnymi grupami szczepów izolowanymi w różnych okresach czasu np. w latach 60., w latach 90. oraz w latach 2004–2008. Jednak przewagą metody MLST i MLVA jest możliwość utworzenia ogólnodostępnej międzynarodowej bazy danych genotypów *C. diphtheriae* występujących na różnych obszarach, co ułatwia ustalenie źródła epidemii oraz pozwala na badanie rozprzestrzeniania się szczepów oraz ich zmienności [17,18]. Taka baza danych została już utworzona dla genotypów MLST *C. diphtheriae* (<http://pubmlst.org/cdiphtheriae/>). Możliwość zastosowania metody MLVA do genotypowania *C. diphtheriae* zastała opisana po

raz pierwszy w 2011 roku i wymaga przebadania większej liczby szczepów pochodzących z różnych rejonów świata.

WNIOSKI

Zarówno ERIC-PCR, PFGE, MLST jak też MLVA mogą być stosowane do genotypowania *C. diphtheriae*, zależnie od możliwości finansowych laboratorium oraz wyposażenia jakim dysponuje,

szczególnie w przypadku badań dotyczących ognisk zakażeń. Jednak MLST daje możliwość porównania badanych szczepów ze szczepami izolowanymi w innych krajach na przestrzeni lat, o których informacja jest zdeponowana w ogólnodostępnej bazie danych. Metoda MLVA może stanowić tańszą alternatywę dla MLST po przebadaniu odpowiednio zróżnicowanej dużej grupy szczepów, co pozwoli na utworzenie bazy danych genotypów MLVA *C. diphtheriae*.

Piśmiennictwo:

1. Kuszewski K, Błonica W, Magdzik W i wsp.: Choroby zakaźne i pasożytnicze – epidemiologia i profilaktyka. VI wyd. α-medica press, 2007; 40–4
2. DeWinter LM, Bernard KA, Romney MG: Human clinical isolates of *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* collected in Canada from 1999 to 2003 but not fitting reporting criteria for cases of diphtheria. J Clin Microbiol, 2005; 43: 3447–9
3. Zasada AA, Baczewska-Rej M, Wardak S: An increase in non-toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* infections in Poland – molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of strains isolated from past outbreaks and those currently circulating in Poland. Int J Infect Dis, 2010; 14: e907–12
4. Zasada AA, Zaleska M, Podlasin RB i wsp.: The first case of septicemia due to nontoxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* in Poland: case report. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2005; 4: 8 (<http://www.ann-clinmicrob.com/content/4/1/8>)
5. Vitek CR, Wharton M: Diphtheria in the former Soviet Union: reemergence of a pandemic disease. Emerg Infect Dis, 1998; 4: 539–50
6. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2010. Stockholm, ECDC; 2010
7. Patey O, Bimet F, Riegel P i wsp.: Clinical and molecular study of *Corynebacterium diphtheriae* systemic infections in France. J Clin Microbiol, 1997; 35: 441–5
8. von Hunolstein C, Alfaroni G, Scopetti F i wsp.: Molecular epidemiology and characteristics of *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* strains isolated in Italy during the 1990s. J Med Microbiol, 2003; 52: 181–8
9. Gubler J, Huber-Schneider C, Gruner E i wsp.: An outbreak of nontoxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* infection: single bacterial clone causing invasive infection among Swiss drug users. Clin Infect Dis, 1998; 27: 1295–8
10. Funke G, Altwegg M, Frommelt L i wsp.: Emergence of related nontoxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* biotype mitis strains in Western Europe. Emerg Infect Dis, 1999; 6: 640–5
11. Romney MG, Roscoe DL, Bernard K i wsp.: Emergence of invasive clone of nontoxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* in the urban poor population of Vancouver, Canada. J Clin Microbiol, 2006; 44: 1625–9
12. DeWinter LM, Bernard KA, Romney MG: Human clinical isolates of *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* collected in Canada from 1999 to 2003 but not fitting reporting criteria for cases of diphtheria. J Clin Microbiol, 2005; 43: 3447–9
13. Zasada AA, Baczewska-Rej M: Typy szczepów *Corynebacterium diphtheriae* izolowanych w Polsce w latach 2004–2008. Med Dośw Mikrobiol, 2008; 60: 183–90
14. Kolodkina V, Titov L, Harapa T i wsp.: Molecular epidemiology of *C. diphtheriae* strains during different phases of the diphtheria endemic in Belarus. BMC Infect Dis, 2006; 6: 129
15. Steinbruechner B, Ruberg F, Kist M: Bacterial genetic fingerprint: a reliable factor in the study of the epidemiology of human *Campylobacter enteritis*? J Clin Microbiol, 2001; 39: 4155–9
16. De Zoysa A, Efstratiou A, George RC i wsp.: Molecular epidemiology of *Corynebacterium diphtheriae* from northwestern Russia and surrounding countries studied by using ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol, 1995; 33: 1080–3
17. Bolt F, Cassiday P, Tondella ML i wsp.: Multilocus sequence typing identifies evidence for recombination and two distinct lineages of *Corynebacterium diphtheriae*. J Clin Microbiol, 2010; 48: 4177–85
18. Zasada AA, Jagielski M, Rzczkowska M i wsp.: Zastosowanie metody MLVA do genotypowania *Corynebacterium diphtheriae*. Badania wstępne. Med Dośw Mikrobiol, 2011; 63: 209–18 **Publikacja powstała w wyniku realizacji grantu Naukowej Fundacji Polpharmy**
19. Versalovic J, Koeuth T, Lupski R: Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucl Acids Res, 1991; 19: 6823–31
20. Ugorski M, Chmielewski R: Powtórzone sekwencje DNA typu REP i ERIC u bakterii – znaczenie diagnostyczne. Post Hig Med Dośw, 2000; 54: 3–15
21. Gillings M, Holley M: Repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers is not necessarily directed at ERIC elements. Lett Appl Microbiol, 1997; 25: 17–21
22. Urwin R, Maiden MCJ: Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. Trends in Microbiol, 2003; 11: 479–87
23. Lindstedt B-A: Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. Electrophoresis, 2005; 26: 2567–82

24. van Belkum A: Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). FEMS Immunol Med Microbiol, 2007; 49: 22–7
25. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV i wsp.: Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol, 1995; 33: 2233–9
26. van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L i wsp.: Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. Clin Microb Infect Dis, 2007; 13(Suppl.3): 1–46