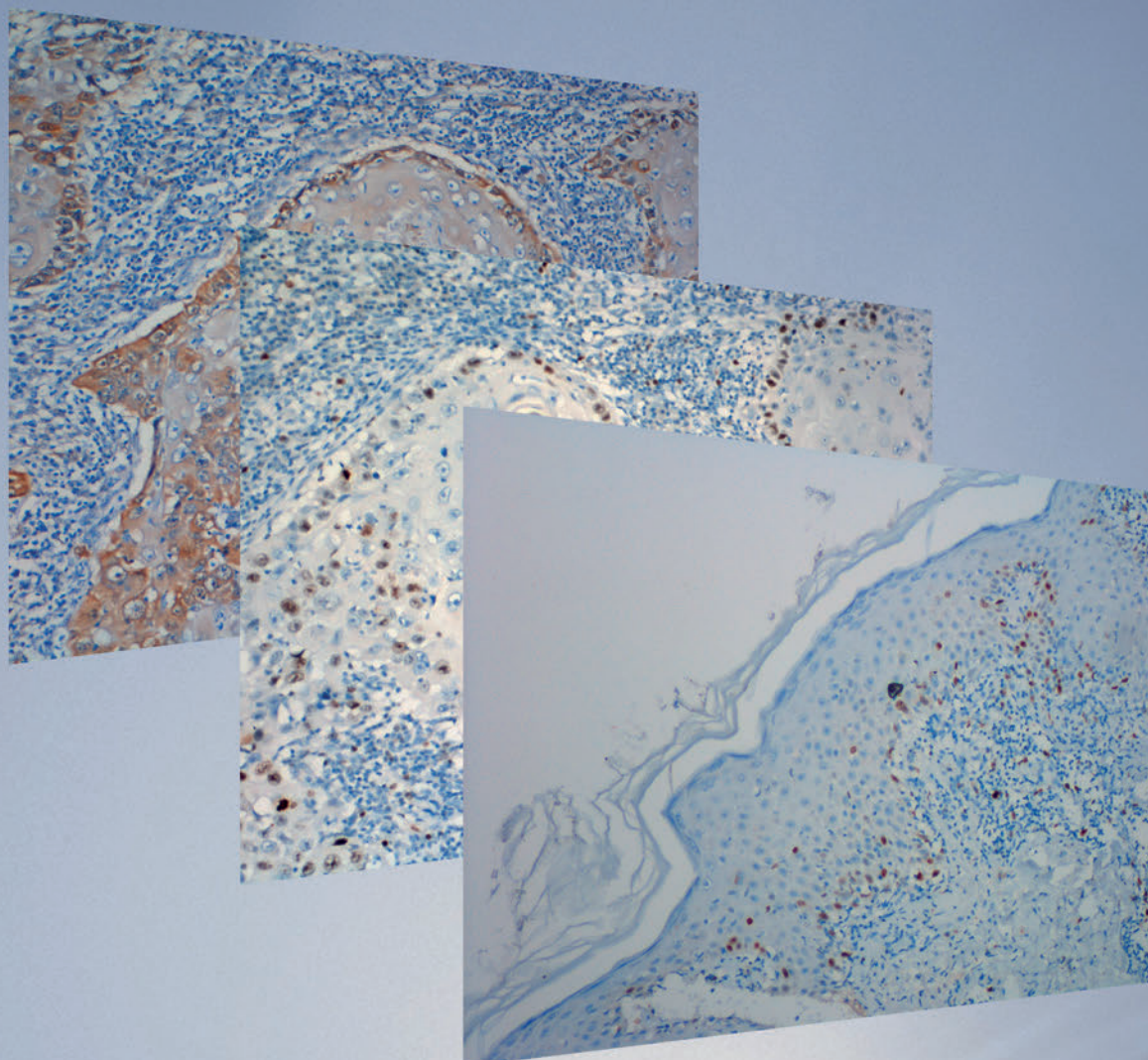


POSTĘPY POLSKIEJ MEDYCYNY I FARMACJI

Zeszyty Naukowe Fundacji Polpharmy





Naukowa
Fundacja
Polpharmy

POMAGAMY LUDZIOM NAUKI

Naukowa Fundacja Polpharmy została założona w 2001 roku przez Zakłady Farmaceutyczne Polpharma SA. Misją Fundacji jest wspieranie rozwoju nauk farmaceutycznych i medycznych poprzez finansowanie badań naukowych w tych dziedzinach. Środki na działalność statutową Fundacji pochodzą w całości z budżetu Polpharmy.

Najważniejszym programem realizowanym przez Fundację jest przeprowadzany corocznie **Konkurs na finansowanie projektów badawczych** w dziedzinie nauk farmaceutycznych i medycznych. Dotychczas odbyło się XII edycji konkursu, na które wpłynęło ponad 500 projektów prac badawczych. Granty naukowe otrzymało 59 zespołów badawczych wywodzących się zarówno z ośrodków akademickich, jak i niezależnych instytucji naukowych. Wartość wszystkich przyznanych grantów wyniosła blisko 16 mln PLN.

Fundacja realizuje również inne programy: Grant rekomendowany

W 2012 roku Fundacja podjęła decyzję o przyznawaniu grantu na realizację projektu badawczego wyłonionego w konkursie organizowanym przez naukowe towarzystwo medyczne. Celem jest wsparcie badań prowadzonych przez młodych badaczy, członków towarzystw naukowych.

Projekt nagradzania najlepszych

Fundacja od dziewięciu lat jest fundatorem nagród finansowych dla laureatów Ogólnopolskiego Konkursu Prac Magisterskich Wydziałów Farmaceutycznych organizowanego od przeszło 40 lat przez Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne.

Program stypendialny

W 2006 roku Fundacja uruchomiła program stypendialny adresowany do uczestników studiów doktoranckich uczelni medycznych. Celem programu jest promowanie i nagradzanie najzdolniejszych doktorantów. Nagrodą jest stypendium naukowe w wysokości 10 tys. zł. Dotychczas Fundacja przyznała 27 stypendiów.

Projekt compliance

Fundacja od wielu lat podejmuje działania, których celem jest utrwalenie w środowisku medycznym znaczenia dobrej współpracy lekarza z pacjentem w leczeniu chorób i jej wpływu na przestrzeganie zaleceń terapeutycznych. W 2013 roku była współorganizatorem kampanii edukacyjnej „Partnerstwo w Leczeniu. Lekarz – Pacjent – Rodzina” prowadzonej pod hasłem „Leczę się skutecznie – przestrzegam zaleceń lekarza.”

Fundacja była wielokrotnie nagradzana i wyróżniana przede wszystkim za konsekwentne wspieranie rozwoju nauk medycznych i farmaceutycznych, m.in., dwukrotnie przez kapitułę Konkursu „Sukces roku w ochronie zdrowia – Liderzy Medycyny” oraz Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne i Samorząd Aptekarski.

POSTĘPY POLSKIEJ MEDYCYNY I FARMACJI

ADVANCES IN POLISH MEDICINE
AND PHARMACOLOGICAL SCIENCES

Tom 3 • Zeszyt 1



WARSZAWA 2013

POSTĘPY POLSKIEJ MEDYCYNY I FARMACJI
ADVANCES IN POLISH MEDICINE AND PHARMACOLOGICAL SCIENCES

Editor-in-Chief Chairman of the Editorial Board • Redaktor Naczelny Przewodniczący
Rady Naukowej PPMiF

Prof. dr hab. n. med. Zbigniew Gaciong, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Associate Editor • Kolegium Redakcyjne

Bożenna Płatos, Naukowa Fundacja Polpharmy, Warszawa

Chairman of the Scientific Council • Przewodniczący Rady Naukowej, Naukowej Fundacji Polpharmy

Prof. Piotr Kuna, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Editorial Board • Rada Naukowa

Prof. dr hab. Waldemar Banasiak

Prof. dr hab. Stefan Chłopicki

Prof. dr hab. Edward Franek

Prof. dr hab. Grzegorz Gryniewicz

Prof. dr hab. Marek Jarema

Prof. dr hab. Roman Kaliszan

Prof. dr hab. Roman Lorenc

Prof. dr hab. Andrzej Mackiewicz

Prof. dr hab. Grzegorz Opolski

Prof. dr hab. Edmund Przeglński

Prof. dr hab. Jarosław Reguła

Prof. dr hab. Kazimierz Roszkowski-Śliż

Doc. dr hab. Jacek Rożniecki

Prof. dr hab. Jacek Szałwiński

Prof. dr hab. Janina Stępińska

Prof. dr hab. Jerzy Szaflik

Prof. dr hab. Cezary Szczylik

Prof. dr hab. Jerzy Władysław Wordliczek

Prof. dr hab. Marian Zembala

Editorial office • Redakcja

Assistant Editor • Redaktor Prowadzący

Małgorzata Łada

malgorzata.lada@indexcopernicus.com

Associate Editor • Kolegium Redakcyjne

Bożenna Płatos

bozenna.platos@polpharma.com

Publisher Wydawca

INDEX COPERNICUS
INTERNATIONAL

Index Copernicus Sp. z o.o.

Ul. Żurawia 6/12

00-503 Warszawa

e-mail: postepy@indexcopernicus.com

Published for Wydawane dla



Prezes Zarządu

Dr Wojciech Kuźmierkiewicz

WicePrezes Zarządu

Dr Bożenna A. Skalińska

Członkowie Zarządu

Beata Kamosińska

Naukowa Fundacja Polpharmy

ul. Bobrowiecka 6 • 00-728 Warszawa

tel. (22) 364 63 13 • fax: (22) 364 61 56

e-mail: fundacja@polpharma.com

ISSN 1234-5678

rocznik

Indeksowane w: Index Copernicus

1.500 egz

Zdjęcia na okładce pochodzą z pracy Aleksandry Zamirskiej i Jacka Szepietowskiego
pt. „Rola metalotionein w skórnej karcynogenezie”

© Naukowa Fundacja Polpharmy. Wszystkie prawa zastrzeżone.

Żadna część tej publikacji nie może być przedrukowana, kopiowana, powielana,
udostępniana w formie papierowej jak i elektronicznej bez uprzedniej pisemnej zgody Fundacji.

Spis treści

- 5 **Słowo wstępne**
Editorial
Zbigniew Gaciong
- 7 **Rola metalotionein w skórnej karcynogenezie**
Role of metallothioneins in cutaneous carcinogenesis
Aleksandra Zamirska • Jacek Szepietowski
- 17 **Badania przesiewowe poprzedzające chemioterapię 5-fluorouracylem**
The screening methods preceding 5-FU-based chemotherapy
Barbara Dołęgowska • Anna Ostapowicz • Małgorzata Stańczyk-Dunaj • Wojciech Błogowski
- 29 **Sporadyczny rak piersi – charakterystyka molekularna oraz genomowe rearanżacje strukturalne w diagnostyce i rokowaniu**
Sporadic breast cancer – molecular characteristics and structural genomic rearrangements in diagnostics and disease outcome prognosis
Kinga Kochan • Anna Ronowicz • Magdalena Gucwa • Piotr Madanecki • J. Renata Ochocka • Jarosław Skokowski • Arkadiusz Piotrowski
- 45 **Hamowanie aktywności biologicznej interleukiny 15 – nowe perspektywy**
Inhibition of the biological activity of interleukin-15 - new perspectives
Barbara Żyżyńska-Granica • Oliwia Zegrocka-Stendel • Małgorzata Dutkiewicz • Szymon Niewieczera • Bartosz Trzaskowski • Sławomir Filipek • Piotr Krzeczyński • Magdalena Winiarska • Katarzyna Koziak
- 57 **Kinaza białkowa ERK1/2 jako wewnątrzkomórkowy obiekt badań nad mechanizmem uzależnienia od kokainy i jako cel potencjalnej farmakoterapii tej choroby**
The protein kinase ERK1/2 as an intracellular object of the mechanism of cocaine addiction and as a target of the potential pharmacotherapy of this brain disorder
Małgorzata Filip
- 67 **W poszukiwaniu podłoża genetycznego astmy oskrzelowej z nadwrażliwością na aspirynę**
In search of genetic background for aspirin-induced asthma
Dorota Kacprzak • Rafał Pawliczak
- 75 **Związek zmienności występującej w całym genomie (Genomewide association) ze stopniem przerostu mięśnia lewej komory serca u chorych ze zwężeniem zastawki aortalnej oraz z jego regresją po operacji wszczepienia zastawki aortalnej**
Impact of genetic variation on myocardial hypertrophy in patients with aortic valve stenosis and on its regression after aortic valve replacement surgery. A whole genome approach
Grzegorz Placha • Ewa Orłowska-Baranowska
- 83 **Nieprzestrzeganie przez pacjentów zaleceń terapeutycznych podczas leczenia hiperlipidemii – częstość, przyczyny, możliwości poprawy**
Non-adherence to hyperlipidemia treatment – prevalence, reasons, possible interventions
Przemysław Kardas

Słowo wstępne

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



Szanowni Państwo,

Kolejny, III numer Postępów Polskiej Medycyny i Farmacji prezentuje artykuły, zawierające wyniki badań związanych z realizacją projektów naukowych finansowanych przez Naukową Fundację Polpharmy w latach 2007-2010.

Pomimo, że w żadnym z ogłoszonych w tym czasie konkursów onkologia nie stanowiła tematu edycji, to jednak cztery nagrodzone projekty dotyczyły zagadnień związanych z biologią nowotworów. Zespół prof. Jacka Szepietowskiego analizował rolę metalotionein – białek powstających w wyniku ekspozycji na promieniowanie ultrafioletowe, w procesie powstawania nowotworów skóry. Badacze wykazali, że przeciwnie do opinii niektórych ekspertów, obecność wymienionych białek może wiązać się z bardziej agresywnymi postaciami raka, co nakazuje ostrożność przy dalszych próbach terapeutycznego modulowania ekspresji tych cząsteczek w skórze człowieka.

5-Fluorouracyl i kapecytabina – jego prolek podawany doustnie, należą do podstawowych preparatów w terapii nowotworów przewodu pokarmowego. Niedobór dehydrogenazy dihydropyrimidynowej – podstawowego enzymu metabolizującego lek – grozi wystąpieniem ciężkich działań niepożądanych. Prof. Barbara Dołęgowska wykazała, że kosztowne badania genetyczne czy analiza aktywności enzymu przy użyciu HPLC mogą być zastąpione znacznie łatwiejszą metodą pomiaru aktywności enzymu w spektrofotometrii. Wyniki te wskazują, że metody spektrofotometryczne można stosować jako badania przesiewowe poprzedzające chemioterapię 5-FU.

Z biologią nowotworów wiąże się także projekt doc. Arkadiusza Piotrowskiego, którego zespół analizował indywidualny profil mutacji w komórkach raka sutka posługując się specjalnie do tego celu zaprojektowaną mikromacierzą DNA. Jak podkreślają Autorzy pracy, ich dane przybliżają szanse na w pełni spersonalizowaną terapię opartą na diagnostyce molekularnej i genetycznej w tak zróżnicowanej chorobie jaką jest rak piersi.

Interleukina 15 powstaje w wielu komórkach, także poza układem odpornościowym i wpływa nie tylko na odpowiedź immunologiczną, ale także na procesy związane z nowotworzeniem czy rozwojem patologii naczyń. Zespół prof. Katarzyny Koziak znalazł szereg związków, które hamują aktywność IL-15, co może mieć znaczenie w terapii schorzeń o podłożu zapalnym, czy nowotworów. Warto podkreślić, że wyniki prac finansowanych przez Fundację Polpharmy stały się podstawą dla czterech zgłoszeń patentowych.

Kinazy białkowe rodziny ERK regulują liczne procesy komórkowe; między innymi uczestniczą w aktywacji receptorów dopaminowych czy glutaminianergicznych, które wiążą się z utrwalaniem śladów pamięciowych powstałych podczas stosowania substancji uzależniających. Prof. Małgorzata Filip posługując się modelem szczurzym uzależnienia od kokainy analizowała rolę kinazy białkowej ERK1/2 w mechanizmie rozwoju nałogu i jej potencjalne znaczenie w terapii. Badania wykazały, że blokowanie aktywności kinazy hamuje nawrót do nałogu, co stwarza możliwość zastosowania inhibitorów

ERK1/2 w farmakoterapii uzależnienia od tej substancji psychoaktywnej.

Kolejne dwa projekty, których wyniki stały się podstawą do publikacji w bieżącym numerze Postępów zawierają wyniki poszukiwań podłoża genetycznego często występujących chorób. Prof. Rafał Pawliczak poszukiwał genów, które ulegają ekspresji w komórkach krwi krążącej u pacjentów z astmą aspirynową. Dane Autorów oparte na analizie mikromacierzy RNA nie dostarczają dowodów na istnienie genów, które ulegają systemowej aktywacji w tej chorobie. Tym samym wyniki Autorów wskazują kierunek dalszych poszukiwań, który powinien dotyczyć analizy zmian na poziomie białek czy zjawisk występujących lokalnie w drogach oddechowych.

Dr Grzegorz Placha i Prof. Ewa Orłowska-Baranowska poszukują czynników genetycznych, które wpływają na masę lewej komory. Autorzy wykorzystują unikalną bazę danych pacjentów zgromadzonych w Instytucie Kardiologii ze stenozą aortal-

ną, poddanych operacji wymiany zastawki. Jest to najczęściej występująca nabyta wada serca i ryzyko powikłań zależy także od stopnia towarzyszącego przerostu lewej komory. Dotychczasowe wyniki wskazują, że na masę lewej komory mogą wpływać znane geny – jak chymaza, ale także istnieją nieodkryte dotychczas *loci*, które wiążą się z przerostem lewej komory w odpowiedzi na obciążenie mechaniczne.

Na koniec – co nie znaczy najmniej istotne, wyniki badań prof. Przemysława Kardasa, dotyczące czynników wpływających na przestrzeganie zaleceń terapeutycznych przez pacjentów. Autorzy badali grupę osób z hipercholesterolemią przyjmujących statyny w ramach konkursu dotyczącego „*compliance*”. Bez wątplenia, zespół należy do największych ekspertów tego zagadnienia w Polsce, a jego kierownik stał na czele dużego projektu ABC finansowanego z budżetu Unii Europejskiej.

Zapraszam do lektury



Rola metalotionein w skórnej karcynogenezie

Role of metallothioneins in cutaneous carcinogenesis

Aleksandra Zamirska,
Jacek Szepietowski

Katedra i Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Akademii Medycznej
we Wrocławiu

Naukowa Fundacja Polpharmy przyznała w 2009 roku zespołowi pracującemu pod kierunkiem prof. dr hab. Jacka Szepietowskiego grant na realizację projektu badawczego pt.: „Rola metalotionein w skórnej karcynogenezie w oparciu o ocenę ekspresji metalotionein oraz antygenu Ki-67 w raku kolczystokomórkowym i rogowaceniu słonecznym”

STRESZCZENIE

Metalotioneiny (MT) to niskocząsteczkowe białka powszechnie występujące w komórkach i tkankach, biorące udział w utrzymaniu homeostazy cynku i miedzi w organizmie, usuwające metale ciężkie oraz wolne rodniki tlenowe. MT dostarczają jony cynku enzymom zaangażowanym w procesy replikacji, transkrypcji i biosyntezy białek, uczestniczą w proliferacji i różnicowaniu komórek, regulują proces apoptozy, angiogenezy, modyfikują stan zapalny. Wzmoczoną ekspresję MT wykazano w tkankach wielu nowotworów narządów wewnętrznych oraz w czerniaku skóry. Udowodniono, że nasilona ekspresja MT występuje w słabiej zróżnicowanych postaciach nowotworów i wiąże się z agresywniejszym przebiegiem choroby. Nieliczne, opublikowane dotychczas badania nie wyjaśniły w pełni roli i ekspresji MT w nieczerniakowych nowotworach skóry.

Słowa kluczowe: metalotioneiny • rak kolczystokomórkowy skóry • rogowacenie słoneczne • skóra

SUMMARY

Metallothioneins (MT) are low molecular weight metal-binding proteins widely expressed in cells and tissues, engaged in zinc and copper homeostasis, participating in detoxification of heavy metal ions, protecting cells against reactive oxygen species. Metallothioneins supply zinc ions to Zn-enzymes involved in replication, transcription and protein synthesis, take part in cell proliferation and differentiation, regulate apoptosis and angiogenesis, modulate inflammation. MT-overexpression was revealed in variety of internal organ cancers and in malignant melanoma. Higher MT-expression was found in less differentiated tumor cells and correlated positively with more aggressive course of the disease. There are just a few studies on the role and expression of MT in non-melanoma skin cancers.

Wpłynęło: 2012-09-25
Zaakceptowano: 2012-10-09
Opublikowano: 2013-12-31

Adres do korespondencji:
Dr Aleksandra Zamirska
Klinika Dermatologii, Wenerologii
i Alergologii, Chałubińskiego 1,
50-368 Wrocław,
e-mail: ola@zamirska.com

Key words: metallothioneins • squamous cell carcinoma • actinic keratosis • skin

WPROWADZENIE

Nieczerniakowe nowotwory skóry to najczęstsze nowotwory złośliwe u przedstawicieli rasy kaukaskiej. Na świecie co roku notuje się ponad 2,75 miliona nowych zachorowań [1-3]. Za stały wzrost liczby zachorowań na raki skóry odpowiadają min. zmiany stylu życia związane z częstszymi podróżami do ciepłych krajów i przewlekłym opalaniem, nieustanna popularność łóżek solaryjnych, wzrastająca populacja ludzi starszych oraz zmniejszenie grubości ochronnej warstwy ozonowej w atmosferze. Poważny problem stanowią nowotwory skóry u chorych po przeszczepach, pacjentów z pierwotnymi lub wtórnymi niedoborami odporności np.: nosicieli wirusa HIV lub chorych leczonych stale lekami immunosupresyjnymi, u których śmiertelność spowodowana rakami kolczystokomórkowymi skóry (SCC, squamous cell carcinoma) jest wielokrotnie wyższa w porównaniu do populacji ogólnej [4-8].

Podstawowym czynnikiem odpowiedzialnym za powstanie zmian przednowotworowych, takich jak rógowacenie słoneczne (AK) i nowotworów skóry jest długotrwała, nadmierna ekspozycja na działanie promieniowania ultrafioletowego (UV) [9-10]. Promieniowanie UV uszkadza DNA komórek, powoduje powstanie wolnych rodników tlenowych niszczących struktury komórkowe oraz obniża odporność organizmu, co po latach prowadzi do przekształcenia prawidłowych keratynocytów w komórki rakowe [11-13]. Jednym z mechanizmów obronnych uruchamianych w skórze po opalaniu jest pobudzenie syntezy metalotionein [14-15].

METALOTIONEINY, A NOWOTWORY

Metalotioneiny (MT I-IV) to niskocząsteczkowe, bogate w cysteinę białka, występujące powszechnie w komórkach i tkankach. Wysoki poziom MT-I i II, najczęściej występujących izoform metalotionein, stwierdzono w wątrobie, nerkach oraz w komórkach wielu nowotworów narządów wewnętrznych [16-18]. MT-III została zidentyfikowana w mózgu, natomiast MT-IV w naskórku i nabłonku wielowarstwowym płaskim górnego odcinka przewodu pokarmowego. W nabłonku wielowarstwowym płaskim rógowaciejącym obecność MT-I i II wykazano w warstwie podstawnej, natomiast MT-IV w warstwach przypodstawnych [19-20].

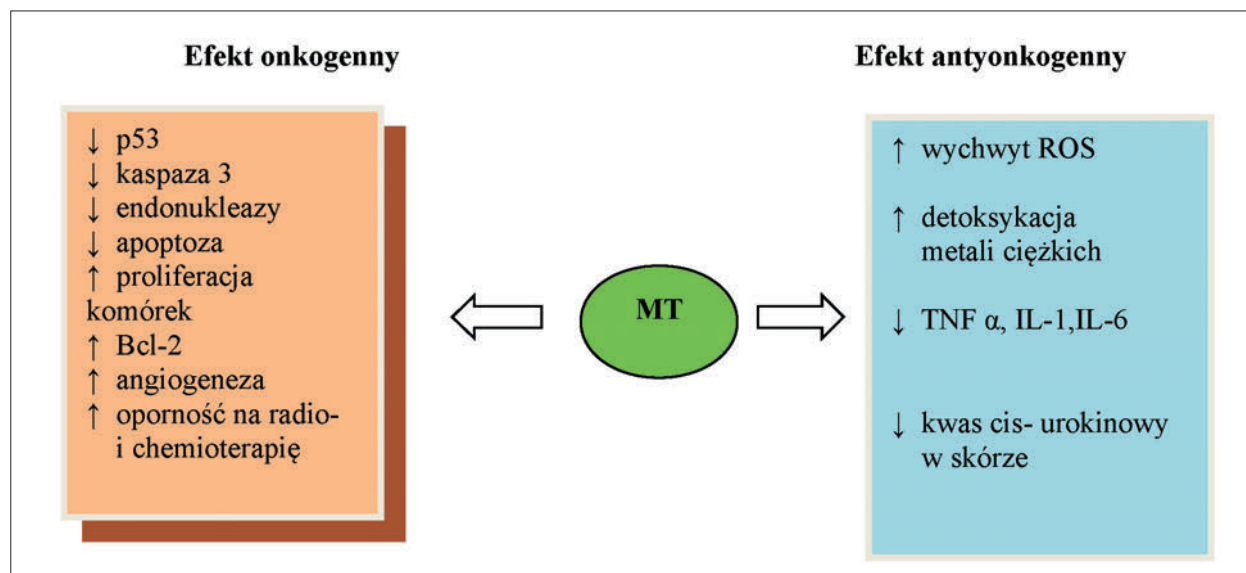
Główną funkcją metalotionein jest utrzymanie równowagi cynku i miedzi w organizmie. Metale te wchodziły w skład enzymów i białek, między innymi białka p53, uczestniczących w usuwaniu uszkodzeń DNA, replikacji, transkrypcji, proliferacji i różnicowaniu komórek.

Ich synteza zmienia się w różnych fazach cyklu komórkowego, a najwyższą ekspresję MT stwierdza się w jądrze komórkowym w fazie S i G2 cyklu komórkowego [21-23]. Metalotioneiny wiążą także metale ciężkie min. kadm, ołów, nikiel, rtęć, co zabezpiecza organizm przed ich toksycznym działaniem [24]. MT mają dodatkowo zdolność hamowania apoptozy, pobudzania angiogenezy, zmniejszania stanu zapalnego oraz wykształcania oporności na radioterapię i chemioterapię w komórkach nowotworowych [25-26]. Wszystkie te cechy sprawiły, że metalotioneiny stały się cennym obiektem badań w kontekście ich znaczenia dla przebiegu transformacji nowotworowej komórek.

Wpływ na proliferację i różnicowanie komórek polega prawdopodobnie na dostarczaniu jonów Zn do syntezy białek i molekuł regulatorowych zaangażowanych w proces proliferacji zarówno komórek prawidłowych jak i nowotworowych [22,27]. Jak dotąd nie zostało wyjaśnione, czy wzrost ekspresji MT w tkance nowotworowej jest zjawiskiem pierwotnym czy wtórnym w stosunku do większego gromadzenia się Zn w komórkach guza. Podając dietę ubogą w cynk zwierzętom doświadczalnym, uzyskano zmniejszenie masy nowotworu oraz spadek zawartości MT w wątrobie [17]. Jednak samo ograniczenie ilości Zn nie wystarcza do zmniejszenia syntezy MT, która może być pobudzana również przez inne czynniki [17]. Stwierdzono np.: że wraz ze wzrostem guza, rośnie także synteza MT w wątrobie nie objętej procesem chorobowym, a usunięcie chirurgiczne nowotworu powoduje spadek stężenia MT w surowicy i komórkach wątrobowych do wartości prawidłowych [28]. Cynk w tkance nowotworowej gromadzi się kosztem Zn w tkankach gospodarza. Jednocześnie zwiększa się jego resorpcja z przewodu pokarmowego i spada stężenie Zn w surowicy [14,17].

Wzmożoną ekspresję MT wykazano w tkankach wielu nowotworów narządów wewnętrznych takich jak: nowotwory płuc, sutka, nerek, pęcherza moczowego, nosogardła, ślinianek, krtani, przełyku, szyjki i trzonu macicy, jajnika, jądra, trzustki, natomiast spadek aktywności MT obserwowany był w raku wątroby, żołądka, jelita grubego, tarczycy i w nowotworach centralnego układu nerwowego [16,21,22,29].

Na ekspresję MT mogą wpływać: stopień zróżnicowania histologicznego (G) oraz indeks proliferacyjny nowotworu (mitotic index - MI). Niektórzy badacze sugerują, że komórki nowotworowe bardziej niedojrzałe i szybciej się dzielące wykazują wyższą ekspresję MT, a białko to może być wykorzystane jako ważny czynnik rokowniczy. Korelację pomiędzy niekorzystnym przebiegiem choroby nowotworowej a nadekspresją MT wykazano jak dotychczas w rakach: sutka [16,30], płuc [31], nerek i dróg moczowych [32], pęcherzyka żółciowego [33].



Ryc.1. Wpływ metalotionein na onkogenezę [22] – modyfikacja własna

wego [33], trzustki [34], jajnika [35], mięsakach tkanek miękkich [36], w płaskonabłonkowych rakach jamy ustnej, krtani i przełyku [37-39] oraz w czerniaku skóry [40-44]. Nie stwierdzono natomiast wpływu ekspresji MT na przebieg raka żołądka [45], jelita grubego [46-47], ostrej białaczki limfoblastycznej [48] oraz guzów mózgu [16]. Zaobserwowano niższą aktywność MT w bardziej zaawansowanych i rokujących gorzej nowotworach tarczycy, wątroby i prostaty [22].

Dowodzono także, że wysoki poziom metalotionein w tkankach nowotworowych jest jednym z czynników odpowiedzialnych za wielolekową oporność tkanek guza na cytostatyki (multiple drug resistance) oraz na radioterapię [14] (Ryc.1). Mechanizm unieczynnienia chemioterapeutyków przez MT może być bezpośredni (wiązanie leku przez MT z utworzeniem jego nieaktywnej formy) lub pośredni przez inaktywację wolnych rodników tlenowych powstałych po zastosowaniu niektórych leków przeciwnowotworowych np.: antracyklin [16]. Wśród leków, których efekt terapeutyczny ulega obniżeniu przy wysokich poziomach MT, wymienia się: cisplatynę, adriamycynę, bleomycynę, cyklofosfamid, chlorambucil, melfalan [14,49]. Również inne substancje wykorzystywane w terapii nowotworów (kortykosteroidy, INF) mogą zwiększać syntezę MT, a przez to powodować oporność tkanek guza na chemioterapię [49]. Brak skuteczności radioterapii wynika z wychwytywania przez MT wolnych rodników tlenowych, powstałych w następstwie działania promieni jonizujących [14]. Wykazano także, że MT mogą hamować apoptozę indukowaną podaniem etopozydu czy doksorubicyny [50-51].

Metalotioneiny hamują apoptozę poprzez wpływ jonów Zn na kaspazę 3 i endonukleazę zależną od Ca/

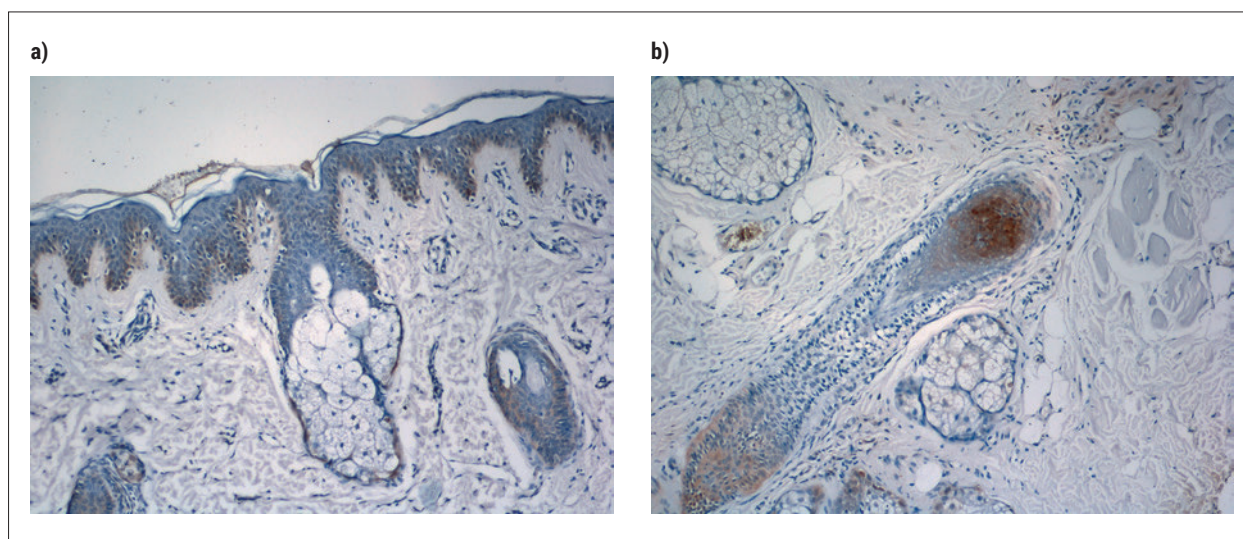
Mg. Kaspaza 3 i endonukleaza są ważnymi białkami pobudzającymi fragmentację DNA, będącą kluczowym zjawiskiem w procesie apoptozy [22]. MT inaktywują dodatkowo zależne od jonów cynku białko p53 (Ryc.1). W ten sposób, niezależnie od mutacji genu p53, dochodzi do zmniejszenia aktywności białka p53, zahamowania apoptozy i w rezultacie proliferacji komórek z nieprawidłowym materiałem genetycznym.

Rosnący nowotwór wymaga obecności większej liczby naczyń krwionośnych, dzięki którym dostarczany jest tlen i substancje odżywcze dla szybko dzielących się komórek guza. Metalotioneiny stymulują angiogenezę poprzez pobudzenie syntezy VEGF, TGF β , FGF [26,52-53] (Ryc.1).

Gniazda komórek nowotworowych otaczają zwykle nacieki zapalne złożone z limfocytów, neutrofilów, makrofagów, z których uwalniane są cytokiny o działaniu proonkogennym: TNF α , IL-1, IL-6 oraz wolne rodniki tlenowe [22,54]. MT-I i MT-II zmniejszają aktywację i napływ komórek zapalnych oraz obniżają poziom TNF α , IL-1, IL-6 [22,26] (Ryc.1).

METALOTIONEINY W SKÓRZE ZDROWEJ

Wiadomo, że synteza MT w skórze jest pobudzana po ekspozycji na UV bezpośrednio lub wtórnie poprzez uwalnianie czynników zapalnych i wolnych rodników tlenowych [46-47]. Ablett i wsp. [55] oceniali wpływ intensywnego opalania na ekspresję MT w skórze zdrowej. Stwierdzili znaczący wzrost syntezy MT w warstwie podstawnej naskórka i w mniejszym stopniu w warstwie przypodstawnej u osób,



Ryc.2. Ekspresja MT w skórze zdrowej - intensywne barwienie komórek warstwy podstawnej naskórka (a) i macierzy włosa (b).

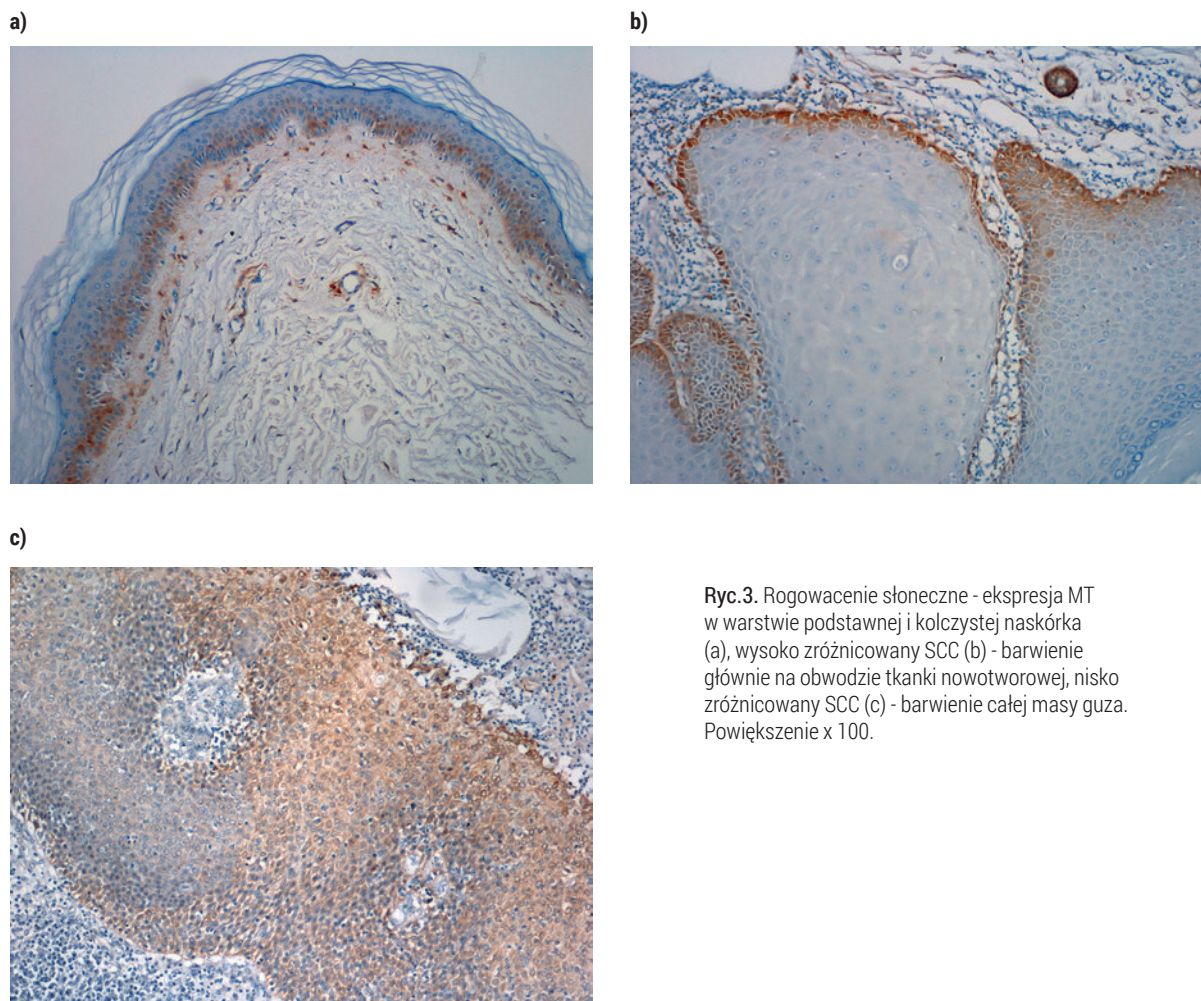
które przebywały na słońcu w ciągu 72 godzin przed badaniem. Co ciekawe w grupie tej nadekspresję MT wykazano zarówno w skórze bezpośrednio ekspozowanej na ultrafiolet jak i w skórze zasłoniętej. Autorzy tłumaczyli fakt ten obecnością krążących we krwi cytokin, głównie IL-6, które uwalniane z komórek pod wpływem UV mogą stymulować syntezę metalotionein w obszarach skóry nie ekspozowanych na UV [55]. Podobne obserwacje opublikował Nashimura i wsp. [56]. Uczni japońscy zaobserwowali, że uszkodzone pod wpływem UV keratynocyty uwalniają cytokiny, głównie IL-6, a przy jej braku TNF- α , które silnie pobudzają syntezę MT w fibroblastach i keratynocytach odpowiednio w 24 i 72 godzin po naświetlaniu [56]. Jednocześnie badacze ci wykluczyli możliwość wpływu jonów Zn lub Cu na syntezę MT po ekspozycji na ultrafiolet. Widyarini i wsp. [57] potwierdzili, że w skórze zdrowej naświetlanej promieniami UV, wzrasta znacząco synteza MT, ale tłumaczyli to odpowiedzią komórek na zwiększoną ilość wolnych rodników tlenowych. Udowodniono także, że MT inaktywują działający immunosupresyjnie kwas cis-urokinowy (cis-UCA) [58]. Potwierdziły to badania Hanady [59], który stwierdził większą liczbę uszkodzonych przez UVB komórek, tzw. sunburn cells (SBC) w skórze myszy pozbawionych genu dla MT-I i MT-II.

Badacze z Australii wykazali, że aplikacja na skórę izoflawonoidów: equolu (4',7-dihydroxyizoflavone) lub jego syntetycznej pochodnej NV-07 α , może pobudzać syntezę MT w skórze naświetlanej przez promieniowanie imitujące promienie słoneczne (SSUV - solar simulated UV radiation), co łącznie zmniejsza reakcję zapalną wywołaną ultrafioletem oraz hamuje supresję układu immunologicznego [57]. Jednocześnie samo podawanie equolu bez naświetlań

UV nie powoduje wzrostu syntezy MT w skórze [57]. Equol zmniejsza także karcynogenezę indukowaną przez UV i DMBA (7,12-dimethylbenzantracen) [60]. U myszy, którym aplikowano na skórę preparat z tym izoflawonoidem, po 40 tygodniach jednoczesnego naświetlania UV i stosowania DMBA, liczba zmian nowotworowych była nawet do 58 % mniejsza, a powstałe SCC miały rozmiar o 71-82 % mniejszy w porównaniu z myszami, których skóra nie była chroniona [60]. Korzystne działanie miejscowych izoflawonoidów u ludzi potwierdził natomiast Friedman i wsp. [61]. Wykazał on, że stosowanie NV-07 α hamuje efekt immunosupresyjny UV, co wynika ze zwiększenia aktywności MT w skórze [61].

Wzmocniona ekspresja MT w skórze hamuje także transformację nowotworową spowodowaną czynnikami chemicznymi. W badaniu na modelu zwierzęcym wykazano, że MT jako antyoksydanty chronią skórę przed rozwojem raków indukowanych miejscowo aplikowanymi związkami chemicznymi o znanym potencjale karcynogennym: DMBA lub TPA (12-O-tetradecanol-forbol-13-acetatem) [62-63]. Karasawa i wsp. [64] stwierdzili wzrost syntezy MT w warstwie podstawnej naskórka po zastosowaniu forbolu lub toksyny cholery. Wydaje się więc, że wzbudzenie syntezy MT w skórze zdrowej jest czynnikiem korzystnym, hamującym wczesny etap karcynogenezy wywołanej zarówno czynnikami chemicznymi jak i promieniowaniem UV.

W skórze zdrowej ekspresję MT wykazują komórki warstwy podstawnej, komórki tworzące opuszkę i zewnętrzną pochewkę mieszków włosowych oraz komórki gruczołów łojowych i potowych, co potwierdzają badania własne jak i doniesienia innych autorów [55,64-67]. W prawidłowym naskórku odsetek



Ryc.3. Rogowacenie słoneczne - ekspresja MT w warstwie podstawnej i kolczystej naskórka (a), wysoko zróżnicowany SCC (b) - barwienie głównie na obwodzie tkanki nowotworowej, nisko zróżnicowany SCC (c) - barwienie całej masy guza. Powiększenie x 100.

komórek MT-dodatnich nie przekracza 50% komórek, a ekspresja metalotionein jest słaba, mimo że poddano ocenie fragmenty skóry zdrowej z okolic ekspozowanych na promienie UV [67].

EKSPRESJA MT W ROGOWACENIU SŁONECZNYM I W RAKACH SKÓRY

W ogniskach rogowacenia słonecznego, będącego stanem przednowotworowym dla SCC, komórki MT-dodatnie stwierdza się najczęściej w warstwie podstawnej i przypodstawnej zmienionego naskórka (83% przypadków AK) [67]. Rozmieszczenie MT w rakach pochodzenia ektodermalnego wykazuje pewne podobieństwa. W dobrze zróżnicowanych rakach płaskonabłonkowych języka wykazano największą ekspresję MT na obrzeżach guza [68]. Badacze brazylijscy oceniając raki kolczystokomórkowe skóry stwierdzili obecność komórek MT-dodatnich rozproszonych w całej masie guza, jednak w SCC wysoko zróżnicowanych,

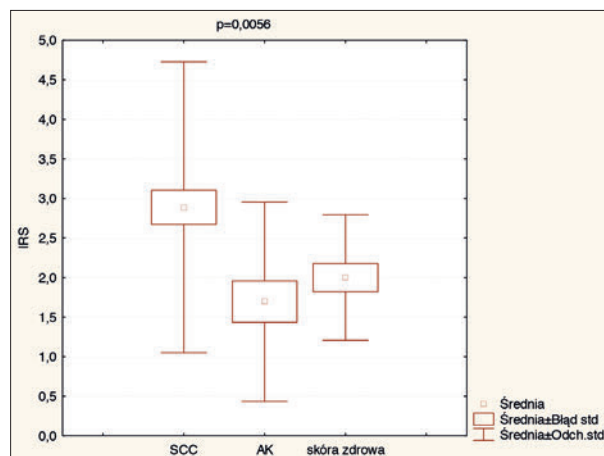
podobnie jak we wcześniejszej pracy, wybarwieniu ulegały głównie komórki na brzegach zmian, natomiast obszary w środku gniazd nowotworowych, gdzie keratynizacja była większa, nie ulegały zabarwieniu w ogóle [65]. Własne obserwacje potwierdzają powyższe doniesienia. W SCC wysoko zróżnicowanych (Broders 1-2) ekspresja metalotionein jest najbardziej nasiloną na obrzeżach gniazd nowotworowych (61%), natomiast w rakach słabo zróżnicowanych i anaplastycznych (Broders 3-4) komórki wykazujące obecność MT rozrzucone są w całej masie guza (67,5%) [67]. Lokalizacja komórek o największej aktywności MT na obwodzie mas nowotworowych wynika prawdopodobnie z najwyższej aktywności proliferacyjnej tych części guza. Mimo to, nie stwierdza się istotnych statystycznie różnic pomiędzy nasileniem ekspresji MT, a rozmieszczeniem komórek MT-dodatnich w rakach kolczystokomórkowych skóry ($p=0,99$) [67].

W rakach głowy i szyi zaobserwowano ekspresję MT w zdrowych komórkach otaczających no-

wotwór [25]. W naskórku przylegającym do raka kolczystokomórkowego skóry również stwierdzono zwiększoną barwność warstwy suprabazalnej [65]. Wynika stąd, że komórki nowotworowe mogą pobudzać syntezę MT w otaczających tkankach.

W zmienionych nowotworowo keratynocytach rola metalotionein nie jest do końca jasna. Rossen i wsp. [69] badając raki podstawnkomórkowe skóry stwierdzili nasilenie ekspresji MT w postaci naciekającej BCC oraz słabą lub nieoznaczalną ekspresję MT w postaci guzowatej, co przemawiało za powstaniem gorszej rokowniczo odmiany BCC przy zwiększonej aktywności metalotionein. We własnej pracy na podstawie badania histopatologicznego dokonano podziału 73 przypadków SCC na raki rogowaciejące (keratodes), nierogowaciejące (akeratodes) oraz postaci mieszane SCC/BCC. Zauważono, że najwyższe wartości ekspresji MT występują w rakach nierogowaciejących, niższe w rakach rogowaciejących a najniższe w postaciach mieszanych, jednak różnice te nie były istotne statystycznie, co wskazuje, że aktywność MT nie zależy od typu histologicznego guza [67]. Jednocześnie dokonując nieco innego podziału SCC skóry z uwzględnieniem ich stopnia zróżnicowania histologicznego (G) według Brodersa, zauważono wyraźną tendencję do wzrostu ekspresji MT w rakach słabiej zróżnicowanych, a różnice między SCC wysoko i słabo zróżnicowanymi zbliżyły się do granicy istotności statystycznej ($p=0,06$) [67]. Być może analiza większej grupy raków kolczystokomórkowych skóry dałaby jednoznaczny wynik, a MT mogłaby być dobrym wskaźnikiem złośliwości SCC. Dodatkowo stwierdzono, że zarówno głębokość nacieku nowotworowego jak i wielkość i głębokość stanu zapalnego wokół SCC nie ma wpływu na ekspresję metalotionein [67].

Borges i wsp. [65] analizowali różnice w ekspresji metalotionein w BCC, będącym nowotworem o mniejszej agresywności i łagodniejszym przebiegu klinicznym, w porównaniu z SCC. Do badań zostało włączonych 26 przypadków BCC i 20 przypadków SCC. W przypadku BCC stwierdzono średnio 18,5 % komórek MT-dodatnich, podczas gdy wartość ta dla SCC wyniosła 69,1 % [65]. Badacze sugerowali, że wyższa ekspresja MT towarzyszy rakom skóry o agresywniejszym przebiegu. By przybliżyć rolę metalotionein w zmienionych nowotworowo keratynocytach autorka i wsp. [67] porównywali nasilenie ekspresji MT w skórze zdrowej, w rogowaceniu słonecznym oraz w raku kolczystokomórkowym i wykazali, że ekspresja MT jest znamiennej wyższa (średnio $2,89 \pm 1,84$) w porównaniu z AK (średnio $1,69 \pm 1,26$) ($p=0,006$) i wyższa w porównaniu ze skórą zdrową (średnio $2 \pm 0,79$) ($p=0,075$) [67] (Ryc.4).

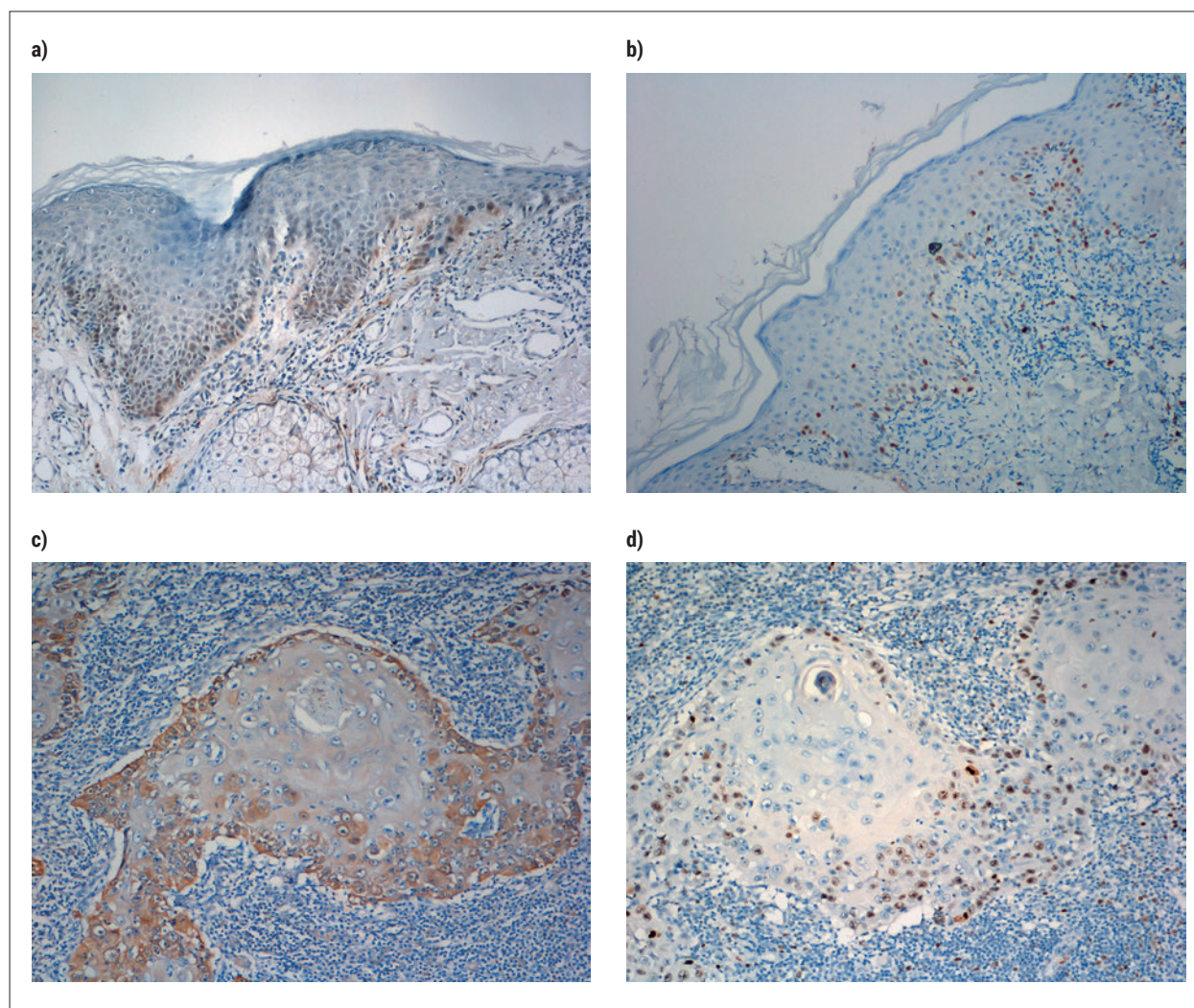


Ryc.4. Nasilenie ekspresji MT (IRS) w SCC, w AK i skórze zdrowej [67].

Także inne badania dowodzą, że aktywność MT rośnie w przypadku nowotworów złośliwych w porównaniu ze zmianami przednowotworowymi, na podłożu których rozwijają się poszczególne raki. Wspomnianą zależność obserwowano w przypadku raków krtani i jamy nosowo-gardłowej [70-71]. Wydaje się, że większa aktywność MT w nowotworze złośliwym w porównaniu ze zmianą łagodną spowodowana jest większym zapotrzebowaniem na jony Zn, dla których MT jest magazynem oraz bardziej nasiloną proliferacją komórek nowotworowych [70]. Jednocześnie brak jest różnic w aktywności MT pomiędzy skórą zdrową, a rogowaceniem słonecznym, co zaprzecza tezie, że MT promują karcynogenezę w zdrowych tkankach.

Podobnie jak w przypadku innych nowotworów złośliwych, tak i w raku kolczystokomórkowym skóry poszukuje się nowych markerów, dzięki którym można by wyodrębnić te przypadki nowotworów złośliwych skóry, które cechuje wyższa aktywność proliferacyjna, większa zdolność do naciekania podłoża, szybkiego wzrostu i przerzutowania. W raku kolczystokomórkowym zarówno badania własne jak i doniesienia badaczy koreańskich potwierdzają, że antygen Ki-67 koreluje pozytywnie ze stopniem zróżnicowania histologicznego SCC [67,72]. Ponieważ w raku kolczystokomórkowym i w rogowaceniu słonecznym ekspresja białka Ki-67 koreluje dodatkowo z ekspresją metalotionein (odpowiednio $p=0,017$ i $p=0,018$), oba te białka mogą być wskaźnikami proliferacji komórkowej w SCC i AK [67] (Ryc.5)

Oznaczenie ekspresji MT oraz białka Ki-67 w przypadku zmian, o których nie można jednoznacznie powiedzieć czy są rogowaceniem słonecznym czy inwazyjnym rakiem kolczystokomórkowym skóry, daje możliwość różnicowania obu tych stanów. Ekspresja Ki-67 jest wysoka zarówno w AK jak i w SCC,



Ryc. 5. Dodatnia korelacja pomiędzy ekspresją MT a antygenem Ki-67 w AK i SCC: słaba ekspresja MT w AK (a) oraz słaba ekspresja antygeny Ki-67 w AK (b), silna ekspresja MT w SCC (c), silna ekspresja Ki-67 w SCC (d).

natomiast ekspresja MT jest istotnie wyższa w SCC w porównaniu z rogowaceniem słonecznym [67]. By jednak precyzyjnie określić wartość ekspresji MT, od której można już mówić o pewnym rozpoznaniu SCC potrzeba badań na większej grupie pacjentów.

Jak wspomniano we wstępie, metalotioneiny mogą hamować proces apoptozy. Dzieje się to przez inaktywację zależnego od jonów Zn białka p53, zwiększenie syntezy białka Bcl-2 oraz zahamowanie białek pobudzających fragmentację DNA: kaspazy 3 i endonukleazy [22]. W SCC języka i w raku jamy nosowo-gardłowej synteza MT koreluje ze spadkiem liczby komórek apoptotycznych [68,73]. W przypadku jednak nieczerniakowych nowotworów skóry związek między MT, apoptozą, a większą złośliwością raków skóry jest nie do końca pewny. Stratigos i wsp. [74] nie stwierdzili różnic w ekspresji p53 w BCC i SCC. Bąkowska i wsp. [75] obserwowali obecność antyapoptotycznego białka Bcl-2 we wszystkich, badanych przypadkach BCC, podczas

gdy jedynie połowa raków SCC wykazała ekspresję Bcl-2, co sugerowałoby, że apoptoza jest bardziej hamowana w nowotworach skóry o mniejszej złośliwości. W badaniach innych autorów, nie stwierdzono w ogóle ekspresji Bcl-2 w raku kolczystokomórkowym [76-78].

Borges i wsp. [65] sugerują, że MT dezaktywują białko p53 poprzez zmniejszenie poziomu Zn w komórce, co ma sprzyjać transformacji nowotworowej zdrowych komórek we wczesnych etapach karcynogenezy. We własnym doświadczeniu nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy ekspresją MT w skórze zdrowej i w ogniskach rogowacenia słonecznego, dlatego wydaje się, że MT nie promują transformacji nowotworowej keratynocytów we wczesnym okresie fotokarcynogenezy. Możliwe, że funkcja antyoksydacyjna MT i zdolność do inaktywacji czynników immunosupresyjnych w skórze przeważa nad jej potencjałem proliferacyjnym i antyapoptotycznym w skórze zdrowej, co jest zjawiskiem

korzystnym. W raku kolczystokomórkowym skóry nadekspresja MT wiąże się jednak z większą proliferacją nowotworową i prawdopodobnie też większą agresywnością guza. Stwierdzenie to ma szczególne znaczenie w świetle pierwszych doniesień o izo-flawonoidach: equolu i jego syntetycznej pochodnej, które aplikowane na zdrową skórę po ekspozycji na słońce wzmagają syntezę metalotionein i chronią przed powstaniem nowotworów [57]. Wyprodukowanie preparatów do stosowania po opalaniu, które pobudzałyby syntezę MT, mogłoby zmniejszyć ryzyko pojawienia się raków skóry w całej populacji. Wydaje się jednak, że użycie takich substancji u chorych ze zmianami przednowotworowymi lub rakami kol-

czystokomórkowymi skóry przyspieszałoby przebieg nowotworu.

Podsumowując, na podstawie własnych doświadczeń oraz nielicznych danych dostępnych ze światowego piśmiennictwa wydaje się, że zwiększona aktywność MT w komórkach raków skóry jest czynnikiem niekorzystnym, wspierającym rozwój nowotworu.

PODZIĘKOWANIA

Przedstawione wyniki uzyskano dzięki funduszom ze środków Naukowej Fundacji Polpharmy.

PIŚMIENICTWO:

1. Wolska H. Rola słońca w rozwoju nowotworów skóry. *Med Dopl.* 2007;16:19-23
2. Kordek R. *Onkologia Podręcznik dla studentów i lekarzy.* Via Medica. Gdańsk 2007
3. Keyvan Nouri. *Skin Cancer.* Mc Graw Hill Professional 2007
4. Euvrard S, Kanataakis J, Claudy A. Cutaneous tumors in organ transplant recipients. *Presse Med.* 2002;31:1895-903.
5. Euvrard S, Kanitakis J, Claudy A. Skin cancers after organ transplantation. *N Engl J Med.* 2003;348:1681-91
6. Hoxtell EO, Mandel JS, Murray SS i wsp. Incidence of skin carcinoma after renal transplantation. *Arch Dermatol.* 1977;113:436-8.
7. Szepietowski J, Wąsik F, Szepietowski T i wsp. Kliniczne spektrum chorób infekcyjnych stanów przed- i nowotworowych skóry u chorych po przeszczepie nerki. *Przegl Dermatol* 1995; 82, 5: 465-70.
8. Weimar VM, Ceilley RI, Goeken JA. Aggressive biologic behaviour of basal- and squamous-cell cancers in patients with chronic lymphocytic leukemia or chronic lymphocytic lymphoma. *J Dermatol Surg Oncol.* 1979;5:609-14
9. Cohn BA. From sunlight to actinic keratosis to squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol.* 2000; 42:143-4
10. Ouhtit A, Ananthaswamy HN. A model for UV- induction of skin cancer. *J Biomed Biotechnol.* 2001;1:5-6.
11. Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH i wsp. *Dermatologia.* Tom II. Czelej 2004
12. Jabłońska S, Majewski S. *Choroby skóry i choroby przenoszone drogą płciową PZWL, Warszawa 2005*
13. Wąsik F, Baran E, Szepietowski J. *Zarys dermatologii klinicznej, Volumed, Wrocław 1995: 347-79*
14. Floriańczyk B. Metalotioneiny a wrażliwość nowotworów na chemioterapię i radioterapię. *Now Lek.* 1999; 68:829-37
15. Floriańczyk B, Grzybowska L. Metallothionein levels in cell fractions from breast cancer tissues. *Acta Oncol.* 2000;39:141-3
16. Dziągiel P. Expression of metallothioneins in tumor cells. *Pol J Pathol.* 2004; 55:3-12
17. Floriańczyk B. Funkcja metalotionein w ustroju. *Post Hig Med Dośw.* 1996;50: 375-82
18. Pastuszewski W, Dziągiel P, Kręcicki T i wsp. Prognostic significance of metallothionein, p53 protein and Ki-67 antigen expression in laryngeal cancer. *Anticancer Res.* 2007;27:335-42
19. Palmiter RD, Findley SD, Whitmore TE i wsp. MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89:6333-7
20. Quaife CJ, Findley SD, Erickson JC i wsp. Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry.* 1994;33:7250-9
21. Cherian MG, Jayasurya A, Bay BH. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutat Res.* 2003; 533:201-9.
22. Pedersen MØ, Larsen A, Stoltenberg M i wsp. The role of metallothionein in oncogenesis and cancer prognosis. *Prog Histochem Cytochem* 2009;44:29-64
23. Floriańczyk B, Trojanowski T. Metallothioneins in neoplastic cells - distribution in subfractions. *JPCRR.* 2007;1:182-4
24. Klaassen CD, Liu J, Choudhuri S. Metallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 1999;39:267-94
25. Dutsch-Wicherek M, Sikora J, Tomaszewska R. The possible biological role of metallothionein in apoptosis. *Front Biosci.* 2008;13:4029-38
26. Penkowa M, Cáceres M, Borup R i wsp. Novel roles for metallothionein-I + II (MT-I + II) in defense responses, neurogenesis, and tissue restoration after traumatic brain injury: insights from global gene expression profiling in

- wild-type and MT-I + II knockout mice. *J Neurosci Res.* 2006;84:1452-74
27. Meskel HH, Cherian MG, Martinez VJ i wsp. Metallothionein as an epithelial proliferative compartment marker for DNA flow cytometry. *Mod Pathol.* 1993;6:755-60
 28. Kloth DM, Chin JL, Cherian MG. Induction of hepatic metallothionein I in tumour-bearing mice. *Br J Cancer.* 1995;71:712-6
 29. Theocharis SE, Margeli AP, Klijanienko JT i wsp. Metallothionein expression in human neoplasia. *Histopathology.* 2004;45:103-18
 30. Jin R, Huang J, Tan PH i wsp. Clinicopathological significance of metallothioneins in breast cancer. *Pathol Oncol Res.* 2004;10:74-9
 31. Dzięgiel P, Jeleń M, Muszczyńska B i wsp. Role of metallothionein expression in non-small cell lung carcinomas. *Rocz Akad Med Białymst.* 2004;49:43-5
 32. Mitropoulos D, Kyroudi-Voulgari A, Theocharis S i wsp. Prognostic significance of metallothionein expression in renal cell carcinoma. *World J Surg Oncol.* 2005;3:5
 33. Shukla VK, Aryya NC, Pitale A i wsp. Metallothionein expression in carcinoma of the gallbladder. *Histopathology.* 1998; 33:154-7.
 34. Ohshio G, Imamura T, Okada N i wsp. Immunohistochemical study of metallothionein in pancreatic carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1996;122:351-5
 35. Surowiak P, Materna V, Kaplenko I i wsp. Augmented expression of metallothionein and glutathione S-transferase pi as unfavourable prognostic factors in cisplatin-treated ovarian cancer patients. *Virchows Arch.* 2005;447:626-33
 36. Dzięgiel P, Salwa-Żurawska W, Żurawski J i wsp. Prognostic significance of augmented metallothionein (MT) expression correlated with Ki-67 antigen expression in selected soft tissue sarcomas. *Histol Histopathol.* 2005;20:83-9
 37. Brown JJ, Xu H, William-Smith L i wsp. Evaluation of metallothionein and p53 expression as potential prognostic markers for laryngeal squamous cell carcinoma. *Cell Mol Biol* 2003;49 Online Pub:OL473-9
 38. Cardoso SV, Silveira Junior JB, De Carvalho Machado V i wsp. Expression of metallothionein and p53 antigens are correlated in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2009;29:1189-93
 39. Hishikawa Y, Koji T, Dhar DK i wsp. Metallothionein expression correlates with metastatic and proliferative potential in squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Br J Cancer* 1999;81(4):712-20
 40. Cherpelis BS, Haddad F, Messina J i wsp. Sentinel lymph node micrometastasis and other histologic factors that predict outcome in patients with thicker melanomas. *J Am Acad Dermatol.* 2001;44:762-6.
 41. Weinlich G, Bitterlich W, Mayr V i wsp. Metallothionein overexpression as a prognostic factor for progression and survival in melanoma. A prospective study on 520 patients. *Br J Dermatol.* 2003; 149:535-41
 42. Weinlich G, Eisendle K, Hassler E i wsp. Metallothionein overexpression as a highly significant prognostic factor in melanoma: a prospective study on 1270 patients. *Br J Cancer.* 2006; 94: 835-41
 43. Weinlich G, Topar G, Eisendle K i wsp. Comparison of metallothionein- overexpression with sentinel lymph node biopsy as prognostic factors in melanoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2007;21:669-77
 44. Zelger B, Hittmair A, Schir M i wsp. Immunohistochemically demonstrated metallothionein expression in malignant melanoma. *Histopathology.* 1993;23:257-63
 45. Miyashita H, Sato Y. Metallothionein 1 is a Downstream Target of Vascular Endothelial Zinc Finger 1 (VEZF1) in Endothelial Cells and Participates in the Regulation of Angiogenesis. *Endothelium.* 2005;12: 163 - 70
 46. Dzięgiel P, Dumańska M, Forgacz J i wsp. Intensity of apoptosis as related to the expression of metallothionein (MT), caspase-3 (cas-3) and Ki-67 antigen and the survival time of patients with primary colorectal adenocarcinomas. *Rocz Akad Med Białymst.* 2004;49 Suppl 1: 5-7
 47. Dzięgiel P, Forgacz J, Suder E i wsp. Prognostic significance of metallothionein expression in correlation with Ki-67 expression in adenocarcinomas of large intestine. *Histol Histopathol.* 2003;18:401-7
 48. Sauerbrey A, Zintl F, Volm M. Expression of metallothionein in initial and relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Ann Hematol* 1994; 69:111-5
 49. Kelley SL, Basu A, Teicher BA i wsp. Overexpression of metallothionein confers resistance to anticancer drugs. *Science.* 1988;241:1813-5
 50. Shimoda R, Achanzar WE, Qu W i wsp. Metallothionein is a potential negative regulator of apoptosis. *Toxicol Sci.* 2003; 73:294-300
 51. Wang G-W, Klein JB, Kang YJ. Metallothionein inhibits doxorubicin-induced mitochondrial cytochrome c release and caspase-3 activation in cardiomyocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001;298:461-8
 52. Miyashita H, Sato Y. Metallothionein 1 is a Downstream Target of Vascular Endothelial Zinc Finger 1 (VEZF1) in Endothelial Cells and Participates in the Regulation of Angiogenesis. *Endothelium.* 2005;12: 163-70
 53. Nielsen AE, Bohr A, Penkowa M. The balance between life and death of cells: roles of metallothioneins. *Bio-marker Insights.* 2007;2:99-111
 54. Ohshima H, Tazawa H, Sylla BS i wsp. Prevention of human cancer by modulation of chronic inflammatory processes. *Mutat Res.* 2005;591:110-22.
 55. Ablett E, Whiteman DC, Boyle GM. Induction of metallothionein in human skin by routine exposure to sunlight: evidence for a systemic response and enhanced induction at certain body sites. *J Invest Dermatol.* 2003;120:318-24

56. Nishimura N, Reeve VE, Nishimura H i wsp. Cutaneous metallothionein induction by ultraviolet B irradiation in interleukin-6 null mice. *J Invest Dermatol.* 2000;114:343-8.
57. Widyarini S, Allanson M, Gallagher NL i wsp. Isoflavonoid photoprotection in mouse and human skin is dependent on metallothionein. *J Invest Dermatol.* 2006;126:198-204
58. Reeve VE, Nishimura N, Bosnic M i wsp. Lack of metallothionein -I and II exacerbates the immunosuppressive effect of ultraviolet B radiation and cis-urocanic acid in mice. *Immunology.* 2000;100:399-404
59. Hanada K. Photoprotective role of metallothionein in UV-injury- metallothionein-null mouse exhibits reduced tolerance against ultraviolet -B. *J Dermatol Sci.* 2000;23:51-6
60. Widyarini S, Husband AJ, Reeve VE. Protective effect of the isoflavonoid equol against hairless mouse skin carcinogen. *Photochem Photobiol.* 2005;81:32-7
61. Friedmann AC, Halliday GM, Barnetson R i wsp. The topical isoflavonoid NV-07 α reduces solar-simulated UV-induced suppression of Mantoux reactions in humans. *Photochem Photobiol.* 2004;80:416-21
62. Suzuki JS, Nishimura N, Zhang B i wsp. Metallothionein deficiency enhances skin carcinogenesis induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in metallothionein-null mice. *Carcinogenesis.* 2003;24:1123-32.
63. Zhang B, Satoh M, Nishimura N i wsp. Metallothionein deficiency promotes mouse skin carcinogenesis induced by 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene. *Cancer Res.* 1998;58:4044-6
64. Karasawa M, Nishimura N, Nishimura H i wsp. Localization of metallothionein in hair follicles of normal skin and the basal cell layer of hyperplastic epidermis: possible association with cell proliferation. *J Invest Dermatol.* 1991;97:97-100
65. Borges Junior PC, Ribeiro RI, Cardoso SV i wsp. Metallothionein immunolocalization in actinic skin nonmelanoma carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2007;15:165-9
66. Van den Oord JJ, De Ley M. Distribution of metallothionein in normal and pathological human skin. *Arch Dermatol Res.* 1994;286:62-8
67. Zamirska A, Matusiak L, Dziągpiel P i wsp. Expression of Metallothioneins in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma and Actinic Keratosis. *Pathol Oncol Res.* 2012 Mar 10. [Epub ahead of print]
68. Sundelin K, Jadner M, Norberg-Spaak L i wsp. Metallothionein and Fas (CD95) are expressed in squamous cell carcinoma of the tongue. *Eur J Cancer.* 1997;33:1860-4.
69. Rossen K, Haerslev T, Hou-Jensen K i wsp. Metallothionein expression in basaloid proliferations overlying dermatofibromas and basal cell carcinomas. *Br J Dermatol.* 1997;136:30-4
70. Jayasurya A, Bay BH, Yap WM i wsp. Proliferative potential in nasopharyngeal carcinoma: correlations with metallothionein expression and tissue zinc levels. *Carcinogenesis.* 2000;21:1809-12
71. Pastuszewski W, Dziągpiel P, Kręcicki T i wsp. Prognostic significance of metallothionein, p53 protein and Ki-67 antigen expression in laryngeal cancer. *Anticancer Res.* 2007;27:335-42
72. Son KD, Kim TJ, Lee YS i wsp. Comparative analysis of immunohistochemical markers with invasiveness and histologic differentiation in squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma of the skin *J Surg Oncol* 2008;97:615-20
73. Jayasurya A, Bay BH, Yap WM i wsp. Correlation of metallothionein expression with apoptosis in nasopharyngeal carcinoma. *Br J Cancer* 2000;82:1198-203
74. Stratigos AJ, Kapranos N, Petrakou E i wsp. Immunophenotypic analysis of p53 gene in non-melanoma skin cancer and correlation with apoptosis and cell proliferation. *J EADV.* 2005;19:180-6
75. Bąkowska A, Kaszuba A, Czyż P i wsp. Ocena stopnia ekspresji onkoproteiny Bcl-2 w raku podstawno- i kolczystokomórkowym skóry. *Przegl. Dermatol.* 2007; 94:181-6.
76. Baldursson B, Syrjänen S, Beitner H. Expression of p21WAF1/CIP1, p53, bcl-2 and Ki-67 in venous leg ulcers with and without squamous cell carcinoma. *Acta Derm Venereol.* 2000;80:251-5.
77. Delehedde M, Cho SH, Sarkiss M i wsp. Altered expression of bcl-2 family member proteins in nonmelanoma skin cancer. *Cancer.* 1999;85:1514-22.
78. Verhaegh ME, Sanders CJ, Arends JW i wsp. Expression of the apoptosis-suppressing protein Bcl-2 in non-melanoma skin cancer. *Br J Dermatol* 1995;132:740-4

Badania przesiewowe poprzedzające chemioterapię 5-fluorouracylem

The screening methods preceding 5-FU-based chemotherapy

Barbara Dołęgowska¹,
Anna Ostapowicz¹,
Małgorzata
Stańczyk-Dunaj²,
Wojciech Błogowski³

¹ Zakład Analityki Medycznej Katedry Diagnostyki Laboratoryjnej i Medycyny Molekularnej, Pomorski Uniwersytet Medyczny, Szczecin

² Zakład Chemii Medycznej, Pomorski Uniwersytet Medyczny, Szczecin

³ Katedra i Klinika Gastroenterologii, Pomorski Uniwersytet Medyczny, Szczecin

Naukowa Fundacja Polpharmy w 2008 roku przyznała zespołowi pracującemu pod kierunkiem dr hab. Barbary Dołęgowskiej grant na realizację projektu badawczego pt. *Porównanie metod pomiaru aktywności dehydrogenazy dihydropirymidynowej (DPD) w osoczu i limfocytach krwi obwodowej – wybór optymalnej metody dla testów przesiewowych poprzedzających leczenie pochodnymi 5-fluoropirymidynowymi.*

STRESZCZENIE

5-Fluorouracyl (5-FU) i jego doustny prolek capecitabina, są dwoma najczęściej zalecanymi chemioterapeutykami, stosowanymi u pacjentów z rakiem przewodu żołądkowo-jelitowego, sutka, głowy i szyi. Około 80% podanego 5-fluorouracylu jest katabolizowana przez dehydrogenazę dihydropirymidynową (DPD). U pacjentów z niedoborem tego enzymu istnieje ryzyko, że po podaniu 5-FU dojdzie do rozwinięcia się ciężkiej, niekiedy nawet letalnej toksyczności tego leku.

Znanych jest co najmniej 30 mutacji genu *DPYD*, które są związane z niedoborem lub zmniejszoną aktywnością DPD. W znacznym stopniu utrudnia to wprowadzenie prostego testu genetycznego jako badania przesiewowego u pacjentów, u których ma być zastosowana chemioterapia pochodnymi 5-fluoropirymidynowymi.

Celem projektu finansowanego przez Naukową Fundację Polpharmy było opracowanie badań obejmujących wszystkich pacjentów, u których planuje się rozpoczęcie terapii 5-fluorouracylem.

Opracowano dwie metody spektrofotometryczne oznaczania aktywności DPD w PBMC, przeprowadzono ich walidację i wstępnie oceniono trafność diagnostyczną. Jako metodę odniesienia zastosowano RP HPLC. Porównano metody spektrofotometryczne z metodami RP HPLC, HPLC MS oznaczania aktywności DPD w PBMC oraz z metodą pośrednią oznaczając wskaźnik dihydrouracyl/uracyl (DHU/U) w osoczach ochotników techniką RP HPLC. Oznaczenia wykonano u 200 zdrowych ochotników w wieku od 22 do 63 lat.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono iż metody spektrofotometryczne mogą być stosowane jako badania przesiewowe poprzedzające chemioterapię 5-FU. Przed powszechnym zastosowaniem tych metod konieczne są dalsze badania na dużej grupie osób z uwzględnieniem pacjentów, u których stwierdzono zmniejszoną aktywność DPD potwierdzoną badaniami genetycznymi.

Wpłynęło: 2012-09-25
Zaakceptowano: 2012-10-09
Opublikowano: 2013-12-31

Adres do korespondencji:

Dr hab. Barbara Dołęgowska,
Zakład Analityki Medycznej
Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej
i Medycyny Molekularnej PUM,
Al. Powstańców Wlkp. 72,
70-711 Szczecin, e-mail:
Barbara.Dolegowska@pum.edu.pl

Słowa kluczowe: 5-fluorouracyl • uracyl • dihydrouacyl • dehydrogenaza dihydropirymidynowa • komórki mononuklearne krwi obwodowej • HPLC

SUMMARY

5-fluorouracil (5-FU) and its oral prodrug capecitabine, are two most commonly used chemotherapeutics in the treatment of the head, neck, breast and gastrointestinal tract's malignancies. Around 80% of 5FU is catabolized by dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD). Patients, in whom a deficiency of this enzyme's activity is observed, are at great risk of severe, even lethal, 5-FU toxicity development.

According to the modern literature over 30 mutations of DPYD gene, which are associated with DPD deficiency/insufficiency, are already discovered. This fact seems to be an impediment to the introduction of an easy genetic test as a screening tool for the detection of DPD deficiency/insufficiency in patients qualified for 5-fluoropyrimidine chemotherapy.

The aim of the project supported by Polpharma Scientific Foundation was to perform examinations that would include all cancer patients qualified for the 5-fluorouracil chemotherapy.

The spectrophotometric methods were compared with RP HPLC, HPLC MS methods for measurements of DPD activity in PBMCs, as well as, with indirect analysis dihydrouacyl/uracyl (DHU/U) ratio using RP HPLC technique in volunteers' plasma. The determinations were developed on analysis of 200 generally healthy volunteers aged 22-63.

Basing on our findings, we conclude that spectrophotometric methods may be used as a screening protocol preceding 5-FU-based chemotherapy. Nevertheless, before introduction into clinical reality, our results should be confirmed in further larger studies, including patients with lower DPD activity detected in genetic analysis.

Key words: 5-fluorouracil • uracyl • dihydrouacyl • dihydropyrimidine dehydrogenase • peripheral blood mononuclear cell • HPLC

WSTĘP

5-Fluorouracyl (5FU) i jego doustny prolek capecitabina, są dwoma najczęściej zalecanymi chemioterapeutykami, stosowanymi u pacjentów z rakiem przewodu żołądkowo-jelitowego, sutka, głowy i szyi [1,2-8]. Siła działania przeciwnowotworowego 5-FU jest istotnie związana z nasileniem przemian katabolicznych, którym ulega około 80% podanej dawki leku. Enzymem regulatorowym szlaku katabolicznego decydującym o szybkości całego procesu, jednocześnie regulującym ilość 5-FU dostępnego dla przemian anabolicznych, jest dehydrogenaza dihydropirymidynowa (DPD) [9].

Dotychczasowe wyniki badań doświadczalnych, dotyczących poszukiwania przyczyny występowania ciężkich, niekiedy nawet śmiertelnych powikłań terapii 5-fluorouracylem jako głównego czynnika toksyczności leku, wskazują na zmniejszoną aktywność dehydrogenazy dihydropirymidynowej w organizmach pacjentów [1]. U chorych, u których zanoowano skrajnie wysokie stężenia 5-FU w surowicy krwi, stwierdzono całkowity lub prawie całkowity brak DPD. Towarzyszyło temu występowanie wielu niepożądanych objawów takich jak neutropenia, trombocytopenia, leukopenia, supresja szpiku, zapalenie błony śluzowej przewodu pokarmowego, zaburzenia ruchowe, zmiany skórne, biegunka,

nudności, wymioty, zaburzenia sercowo-naczyniowe, w krańcowych wypadkach prowadzące do zgonu [2,10-20].

Poprzez wprowadzenie badań przesiewowych, mających na celu wykrycie osób z niedoborem białka enzymatycznego oraz zmniejszoną aktywnością DPD możliwe jest uniknięcie poważnych efektów ubocznych podczas stosowania 5-FU. Obecnie znanych jest kilka metod pomiaru aktywności DPD, jednak żadna z nich, ze względu na różne ograniczenia nie może być powszechnie stosowana.

Celem pracy było opracowanie metody spektrofotometrycznej oznaczania aktywności dehydrogenazy dihydropirymidynowej – prostej i ogólnodostępnej, która będzie mogła być wykorzystana jako test przesiewowy w odniesieniu do wszystkich pacjentów, u których planowana jest terapia 5-fluorouracylem, przeprowadzenie jej wstępnej walidacji oraz porównanie z innymi metodami wykorzystywanymi do oznaczania aktywności DPD.

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA 5-FLUOROURACYLU

5-Fluorouracyl (5-FU) należy do grupy antymetabolitów zasad pirymidynowych [1,21]. Mechanizm jego działania polega na zaburzeniu biosyntezy kwasów nukleinowych oraz hamowaniu podziału komórek [1] a swoje szerokie zastosowanie zawdzięcza obserwacji, że część nowotworów do biosyntezy pirymidyn preferuje uracyl. Ze względu na złe wchłanianie z przewodu pokarmowego, główną drogą podania 5-FU jest infuzja dożylna, w formie krótkotrwałego wstrzyknięcia lub ciągłego wlewu kroplowego [21]. Po podaniu drogą dożylną lek ulega szybkiej dystrybucji i eliminacji. Okres jego półtrwania ($t_{0,5}$) wynosi 8-20 minut. Krótki $t_{0,5}$ 5-FU spowodowany jest intensywnym metabolizmem leku zachodzącym głównie w wątrobie.

Farmakokinetyka 5-FU jest nieliniowa, a indeks terapeutyczny bardzo wąski, co znacznie utrudnia prognozowanie reakcji organizmu na podanie standardowej dawki leku [1,21-23]. U różnych pacjentów po podaniu tej samej dawki leku można zaobserwować zarówno odpowiedź pozytywną, całkowitą oporność na leczenie jak i wystąpienie wielu objawów ubocznych terapii, które mogą prowadzić nawet do śmierci [23].

Playearmsaeng i wsp. najkorzystniejsze efekty chemioterapii 5-FU obserwowali gdy AUC (pole powierzchni pod krzywą zależności stężenia od cza-

su) leku mieściło się w granicach 25-30 mg·h/l, natomiast zwiększenie AUC powyżej 30 mg·h/l było przyczyną bardzo dużego wzrostu jego toksyczności. Wśród pacjentów, u których po podaniu 5-FU wystąpiły działania niepożądane, zaobserwowano niższy klirens oraz wyższe wartości AUC i C_{max} (stężenie maksymalne) w porównaniu z osobami, u których nie wystąpiły toksyczne efekty indukowane przez 5-FU [21].

U kobiet oraz u osób starszych stwierdza się zmniejszony klirens 5-FU [21,22]. W związku z tym w przypadku kobiet w wieku powyżej 70 lat zaleca się rozpoczynanie terapii 5-FU od 80% standardowo podawanej dawki oraz ściśle monitorowanie zmian parametrów farmakokinetycznych decydujących o możliwych modyfikacjach kolejnych dawek leku [22].

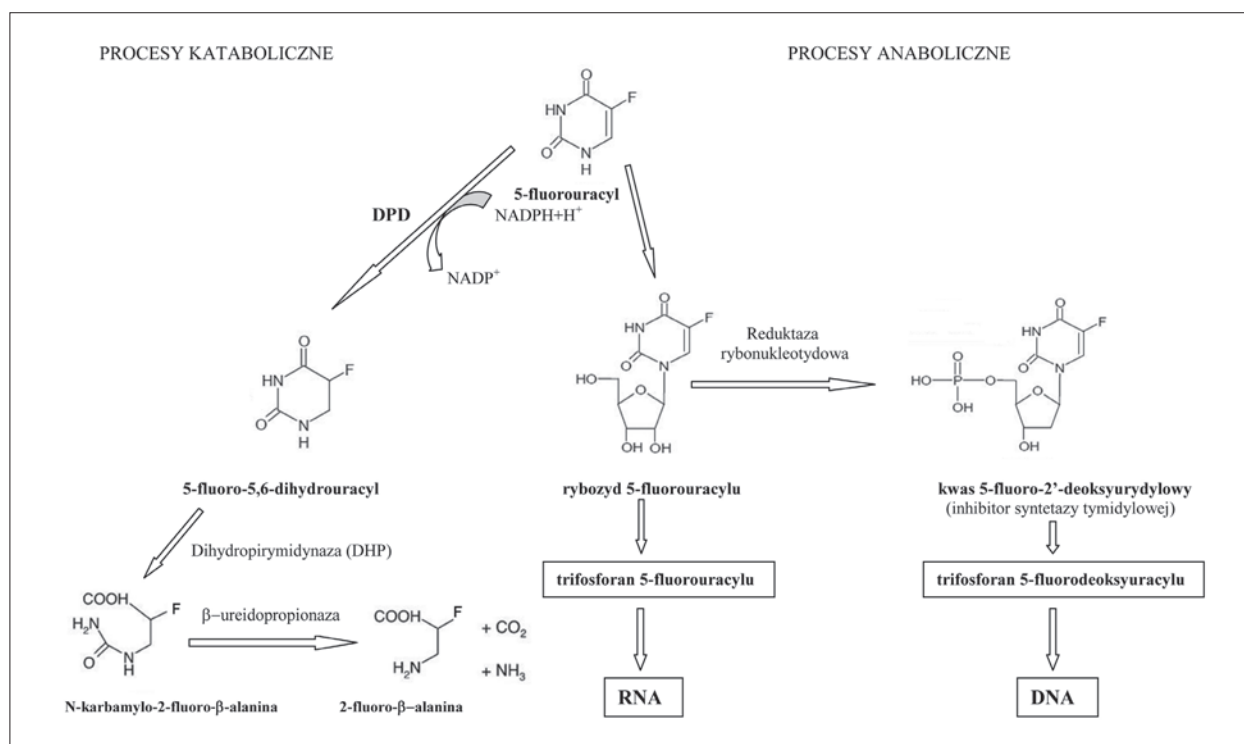
METABOLIZM 5-FLUOROURACYLU

5-Fluorouracyl jest metabolizowany na dwóch szlakach: anabolicznym, na drodze którego powstają aktywne farmakologicznie metabolity, odpowiadające za cytotoksyczne właściwości 5-FU [1-3,9,11-13,24-28] oraz katabolicznym, w wyniku, którego tworzą się biologicznie nieaktywne metabolity wydalane z moczem lub żółcią (Rycina 1) [21].

Dehydrogenaza dihydropirymidynowa (EC 1.3.1.2) rozpoczynająca kataboliczny proces degradacji zasad pirymidynowych - uracylu i tyminy, a także 5-FU, [9,24-26,29-38] jest homodimerem o masie cząsteczkowej 222 kDa [5,39-41]. Każda podjednostka jest zbudowana z 1025 aminokwasów i zawiera cząsteczki dinukleotydu flawinoadeninowego (FAD), mononukleotydu flawinowego (FMN) oraz cztery ugrupowania żelazo-siarkowe (4Fe-4S) [24,26].

DPD jest obecna w wielu narządach i tkankach. Największe jej aktywności stwierdzono w wątrobie oraz komórkach mononuklearnych krwi obwodowej (PBMC) [11,13,26,29,42]. Stężenie oraz aktywność DPD charakteryzuje duża zmienność osobnicza, co istotnie wpływa na zróżnicowane stężenia 5-FU we krwi pacjentów [1,9,43].

Wyniki badań prowadzonych wśród pacjentów z chorobami nowotworowymi wskazują na występowanie korelacji pomiędzy aktywnością DPD w PBMC i ogólnym klirensiem 5-FU [13]. Van Kuilenburg i wsp. stwierdzili, że 39-61% przypadków dużej toksyczności indukowanej chemioterapią 5-FU koreluje ze zmniejszoną aktywnością DPD w PBMC [44].



Rycina 1. Metabolizm 5-fluorouracylu

U 3-5% populacji występuje częściowy, natomiast u 0,1% całkowity niedobór DPD [21,31].

PODŁOŻE GENETYCZNE METABOLIZMU 5-FLUOROURACYLU

Zmniejszenie aktywności DPD spowodowane jest mutacjami w obrębie genu *DPYD* kodującego enzym. Gen ten zlokalizowany jest na chromosomie 1p22 i składa się z 23 egzonów. Do chwili obecnej w obrębie genu *DPYD* zidentyfikowano ponad 30 mutacji [21,25,46,47], przy czym ich liczba nadal wzrasta. Najczęstszą (52%), a zarazem najlepiej udokumentowaną jest mutacja G>A końca 5' intronu 14 (IVS14 + 1G>A) [1,2,26,27,45,47-50]. Allel ten (znany jako *DPYD**2A) warunkuje powstawanie nieprawidłowego RNA oraz białka enzymatycznego, które ulega szybkiej degradacji. Badania wykazały, że w przypadku gdy opisana mutacja występuje u heterozygot, 50% zmniejszenie aktywności DPD powoduje 50% redukcję klirensu 5-FU. Wpływa to na wystąpienie u pacjentów wielu niepożądanych działań leku. Natomiast wśród homozygot, u których występuje całkowity brak DPD podanie 5-FU może stać się przyczyną zejścia śmiertelnego. Konsekwencje kliniczne innych zmian w obrębie genu *DPYD* nie zostały jeszcze tak dobrze poznane jak w przypadku mutacji IVS14 + 1G>A. Wiadomo natomiast, że związane są między innymi z mutacjami zmiany sensu, nonsensowną oraz delecją (tabela 1) [21,25,51].

METODY OZNACZANIA AKTYWNOŚCI DEHYDROGENAZY DIHYDROPIRYMIDYNOWEJ

Do chwili obecnej opisano wiele metod oznaczania DPD. Są to zarówno badania genetyczne jak i dotyczące szlaku katabolicznego 5-FU. Są to między innymi takie metody jak wykrywanie SNP (polimorfizmu pojedynczego nukleotydu) w obrębie genu *DPYD* [1,2,26,27,45,46,52-54], analiza poziomu ekspresji mRNA *DPYD* [8,54-58], oznaczanie aktywności DPD w komórkach mononuklearnych krwi obwodowej [6,13,21,26,44,54,59], pomiar stężenia uracylu w surowicy krwi oraz w moczu [26,27,54,57,60], wyznaczenie wartości współczynnika DHU/U (dihydrouracylu/uracylu) oraz DHTHY/THY (dihydrotymina/tymina) w surowicy oraz w moczu [1,21,27,54,57,61], ocena zawartości (2-¹³C)-uracylu w wydychanym powietrzu [21,54,57], podanie dawki testowej 5-FU [21,54], a także analiza stężenia 2-fluoro-β-alaniny [54,62].

Oznaczenia aktywności DPD u ludzi wykonuje się najczęściej w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC) – limfocytach i monocytach [6,13,21,26,44,54,59]. Ploylearmsaeng i wsp. w swoich badaniach wykorzystali analizę z zastosowaniem ¹⁴C-fluorouracylu jako substratu w reakcji katalizowanej przez DPD w komórkach PBMC. Jej produktem jest ¹⁴C-5-dihydrofluorouracylu oznaczany metodą RP HPLC [21,54]. Średnia aktywność DPD oznaczona tą metodą wynosiła 222 (zakres 65-559)

pmol/min/mg białka. Pacjentów, u których poziom enzymu był mniejszy lub równy 30% wartości średniej (≤ 150 pmol/min/mg białka), uznano za osoby z grupy wysokiego ryzyka niedoboru DPD [21,54].

Znana jest także metoda, w której substratem dla DPD w komórkach PBMC jest 4-¹⁴C-tymina, natomiast aktywność enzymu określana jest na podstawie ilości 4-¹⁴C-dihydrotyminy oznaczonej z wykorzystaniem RP HPLC [6,13,26,54]. Powyższe metody posiadają jednak istotne ograniczenia, związane z koniecznością stosowania standardów znakowanych izotopami [21,54]. Déporte-Féty i wsp. opracowali metodę z 5-FU jako substratem, polegającą na oznaczaniu produktu reakcji katalizowanej przez DPD - 5-FUH₂ techniką RP HPLC [54,59]. Z kolei van Kuilenburg i wsp. jako substrat wykorzystywali tyminę. Analiza polegała na oznaczaniu produktu - dihydrotyminy przy użyciu HPLC-MS/MS [44,54].

METODY SPEKTROFOTOMETRYCZNE OZNACZANIA AKTYWNOŚCI DEHYDROGENAZY DIHYDROPIRYMIDYNOWEJ W KOMÓRKACH MONONUKLEARNYCH KRWI OBWODOWEJ

Materiał badany stanowiły komórki mononuklearne krwi obwodowej (PBMC) oraz osocze uzyskane od 200 zdrowych ochotników (102 kobiet i 98 mężczyzn) w wieku od 22 do 63 lat (średnio 34 ± 13 lat). W celu zminimalizowania wpływu zmienności dobowej aktywności DPD pobranie wykonywano w godzinach rannych – pomiędzy 8.00 i 11.00. Wszyscy ochotnicy objęci badaniami wyrazili pisemną zgodę na udział w badaniu. Badania uzyskały akceptację Komisji Bioetycznej przy Pomorskim Uniwersytecie Medycznym.

Komórki mononuklearne izolowano z zastosowaniem gradientu LymphoprepTM Tube (gęstość $1,077 \pm 0,001$ g/ml; osmolalność 280 ± 15 mOsm). Lizaty PBMC otrzymywano za pomocą odczynnika lizującego Complete Lysis-M, EDTA-free [63].

Opracowano dwie metody spektrofotometryczne oznaczania aktywności DPD w lizatach PBMC, które następnie poddano walidacji i porównaniu z metodą RP HPLC jako metodą odniesienia [51,63]. W pierwszej z nich mierzono spadek absorbancji przy 340 nm związany ze zmniejszeniem stężenia NADPH+H⁺ uczestniczącego w reakcji redukcji tyminy do dihydrotyminy [51,63]. Natomiast druga metoda polegała na pomiarze wzrostu absorbancji przy 260 nm związanego ze zwiększeniem stężenia uracylu powstającego w wyniku reakcji utleniania dihydrouracylu, której towarzyszyła redukcja NADP⁺. Oznaczenia wykonano z zastosowaniem spektrofotometru UV-VIS Specord 250 (Analytic Jena, Niemcy) [63].

OZNACZANIE AKTYWNOŚCI DEHYDROGENAZY DIHYDROPIRYMIDYNOWEJ W KOMÓRKACH MONONUKLEARNYCH KRWI OBWODOWEJ METODĄ RP HPLC

Substratem w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę dihydropirymidynową zawartą w lizatach PBMC był uracyl [63]. Analizę wykonano z zastosowaniem chromatografu Hewlett Packard 1100 Series (Agilent Technologies, Warszawa, Polska).

Rozdział w układzie z odwróconymi fazami (RP-HPLC) prowadzono na kolumnie SymmetryShieldTM RP18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m) (Waters, Warszawa, Polska). Temperatura kolumny wynosiła 25°C. Zastosowano metodę izokratyczną. Fazę ruchomą stanowił bufor KH₂PO₄ (pH 3,0). Szybkość przepływu wynosiła 0,8 mL/min. Próbkę o objętości 50 μ l były nastrzykiwane co 30 minut. Długość fali dla detekcji uracylu oraz 5-fluorocytozyny (wzorzec wewnętrzny) wynosiła 260 nm, a dla 5,6-dihidrouracylu 210 nm. Podstawą dla obliczeń zawartości uracylu i 5,6-dihidrouracylu były pola powierzchni pików tych substancji w odniesieniu do pola pików standardu wewnętrznego. Do identyfikacji pików i kalibracji stosowano mieszaninę wzorców standardów uracylu, 5,6-dihidrouracylu, 5-fluorocytozyny (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska). Na podstawie wyznaczonych zmian stężenia uracylu i/lub 5,6-dihidrouracylu w czasie obliczono aktywność dehydrogenazy dihydropirymidynowej [63].

OZNACZANIE AKTYWNOŚCI DEHYDROGENAZY DIHYDROPIRYMIDYNOWEJ W KOMÓRKACH MONONUKLEARNYCH KRWI OBWODOWEJ METODĄ HPLC MS

Substratem w reakcji katalizowanej przez DPD zawartą w lizatach PBMC była tymina. Analizę przeprowadzono metodą HPLC MS z zastosowaniem analizatora Flexar SQ300 (Perkin-Elmer, USA). Rozdział w układzie z odwróconymi fazami (RP-HPLC) przeprowadzono na kolumnie SymmetryShieldTM RP18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m) (Waters). Cartridge 4 x 4 mm z takim samym wypełnieniem posłużył jako prekolumna. Temperatura kolumny wynosiła 20°C. Zastosowano metodę gradientową z fazą ruchomą złożoną z roztworu A (50 mmol/L CH₃COOH; pH 4,0) i B (100% metanol). Szybkość przepływu wynosiła 0,6 mL/min. Procentowa zawartość roztworu A wynosiła 75% fazy ruchomej w 0,0 minucie, liniowo malała do 50% w 5 minucie, a następnie rosła liniowo do 75% w okresie od 5,1 do 10 minut. Kwadrupolowy detektor masowy z jonizacją w polu elektrycznym (ESI) posłużył do uzyskania widma masowego w zakresie od m/z 100 do m/z 210. Uzyskane dane były opracowane z wykorzystaniem oprogramo-

wania Chromera 3.2.1 (Perkin-Elmer, USA). Na podstawie oznaczonych zmian stężenia 5,6-dihydrotyminy w czasie obliczono aktywność dehydrogenazy dihydropyrimidynowej w lizatach PBMC.

METODA POŚREDNIA OZNACZANIA AKTYWNOŚCI DEHYDROGENAZY DIHYDROPIRYMIDYNOWEJ - OZNACZANIE WSKAŹNIKA DHU/U W OSOCZU METODĄ RP HPLC

Osocza uzyskane od zdrowych ochotników oczyszczano i zagęszczano techniką SPE z wykorzystaniem kolumniek Atoll Xtrem Capacity (Interchim, Francja). Analizę przeprowadzono metodą RP HPLC z zastosowaniem chromatografu Hewlett Packard 1100 Series (Agilent Technologies, Warszawa, Polska).

Rozdział w układzie z odwróconymi fazami (RP-HPLC) prowadzono na kolumnie SymmetryShield™ RP18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) (Waters, Warszawa, Polska). Temperatura kolumny wynosiła 25°C. Zastosowano metodę izokratyczną. Fazę ruchomą stanowił bufor KH_2PO_4 (pH 3,0). Szybkość przepływu wynosiła 0,8 mL/min. Próbkę o objętości 50 µl były nastrzykiwane co 30 minut. Długość fali dla detekcji uracylu oraz 5-fluorocytozyny (wzorzec wewnętrzny) wynosiła 260 nm, a dla 5,6-dihydrouracylu 210 nm. Podstawą dla obliczeń zawartości uracylu i 5,6-dihydrouracylu były pola powierzchni pików tych substancji w odniesieniu do pola pików standardu wewnętrznego. Do identyfikacji pików i kalibracji stosowano mieszaninę wzorców standardów uracylu, 5,6-dihydrouracylu, 5-fluorocytozyny (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska). Wyznaczono stosunek stężeń 5,6-dihydrouracylu do 5,6-uracylu (współczynnik DHU/U).

WALIDACJA METOD SPEKTROFOTOMETRYCZNYCH OZNACZANIA AKTYWNOŚCI DEHYDROGENAZY DIHYDROPIRYMIDYNOWEJ W KOMÓRKACH MONONUKLEARNYCH KRWI OBWODOWEJ

Postępowanie walidacyjne polegało na przeprowadzeniu charakterystyki metod spektrofotometrycznych i ich porównaniu z metodą odniesienia (metodą RP-HPLC oznaczania aktywności DPD w komórkach mononuklearnych krwi obwodowej). Wyznaczono wartości takich parametrów jak: granice wykrywalności, granice oznaczalności, czułość, zakres liniowości, dokładność (poprawność), precyzja w warunkach powtarzalności w serii i między seriami. Podczas oznaczeń wykorzystano oczyszczony preparat enzymu uzyskany z komórek mononuklearnych krwi obwodowej zdrowych ochotników [51].

Określono przydatność metod spektrofotometrycznych jako metod przesiewowych pozwalających na wykrycie zmniejszonej aktywności DPD. W tym celu zostały one poddane analizie w celu oceny ich trafności diagnostycznej. Obliczono czułość i swoistość diagnostyczną testów oraz przeprowadzono analizę krzywych ROC [63].

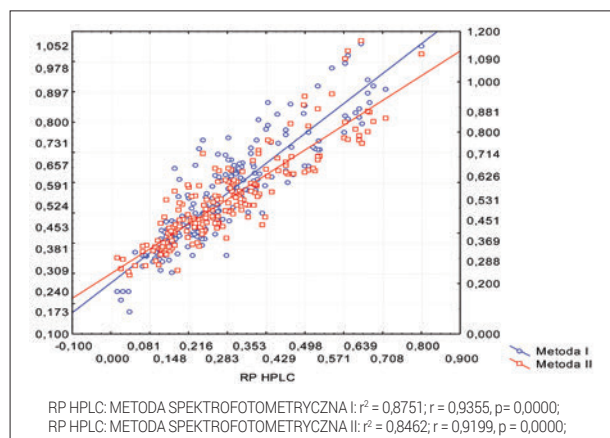
WYNIKI I WNIOSKI

Większość przypadków wystąpienia działań ubocznych po podaniu 5-FU związane jest z niedoborem DPD [1-3,5,6,21]. Wykrycie zmniejszonej aktywności DPD u chorych z planowaną chemioterapią wskazywałoby zatem na konieczność zastosowania zmniejszonych dawek leku, jego kontrolowanego dawkowania lub terapii alternatywnej.

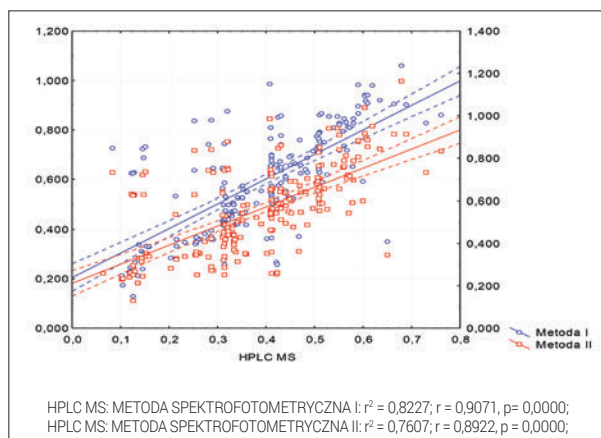
Liczba znanych mutacji genu *DPYD* w znacznym stopniu utrudnia wprowadzenie prostego testu genetycznego jako badania przesiewowego u pacjentów, u których ma być zastosowane leczenie pochodnymi 5-fluoropirymidynowymi. Należy zatem rozważać możliwość wykorzystania w tym celu metod pozwalających na pośredni lub bezpośredni pomiar aktywności DPD, zarówno w osoczu jak i w komórkach jednojądrzastych.

Metodą referencyjną oznaczania aktywności DPD w komórkach jednojądrzastych wyizolowanych z krwi obwodowej jest HPLC/MS/MS [54,64,65]. Metoda ta wymaga wyposażenia w kosztowny i trudno dostępny sprzęt.

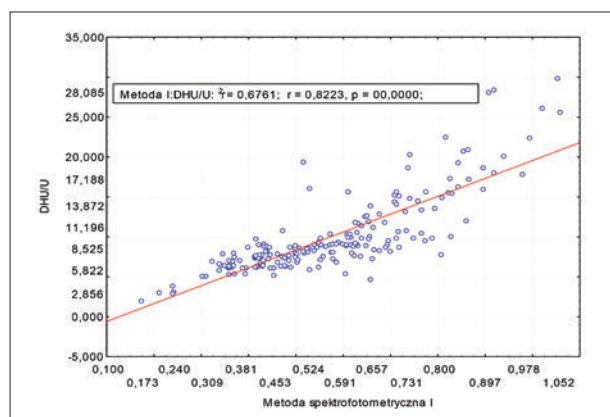
Metoda pośrednia oznaczania aktywności DPD polegająca na pomiarze stężenia uracylu i dihydrouracylu (RP HPLC) w osoczu krwi lub moczu, a następnie obliczeniu wskaźnika DHU/U ma tę zaletę, że do wykonania badań potrzebna jest stosunkowo niewielka ilość łatwo dostępnego materiału badanego [66-69]. U osób z niedoborem DPD metabolizm uracylu do dihydrouracylu ulega zwolnieniu, a tym samym zmniejsza się iloraz stężeń DHU/U. Jiang i wsp. stwierdzili liniową korelację pomiędzy aktywnością wątrobowej DPD u szczurów [66] i wskaźnikiem DHU/U zmierzonym zarówno w moczu jak i w surowicy. Ponadto stwierdzono istotną korelację pomiędzy klirensiem 5-FU i ilorazem DHU/U. Wskazuje to na możliwość wykorzystania tego wskaźnika podczas diagnozowania niedoboru DPD przed podaniem 5-FU. Jednakże stwierdzono, że po podaniu 5-FU wartość ilorazu DHU/U ulega zmniejszeniu wraz ze wzrostem stężenia 5-fluorouracylu, aby następnie wrócić do wartości wyjściowej kiedy 5-FU jest już niewykrywalny [66]. Ploylearmsaeng i wsp. stwierdzili również, że wzrost stężenia uracylu w płynach ustrojowych występuje jedynie u osób wykazujących całkowity brak DPD, podczas gdy heterozygoty nadal wyka-



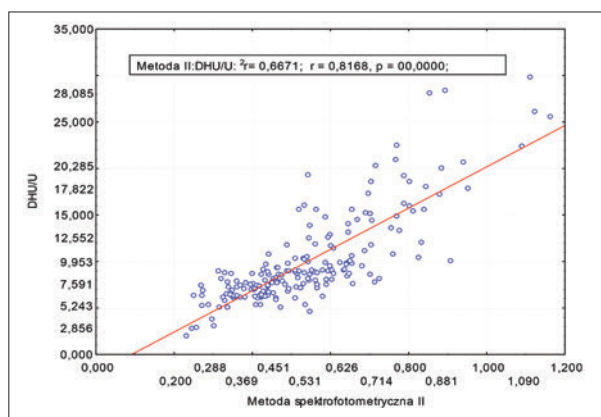
Rycina 2. Porównanie metod spektrofotometrycznych i metody RP HPLC oznaczania aktywności DPD w komórkach mononuklearnych krwi obwodowej zdrowych ochotników (n=200)



Rycina 3. Porównanie metod spektrofotometrycznych i metody HPLC MS oznaczania aktywności DPD w komórkach mononuklearnych krwi obwodowej zdrowych ochotników (n=200)



Rycina 4. Porównanie metody spektrofotometrycznej I oznaczania aktywności DPD w komórkach mononuklearnych krwi obwodowej i wartości wskaźnika DHU/U w osoczu krwi zdrowych ochotników (n=200)



Rycina 5. Porównanie metody spektrofotometrycznej II oznaczania aktywności DPD w komórkach mononuklearnych krwi obwodowej i wartości wskaźnika DHU/U w osoczu krwi zdrowych ochotników (n=200)

zują prawidłowy poziom tych substancji. Co więcej na zmiany stężeń uracylu i dihydrouracylu, a tym samym na wartość wskaźnika DHU/U duży wpływ ma także sposób odżywiania się. W celu jego zminimalizowania pacjent przed pobraniem krwi powinien być co najmniej przez 10 godzin na czczo [66,67].

Wydaje się zatem, że najprostszą, względnie tanią, a zarazem najbardziej dostępną (ze względu na aparaturę, w którą jest wyposażone każde laboratorium), metodą oznaczania aktywności DPD byłaby analiza spektrofotometryczna. Parametry walidacyjne wyznaczone dla opracowanych metod spektrofotometrycznych oraz metody odniesienia wskazują na większą czułość i dokładność analityczną oraz lepszą powtarzalność w serii metody RP HPLC. Powtarzalność pomiędzy seriami oraz prostoliniowy zakres krzywej zależności aktywności DPD od stężenia białka w oczyszczonych preparatach enzymu są porównywalne dla obydwu metod spektrofotometrycznych oraz RP HPLC [63].

Aktywności DPD w komórkach mononuklearnych krwi obwodowej zdrowych ochotników oznaczane

metodami spektrofotometrycznymi są istotnie większe w porównaniu z wartościami uzyskanymi metodami RP HPLC oraz HPLC MS [63]. Jednakże wysokie wartości współczynników korelacji pomiędzy metodami oraz analiza rozrzutu uzyskanych wyników (Rycina 2 i 3) wskazują, że metody spektrofotometryczne mogłyby być stosowane do oceny aktywności DPD, chociaż wartości graniczne pozwalające na wykrycie zmniejszonej aktywności DPD będą wyższe w porównaniu z metodami RP HPLC i HPLC MS.

Stwierdzono także silną korelację pomiędzy wartościami aktywności DPD w PBMC, które zostały oznaczone metodami spektrofotometrycznymi i wskaźnikami DHU/U wyznaczonymi metodą pośrednią. Świadczą o tym zarówno wykresy rozrzutu (Rycina 4 i 5) jak i obliczone współczynniki korelacji rang Spearmana pomiędzy porównywanymi metodami.

Wstępnie oceniono przydatność opracowanych metod spektrofotometrycznych jako metod przesiewowych. Przy założonej wartości granicznej dla metody RP HPLC wynoszącej 0,155 nmoli/min/mg białka [59,63]

odpowiadającej 98% czułości i 97% swoistości diagnostycznej tej metody podzielono badaną grupę na osoby ze zmniejszoną aktywnością DPD oraz grupę z prawidłową aktywnością enzymu [59,63]. Wyniki analizy trafności diagnostycznej wskazują zarówno na wysoką czułość jak i swoistość diagnostyczną obydwu metod spektrofotometrycznych. Metoda spektrofotometryczna II, w której podstawą analizy był wzrost absorbancji przy 260 nm związany z utlenianiem 5,6-dihydrouracylu do uracylu charakteryzuje się większą czułością diagnostyczną w porównaniu z metodą spektrofotometryczną I, mogłaby być zatem stosowana jako metoda przesiewowa do wykrywania zmniejszonej aktywności DPD u pacjentów, u których planowane jest leczenie 5-FU [63]. Wynik testu przesiewowego wskazujący na zmniejszoną aktywność DPD powinien być potwierdzony metodą pośrednią, RP HPLC, HPLC MS lub poprzez wykonanie badań genetycznych.

Wprowadzenie metody spektrofotometrycznej do rutynowej diagnostyki poprzedzającej leczenie 5-FU wymaga znacznego rozszerzenia liczebności grupy badanej.

STAN WIEDZY W CHWILI ROZPOCZĘCIA PROJEKTU

Większość przypadków wystąpienia działań ubocznych po podaniu 5-FU związane jest z niedoborem DPD. Wykrycie zmniejszonej aktywności DPD u chorych z planowaną chemioterapią wskazywałoby zatem na konieczność zastosowania zmniejszonych dawek leku, jego kontrolowanego dawkowania lub terapii alternatywnej. Znanych jest co najmniej 30 mutacji genu *DPYD*, związanych z niedoborem lub zmniejszoną aktywnością DPD. W znacznym stopniu utrudnia to wprowadzenie prostego testu gene-

tycznego jako badania przesiewowego u pacjentów, u których ma być zastosowana chemioterapia pochodnymi 5-fluoropirymidynowymi. Metoda przesiewowa pozwalająca na bezpośredni lub pośredni pomiar aktywności DPD w komórkach mononuklearnych krwi obwodowej i/lub w osoczu, umożliwi uzyskanie informacji o tym czy terapia 5-FU może okazać się toksyczna dla pacjenta.

CO PRZYNIOSŁA REALIZACJA GRANTU POLPHARMY

W czasie realizacji projektu 3/VII/2008 finansowanego przez Naukową Fundację Polpharmy opracowano dwie metody spektrofotometryczne oznaczania aktywności DPD w PBMC, przeprowadzono ich walidację i wstępnie oceniono trafność diagnostyczną. Jako metodę odniesienia zastosowano RP HPLC. Porównano metody spektrofotometryczne z metodami RP HPLC, HPLC MS oznaczania aktywności DPD w PBMC oraz z metodą pośrednią, wyznaczając wartość wskaźnika DHU/U w osoczach ochotników techniką RP HPLC. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono iż metody spektrofotometryczne mogą być stosowane jako badania przesiewowe poprzedzające chemioterapię 5-FU.

DALSZE KIERUNKI BADAŃ

Przed powszechnym wprowadzeniem opracowanych metod spektrofotometrycznych jako metod przesiewowych konieczne są dalsze badania na znacznie większej grupie osób z uwzględnieniem pacjentów, u których stwierdzono zmniejszoną aktywność DPD potwierdzoną badaniami genetycznymi. Badania są kontynuowane.

PIŚMIENNICTWO

1. Fredj RB, Gross E, Ahmed SB, Hassine H, Saguem S. The dihydrouracil/uracil ratio in plasma, clinical and genetic analysis for screening of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency in colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil. *Pathol Biol* 2009; 57: 470-6.
2. Gross E, Busse B, Riemenschneider M, Neubauer S, Seck K, Klein HG, Kiechle M, Lordick F, Meindl A. Strong association of common dihydropyrimidine dehydrogenase gene polymorphism with fluoropyrimidine-related toxicity in cancer patients. *PLoS ONE* 2008; 3: e4003.
3. Johnson MR, Diasio RB. Importance of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency in patients exhibiting toxicity following treatment with 5-fluorouracil. *Adv. Enzyme Regul.* 2001; 41: 151-7.
4. Nishi M, Shimada M, Utsunomiya T, Morine Y, Imura S, Ikemoto T, Mori H, Hanaoka J, Bando Y. Role of dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase expression in immunohistochemistry of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatol Res.* 2011; 41: 64-70.
5. Schnackerz KD, Dobritzsch D, Lindqvist Y, Cook PF. Dihydropyrimidine dehydrogenase: a flavoprotein with four iron-sulfur clusters. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1701: 61-74.
6. Van Kuilenburg ABP, Klumpen HJ, Westermann AM, Zoetekouw L, Bakker PJM, Guchelaar HJ, Richel DJ. Altered dihydropyrimidine dehydrogenase activity associated with mild toxicity in patients treated with 5-fluorouracil containing chemotherapy. *Nucleos Nucleot Nucleic Acids.* 2008; 27: 726-32.

7. Szawłowski AW, Jeziorski K, Guzel Z, Radziszewski J. Leczenie skojarzone raka przełyku, raka żołądka i raka trzustki. Aktualny stan wiedzy. *Gastroenterol Pol.* 1999; 6: 47-55.
8. Kim DW, Oh J, Cho YH, Kim SY, Yoon SY. Reversible encephalopathy following 5-fluorouracil-based chemotherapy in patients with dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Asia Pac J Clin Oncol.* 2009; 5: 159-64.
9. Bielicki D, Sulżyc-Bielicka V. Postępy chemioterapii raka jelita grubego. *Gastroenterol Pol.* 2003; 10: 251-4.
10. Calik AN, Celiker E, Velibey Y, Cagdas M, Guzelburc O. Initial dose effect of 5-fluorouracil: rapidly improving severe, acute toxic myopericarditis. *Am J Emerg Med.* 2012; 257: e1-3.
11. Van Kuilenburg ABP, Klumpen HJ, Westermann AM, Zoetekouw L, Lenthe H, Bakker PJM, Richel DJ, Guchelaar HJ. Increased dihydropyrimidine dehydrogenase activity associated with mild toxicity in patients treated with 5-fluorouracil and leucovorin. *Eur J Cancer.* 2007; 43: 459-65.
12. Lostia AM, Lionetto L, Ialongo C, Gentile G, Viterbo A, Malanguti P, Paris I, Marchetti L, Marchetti P, Blasi AD, Simmaco M. A liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of 5-fluorouracil degradation rate by intact peripheral blood mononuclear cells. *Ther Drug Monit.* 2009; 31: 482-8.
13. Van Kuilenburg ABP, van Lenthe H, Tromp A, Veltman PCJ, van Gennip AH. Pitfalls in the diagnosis of patients with a partial dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Clin Chem.* 2000; 46: 9-17.
14. Deporte R, Amiand M, Moreau A, Charbonnel C, Champion L. High-performance liquid chromatographic assay with UV detection for measurement of dihydropyrimidine dehydrogenase activity in plasma. *J Chromatogr B.* 2006; 834: 170-7.
15. Liem LK, Choong LHL, Woo KT. Porous graphitic carbon shows promise for the rapid screening partial DPD deficiency in lymphocyte dihydropyrimidine dehydrogenase in Chinese, Indian and Malay in Singapore by using semi-automated HPLC-radioassay. *Clin Biochem.* 2002; 35: 181-7.
16. Fadl MH, Bagai RK, Spiro TP, Daw HA. 5-Fluorouracil-induced cardiotoxicity during chemotherapy for adenocarcinoma of the small bowel. *Gastrointest Cancer Res.* 2009; 3: 167-70.
17. Rahman Z, Kohli K, Khar RK, Ali M, Charoo NA, Shamsher AAA. Characterization of 5-fluorouracil microspheres for colonic delivery. *AAPS PharmSciTech.* 2006; 7: E47.
18. Koton-Czarnecka M. Rak jelita grubego: nowe terapie. *Puls medycyny.* 2005; 14.
19. Franco DAF, Greenberg HS. 5-FU multifocal inflammatory leukoencephalopathy and dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Neurology* 2001; 56: 110-2.
20. Yen JL, McLeod HL. Should DPD analysis be required prior to prescribing fluoropyrimidine? *Eur J Cancer.* 2007; 43: 1011-6.
21. Ploylearmsaeng S, Furr U, Jetter A. How may anticancer chemotherapy with fluorouracil be individualised? *Clin Pharmacokinet.* 2006; 45: 567-92.
22. Young AM, Daryanani S, Kerr DJ. Can pharmacokinetic monitoring improve clinical use of fluorouracil? *Clin. Pharmacokinet.* 1999; 36: 391-8.
23. Gamelin E, Boisdron-Celle M. Dose monitoring of 5-fluorouracil in patients with colorectal or head and neck cancer – status of the art. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1999; 30: 71-9.
24. Weidensee S, Goettig P, Bertone M, Haas D, Magdolen V, Kiechle M, Meindl A, van Kuilenburg ABP, Gross E. A mild phenotype of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and developmental retardation associated with a missense mutation affecting cofactor binding. *Clin Biochem* 2011; 44: 722-4.
25. Sulżyc-Bielicka V, Bińczak-Kuleta A, Pioch W, Kładny J, Ziut K, Bielicki D, Ciechanowicz A. 5-Fluorouracil toxicity-attributable IVS14+1G>A mutation of the dihydropyrimidine dehydrogenase gene in Polish colorectal cancer patients. *Pharmacol Rep.* 2008; 60: 238-42.
26. Van Kuilenburg ABP, Dobritzsch D, Meinsma R, Haasjes J, Wamerham HR, Nowaczyk MJM, Maropoulos D, Hein G, Kalhoff H, Kirk JM, Baaske H, Aukett A, Duley JA, Waerd KD, Lindqvist Y, van Gennip AH. Novel disease-causing mutations in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene interpreted by analysis of the three-dimensional protein structure. *Biochem J.* 2002; 364: 157-63.
27. Morel A, Boisdron-Celle M, Fey L, Lainé-Cessac P, Gamelin E. Identification of a novel mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene in a patient with a lethal outcome following 5-fluorouracil administration and the determination of its frequency in a population of 500 patients with colorectal carcinoma. *Clin Biochem.* 2007; 40: 11-7.
28. Van Kuilenburg ABP, Maring JG, Schalhorn A, Terborg C, Schmalenberg H, Behnke D, Schwabe W, Jabschinsky K, Hausler P. Pharmacokinetics of 5-fluorouracil in patients heterozygous for the IVS14+1G>A mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene. *Nucleos Nucleot Nucleic Acids.* 2008; 27: 692-8.
29. Lostia AM, Lionetto L, Ialongo C, Gentile G, Viterbo A, Malanguti P, Paris I, Marchetti L, Marchetti P, Blasi AD, Simmaco M. A liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of 5-fluorouracil degradation rate by intact peripheral blood mononuclear cells. *Ther Drug Monit.* 2009; 31: 482-8.
30. Lohkamp B, Voevodskaya N, Lindqvist Y, Dobritzsch D. Insights into the mechanism of dihydropyrimidine dehydrogenase from site-directed mutagenesis targeting the active site loop and redox cofactor coordination. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1804: 2198-206.
31. Ogura K, Ohnuma T, Minamide Y, Mizuno A, Nishiyama T, Nagashima S, Kanamaru M, Hiratsuka A, Watabe T, Uematsu T. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity in 150 healthy Japanese volunteers and identification of novel mutations. *Clin Cancer Res.* 2005; 11: 5104-11.

32. Serdar MA, Sertoglu E, Uyanik M, Tapan S, Akm O, Cihan M. Determination of 5-fluorouracil and dihydrofluorouracil levels by using a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for evaluation of dihydropyrimidine dehydrogenase enzyme activity. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011; 68: 525-9.
33. Paolo AD, Danesi R, Falcone A, Cionini L, Vannozzi E, Masi G, Allegrini G, Mini E, Bocci G, Conte PE, Tacca MD. Relationship between 5-fluorouracil disposition, toxicity and dihydropyrimidine dehydrogenase activity in cancer patients. *Ann Onc*. 2001; 12: 1301-6.
34. Van Kuilenburg AB, Abreu RA, van Gennip AH. Pharmacogenetic and clinical aspects of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Ann Clin Biochem*. 2003; 40: 41-5.
35. Saif MW, Hashmi S, Bell D, Diasio RB. Prognostication of pancreatic adenocarcinoma by expression of thymidine phosphorylase/dihydropyrimidine dehydrogenase ratio and its correlation with survival. *Expert Opin Drug Saf J*. 2009; 8: 507-14.
36. Lu Z, Zhang R, Diasio RB. Population characteristics of hepatic dihydropyrimidine dehydrogenase activity, a key metabolic enzyme in 5-fluorouracil chemotherapy. *Clin Pharmacol Ther*. 1995; 58: 512-22.
37. Ackland SP, Garg MB, Dunstan RH. Simultaneous determination of dihydrofluorouracil and 5-fluorouracil in plasma by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*. 1997; 246: 79-85.
38. Wei X, Elizondo G, Sapone A, McLeod HL, Raunio H, Fernandez-Salguero P, Gonzalez FJ. Characterization of the human dihydropyrimidine dehydrogenase gene. *genomics*. 1998; 51: 391-400.
39. Dobritzsch D, Ricagno S, Schneider G, Schnackerz KD, Lindqvist Y. Crystal structure of the productive ternary complex of dihydropyrimidine dehydrogenase with NADPH and 5-iodouracil. *J Biol Chem*. 2002; 277: 13155-66.
40. Hagen WR, Vanoni MA, Rosenbaum K, Schnackerz KD. On the iron-sulfur clusters in the complex redox enzyme dihydropyrimidine dehydrogenase. *Eur J Biochem*. 2000; 267: 3640-6.
41. Rosenbaum K, Jahnke K, Curti B, Hagen WR, Schnackerz KD, Vanoni MA. Procine recombinant dihydropyrimidine dehydrogenase: comparison of the spectroscopic and catalytic properties of the wild-type and C671A mutant enzymes. *Biochemistry*. 1998; 37: 17598-609.
42. Konings IRHM, Sleifer S, Mathijssen RHJ, Bruijn P, Moghaddam-Helmantel IMG, van Dam LM, Wiemer EAC, Verweij J, Loos WJ. Increasing tumoral 5-fluorouracil concentrations during a 5-day continuous infusion: a microdialysis study. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011; 67: 1055-62.
43. Yasumatsu R, Nakashima T, Uryu H, Maruda M, Hirakawa N, Shiratsuchi H, Tomita K, Fukushima M, Komune S. The role of dihydropyrimidine dehydrogenase expression in resistance to 5-fluorouracil in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Oral Oncol*. 2009; 45: 141-7.
44. Van Kuilenburg ABP, van Lenthe H, Zoetekouw L, Kulik W. HPLC-Electrospray tandem mass spectrometry for rapid determination of dihydropyrimidine dehydrogenase activity. *Clin Chem*. 2007; 53: 528.
45. Hasegawa T, Kim H, Fukushima M, Wataha Y. Sequence analysis of the 5'-flanking region of human dihydropyrimidine dehydrogenase gene: identification of a New polymorphism related with effects of 5-fluorouracil. *Nucleos Nucleot Nucleic Acids*. 2005; 24: 233-42.
46. Van Kuilenburg ABP, Meijer J, Mul ANPM, Meinsma R, Schmid V, Dobritzsch D, Hennekam R, Mannens MMAM, Kiechle M, Etienne-Grimaldi MCh, Klumpen HJ, Maring JG, Derleyn VAD, Maartense E, Milano G, Vijzelaar R, Gross E. Intragenic deletions and deep intronic mutation affecting pre-mRNA splicing in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene as novel mechanisms causing 5-fluorouracil toxicity. *Hum Genet*. 2010; 128: 529-38.
47. Mazur A, Figurski S, Płoskoń A, Mejer J, Zoetekouw L, Wątróbka S, Sykut-Cegielska J, Gradowska W, van Kuilenburg ABP. Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency presenting with psychomotor retardation in the first Polish patient. *Acta Biochim Pol*. 2008; 55: 787-90.
48. Maring JG, Theeuwes-Oonk BN, van Kuilenburg ABP, Uges DRA, Vries EGE, Hospers GAP. Dihydropyrimidine dehydrogenase phenotyping in human volunteers and a DPD deficient patient by assessing uracil pharmacokinetics after an oral uracil test dose. A preliminary report. *NY City Health Prevent USA*. 1995; 102-9.
49. Magne N, Etienne-Grimaldi MC, Cais L, Renee N, Formento JL, Francoual M, Milano G. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity and the IVS14+1G>A mutation in patients developing 5FU-related toxicity. *Br J Clin Pharmacol*. 2007; 64: 237-40.
50. Al-Sanna'a NA, van Kuilenburg ABP, Atrak TM, Jabbar MAA, Gennip AH. Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency presenting at birth. *J Inherit Metab Dis*. 2005; 28: 793-6.
51. Ostapowicz A. Zastosowanie metod spektrofotometrycznych do analizy aktywności dehydrogenazy dihydropyrimidynowej w badaniach przesiewowych poprzedzających chemioterapię 5-fluorouracylem. **Rozprawa doktorska powstała w wyniku realizacji grantu Naukowej Fundacji Polpharmy**
52. Ahluwalia R, Freimuth R, McLeod HL, Marsh S. Use of pyrosequencing to detect clinically relevant polymorphisms in dihydropyrimidine dehydrogenase. *Clin Chem*. 2003; 49: 1661-4.
53. Ezzeldin H, Okamoto Y, Johnson MR, Diasio RB. A high-throughput denaturing high-performance liquid chromatography method for the identification of variant alleles associated with dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Anal Biochem*. 2002; 306: 63-73.
54. Ostapowicz A, Dolegowska B. Przegląd metod oznaczania dehydrogenazy dihydropyrimidynowej oraz możliwości ich zastosowania w badaniach przesiewowych poprzedzających chemioterapię 5-fluorouracylem. *Przegl Lek*. 2012; 69: 694-7 **Publikacja powstała w wyniku realizacji grantu Naukowej Fundacji Polpharmy**

55. Krugluger W, Brandstatter A, Kállay E, Schueller J, Krexner E, Kriwanek S, Bonner E, Cross HS. Regulation of genes of the circadian clock in human colon cancer: reduced period-1 and dihydropyrimidine dehydrogenase transcription correlates in high-grade tumors. *Cancer Res.* 2007; 67: 7916-22.
56. Fakhrejahani E, Miyamoto A, Tanigawa N. Correlation between thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA level and in vitro chemosensitivity to 5-fluorouracil, in relation to differentiation in gastric cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2007; 60: 437-46.
57. Boisdron-Celle M, Remaud G, Traore S, Poirier AL, Gamelin L, Morel A, Gamelin E. 5-Fluorouracil-related severe toxicity: A comparison of different methods for the pretherapeutic detection of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Cancer Lett.* 2007; 249: 271-82.
58. Tateishi Y, Tatemoto Y, Ohno S, Morishita K, Ueta E, Yamamoto T. Combined evaluation of dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidine phosphorylate mRNA levels in tumor predicts the histopathological effect of 5-fluorouracil-based chemoradiotherapy. *Cancer Lett.* 2009; 274: 187-93.
59. Deporte-Fety R, Picot M, Amiand M, Moreau A, Campion L, Lanoe D, Renee N, Milano G. High-performance liquid chromatographic assay with ultraviolet detection for quantification of dihydrofluorouracil in human lymphocytes: application to measurement of dihydropyrimidine dehydrogenase activity. *J Chromatogr B.* 2001; 762: 203-9.
60. Bi D, Anderson LW, Shapiro J, Shapiro A, Grem JL, Takimoto CH. Measurement of plasma uracil using gas chromatography-mass spectrometry in normal individuals and in patients receiving inhibitors of dihydropyrimidine dehydrogenase. *J Chromatogr B.* 2000; 738: 249-58.
61. Ciccolini J, Mercier C, Blachon MF, Favre R, Durand A, Lacarelle B. A simple and rapid high-performance liquid chromatographic (HPLC) method for 5-fluorouracil (5-FU) assay in plasma and possible detection of patients with impaired dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD activity). *J Clin Pharm Ther.* 2004; 29: 307-15.
62. Serve KM, Darnell JL, Takemoto JK, Davies NM, Black ME. Validation of an isocratic HPLC method to detect 2-fluoro- β -alanine for the analysis of dihydropyrimidine dehydrogenase activity. *J Chromatogr B.* 2010; 878: 1889-92.
63. Dolegowska B, Ostapowicz A, Stanczyk-Dunaj M, Błogowski W. Spectrophotometric methods as a novel screening approach for analysis of dihydropyrimidine dehydrogenase activity before treatment with 5-fluorouracil chemotherapy. *J Physiol Pharmacol.* 2012; 63(4): 411-21. **Publikacja powstała w wyniku realizacji grantu Narodowej Fundacji Polpharmy**
64. Dobritzsch D, Schneider G, Schnackerz KD, Lindqvist Y. Crystal structure of dihydropyrimidine dehydrogenase, a major determinant of the pharmacokinetics of the anti-cancer drug 5-fluorouracil. *EMBO J.* 2001; 20: 650-60.
65. Chung YM, Park SH, Park JK, Kim YT, Kang YK, Yoo YD. Establishment and characterization of 5-fluorouracil-resistant gastric cancer cells. *Cancer Lett.* 2000; 159: 95-101.
66. Jiang H, Lu J, Jiang J, Hu P. Important role of the dihydrouracil/uracil ratio in marked interpatient variations of fluoropyrimidine pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J Clin Pharmacol.* 2004; 44: 1260-72.
67. Jiang H, Lu J, Jiang J. Circadian rhythm of dihydrouracil/uracil ratios in biological fluids: a potential biomarker for dihydropyrimidine dehydrogenase levels. *Br J Pharmacol.* 2004; 141: 616-23.
68. Remaud G, Boisdron-Celle M, Hameline C, Morel A, Gamelin E. An accurate dihydrouracil/uracil determination using improved high performance liquid chromatography method for preventing fluoropyrimidines-related toxicity in clinical practice. *J Chromatogr B.* 2005; 823: 98-107.
69. Svoboda R, Solassol I, Pinguet F, Ivanauskas L, Bres J, Bressolle FMM. HPLC with UV or mass spectrometric detection for quantifying endogenous uracil and dihydrouracil in human plasma. *Clin Chem.* 2008; 54: 1463-72.

Sporadyczny rak piersi – charakterystyka molekularna oraz genomowe rearanżacje strukturalne w diagnostyce i rokowaniu

Sporadic breast cancer – molecular characteristics and structural genomic rearrangements in diagnostics and disease outcome prognosis

Kinga Kochan¹,
Anna Ronowicz¹,
Magdalena Gucwa¹,
Piotr Madanecki¹,
J. Renata Ochocka¹,
Jarosław Skokowski^{2,3},
Arkadiusz Piotrowski¹

¹ Katedra i Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk

² Centralny Bank Tkanek i Materiału Genetycznego, Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk

³ Katedra i Klinika Chirurgii Onkologicznej, Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk

Naukowa Fundacja Polpharmy w 2009 roku przyznała zespołowi pracującemu pod kierunkiem dr hab. Arkadiusza Piotrowskiego grant na realizację projektu badawczego pt. *Czas, mechanizm i częstość powstawania subchromosomalnych rearanżacji strukturalnych w rejonach flankujących sequencing gaps jako wskaźniki diagnostyczne i prognostyczne w sporadycznym raku piersi.*

STRESZCZENIE

Chociaż sporadyczny rak piersi jest jednym z najpowszechniej występujących nowotworów na świecie, to jego etiologia pozostaje w dużej mierze niejasna. Ponadto, miejsce i czas powstawania przerzutów, stanowiących główną przyczynę śmiertelności, są przedmiotem ciągłej debaty i kontrowersji. W niniejszej pracy dokonano przeglądu aktualnej wiedzy dotyczącej genetyki raka piersi, ze szczególnym uwzględnieniem genomowych rearanżacji strukturalnych. Podkreślona została heterogeniczność tego nowotworu i jej powiązanie z obrazem klinicznym, przede wszystkim z perspektywy znaczenia danych molekularnych dla diagnostyki i oceny rokowania. Przedstawiono również najnowsze dane dotyczące modeli inicjacji i progresji guzów oraz przerzutowania. W podsumowaniu zaprezentowano ogólny zarys wyników badań wspieranych przez Naukową Fundację Polpharmy, dotyczących subchromosomalnych rearanżacji DNA w rejonach flankujących luki w sekwencjonowaniu w materiale od pacjentek ze sporadycznym rakiem piersi.

Słowa kluczowe: rak piersi • przerzuty • CNV • metylacja DNA • array-CGH • luki w sekwencjonowaniu

SUMMARY

Although sporadic breast cancer is one of the most common neoplasms worldwide, its etiology still remains largely unclear. Moreover, there is ongoing debate and controversy concerning temporal and spatial origin of metastases - the main cause of cancer related mortality. In this review we present current knowledge on breast cancer genetics with specific focus on genomic structural rearrangements. We highlight genetic heterogeneity of this cancer and its relevance to the clinical picture, specifically from the standpoint of diagnostic and prognostic significance

Wpłynęło: 2013-01-30
Zaakceptowano: 2013-02-13
Opublikowano: 2013-12-31

Adresy do korespondencji:

Dr hab. Arkadiusz Piotrowski,
Katedra Biologii i Botaniki
Farmaceutycznej,
Wydział Farmaceutyczny,
Gdański Uniwersytet Medyczny,
ul. Hallera 107, 80-416 Gdańsk,
e-mail: piotr@gumed.edu.pl
(biologia molekularna);
dr Jarosław Skokowski,
e-mail: jskokowski@gumed.edu.pl
(aspekty kliniczne, biobankowanie)

of molecular data. We also discuss state-of-the-art models for tumor initiation, progression and metastasis. Finally, we provide overview of our findings from the study of subchromosomal DNA rearrangements in the regions flanking sequencing gaps in tissues from sporadic breast cancer patients.

Key words: breast cancer • metastasis • CNV • DNA methylation • array-CGH • sequencing gaps

WSTĘP

Rak piersi w populacji polskiej – częstość zachorowań, profilaktyka, przeżywalność

W skali światowej najczęściej występującym nowotworem złośliwym wśród kobiet jest rak gruczołu sutkowego [1,2]. Znaczny postęp, zarówno w obszarze jego diagnostyki, jak i leczenia zaowocował poprawą ogólnych rokowań i zmniejszeniem wskaźnika śmiertelności z powodu tego nowotworu [3-6]. W Polsce rak gruczołu sutkowego był najczęstszą przyczyną zgonów nowotworowych od połowy lat siedemdziesiątych ubiegłego wieku. W latach osiemdziesiątych współczynnik śmiertelności unormował się, zatrzymując się na stałym poziomie. Z początkiem lat dziewięćdziesiątych zaczęto obserwować jego niewielką tendencję spadkową, przy stałym wzroście zachorowalności, co świadczy o rosnącej skuteczności profilaktyki wtórnej [1]. Między innymi dzięki programowi badań profilaktycznych, wprowadzeniu nowych leków oraz lepszych i mniej inwazyjnych metod terapii [3-5], w 2007 roku rak gruczołu sutkowego spadł na drugą pozycję wśród przyczyn umieralności z powodu nowotworów u Polek, ustępując miejsca rakowi płuca [1]. Wiele pacjentek udaje się wyleczyć, bądź wydłużyć okres przeżycia znacznie powyżej oczekiwań. Jednak przypadki niepowodzeń terapii, nawrotów choroby i zgonów z powodu raka piersi występują nadal nazbyt często [3-5,7]. W Polsce, według najnowszych danych Krajowego Rejestru Nowotworów, rak gruczołu sutkowego wciąż pozostaje drugą przyczyną śmierci pacjentek onkologicznych, stanowiąc 12,8% wszystkich zgonów z powodu nowotworów. Zachorowalność u kobiet wynosi 22,8% i nadal znacznie przekracza procent zachorowań zarówno na raka jelita grubego (10,0%), jak i na raka płuca (8,5%). W 2009 roku zdiagnozowano go u 15 700 Polek, zmarło ich zaś 5 242. Szacuje się, że do 2015 roku liczba zachorowań w naszym kraju wzrośnie w przybliżeniu do 20 000 kobiet rocznie [1].

Podłoże genetyczne raka gruczołu sutkowego

Rak piersi jest chorobą uwarunkowaną czynnikami genetycznymi i w niektórych wypadkach możliwe jest powiązanie mutacji DNA z obrazem klinicznym i histologicznym [2,8]. Dziedziczny rak gruczołu sutkowego stanowi jednak jedynie około 10% wszystkich przypadków, a nowotwory piersi w wywiadzie rodzinnym wykazuje tylko dodatkowe 15-20% chorych [9]. Zdecydowana większość nowotworów gruczołu piersiowego to tak zwane przypadki sporadyczne [2]. Oznacza to, że dla przeważającej większości pacjentów nie udaje się znaleźć związku między rozwojem raka piersi, a mutacją genetyczną, bądź zwiększoną zapadalnością na nowotwory w rodzinie.

Około 1% wszystkich przypadków nowotworów wykazuje związek z syndromami dziedzicznymi autosomalnie, dominująco lub recesywnie, takimi jak: zespół Cowden, zespół Li-Fraumeni, zespół Peutz-Jeghersa, zespół Bloom, zespół Wernera, czy skóra pergaminowa (łac. *Xeroderma pigmentosum*) [2]. 2-3% wszystkich chorych na raka gruczołu sutkowego jest nosicielami autosomalnie dominujących mutacji genów supresorowych *BRCA1* (ang. breast cancer susceptibility gene 1) i *BRCA2* (ang. breast cancer susceptibility gene 2). Mutacja jednego z tych genów stanowi przyczynę 30-40% przypadków nowotworów o tak zwanym uwarunkowaniu rodzinnym [8], a ryzyko zachorowania na raka piersi dla kobiet będących nosicielkami tych mutacji sięga 85% [10,11]. Mutacje w genach *BRCA1* i *BRCA2*, a także w genach *PTEN* oraz *TP53* należą do tak zwanej grupy zmian wysokiego ryzyka. Dobrze zbadane i udokumentowane są także zmiany umiarkowanego ryzyka w genach *CHEK2*, *ATM*, *BRIP1* i *PALB2*, a także około 20 zmian w genach niskiego ryzyka [12]. Wszystkie one wykazują związek ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na raka gruczołu sutkowego u kobiet. W ciągu minionych dwóch dekad obserwowano dynamiczny wzrost liczby doniesień dotyczących powiązań wariantów genów z zagrożeniem rakiem piersi [12].

Jednak ostatecznie wyselekcjonowanych zostało niewiele nowych wariantów genowych, które wykazują znaczące powiązanie z ryzykiem rozwoju raka gruczołu sutkowego [12,13], część z nich odkrytych zostało dzięki badaniom wykorzystującym skanowanie całego genomu – GWAS (ang. genome-wide association studies) [13-15].

Kliniczna i molekularna heterogeniczność raka piersi

Rak gruczołu sutkowego to jednostka chorobowa silnie zróżnicowana pod względem biologicznym i klinicznym [2,5,16]. Nowotwór ten jest niejednorodny także, jeśli chodzi o reakcje na zastosowane leczenie, wzorce przerzutowania, czy rokowanie [3,17]. Ta wielopłaszczyznowa heterogeniczność jest niewątpliwie jedną z przyczyn, dla których współczynnik umieralności na raka piersi pozostaje wciąż na tak wysokim poziomie [3,18]. Rak gruczołu sutkowego powstaje z nabłonka tkanki gruczołowej przewodów mlecznych [2,18,19]. Według Światowej Organizacji Zdrowia wyróżnia się 17 histologicznych typów tego nowotworu [20,21], choć zdecydowana większość wszystkich inwazyjnych przypadków jest diagnozowana jako rak przewodowy (85-95%), bądź też zrazikowy (10%) [2,8,19,22]. Do końca lat dziewięćdziesiątych ocena guza, określenie rokowań i wybór terapii opierały się wyłącznie na klasyfikacji histopatologicznej [18,23], jednak zmiany identyczne pod względem patomorfologicznym wykazują często odmienny przebieg kliniczny [16,24,25]. Intensywny rozwój metod opartych na technikach biologii molekularnej przyniósł przełom w poznawaniu nowotworów [25]. W 2000 roku, w trakcie badania ekspresji genów przy użyciu mikromacierzy potwierdzono heterogeniczność raka gruczołu sutkowego na poziomie molekularnym [16,23,26]. Wprowadzanie metod molekularnych do oceny tkanek nowotworowych doprowadziło do ustalenia klasyfikacji raka gruczołu sutkowego, opartej na ekspresji genowej. Obejmuje ona 5 grup: typ normalny, typ HER-2 dodatni (zwany też ERBB2-dodatnim), dwa typy raka ER dodatniego: luminalny A i luminalny B oraz typ podstawny, czy inaczej basalny (ang. basal-like) [16,23,25,27-30]. Badania wykazały, że grupy te różnią się między sobą pod względem częstości występowania [31,32], odpowiedzi na leczenie [33-36] oraz przeżywalności [26,27,37-39], a nowotwory typu ER ujemnego i ER dodatniego są na poziomie transkrypcji niemal całkowicie odmienne [16]. Najliczniejszą i najbardziej zróżnicowaną grupę stanowi rak z dodatnią ekspresją receptorów estrogenowych [28]. Zarówno typ luminalny A, jak i luminalny B wykazują także dodatnią ekspresję

markerów komórek gruczołowych tworzących wewnętrzną warstwę prawidłowych przewodów i zrazików piersi, jednak różnią się między sobą ekspresją między innymi *TOPO II*, antygenu jądrowego komórek proliferujących, białek cyklu komórkowego [29]. Typ luminalny B przeważnie jest słabiej zróżnicowany, ma wyższy indeks mitotyczny i wiąże się z gorszym rokowaniem niż typ A [40]. Rak ER (+) w większości przypadków pozytywnie reaguje na terapię hormonalną [18]. Opracowane zostały specjalne testy genowe, wspomagające ocenę rokowań pacjentów z nowotworem ER (+) poddanych takiemu leczeniu [21,28,40]. Rak basalny, zwany też potrójnie ujemnym (ang. TNBC - triple-negative breast cancer) jest najsłabiej zróżnicowany. Charakteryzuje się brakiem ekspresji receptorów estrogenowych, progesteronowych oraz HER-2, a także wysoką ekspresją genów typowych dla warstwy podstawnej komórek nabłonka [29]. To typ o agresywnym, niekorzystnym przebiegu, dla którego jedynym leczeniem pozostaje tradycyjna chemioterapia [18,28,40]. Rak HER-2 (+) wykazuje nadekspresję HER-2 i wielu genów amplikonu 17q11 oraz brak ekspresji receptorów hormonalnych i markerów komórek podstawnych [29]. W jego przebiegu skuteczna jest terapia celowana skierowana przeciwko receptorowi HER-2 [18,28,40,42,43]. W ostatnich latach klasyfikacja molekularna rozszerzona została o dodatkową grupę zwaną „claudin-low”, charakteryzującą się niskim poziomem ekspresji genów z rodziny kładyn, które kodują białka wchodzące w skład obwódki zamykającej – struktury uszczelniającej nabłonki [3,23,25,36,44,45]. Nadal jednak trudno przewidzieć progresję kliniczną tego nowotworu [5]. Choć poczyniono znaczny postęp w leczeniu guzów pierwotnych, to brakuje skutecznej terapii skierowanej przeciwko głównej przyczynie śmiertelności związanej z rakiem piersi. Są nią przerzuty, które mogą zostać wykryte nawet po wielu latach remisji [6,41,46]. Badania przeprowadzone w ostatnich kilku latach pozwalają wysunąć hipotezę, że potencjał do przerzutowania określony jest już na etapie inicjacji nowotworzenia, o wiele wcześniej niż pojawienie się pierwszych objawów [6,41,47]. W świetle powyższych faktów konieczne staje się opracowanie metod wczesnej diagnostyki oraz determinacji predyspozycji do zachorowań i tworzenia przerzutów [47,48].

Dane molekularne w diagnostyce i rokowaniu

Możliwość określenia profilu molekularnego nowotworów dostarczyła dodatkowe informacje, uzupełniające klasyfikację histopatologiczną [3,49], a także przyczyniła się do odkrycia nowych markerów predykcyjnych i prognostycznych, co umożliwiło sta-

wianie bardziej precyzyjnej diagnozy i trafniejszy wybór terapii [6,40]. Uzyskanie pełnego obrazu diagnostycznego jest szczególnie ważne w odniesieniu do sporadycznych przypadków raka gruczołu sutkowego o nieznannej etiologii.

Czynniki prognostyczne służą do przewidywania przebiegu choroby, predyktoryjne natomiast umożliwiają selekcję pacjentów z wysokim prawdopodobieństwem pozytywnej reakcji na zastosowaną terapię. Ma to na celu zmniejszenie całkowitych kosztów leczenia, a także uchronienie osób nie odnoszących korzyści z jego stosowania przed poważnymi działaniami niepożądanymi leków przeciwnowotworowych [21]. W praktyce najczęściej brany pod uwagę czynnikami są: wiek pacjentki, stan pachowych węzłów chłonnych, obraz histologiczny, wielkość guza oraz stan ekspresji receptorów hormonalnych ER i PR oraz receptora HER-2 [3,16,24]. Nie uwzględniają one w pełni biologicznej różnorodności nowotworów gruczołu sutkowego, dotyczącej między innymi zmian molekularnych, składu komórkowego i wrażliwości na terapię [3]. Nie pozwalają zatem na wystarczająco dokładną ocenę prognostyczną indywidualnych pacjentów, co rzutuje na wybór i skuteczność leczenia [5,6,16,24]. Ma to szczególne znaczenie w odniesieniu do przypadków sporadycznych raka piersi.

W ostatnich latach, dzięki rozwojowi technik molekularnych, opracowano nowe metody oceny rokowania, takie jak badanie obecności CK5/6 (cytokeratyny 5/6), EGFR (receptora dla naskórkowego czynnika wzrostu, ang. Epidermal Growth Factor Receptor), Ki67 (markera proliferacji komórkowej), a także ocenę profilu genetycznego guza przy użyciu mikromacierzy [24]. Ostatnia z metod opiera się na analizie ekspresji wybranych genów związanych z rozwojem guzów [50, 6]. Te charakterystyczne sygnatury genowe posłużyły do opracowania testów genetycznych stosowanych do rozpoznania pacjentek z wysokim ryzykiem nawrotów choroby, które powinny otrzymać chemioterapię uzupełniającą. Komercyjnie dostępnych jest kilka różnych testów genowych, w tym: 21-genowy Oncotype DX oraz 70-genowy MammaPrint. Dla tych dwóch testów prowadzone są obecnie randomizowane perspektywne badania kliniczne mające ocenić ich użyteczność w praktyce klinicznej [16,24,40].

TEORIE KARCINOGENEZY W ODNIESIENIU DO RAKA GRUCZOŁU SUTKOWEGO

Współczesna medycyna coraz większą wagę przywiązuje do zapobiegania i wczesnego wykrywania chorób oraz rozwoju terapii personalizowanych.

Badania nad rakiem piersi nie odbiegają od tej tendencji – prowadzone są liczne projekty mające na celu wykrycie markerów umożliwiających ocenę ryzyka zachorowania, wczesną diagnozę i prognozowanie przebiegu tego nowotworu. Aby tego dokonać, niezbędne jest jednak poznanie modeli leżących u podstaw procesów kancerogenezy raka piersi [41,47].

Powstanie komórki nowotworowej, potencjał metastatyczny i rokowanie

Najbardziej znaną teorią tłumaczącą nowotworzenie jest hipoteza Knudsona, zwana także modelem „two-hits”, zakładająca, że powstanie nowotworu jest efektem nagromadzenia się mutacji w genomie komórki i do rozwoju raka niezbędne są dwa uszkodzenia DNA (ang. two hits) [51,52]. Przyczyniła się ona do odkrycia onkogenów i genów supresorowych [52], tłumaczy też przyspieszoną karcynogenezę w rodzinnych przypadkach raka gruczołu sutkowego u nosicielek heterozygotycznej mutacji w genie *BRCA1*. Jednak nowotwór piersi pod pewnymi względami wymyka się założeniom tej teorii. *BRCA1* odgrywa ważną funkcję w utrzymaniu integralności genomu i jego bialleliczna inaktywacja spowodować powinna apoptozę lub upośledzenie proliferacji. Tymczasem tak zmutowanym komórkom udaje się przeżyć, prawdopodobnie na skutek akumulacji kolejnych mutacji, na przykład w genie *p53*. Mechanizmem przypuszczalnie ułatwiającym nabycie dodatkowych mutacji jest utrata stabilności genomu, do spowodowania której wystarcza inaktywacja pojedynczego allelu *BRCA1* [10]. Utrata heterozygotyczności i deregulacja ekspresji genu *BRCA1* spotykana jest także w sporadycznych przypadkach raka piersi [8,53,54].

Komórki nowotworowe powstają na skutek mutacji genetycznych i epigenetycznych. Według „stochastycznej” teorii karcynogenezy, proces ten zaczyna się od przypadkowej pojedynczej komórki ulegającej następnie procesowi klonalnej selekcji. Tymczasem „hierarchiczny” model karcynogenezy oraz stosunkowo nowa teoria „macierzystych komórek raka”, zwana też hipotezą CSC (ang. cancer stem cell hypothesis) zakładają, że transformacji nowotworowej ulega pewna grupa komórek pnia i komórek progenitorowych, występująca w prawidłowej tkance gruczołu sutkowego [29]. Komórki nowotworowe muszą nabyć fenotyp nowotworowych komórek macierzystych na drodze przemiany epithelialno-mezenchymalnej (ang. epithelial-mesenchymal transition or transformation, EMT). Dzięki zdolności do różnicowania oraz samodzielnego odnawiania się, dają one początek wszystkim rodzajom komórek produkowanym przez guz pierwotny, co tłumaczy obser-

wowaną heterogeniczność nowotworów [55].

Poszczególne przypadki raka gruczołu sutkowego wykazują ogromny stopień różnorodności, jednak nawet w obrębie tego samego nowotworu od dawna zauważa się obszary odmienne pod względem morfologicznym. Ostatnie lata przyniosły potwierdzenie tej wewnątrznowotworowej heterogeniczności na poziomie molekularnym. Odkryto, że poszczególne populacje komórek, a nawet indywidualne komórki tego samego nowotworu, różnią się między sobą ilością i rodzajem zmian genetycznych. Niektóre typy molekularne wydają się wykazywać większą różnorodność wewnątrznowotworową, niż inne [21,56], ale zarówno przyczyny tej zmienności, jak i jej konsekwencje nadal nie są do końca poznane [21]. Wydaje się jednak, że zmienność ta może mieć związek z tak ważnymi zjawiskami jak agresywność guza [21,57], czy odpowiedź na terapię [21,57-59]. Traktowanie heterogenicznych zmian nowotworowych, jako wielu odrębnych populacji komórek może przyczynić się do poprawienia efektywności leczenia [57].

Rozwój choroby nowotworowej w kierunku metastazy to proces złożony i wciąż nie w pełni zbadany [41,55]. Znane są jednak podstawowe etapy konieczne do wytworzenia przerzutów, czyli powstanie zmiany pierwotnej, przenikanie komórek nowotworowych do naczyń krwionośnych (intrawazacja), ich transport i przetrwanie w prądzie krwi, migracja z krążenia do tkanek (ekstrawazacja), a w końcu kolonizacja tkanek i narządów odległych [41,60]. Progresa nowotworu wymaga powstania specyficznych zmian w genomie, zaczynając od tych inicjujących rozwój guza przez zapewnienie komórkom zdolności nieograniczonej proliferacji, możliwości tolerowania zaburzeń podziałów komórkowych i niestabilności genomu oraz utrzymanie fenotypu progenitorowego. Transformacja onkogeniczna nie wystarcza jednak do nabrania potencjału metastatycznego [41,47,61]. Komórka musi nabyć nowe zdolności, przyczyniające się ostatecznie do umożliwienia założenia wtórnych kolonii i zajęcia innych tkanek. Choć podstawowe etapy prowadzące do powstania przerzutów są takie same dla wszystkich rodzajów nowotworów, to metastaza do różnych organów wiąże się z koniecznością nabycia innych właściwości, a w związku z tym, z powstawaniem odmiennych mutacji leżących u ich podstaw [41]. Zidentyfikowano już wiele zmian, zarówno genetycznych jak i epigenetycznych, przyczyniających się do progresji nowotworowej [29,41] i wciąż odkrywane są kolejne [62].

Komórki nowotworowe opuszczają guz pierwotny drogą limfatyczną lub krwionośną [46,63]. Wiele nowotworów, w tym rak gruczołu sutkowego, pierwsze

ogniska przerzutowe tworzy najczęściej w regionalnych węzłach chłonnych, stąd pojawienie się koncepcji węzła wartowniczego (ang. sentinel lymph node, SLN), czyli pierwszego węzła limfatycznego na drodze spływu chłonki z ogniska nowotworowego, w którym to wtórna zmiana nowotworowa powinna rozwinąć się najszybciej. Zdarza się, że przerzuty w regionalnych węzłach chłonnych są pierwszym zauważalnym objawem raka piersi i ich diagnoza poprzedza wykrycie guza pierwotnego [19]. Stan pachowych węzłów chłonnych jest jednym z ważniejszych czynników pozwalających prognozować przebieg raka gruczołu sutkowego, mającym wskazywać, czy prawdopodobne jest powstanie przerzutów wisceralnych. Pacjenci bez przerzutów w tych węzłach oceniani są jako lepiej rokujący, mimo to jednak u znacznej części z nich rozwiną się guzy wtórne [19,46,63] – główna przyczyna wysokiej śmiertelności raka piersi. Często ma miejsce także sytuacja odwrotna: u chorych z przerzutami do węzłów pachowych nigdy nie stwierdza się nawrotu nowotworu. Ten brak jednoznacznej korelacji świadczy o złożoności procesów leżących u podstaw karcynogenezy [46]. U ponad 80% kobiet z inwazyjnym rakiem piersi bez zajętych węzłów chłonnych w ciągu dziesięciu lat od diagnozy prawdopodobnie nie dojdzie do pojawienia się przerzutów [19]. Tej grupie pacjentek cytotoksyczna chemioterapia niesie jedynie niewielką poprawę rokowań, tymczasem są one narażone na towarzyszące jej poważne działania niepożądane ze względu na brak możliwości rozróżnienia, którzy chorzy odniosą z niego rzeczywistą korzyść [6,19].

Metastaza – model progresji liniowej a model progresji równoległej

Do niedawna, powszechnie akceptowaną teorią tłumaczącą proces powstawania przerzutów był tak zwany model progresji liniowej, według którego metastaza jest końcowym etapem karcynogenezy [55]. Hipoteza ta początkowo opierała się na obserwacji stopniowego postępowania zaburzeń morfologicznych związanych z nowotworem [64], zaś później powiązano z tym procesem odkryte w genomie raka akumulacje zmian genetycznych i epigenetycznych [47,65]. Zgodnie z tym modelem, niewielka grupa komórek nowotworowych w guzie pierwotnym przechodzi liczne selekcyjne cykle mutacji. Po tych przemianach są one w stanie dzielić się niezależnie i w szybkim tempie, dzięki czemu pierwotny guz roztęka się. W późnej fazie rozwoju nowotworu część z wyselekcjonowanych klonów komórek rakowych, którym udało się uzyskać inwazyjny fenotyp, opuszcza zmianę pierwotną, by dać początek przerzutom [47,65-67]. Proces adaptacji jest tutaj rozumiany jako zakończenie rozwoju i genetycznej ewolucji komór-

ki [67]. Według tej teorii, ostateczna disseminacja w pełni złośliwych klonów komórek nowotworowych zależy od rozmiaru guza – dla przykładu, klonalna ekspansja komórek z mutacją genu supresorowego *TP53* występuje najczęściej, gdy średnica guza przekracza 2 cm [47]. Powyższa obserwacja, poparta faktem, iż częstotliwość występowania przerzutów także wzrasta wraz z rozmiarem guza [47,68-70] (co jest podstawą powszechnie stosowanego systemu klasyfikacji nowotworów TNM, którego nazwa pochodzi od pierwszych liter angielskich słów: Tumor, Nodus, Metastases), wydaje się potwierdzać tezę, według której zdolność do przerzutowania mogą posiadać komórki, które uległy rozsiewowi w zaawansowanej fazie progresji nowotworu pierwotnego [47,68,69]. Zgodnie z teorią progresji liniowej, genomy komórek tworzących przerzuty mogą wykazywać dodatkowe mutacje w stosunku do genomów komórek z guzów pierwotnych, lecz ich ogólny profil genetyczny powinien być zbliżony [55,71].

Zaawansowane badania molekularne pozwoliły na weryfikację założeń hipotezy progresji liniowej i zasugerowały poprawność innego modelu procesu metastazy [6,65-68,72-74]. Teoria ta, nazwana hipotezą progresji równoległej, sformułowana została już w latach 50 ubiegłego wieku. Zmierzono wtedy szybkość wzrostu ludzkich nowotworów i odkryto, że wiele przerzutów było zbyt dużych, by ich rozwój mógł zostać zapoczątkowany w zaawansowanej fazie rozwoju guza pierwotnego [47,75]. Założono więc, że inicjacja nowotworzenia może być rozpoczęta już przed pojawieniem się pierwszych objawów i zdiagnozowaniem choroby [47]. Model ten nie odrzuca podstawowego mechanizmu progresji nowotworów, czyli selekcji klonalnej w guzach pierwotnych, czy akumulacji zmian genetycznych i epigenetycznych. Zakłada jednak, że moment disseminacji komórek o potencjale metastatycznym niekoniecznie przypada na późną fazę rozwoju guza pierwotnego [6,47,65,72], a nawet może być właściwością charakteryzującą zmianę nowotworową już w momencie jej powstania [6,66]. Ponad dziesięć lat temu pierwszy raz wykazana została niewielka ilość cech wspólnych, bądź też ich brak, między genotypem komórek z guza pierwotnego, a komórek z przerzutów raka piersi [76] i raka nerki [77], mogąca być skutkiem wczesnego oddzielenia się wciąż ewoluujących komórek od zmiany macierzystej [47,67]. Nowe badania potwierdziły możliwość ustrojowego rozsiewu komórek nowotworowych już w momencie powstania początkowych zmian nabłonkowych u kobiet z nowotworem piersi [78]. Według modelu progresji równoległej, komórki we wstępnej fazie nowotworzenia, szybko oddzielające się od zmiany macierzystej, podlegają somatycznej progresji w docelowej, odległej lokalizacji [67]. Zmiany genetyczne i epigenetyczne w guzie pier-

wotnym i przerzutach są odmienne, gdyż pojawiają się paralelnie, niezależnie od siebie. Rozsiane komórki nowotworowe – DTC (ang. disseminated tumour cells), krążące po organizmie, podlegają wpływowi mikrośrodowiska, do którego trafiają i mutują w sposób odrębny. Kolejne pokolenia DTC mogą migrować z guza pierwotnego wielokrotnie w różnym czasie, a przerzuty mogą rozwijać się równolegle [41,47]. Koncepcją wskazującą na poprawność modelu równoległego rozwoju guza pierwotnego i przerzutów jest tak zwana „teoria ziarna i gleby” (ang. seed and soil), podkreślająca wpływ odległego mikrośrodowiska na tworzenie przerzutów [79]. Rozsiane komórki nowotworowe wykryto głównie w szpiku kostnym [41,65,67], ale także w węzłach limfatycznych i krwi obwodowej [41,67]. Na podstawie zależności między ich obecnością u pacjentów po resekcji guza pierwotnego, a pojawianiem się przerzutów, DTC są uważane za prawdopodobną przyczynę nawrotów choroby nowotworowej [67,80]. Czasowy odstęp między infiltracją narządów, a ich kolonizacją przez komórki nowotworowe, czyli okres latencji – od wykrycia guza pierwotnego do zdiagnozowania przerzutów – może być odmienny dla różnych rodzajów nowotworu. Choć zarówno gruczolakoraki piersi, jak i płuc przeważnie dają przerzuty do kości, płuc, wątroby i mózgu, to znacznie różnią się czasem, po jakim pojawiają się zmiany wtórne [41,81]. Podczas gdy w przebiegu raka płuc zaawansowane przerzuty stwierdza się często już w momencie diagnozy ogniska pierwotnego [55], w raku piersi nawroty obserwowane są nawet po wielu latach remisji [55,65]. W nowotworach złośliwych, których metastaza poprzedzona jest długotrwałym okresem latencji, takich jak rak gruczołu sutkowego, nabywanie profilu inwazyjnego wydaje się odbywać w czasie przebywania DTC w mikrośrodowisku danego organu odległego. Każda z tkanek wywiera inny wpływ na rozsiane komórki nowotworowe, co może skutkować powstawaniem komórek o potencjale przerzutowym specyficznym dla danego narządu. Mutacje genetyczne i epigenetyczne w populacji rozsianych komórek nowotworowych, a także zmiany w mikrośrodowisku, mogą ostatecznie skutkować osiągnięciem pełnej zdolności tworzenia przerzutów przez część DTC. Potwierdzeniem tej hipotezy może być fakt, że u pacjentów z rakiem piersi, zmiany wtórne rozwijają się najpierw w jednym organie, a dopiero później w kolejnych [41]. W ostatnich latach przy użyciu technik molekularnych o wysokiej rozdzielczości wykazano, iż genomy DTC wyizolowanych ze szpiku kostnego pacjentów z rakiem piersi mogą nie tylko różnić się od genomu komórek pochodzących z macierzystego guza pierwotnego, ale nawet wykazywać mniej aberracji od niego [65,67,82]. Podobne wyniki otrzymano, gdy porównywano komórki pobrane ze zmiany pierwotnej do komórek z przerzutów, zarówno regionalnych, jak i odległych [46,74,76,83-85]. Ta genetyczna heterogenicz-

ność komórek raka piersi może sugerować współistnienie guzów pierwotnych i przerzutów na wczesnym etapie procesu nowotworzenia oraz ich niezależny od siebie rozwój [46,65,67,82]. Analogiczne rezultaty dostarczyły także badania innych nowotworów [67,86-92]. Możliwe jest też istnienie odrębnych grup genów odpowiedzialnych za proces metastazy. Zmiany w „genach inicjacji” i „genach progresji” przerzutowania byłyby wspólne dla guza pierwotnego i zmian wtórnych, natomiast „geny złośliwości” zapewniałyby przewagę komórkom nowotworowym dopiero w nowej lokalizacji, dlatego też ich aberracje nie byłyby wykrywane w guzach pierwotnych [55,66,93-95].

Fakt, że coraz więcej doniesień wskazuje na poprawność teorii równoległej progresji guzów pierwotnych i przerzutów, niesie ze sobą potrzebę zmiany obecnego podejścia klinicznego. Zakwestionowane zostaje stosowanie guzów pierwotnych w przewidywaniu odpowiedzi na terapię raka uogólnionego [46,47,67] oraz korzystanie z linii komórkowych otrzymanych z zaawansowanych zmian nowotworowych, gdyż może to zaburzać selekcję adaptacyjną klonów komórek i wpłynąć na mechanizmy odpowiadające za wczesne przerzutowanie. Choć model progresji liniowej proponuje proste rozwiązanie problemu nowotworów: należy zapobiec powstaniu przerzutów poprzez usunięcie guza we wczesnej fazie progresji, a następnie zniszczyć pozostałe komórki nowotworowe – to jednak takie postępowanie w praktyce nie daje zadawalających efektów [47]. Przyczyną może być brak cech wspólnych między komórkami guza pierwotnego, a rozszanymi komórkami nowotworowymi i przerzutami. Model progresji równoległej, uwzględniający heterogeniczność DTC, daje nadzieję na opracowanie nowych terapii opartych na identyfikacji markerów metastazy oraz zmian DNA inicjujących i predysponujących do nowotworzenia, umożliwiających wczesną diagnostykę raka uogólnionego [47,67].

RAK PIERSI A ABERRACJE LICZBY KOPII DNA

Mozaikowość somatyczna w kontekście CNV

Jednym z efektów intensywnych badań molekularnych prowadzonych w minionych latach było odkrycie, że organizmy ludzkie różnią się między sobą pod względem somatycznych rearanżacji strukturalnych, zwanych CNV (ang. Copy Number Variants) [96-101]. CNV można zdefiniować jako fragmenty DNA o długości powyżej 1 kb, występujące w genomie w różnej liczbie kopii. Mogą występować w postaci delecji, duplikacji, insercji, bądź zmian złożonych zwanych MSVs (ang. Multi-site Variants) [98,102]. Polimorfizm liczby kopii DNA

został uznany za istotny genetyczny element zmienności międzyosobniczej, a liczba doniesień o powiązaniach między aberracjami liczby kopii DNA, a schorzeniami – zarówno rzadkimi o podłożu genetycznym, jak i chorobami często występującymi – stale rośnie [96,98,102].

Jednak mozaikowość somatyczna dotycząca CNV, występująca w obrębie jednego organizmu była do niedawna nieznanym aspektem zmienności ludzkiego genomu. Dowiedziono, że takie subchromosomalne rearanżacje strukturalne mogą dotyczyć pojedynczych organów oraz jednej lub kilku tkanek, także tych patologicznie niezmiennych, w obrębie tego samego organizmu. Podobne zmiany stwierdzono pomiędzy bliźniakami jednojajowymi, które w ujęciu genetycznym można uznać za ekstremalny przykład mozaikowości somatycznej. Zmiany te występują w wielu komórkach i obejmują od kilku tysięcy do kilku milionów par zasad [103-105].

Obecnie uważa się, że zaburzenia w następujących mechanizmach molekularnych prowadzą do powstawania większości rearanżacji strukturalnych w genomie człowieka: NAHR (ang. non-allelic homologous recombination), NHEJ (ang. non-homologous end-joining), FoSTeS (ang. Fork Stalling and Template Switching) i MMBIR (ang. microhomology-mediated break-induced replication) [106,107]. Każdy z nich może odpowiadać za powstawanie zmian w czasie mitozy, jak i mejozy, jednak powiązanie z procesem nowotworzenia wykazują przede wszystkim rearanżacje powstające w komórkach somatycznych [107,108]. Mechanizmy te pozostawiają swoiste ślady na poziomie sekwencji nukleotydów DNA, na podstawie których możliwe jest określenie jakiego rodzaju proces komórkowy uległ zaburzeniu i leży u podstaw powstania danej zmiany [106,107]. Wyniki najnowszych badań donoszą także o kolejnym, zaskakującym mechanizmie powstawania rearanżacji strukturalnych. Okazuje się, że dziesiątki, a nawet setki mutacji mogą powstać w genomie w czasie jednego, często katastrofalnego w skutkach, procesu komórkowego. Zjawisko to, nazwane chromothripsis (gr. chromos - chromosom; thripsis - roztrzaskać na kawałki), zachodzi w 2-3% nowotworów [109].

Luki w sekwencjonowaniu, a aberracje subchromosomalne

Obecność somatycznych aberracji jest charakterystyczna dla sporadycznego nowotworu gruczołu sutkowego [110]. Badania cytogenetyczne i molekularne wykazały występowanie licznych subchromosomalnych rearanżacji strukturalnych w komórkach

somatycznych raka piersi, a także wyłoniły szereg regionów genomu ulegających aberracjom liczby kopii DNA [5,30,111-118].

Nabyte zmiany liczby kopii DNA przyczyniają się do inicjacji i progresji karcynogenezy [108,110], mają potencjał prognostyczny [30,42,43] i wykazują powiązanie z typami molekularnymi raka piersi [30,42,43,119-122]. Jednak tylko jedna zmiana somatyczna – amplifikacja w obrębie genu *HER-2*, występująca w 10-15% guzów – ma zastosowanie kliniczne [111]. Wyodrębnienie grupy charakteryzującej się amplifikacją *HER-2*, doprowadziło do opracowania nowej metody leczenia – terapii celowanej przeciwko receptorowi *HER-2* [18,28,112]. Ogólnie, około 20% różnic w poziomie ekspresji genów, wywołana jest zmianami liczby kopii DNA w raku piersi. *HER2* jest rzadkim przykładem onkogeny, którego nadekspresja jest bezpośrednio związana z amplifikacją ściśle zdefiniowanego *locus* [111]. Niewątpliwym sukcesem klinicznym opartym na odkryciu amplifikacji w obrębie genu *HER-2* przyczynił się do rozwoju badań nad innymi somatycznymi subchromosomalnymi rearanżacjami strukturalnymi występującymi w genomie kobiet z rakiem piersi [28,30,42,43].

Obiecującym obszarem poszukiwań nowych aberracji strukturalnych o potencjale diagnostycznym są rejony flankujące tzw. luki w sekwencjonowaniu, ponieważ charakteryzują się ponadprzeciętną podatnością na powstawanie rearanżacji strukturalnych DNA [104,123]. Luki w sekwencjonowaniu (ang. sequencing gaps) są miejscami w genomie ludzkim, których scharakteryzowanie w trakcie realizacji Projektu Poznania Ludzkiego Genomu (ang. Human Genome Project) okazało się problematyczne, ze względu na problemy z ich sekwencjonowaniem i klonowaniem. Zawierają one najczęściej liczne duplikacje segmentalne, palindromy, a czasem także duże, złożone rearanżacje strukturalne [124]. Rejony te dzielą się na dwa podstawowe rodzaje: luki heterochromatynowe i euchromatynowe [124]. W 2004 roku opublikowano 99% sekwencji euchromatynowej ludzkiego genomu, zidentyfikowano też lokalizacje 341 luk [125]. Liczna obecność polimorfizmów strukturalnych i rearanżacji chromosomalnych na obrzeżach luk w sekwencjonowaniu, sugeruje, że *loci* te wykazują zwiększoną podatność na powstawanie takich aberracji, co ma związek między innymi z utratą stabilności genomu [124]. Efekty zaburzeń działania mechanizmów NAHR, NHEJ, FoSTes i MMBIR powinny być w pierwszej kolejności widoczne w częściach genomu o budowie najbardziej sprzyjającej powstawaniu zmian [125]. Istnieje podejrzenie, że obecność tych stosunkowo dużych zmian genetycznych *de novo*, dotykających często także wielu funkcjo-

nalnych genów, nie pozostaje bez wpływu na fenotyp nosicieli, szczególnie w kontekście somatycznych chorób o podłożu genetycznym, do których należy rak gruczołu sutkowego [126].

Biobankowanie

Próby odkrycia mechanizmów wpływających na złożone procesy nowotworowe wymagają projektowania badań wykorzystujących nowoczesne technologie molekularne, ale nawet w erze sekwencjonowania całego genomu, trudno nie docenić wartości dobrze scharakteryzowanych i opisanych próbek tkankowych. Niewłaściwa ilość bądź jakość próbek, stanowią większą przeszkodę w przeprowadzaniu badań niż skomplikowane technologie molekularne [127]. Obecnie trwają prace nad wprowadzeniem we wszystkich biobankach jednolitych standardów pobierania, przechowywania oraz transportowania próbek w celu ich szerokiego udostępniania [128]. W projekcie realizowanym przy wsparciu Naukowej Fundacji Polpharmy powyższe zadania zostały powierzone Centralnemu Bankowi Tkanek i Materiału Genetycznego – CBTiMG – przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym.

Wychodząc tym oczekiwaniom na przeciw CBTiMG włączył się pan-europejską sieć biobanków (BBMRI – Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure). Od tej pory sukcesywnie wprowadza standardy, zwiększa swoje zasoby oraz rozwija infrastrukturę badawczą (Partners & Members of BBMRI). Podstawą sukcesu CBTiMG jest staranny dobór grup pacjentów, standaryzacja metod pobierania, utrwalania i przechowywania próbek. Udostępniany jest również pełen opis kliniczny, jak i dane z pełnego okresu obserwacji (ang. follow-up), z zachowaniem procedur bioetycznych, takich jak świadoma zgoda pacjentów oraz anonimizacja danych osobowych. Próbkę pobierane są bezpośrednio na sali operacyjnej i natychmiast po pobraniu i opisanu mrożone w oparach ciekłego azotu, następnie transportowane do CBTiMG, gdzie przechowywane są w zamrażarkach niskotemperaturowych. Dane kliniczne pochodzą z wojewódzkich rejestrów chorób nowotworowych, oddziałów NFZ, szpitali, poradni i są powiązane z przechowywanymi próbkami. Dodatkowym źródłem danych oprócz tkanki nowotworowej jest także tkanka zdrowa, krew i mocz – pobierane od tego samego pacjenta. W celu bardzo dokładnego opisanie pobranych próbek CBTiMG tworzy „backup” stanowiący lustrzane odbicie wszystkich przechowywanych tkanek. Pozwala to na precyzyjne określenie badanego materiału oraz pełen opis patomorfologiczny (proporcje tkanek prawidłowych, nowotworowych, martwicy, włóknienia w danej próbce). „Backup” tkankowy pod postacią

zamrożonej próbki i bloczka parafinowego stanowi także rezerwę na wypadek konieczności powtórzenia lub poszerzenia zakresu badań.

Biobanki – jako jedna z dziesięciu idei zmieniających świat – zostały uznane za niezbędny element w osiągnięciu postępu w dziedzinie biotechnologii, ochronie zdrowia, badaniach naukowych oraz w dalszej eksploracji w obszarze nauk o życiu [129,130]. Duże biobanki, czy też sieć biobanków, wyposażone w roboty i automatyczne stacje przetwarzania próbek w niedalekiej przyszłości będą również cennym źródłem dla firm farmaceutycznych poszukujących nowoczesnych leków [131].

CEL, ORYGINALNE ASPEKTY PRZEPROWADZONYCH BADAŃ, WNIOSKI

W zrealizowanym projekcie finansowanym przez Naukową Fundację Polpharmy, postawiono hipotezę, że somatyczne CNV w rejonach genomu flankujących luki w sekwencjonowaniu (ang. sequencing gaps) stanowią pierwszy objaw niestabilności genomu i sprawdzono tę hipotezę w kontekście sporadycznego raka piersi. Właściwym celem projektu było poszukiwanie odpowiedzi na pytanie: czy czas, mechanizm i częstość powstawania somatycznych subchromosomalnych rearanżacji strukturalnych w rejonach flankujących „sequencing gaps” ma zna-

czenie diagnostyczne i prognostyczne w sporadycznym raku piersi? Badanie objęło również zmiany epigenetyczne (w znaczeniu metylacji DNA) w tych samych rejonach, w szczególności analizę funkcjonalną (inaktywacja ekspresji genów) i strukturalną (modyfikacja lokalnej architektury genomu sprzyjająca powstawaniu rearanżacji strukturalnych). Powyższą hipotezę oraz cele sformułowano na podstawie stanu wiedzy zestawionego w Tabeli 1.

Podczas realizacji projektu ukazało się kilka raportów z szeroko zakrojonych prac dotyczących prób klinicznych raka piersi zrealizowanych w znacznej mierze przez duże konsorcja badawcze [28,84,117,132-136]. Tym niemniej, szczegółowy przegląd tych prac pozwala na wyodrębnienie oryginalnych aspektów badań wspieranych przez Naukową Fundację Polpharmy.

W odniesieniu do planu badań wyróżniający jest zakres materiału badawczego oraz indywidualny projekt platformy badawczej (mikromacierzy). Projekt uwzględniał badania guzów pierwotnych, przerzutów (głównie do węzłów chłonnych), zdrowej tkanki gruczołowej pobranej z odległej lokalizacji w stosunku do umiejscowienia guza oraz leukocytów krwi obwodowej jako materiału referencyjnego. Większość badań uwzględnia guzy pierwotne lub przerzuty [70,117,132,133,135-140]. Oba rodzaje guzów pochodzące od tych samych pacjentów rzadko są analizowane razem w jednym badaniu [67], a ma to istotne znaczenie, ze względu na ograni-

Tabela 1. Stan wiedzy w chwili rozpoczęcia projektu

Obserwacja	Stan wiedzy	Pozycja piśmiennictwa
Rejony flankujące luki w sekwencjonowaniu	Rejony te wykazują podwyższoną podatność na powstawanie rearanżacji strukturalnych. Luki charakteryzują się wysoką częstotliwością występowania rearanżacji strukturalnych. Rejony flankujące to często sekwencje zbudowane z duplikacji segmentalnych. Luki w sekwencjonowaniu i rejony je flankujące mogą zawierać geny.	[104,124]
		[123,141]
		[123]
		[104,123]
Czas występowania zmian	Obserwuje się zmiany w guzach pierwotnych i przerzutach. W części doniesień profil tych zmian jest zbliżony, niektóre jednak informują o odmiennych wzorach aberracji, a także o mniejszej ilości zmian w przerzutach niż w zmianach pierwotnych, z których pochodzą. Komórki guzów pierwotnych pobranych od pacjentów z przerzutami do węzłów chłonnych wykazują wyższą niestabilność genomową, niż komórki pacjentów bez przerzutów. Udowodniono możliwość ustrojowego rozsiewu komórek nowotworowych już w momencie powstania początkowych zmian nabłonkowych u kobiet z nowotworem piersi. Brak jest danych w kontekście rejonów flankujących luki w sekwencjonowaniu.	[75,83,85]
		[78]
Mechanizm generowania zmian	Znane są ogólne mechanizmy generowania zmian w rejonach złożonych strukturalnie, m.in. NAHR (ang. non-allelic homologous recombination), NHEJ (ang. non-homologous end-joining), FoSTeS (ang. Fork Stalling and Template Switching) i MMBIR (ang. Microhomology-Mediated Break-Induced Replication).	[106,107]
Zmiany w „zdrowej” tkance gruczołowej	Nie przeprowadzono analizy zmian strukturalnych i epigenetycznych w zdrowej tkance gruczołowej w porównaniu do tkanki nowotworowej. Istnieje doniesienie wskazujące na LOH (ang. loss of heterozygosity) w zdrowej tkance gruczołowej, brak wysokorozdzielczych danych. Brak jest danych w kontekście rejonów flankujących luki w sekwencjonowaniu.	[142]

Tabela 2. Co przyniosła realizacja grantu Naukowej Fundacji Polpharmy

Kategoria obserwacji	Wynik
Czas występowania zmian	Zmiany strukturalne i epigenetyczne występują już w zdrowej tkance gruczołowej. Niektóre próby wykazują zmiany strukturalne w rejonach uważanych za sygnatury genomowe raka piersi. Występowanie zmian w zdrowej tkance gruczołowej otwiera drogę do opracowania rozwiązań diagnostycznych.
Mechanizm generowania zmian	Stwierdzono obecność powtórzeń modułów sekwencji w rejonach rearanżacji oraz charakterystycznych motywów sugerujących możliwą funkcję regulatorową sekwencji niekodujących. Rejony objęte przez rearanżacje strukturalne powiązane są również z występowaniem metylacji DNA.
Częstość powstawania zmian	Średnia liczba rearanżacji strukturalnych w niezmienionej nowotworowo tkance gruczołowej od pacjentek z rakiem piersi jest o ok. ¼ większa niż w grupie tkanek kontrolnych. W tkankach od pacjentek obserwowane zmiany są rozproszone w ponad dwukrotnie większej liczbie badanych rejonów w porównaniu do grupy kontrolnej.
Geny	Mimo że projekt dotyczył w dużej mierze sekwencji niekodujących, możliwe było wytypowanie genów występujących w rejonach rearanżacji strukturalnych i zmian epigenetycznych. Większość z tych genów była wcześniej raportowana w kontekście związku z nowotworzeniem, jednak zidentyfikowano także grupę genów, które jak dotąd nie były przedmiotem szerszych badań w raku piersi.
Rozwiązania metodyczne	Regeneracja mikromacierzy oligonukleotydowych umożliwiającą czterokrotne użycie [143]. Genomic Variants Comparator - oprogramowanie do wykonywania zestawień i porównań danych z mikromacierzy oraz sekwencjonowania następnej generacji [Madanecki i in., w przygotowaniu].

czone możliwości porównania wyników badań wykonanych na próbach od różnych grup pacjentek i z wykorzystaniem odmiennych metod. Ponadto zdrowa tkanka gruczołowa jest pomijana w badaniach, a jeśli zostanie uwzględniona, to pochodzi z bezpośrednio sąsiedztwa guza, dlatego nie jest materiałem optymalnym, z uwagi na procesy zapalne i ryzyko kontaminacji komórkami nowotworowymi [139]. Dodatkowo, jednoczesna analiza somatycznych rearanżacji strukturalnych i metylacji DNA z wykorzystaniem wymienionego, pełnego zakresu tkanek od pacjentek, nie została jak dotąd przeprowadzona. Do wykonania badań wykorzystano dedykowaną oligonukleotydową mikromacierz DNA, zaprojektowaną i wyprodukowaną specjalnie dla potrzeb zrealizowanego projektu. Mikromacierz, złożona w sumie z ponad 580 tysięcy punktów pomiarowych, pozwoliła na analizę rejonów flankujących wszystkie luki w sekwencjonowaniu w genomie ludzkim (edycja sekwencji genomu ludzkiego hg19/GRCh37) z wysoką rozdzielczością (średnia rozmieszczenia przestrzennego sond: 51 bp). Rejony flankujące sequencing gaps ze względu na złożoną strukturę są podatne na rearanżacje strukturalne. Przyjęto więc, że w trakcie nowotworzenia będą w pierwszej kolejności ulegać zmianom strukturalnym i tym samym posiadać znaczenie diagnostyczne.

Uzyskane wyniki pozwoliły sformułować ogólne wnioski, które przedstawiono w Tabeli 2. Szczegółowa prezentacja wyników projektu jest tematem odrębnego raportu badawczego [Ronowicz i wsp., w przygotowaniu]. Wprawdzie przeprowadzone badania miały charakter zasadniczo podstawowy, to uzyskane wy-

ki definitywnie zachęcają do realizacji projektów aplikacyjnych. Ewentualne wdrożenia wymagają opracowania dedykowanych narzędzi diagnostycznych (np. specjalizowanej mikromacierzy), które muszą podlegać walidacji w warunkach klinicznych i z wykorzystaniem znacznej liczby prób od pacjentek oraz z grup kontrolnych. Ponadto, podczas realizacji projektu wprowadzono dwa zasadnicze usprawnienia, które mają charakter niezależnych rozwiązań metodycznych, czyli już obecnie stanowią samodzielne rozwiązania o znaczeniu praktycznym (Tabela 2).

Podsumowując, realizacja projektu wykazała, że czas, mechanizm i częstość powstawania somatycznych subchromosomalnych rearanżacji strukturalnych w rejonach flankujących luki w sekwencjonowaniu mogą mieć znaczenie diagnostyczne i prognostyczne u pacjentek ze sporadycznym rakiem gruczołu sutkowego. Przeprowadzone badania, dotyczące tkanek bardzo rzadko analizowanych łącznie i kompleksowo, przyczyniają się do lepszego poznania niezwykle zróżnicowanej choroby, jaką jest rak piersi i mogą posłużyć do opracowania nowych rozwiązań diagnostycznych. Obecny, gwałtowny rozwój metod i spadek kosztów wysoce wydajnego sekwencjonowania równoległego otwiera drogę do rozwojowej kontynuacji przedstawionego projektu. Dzięki możliwości określenia indywidualnego profilu mutacji dla każdego guza, a nawet dla każdej subpopulacji komórek, nowe metody sekwencjonowania przybliżają spełnienie marzenia o w pełni spersonalizowanej diagnostyce w tak heterogenicznej chorobie jaką jest rak piersi [21,58,144].

PIŚMIENNICTWO:

1. J. Didkowska, U. Wojciechowska i W. Zatoński: Nowotwory złośliwe w Polsce w 2009 roku. Centrum Onkologii Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Warszawa, 2011.
2. M. Benetkiewicz, A. Piotrowski, T. Díaz De Ståhl i wsp.: Chromosome 22 array-CGH profiling of breast cancer delimited minimal common regions of genomic imbalances and revealed frequent intra-tumoral genetic heterogeneity. *Int J Oncol*, tom 29, pp. 935-45, 2006.
3. A. Prat i C. M. Perou: Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*, tom 5, pp. 5-23, 2011.
4. A. Llombart-Cussac: Improving decision-making in early breast cancer: who to treat and how? *Breast Cancer Res Treat*, tom 112, pp. 15-24, 2008.
5. F. Bertucci i D. Birnbaum: Reasons for breast cancer heterogeneity. *J Biol*, tom 7, nr 6, 2008.
6. B. Weigelt, J. L. Peterse i L. J. van't Veer: Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer*, tom 5, pp. 591-602, 2005.
7. D. H. Roukos: Trastuzumab and beyond: sequencing cancer genomes and predicting molecular networks. *Pharmacogenomics J*, tom 11, 2011.
8. P. Kenemans, R. A. Verstraeten i R. H. Verheijen: Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer. *Maturitas*, tom 61, pp. 141-50, 2008.
9. H. T. Lynch, E. Silva, C. Snyder i J. F. Lynch: Hereditary breast cancer: part I. Diagnosing hereditary breast cancer syndromes. *Breast J*, tom 14, pp. 3-13, 2008.
10. H. Konishi, M. Mohseni, A. Tamaki i wsp.: Mutation of a single allele of the cancer susceptibility gene BRCA1 leads to genomic instability in human breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, tom 108, pp. 17773-8, 2011.
11. L. Melchor, E. Honrado, J. Huang i wsp.: Estrogen receptor status could modulate the genomic pattern in familial and sporadic breast cancer. *Clin Cancer Res*, tom 13, pp. 7305-13, 2007.
12. B. Zhang, A. Beeghly-Fadiel, J. Long i W. Zheng: Genetic variants associated with breast-cancer risk: comprehensive research synopsis, meta-analysis, and epidemiological evidence. *Lancet Oncol*, tom 12, pp. 477-88, 2011.
13. S. Peng, B. Lü, W. Ruan i wsp.: Genetic polymorphisms and breast cancer risk: evidence from meta-analyses, pooled analyses, and genome-wide association studies. *Breast Cancer Res Treat*, tom 127, pp. 309-24, 2011.
14. M. Riaz, E. M. Berns, A. M. Sieuwerts i wsp.: Correlation of breast cancer susceptibility loci with patient characteristics, metastasis-free survival, and mRNA expression of the nearest genes. *Breast Cancer Res Treat*, tom 133, pp. 843-51, 2012.
15. P. A. Fasching, P. D. Pharoah, A. Cox i wsp.: The role of genetic breast cancer susceptibility variants as prognostic factors. *Hum Mol Genet*, tom 21, pp. 3926-39, 2012.
16. P. E. Colombo, F. Milanezi, B. Weigelt i J. S. Reis-Filho: Microarrays in the 2010s: the contribution of microarray-based gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction. *Breast Cancer Res*, tom 27, 2011.
17. E. H. van Beers i P. M. Nederlof: Array-CGH and breast cancer. *Breast Cancer Res*, tom 8, 2006.
18. K. Polyak: Heterogeneity in breast cancer. *J Clin Invest*, tom 121, pp. 3786-8, 2011.
19. S. Eccles, L. Paon i J. Sleeman: Lymphatic metastasis in breast cancer: importance and new insights into cellular and molecular mechanisms. *Clin Exp Metastasis*, tom 24, pp. 619-36, 2007.
20. F. A. Tavassoli i P. Devilee: Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs; World Health Organization Classification of Tumours, IARC, 2003.
21. H. G. Russnes, N. Navin, J. Hicks i A. L. Borresen-Dale: Insight into the heterogeneity of breast cancer through next-generation sequencing. *J Clin Invest*, tom 121, pp. 3810-8, 2011.
22. R. Yerushalmi, M. M. Hayes i K. A. Gelmon: Breast carcinoma - rare types: review of the literature. *Ann Oncol*, tom 20, pp. 1763-70, 2009.
23. M. A. Lavasani i F. Moynfar: Molecular classification of breast carcinomas with particular emphasis on „basal-like” carcinoma: a critical review. *J Biophotonics*, tom 5, pp. 345-66, 2012.
24. S. J. Schnitt: Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. *Mod Pathol*, tom 23, pp. 60-4, 2010.
25. H. K. Vollen i C. Caldas: The breast cancer genome--a key for better oncology. *BMC Cancer*, tom 11, 2011.
26. C. M. Perou, T. Sorlie, M. B. Eisen i wsp.: Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, tom 406, pp. 747-52, 2000.
27. T. Sørlie, C. M. Perou, R. Tibshirani i wsp.: Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*, tom 98, pp. 10869-74, 2001.
28. The Cancer Genome Atlas Network: Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, tom 490, pp. 61-70, 2012.
29. L. Melchor i J. Benítez: An integrative hypothesis about the origin and development of sporadic and familial breast cancer subtypes. *Carcinogenesis*, tom 29, pp. 1475-82, 2008.
30. K. K. Shiu, R. Natrajan, F. C. Geyer i wsp.: DNA amplifications in breast cancer: genotypic-phenotypic correlations. *Future Oncol*, tom 6, pp. 967-84, 2010.
31. R. Millikan, B. Newman, C. K. Tse i wsp.: Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, tom 109, pp. 123-9, 2008.
32. L. A. Carey, C. M. Perou, C. A. Livasy i wsp.: Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*, tom 295, pp. 2492-502, 2006.

33. R. Rouzier, C. M. Perou, W. F. Symmans i wsp.: Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res.*, tom 11, pp. 5678-85, 2005.
34. L. A. Carey, E. C. Dees, L. Sawyer i wsp.: The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res.*, tom 13, pp. 2329-34, 2007.
35. J. Hugh, J. Hanson, M. C. Cheang i wsp.: Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial. *J Clin Oncol.*, tom 27, pp. 1168-76, 2009.
36. A. Prat, J. S. Parker, O. Karginova i wsp.: Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.*, tom 12, 2010.
37. Z. Hu, C. Fan, D. S. Oh i wsp.: The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics*, tom 7, 2006.
38. M. C. Cheang, D. Voduc, C. Bajdik i wsp.: Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res.*, tom 14, pp. 1368-76, 2008.
39. H. Kennecke, R. Yerushalmi, R. Woods i wsp.: Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol.*, tom 28, 2010.
40. N. Normanno, A. De Luca, P. Carotenuto i wsp.: Prognostic applications of gene expression signatures in breast cancer. *Oncology*, tom 77, pp. 2-8, 2009.
41. D. X. Nguyen, P. D. Bos i J. Massagué: Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer*, tom 9, pp. 274-84, 2009.
42. K. Chin, S. DeVries, J. Fridlyand i wsp.: Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiologies. *Cancer Cell*, tom 10, pp. 529-41, 2006.
43. A. Bergamaschi, Y. H. Kim, P. Wang i wsp.: Distinct patterns of DNA copy number alteration are associated with different clinicopathological features and gene-expression subtypes of breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, tom 45, pp. 1033-40, 2006.
44. J. I. Herschkowitz, W. Zhao, M. Zhang i wsp.: Comparative oncogenomics identifies breast tumors enriched in functional tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, tom 109, pp. 2778-83, 2012.
45. J. I. Herschkowitz, K. Simin, V. J. Weigman i wsp.: Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol.*, tom 8, 2007.
46. A. B. Popławski, M. Jankowski, S. W. Erickson i wsp.: Frequent genetic differences between matched primary and metastatic breast cancer provide an approach to identification of biomarkers for disease progression. *Eur J Hum Genet*, tom 18, pp. 560-8, 2010.
47. C. A. Klein: Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer*, tom 9, pp. 302-12, 2009.
48. K. Cole, M. Tabernero i K. S. Anderson: Biologic characteristics of premalignant breast disease. *Cancer Biomark.*, nr 9, pp. 177-92, 2010.
49. D. T. Miyamoto i J. R. Harris: Molecular predictors of local tumor control in early-stage breast cancer. *Semin Radiat Oncol*, tom 21, pp. 35-42, 2011.
50. C. Sotiriou i L. Pusztai: Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med*, tom 360, p. 790-800, 2009.
51. A. G. J. Knudson: Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, tom 68, pp. 820-3, 1971.
52. A. H. Berger, A. G. Knudson i P. P. Pandolfi: A continuum model for tumour suppression. *Nature*, tom 476, pp. 163-9, 2011.
53. S. Staff, J. Isola i M. Tanner: Haplo-insufficiency of BRCA1 in sporadic breast cancer. *Cancer Res*, tom 63, pp. 4978-83, 2003.
54. M. Wei, T. Grushko, J. Dignam i wsp.: BRCA1 promoter methylation in sporadic breast cancer is associated with reduced BRCA1 copy number and chromosome 17 aneuploidy. *Cancer Res*, tom 65, pp. 10692-9, 2005.
55. S. Kraljevic Pavelic, M. Sedic, H. Bosnjak i wsp.: Metastasis: new perspectives on an old problem. *Mol Cancer*, tom 10, 2011.
56. S. Y. Park, H. E. Lee, H. Li i wsp.: Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer. *Clin Cancer Res*, tom 16, pp. 876-87, 2010.
57. S. Y. Park, M. Gönen, H. J. Kim i wsp.: Cellular and genetic diversity in the progression of in situ human breast carcinomas to an invasive phenotype. *J Clin Invest*, tom 120, pp. 636-44, 2010.
58. C. Oakman, L. Santarpia i A. Di Leo: Breast cancer assessment tools and optimizing adjuvant therapy. *Nat Rev Clin Oncol*, tom 7, pp. 725-32, 2010.
59. M. Gerlinger i C. Swanton: How Darwinian models inform therapeutic failure initiated by clonal heterogeneity in cancer medicine. *Br J Cancer*, tom 103, pp. 1139-43, 2010.
60. A. F. Chambers, A. C. Groom i I. C. MacDonald: Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Rev. Cancer*, tom 2, p. 563-72, 2002.
61. C. A. Klein: The systemic progression of human cancer: a focus on the individual disseminated cancer cell—the unit of selection. *Adv. Cancer Res*, tom 89, p. 35-67, 2003.
62. T. Ueno, M. Emi, H. Sato i wsp.: Genome-wide copy number analysis in primary breast cancer. *Expert Opin Ther Targets*, tom 16, pp. 31-5, 2012.
63. C. N. Qian, B. Berghuis, G. Tsarfaty i wsp.: Preparing the „soil”: the primary tumor induces vasculature reorganization in the sentinel lymph node before the arrival of metastatic cancer cells. *Cancer Res*, tom 66, pp. 10365-76, 2006.
64. G. Klein: Foulds' dangerous idea revisited: the multistep development of tumors 40 years later. *Adv Cancer Res*, tom 72, pp. 1-23, 1998.

65. O. Schmidt-Kittler, T. Ragg, A. Daskalakis i wsp.: From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, tom 24, pp. 7737-42, 2003.
66. M. Vecchi, S. Confalonieri, P. Nuciforo i wsp.: Breast cancer metastases are molecularly distinct from their primary tumors. *Oncogene*, tom 27, pp. 2148-58, 2008.
67. N. H. Stoecklein i C. A. Klein: Genetic disparity between primary tumours, disseminated tumour cells, and manifest metastasis. *Int J Cancer*, tom 126, pp. 589-98, 2010.
68. J. Engel, R. Eckel, J. Kerr i wsp.: The process of metastatisation for breast cancer. *Eur J Cancer*, tom 39, pp. 1794-806, 2003.
69. R. A. Weinberg: The many faces of tumor dormancy. *APMIS*, tom 116, p. 548-51, 2008.
70. D. M. Marzese, D. S. Hoon, K. K. Chong i wsp.: DNA methylation index and methylation profile of invasive ductal breast tumors. *J Mol Diagn*, tom 14, pp. 613-22, 2012.
71. J. W. Gray: Evidence emerges for early metastasis and parallel evolution of primary and metastatic tumors. *Cancer Cell*, tom 4, pp. 4-6, 2003.
72. R. Gangnus, S. Langer, E. Breit i wsp.: Genomic profiling of viable and proliferative micrometastatic cells from early-stage breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, tom 10, pp. 3457-64, 2004.
73. Y. Feng, B. Sun, X. Li i wsp.: Differentially expressed genes between primary cancer and paired lymph node metastases predict clinical outcome of node-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, tom 103, pp. 319-29, 2007.
74. L. Torres, F. R. Ribeiro, N. Pandis i wsp.: Intratumor genomic heterogeneity in breast cancer with clonal divergence between primary carcinomas and lymph node metastases. *Breast Cancer Res Treat*, tom 102, pp. 143-55, 2007.
75. V. P. Collins, R. K. Loeffler i H. Tivey: Observations on growth rates of human tumors. *Am. J. Roentgenol. Radium Ther. Nucl. Med.*, tom 76, p. 988-1000, 1956.
76. T. Kuukasjarvi, R. Karhu, M. Tanner i wsp.: Genetic heterogeneity and clonal evolution underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer. *Cancer Res*, tom 57, pp. 1597-604, 1997.
77. H. Bissig, J. Richter, R. Desper i wsp.: Evaluation of the clonal relationship between primary and metastatic renal cell carcinoma by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol*, tom 155, pp. 267-74, 1999.
78. Y. Husemann, J. B. Geigl, F. Schubert i wsp.: Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell*, tom 13, pp. 58-68, 2008.
79. R. R. Langley i I. J. Fidler: The seed and soil hypothesis revisited - the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *Int J Cancer*, tom 128, p. 2527-35, 2011.
80. S. Braun, F. D. Vogl, B. Naume i wsp.: A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med*, tom 353, p. 793-802, 2005.
81. K. R. Hess, G. R. Varadhachary, S. H. Taylor i wsp.: Metastatic patterns in adenocarcinoma. *Cancer*, tom 106, pp. 1624-33, 2006.
82. J. A. Schardt, M. Meyer, C. H. Hartmann i wsp.: Genomic analysis of single cytokeratin-positive cells from bone marrow reveals early mutational events in breast cancer. *Cancer Cell*, tom 8, pp. 227-39, 2005.
83. T. E. Becker, R. E. Ellsworth, B. Deyarmin i wsp.: The genomic heritage of lymph node metastases: implications for clinical management of patients with breast cancer. *Ann Surg Oncol*, tom 15, pp. 1056-63, 2008.
84. L. Ding, M. J. Ellis, S. Li i wsp.: Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft. *Nature*, tom 464, pp. 999-1005, 2010.
85. S. C. Santos, I. J. Cavalli, E. M. Ribeiro i wsp.: Patterns of DNA copy number changes in sentinel lymph node breast cancer metastases. *Cytogenet Genome Res*, tom 122, pp. 16-21, 2008.
86. J. A. Malek, E. Mery, Y. A. Mahmoud i wsp.: Copy number variation analysis of matched ovarian primary tumors and peritoneal metastasis. *PLoS One*, tom 6, 2011.
87. J. A. Malek, A. Martinez, E. Mery i wsp.: Gene expression analysis of matched ovarian primary tumors and peritoneal metastasis. *J Transl Med*, tom 10, 2012.
88. A. Kalikaki, A. Koutsopoulos, M. Trypaki i wsp.: Comparison of EGFR and K-RAS gene status between primary tumours and corresponding metastases in NSCLC. *Br J Cancer*, tom 99, pp. 923-9, 2008.
89. J. C. Weber, N. Meyer, E. Pencreach i wsp.: Allelotyping analyses of synchronous primary and metastasis CIN colon cancers identified different subtypes. *Int J Cancer*, tom 120, pp. 524-32, 2007.
90. S. Bahrami, L. Cheng, M. Wang i wsp.: Clonal relationships between epidermotropic metastatic melanomas and their primary lesions: a loss of heterozygosity and X-chromosome inactivation-based analysis. *Mod Pathol*, tom 20, pp. 821-7, 2007.
91. T. D. Jones, M. D. Carr, J. N. Eble i wsp.: Clonal origin of lymph node metastases in bladder carcinoma. *Cancer*, tom 104, pp. 1901-10, 2005.
92. T. M. Katona, T. D. Jones, M. Wang i wsp.: Genetically heterogeneous and clonally unrelated metastases may arise in patients with cutaneous melanoma. *Am J Surg Pathol*, tom 31, pp. 1029-37, 2007.
93. D. X. Nguyen i J. Massagué, „Genetic determinants of cancer metastasis,” *Nat Rev Genet*, tom 8, pp. 341-52, 2007.
94. A. J. Minn, G. P. Gupta, P. M. Siegel i wsp.: Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*, tom 436, pp. 518-24, 2005.
95. G. P. Gupta, D. X. Nguyen, A. C. Chiang i wsp.: Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis. *Nature*, pp. 765-70, 2007.
96. T. D. de Stahl, J. Sandgren, A. Piotrowski i wsp.: Profiling of copy number variations (CNVs) in healthy individuals from three ethnic groups using a human genome 32

- K BAC-clone-based array. *Hum Mutat*, tom 29, pp. 398-408, 2008.
97. J. O. Korbel, A. E. Urban, J. P. Affourtit i wsp.: Paired-End Mapping Reveals Extensive Structural Variation in the Human Genome. *Science*, tom 318, pp. 420-6, 2007.
 98. K. K. Wong, R. J. deLeeuw, N. S. Dosanjh i wsp.: A comprehensive analysis of common copy-number variations in the human genome. *Am J Hum Genet*, tom 80, pp. 91-104, 2007.
 99. R. Redon, S. Ishikawa, K. R. Fitch i wsp.: Global variation in copy number in the human genome *Nature*, tom 444, pp. 444-54, 2006.
 100. A. J. Iafrate, L. Feuk, M. N. Rivera i wsp.: Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet*, tom 36, pp. 949-51, 2004.
 101. J. Sebat, B. Lakshmi, J. Troge i wsp.: Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science*, tom 305, pp. 525-8, 2004.
 102. M. Fanciulli, E. Petretto i T. J. Aitman: Gene copy number variation and common human disease. *Clin Genet*, tom 77, pp. 201-13, 2010.
 103. C. E. Bruder, A. Piotrowski, A. A. Gijsbers i wsp.: Phenotypically concordant and discordant monozygotic twins display different DNA copy-number-variation profiles *Am J Hum Genet*, tom 82, pp. 763-71, 2008.
 104. A. Piotrowski, C. E. Bruder, R. Andersson i wsp.: Somatic mosaicism for copy number variation in differentiated human tissues. *Hum Mutat*, tom 29, pp. 1118-24, 2008.
 105. J. P. Dumanski i A. Piotrowski: Structural genetic variation in the context of somatic mosaicism. *Methods Mol Biol*, tom 838, pp. 249-72, 2012. **Praca powstała m.in. w wyniku realizacji badań finansowanych z grantu Fundacji Naukowej Polpharmy**
 106. P. J. Hastings, G. Ira i J. R. Lupski: A Microhomology-Mediated Break-Induced Replication Model for the Origin of Human Copy Number Variation. *PLoS Genet*, tom 5, 2009.
 107. W. Gu, F. Zhang i J. R. Lupski: Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics*, tom 1, 2008.
 108. J. Fridlyand, A. M. Snijders, B. Ylstra i wsp.: Breast tumor copy number aberration phenotypes and genomic instability. *BMC Cancer*, tom 6, 2006.
 109. P. J. Stephens, C. D. Greenman, B. Fu i wsp.: Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell*, tom 144, pp. 27-40, 2011.
 110. C. Curtis, S. P. Shah, S. F. Chin i wsp.: The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*, tom 486, pp. 346-52, 2012.
 111. A. E. Teschendorff i C. Caldas: The Breast cancer somatic 'muta-ome': tackling the complexity. *Breast Cancer Res*, tom 11, p. 301, 2009.
 112. S. Banerji, K. Cibulskis, C. Rangel-Escareno i wsp.: Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. *Nature*, tom 486, pp. 405-9, 2012.
 113. F. Reyat, N. Stransky, I. Bernard-Pierrot i wsp.: Visualizing chromosomes as transcriptome correlation maps: evidence of chromosomal domains containing co-expressed genes--a study of 130 invasive ductal breast carcinomas. *Cancer Res*, tom 65, pp. 1376-83, 2005.
 114. X. Mao, R. A. Hamoudi, P. Zhao i M. Baudis: Genetic losses in breast cancer: toward an integrated molecular cytogenetic map. *Cancer Genet Cytogenet*, tom 160, pp. 141-51, 2005.
 115. R. J. Leary, J. C. Lin, J. Cummins i wsp.: Integrated analysis of homozygous deletions, focal amplifications, and sequence alterations in breast and colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, tom 105, pp. 16224-9, 2008.
 116. T. Ueno, M. Emi, H. Sato i wsp.: Genome-wide copy number analysis in primary breast cancer. *Expert Opin Ther Targets*, tom 16, pp. 31-5, 2012.
 117. J. Staaf, G. Jönsson, M. Ringnér i wsp.: Landscape of somatic allelic imbalances and copy number alterations in HER2-amplified breast cancer. *Breast Cancer Res*, tom 13, 2011.
 118. P. M. Haverty, J. Fridlyand, L. Li i wsp.: High-resolution genomic and expression analyses of copy number alterations in breast tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, tom 47, pp. 530-42, 2008.
 119. M. Guedj, L. Marisa, A. de Reynies i wsp.: A refined molecular taxonomy of breast cancer. *Oncogene*, tom 31, pp. 1196-206, 2012.
 120. S. F. Chin, A. E. Teschendorff, J. C. Marioni i wsp.: High-resolution aCGH and expression profiling identifies a novel genomic subtype of ER negative breast cancer. *Genome Biol*, tom 8, 2007.
 121. R. Natrajan, B. Weigelt, A. Mackay i wsp.: An integrative genomic and transcriptomic analysis reveals molecular pathways and networks regulated by copy number aberrations in basal-like, HER2 and luminal cancers. *Breast Cancer Res Treat*, tom 121, pp. 575-89, 2010.
 122. F. Andre, B. Job, P. Dessen i wsp.: Molecular characterization of breast cancer with high-resolution oligonucleotide comparative genomic hybridization array. *Clin Cancer Res*, tom 15, pp. 441-51, 2009.
 123. D. Bovee, Y. Zhou, E. Haugen i wsp.: Closing gaps in the human genome with fosmid resources generated from multiple individuals. *Nat Genet*, tom 40, pp. 96-101, 2008.
 124. E. E. Eichler, R. A. Clark i X. She: An assessment of the sequence gaps: unfinished business in a finished human genome. *Nat Rev Genet*, tom 5, pp. 345-54, 2004.
 125. G. P. Pfeifer i P. Hainaut: Next-generation sequencing: emerging lessons on the origins of human cancer. *Curr Opin Oncol*, tom 23, pp. 62-8, 2011.
 126. J. R. Pollack, T. Sørli, C. M. Perou i wsp.: Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, tom 99, pp. 12963-8, 2002.
 127. A. Forsti i K. Hemminki: Breast cancer genomics based on biobanks. *Methods Mol Bio*, tom 675, pp. 375-85, 2011.

128. M. A. Liebert: Best Practices For Repositories. *Biopreservation And Biobanking*, tom 10, 2012.
129. G. Marko-Varga: BioBanking - The Holy Grail of novel drug and diagnostic developments? *J Clin Bioinforma*, tom 1, 2011.
130. A. Park: 10 Ideas Changing the World Right Now. Bio-banks. *The Times*, tom 173, 2009.
131. W. Hancock, G. Omenn, P. LeGrain i Y. K. Paik: Proteomics, Human Proteome Project, and Chromosomes. *J Proteome Res*, tom 10, 2011.
132. S. P. Shah, A. Roth, R. Goya i wsp.: The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature*, tom 486, pp. 395-9, 2012.
133. P. J. Stephens, P. S. Tarpey, H. Davies i wsp.: The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature*, tom 486, pp. 400-4, 2012.
134. N. Navin, J. Kendall, J. Troge i wsp.: Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature*, tom 472, pp. 90-4, 2011.
135. G. Jönsson, J. Staaf, J. Vallon-Christersson i wsp.: Genomic subtypes of breast cancer identified by array-comparative genomic hybridization display distinct molecular and clinical characteristics. *Breast Cancer Res*, tom 12, 2010.
136. S. Nik-Zainal, L. B. Alexandrov, D. C. Wedge i wsp.: Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers. *Cell*, tom 149, pp. 979-93, 2012.
137. S. Kamalakaran, V. Varadan, H. E. Giercksky Russnes i wsp.: DNA methylation patterns in luminal breast cancers differ from non-luminal subtypes and can identify relapse risk independent of other clinical variables. *Mol Oncol*, tom 5, pp. 77-92, 2011.
138. S. A. Joosse, E. H. van Beers, I. H. Tielen i wsp.: Prediction of BRCA1-association in hereditary non-BRCA1/2 breast carcinomas with array-CGH. *Breast Cancer Res Treat*, tom 116, pp. 479-89, 2009.
139. A. Sadanandam, A. Lal, S. C. Benz i wsp.: Genomic aberrations in normal tissue adjacent to HER2-amplified breast cancers: field cancerization or contaminating tumor cells? *Breast Cancer Res Treat*, tom 136, pp. 693-703, 2012.
140. W. Han, E. M. Jung, J. Cho i wsp.: DNA copy number alterations and expression of relevant genes in triple-negative breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, tom 47, pp. 490-9, 2008.
141. International Human Genome Sequencing Consortium: Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, tom 431, pp. 931-45, 2004.
142. D. M. Euhus, L. Cler, N. Shivapurkar i wsp.: Loss of heterozygosity in benign breast epithelium in relation to breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst*, tom 94, pp. 858-60, 2002.
143. A. Ronowicz, M. Brzeskwiniewicz, P. Madanecki i wsp.: Regeneration of comparative genomic hybridization oligonucleotide microarrays with dimethylurea. *Anal Biochem*, tom 426, pp. 91-3, 2012. **Praca powstała m.in. w wyniku realizacji badań finansowanych z grantu Fundacji Naukowej Polpharmy**
144. E. A. Perez: Breast cancer management: opportunities and barriers to an individualized approach. *Oncologist*, tom 16, p. 20-2, 2011.

Hamowanie aktywności biologicznej interleukiny 15 – nowe perspektywy

Inhibition of the biological activity of interleukin-15 - new perspectives

Barbara
Żyżyńska-Granica¹,
Oliwia Zegrocka-Stendel¹,
Małgorzata Dutkiewicz¹,
Szymon Niewiecherza²,
Bartosz Trzaskowski²,
Sławomir Filipek²,
Piotr Krzeczynski³,
Magdalena Winiarska⁴,
Katarzyna Koziak¹

¹ Zakład Immunologii, Biochemii i Żywienia, Wydział Nauki o Zdrowiu, Warszawski Uniwersytet Medyczny

² Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski

³ Zakład Chemii, Instytut Farmaceutyczny, Warszawa

⁴ Zakład Immunologii, Centrum Biostruktury, I Wydział Lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Naukowa Fundacja Polpharmy w 2010 roku przyznała zespołowi pracującemu pod kierunkiem dr hab. Katarzyny Koziak grant na realizację projektu badawczego pt. *Identyfikacja związku chemicznego hamującego biologiczne efekty interleukiny 15 (IL-15) poprzez selektywne blokowanie receptora IL-15Rα*

STRESZCZENIE

Interleukina 15 (IL-15) jest cytokiną o pleiotropowym działaniu oddziałującą zarówno na komórki układu immunologicznego, jak i szeregu innych typów komórek. IL-15 wiąże się z receptorem zbudowanym z trzech podjednostek: specyficznej dla IL-15 podjednostki α (IL-15R α); podjednostki β , którą współdzieli z IL-2 (IL-2/IL-15R β) oraz podjednostki γ_c , biorącej udział w wiązaniu większej grupy cytokin. Zaburzenie mechanizmów regulujących ekspresję IL-15 prowadzące do jej nadprodukcji bezpośrednio przyczynia się do rozwoju procesów zapalnych, autoimmunologicznych, zakaźnych i nowotworowych.

W artykule omówiono dotychczas stosowane metody hamowania aktywności biologicznej IL-15. Przedstawiono również wyniki badań, które pozwoliły zidentyfikować 13 związków skutecznie hamujących odpowiedź komórkową indukowaną IL-15. Badane substancje wyselekcjonowano na podstawie biomodelowania komputerowego. W oparciu o trójwymiarową strukturę modelu kompleksu IL-15-IL-15R α wyznaczono farmakofory miejsc wiążących w receptorze oraz ligandzie, po czym przeszukano bazę skupiającą znane i dostępne handlowo związki chemiczne pod kątem najsilniejszego oddziaływania z wyznaczonymi fragmentami receptora lub liganda. Ocena aktywności biologicznej wybranych związków została zweryfikowana *in vitro* w oparciu o odpowiedź jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC). Zbadany został wpływ wyselekcjonowanych substancji na indukowaną przez IL-15 syntezę dwóch cytokin prozapalnych, TNF- α i IL-17 oraz na proliferację komórek wywołaną IL-15. Związki te mogą stanowić podstawę do stworzenia skutecznego i niedrogiego leku hamującego choroby zapalne i autoimmunologiczne, takie jak RZS.

Słowa kluczowe: interleukina 15 • IL-15R α • reumatoidalne zapalenie stawów • inhibitor

Wpłynęło: 2013-10-15

Zaakceptowano: 2013-10-29

Opublikowano: 2013-12-31

Autor do korespondencji:

Dr hab. Katarzyna Koziak,
Zakład Immunologii, Biochemii
i Żywienia Warszawski Uniwersytet
Medyczny, ul. Banacha 1a,
02-097 Warszawa,
katarzyna.koziak@wum.edu.pl

SUMMARY

Interleukin 15 (IL-15) is a pleiotropic cytokine with a wide spectrum of activity, including its influence on immune cells as well as many other cell types. IL-15 binds to the receptor composed of three subunits: IL-15-specific α subunit (IL-15R α), β subunit, which is shared with IL-2 (IL-2/IL-15R β) and γ_c subunit which participates in binding a few more cytokines. Impaired IL-15 expression leading to its overproduction directly contributes to the development of inflammatory and autoimmune processes, infectious diseases and cancer.

The article discusses the major advances in the research on the inhibition of IL-15 biological activity. It also presents the results of the study which led to the identification of 13 compounds effectively inhibiting the cellular responses induced by IL-15. The analyzed substances were selected on the basis of computer biomodelling analysis. Basing on the three-dimensional structure model of the complex IL-15·IL-15R α , pharmacophores were determined in the receptor and ligand binding sites. Then, a free database of commercially-available compounds for virtual screening was searched for the substances which strongly bind to designated ligand or receptor fragments. Evaluation of the biological activity of selected compounds was verified *in vitro* basing on the response of peripheral blood mononuclear cells (PBMC). The effect of the selected substances on the IL-15-induced synthesis of two proinflammatory cytokines, TNF- α and IL-17, and IL-15-induced cell proliferation was examined. The selected compounds may be used for further studies on an effective and inexpensive drug inhibiting inflammatory and autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis.

Key words: interleukin 15 • IL-15R α • rheumatoid arthritis • inhibitor

WSTĘP

Interleukina 15 (IL-15) jest cytokiną o pleiotropowym działaniu oddziałującą zarówno na komórki układu immunologicznego, jak i szereg innych typów komórek. Ze względu na silny wpływ na komórki układu odpornościowego, m.in. na proliferację i różnicowanie limfocytów T, białko to początkowo zostało scharakteryzowane jako cytokina naśladująca funkcjami interleukinę 2 (IL-2) [1]. Szybko jednak okazało się, że właściwości obu cytokin istotnie się różnią. W odróżnieniu od IL-2, która jest produkowana praktycznie wyłącznie przez limfocyty T, IL-15 charakteryzuje szeroki zakres występowania. Transkrypt IL-15 powstaje w wielu tkankach, między innymi w mięśniach szkieletowych, łożysku, nerkach, płucach, sercu i wątrobie. Mimo, że mRNA kodujące IL-15 występuje powszechnie, do translacji i wydzielania białka najczęściej dochodzi dopiero po ich aktywacji zachodzącej m.in. pod wpływem cytokin prozapalnych [2-4]. Głównym źródłem IL-15 są monocyty i fibroblasty [1,2].

IL-15 wykazuje szeroką aktywność w obrębie swoistej i nieswoistej odpowiedzi immunologicznej. Podobnie jak IL-2, IL-15 stymuluje proliferację aktywowanych limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ oraz komórek NK, indukuje aktywację limfocytów T cytotoksycznych, bierze udział w dojrzewaniu makrofagów i komórek dendrytycznych podczas infekcji bakteryjnych [5]. W przeciwieństwie do IL-2, IL-15 pełni również wiele istotnych funkcji poza układem immunologicznym. Między innymi wpływa na różnicowanie mioblastów i hamuje apoptozę miocytów. Jest czynnikiem różnicowania osteoklastów, co może mieć znaczenie w procesie erozji kości w reumatoidalnym zapaleniu stawów [6], jest czynnikiem wzrostowym komórek nabłonka jelitowego [7] i wykazuje działanie angiogenne oraz antyapoptotyczne na komórki śródbłonka [8,9].

IL-15 oddziałuje z receptorem zbudowanym z trzech podjednostek: specyficznej dla IL-15 podjednostki α (IL-15R α); podjednostki β , którą współdzieli z IL-2 (IL-2/IL-15R β) oraz podjednostki γ_c ,

biorącej udział w wiązaniu większej grupy cytokin, m.in. IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 i IL-21 [2]. Sygnał biologiczny najczęściej jest przekazywany przez podjednostki β i γ . Wprawdzie istnieją doniesienia opisujące przekazywanie sygnału przez IL-15R α , wydaje się jednak, że główną funkcją tej podjednostki receptora jest silne i specyficzne wiązanie IL-15.

Szerokie spektrum aktywności IL-15 powoduje, że bardzo często umieszcza się ją na szczycie kaskady cytokin prozapalnych. Zaburzenie mechanizmów regulujących ekspresję IL-15 prowadzące do jej nadprodukcji bezpośrednio przyczynia się do rozwoju procesów zapalnych, autoimmunologicznych, zakaźnych i nowotworowych. Zwiększony poziom IL-15 w surowicy krwi obserwuje się w takich chorobach, jak łuszczyca [10,11], sarkoidoza [12], toczeń rumieniowaty układowy, nieswoiste zapalenie jelit, astma oskrzelowa, stwardnienie rozsiane [2,13], czy reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) [14,15]. Zauważono również związek pomiędzy podwyższonym stężeniem IL-15 a częstością odrzucania przeszczepów [16].

Eksperymentalne leczenie chorób związanych z nadmierną ekspresją IL-15 uzyskuje się między innymi stosując jej inhibitory. Większość z nich to związki wielkocząsteczkowe, aczkolwiek istnieją również prostsze substancje organiczne hamujące aktywność IL-15 [17,18]. Prace zmierzające do opracowania skutecznych metod blokowania aktywności biologicznej IL-15 do niedawna były prowadzone przy wykorzystaniu cząstkowych informacji na temat jej budowy, uzyskanych przede wszystkim w wyniku mutagenyzy. Nowe perspektywy w poszukiwaniu inhibitora IL-15 pojawiły się w 2007 roku, kiedy wyznaczono strukturę krystaliczną kompleksu IL-15-IL-15R [19,20] oraz dwa lata później, gdy określono najistotniejsze termodynamicznie fragmenty biorące udział w wiązaniu IL-15 do podjednostki α jej receptora [21].

ZNANE METODY INHIBICJI IL-15

W większości badań prowadzonych na eksperymentalnych modelach chorób związanych z nadmierną ekspresją IL-15 hamowanie aktywności biologicznej IL-15 osiągane jest poprzez stosowanie związków oddziałujących bezpośrednio z tą cytokiną bądź jej receptorem (IL-15R). Do blokowania IL-15 wykorzystuje się przeciwciała monoklonalne rozpoznające IL-15 lub rozpuszczalne formy rekombinowanej podjednostki IL-15R α . Z kolei do blokowania receptora stosuje się przeciwciała skierowane przeciwko podjednostkom IL-15R lub zmodyfikowane formy

IL-15. Dotychczas opisane metody inhibicji IL-15 wykorzystujące oddziaływanie z nią bądź jej receptorem zestawiono w Tabeli 1.

Związki wiążące się z IL-15

Pośród przeciwciał skierowanych przeciwko IL-15 i hamujących jej aktywność biologiczną wyróżnić można przeciwciała blokujące wiązanie IL-15 z podjednostką IL-15R α oraz przeciwciała uniemożliwiające wiązanie cytokiny z pozostałymi podjednostkami IL-15R. Do przeciwciał blokujących IL-15R α należą B-E29 [22] oraz DISC0280 [23]. Przeciwciało DISC0280 hamuje ponadto wiązanie IL-15 z heterodimerem IL-2/IL-15R β - γ_c . Jednak, mimo wysokiej skuteczności *in vitro*, w warunkach *in vivo* przeciwciało to wykazuje właściwości hiperagonistyczne, wynikające prawdopodobnie z wydłużenia okresu półtrwania IL-15 po związaniu z przeciwciałem, bądź z ułatwiania *trans*-prezentacji IL-15 komórkom NK [23].

Kolejne obiecujące przeciwciało, MAB247, hamuje przekazywanie sygnału przez IL-15 uniemożliwiając jej wiązanie z podjednostką γ_c [22]. Podobne właściwości wykazuje przeciwciało HuMax-IL-15 (146B6, AMG714), które wiąże się z IL-15 w miejscu wiązania z podjednostką γ_c receptora [10]. Wysoką aktywność biologiczną tego przeciwciała potwierdzono w badaniach *in vitro* i *in vivo*, przeprowadzono także dobrze rokujące próby kliniczne na chorych z RZS [24]. Poważne obawy badaczy budzi jednak zjawisko tzw. odwrotnej sygnalizacji (ang. *reverse signalling*) [25]. Istnieje uzasadnione podejrzenie, że przeciwciało HuMax-IL-15 może wiązać się do IL-15 związanej z błoną komórkową indukując jednocześnie odpowiedź komórkową i właśnie to zjawisko jest przyczyną ograniczonej skuteczności terapeutycznej przeciwciał neutralizujących IL-15 [2].

Kolejnym sposobem inhibicji aktywności IL-15 jest zastosowanie rozpuszczalnych form podjednostki IL-15R α (sIL-15R α) lub jej fragmentów [26]. Wykazano, że wprawdzie minimalny fragment tego receptora niezbędny do wiązania IL-15 stanowi 65-aminokwasowa domena *sushi* [27], to w celu uzyskania właściwości antagonistycznych względem trimery IL-15R α β γ niezbędna jest obecność dodatkowego 13-aminokwasowego fragmentu przylegającego do C-końca tej domeny [28]. Rozpuszczalne analogi podjednostki IL-15R α nie mogą być jednak uniwersalnie stosowane jako inhibitory IL-15, wykazano bowiem, że pewne fragmenty sIL-15R α mogą działać agonistycznie wobec heterodimeru β γ [28-30] prawdopodobnie wydłuża-

Tabela 1. Metody inhibicji IL-15 (na podstawie [22])

Cel	Rodzaj	Nazwa	Krótki opis	Literatura
IL-15	Przeciwciała monoklonalne przeciwko IL-15	B-E29	Wiązanie z IL-15, hamowanie wiązania z IL-15R α	[23]
		DISC0280	Wiązanie z IL-15, hamowanie wiązania z IL-15R α oraz z heterodimerem IL-2/IL-15R β γ_c <i>in vitro</i> , natomiast efekt hiperagonistyczny <i>in vivo</i>	[24]
		MAB247	Wiązanie z IL-15, hamowanie wiązania z IL-2/IL-15R β i/lub γ_c	[23]
		HuMax-IL15 (146B7, AMG714)	Wiązanie z IL-15, hamowanie wiązania z γ_c , I/II faza badań klinicznych	[10, 25]
	Fragmenty IL15R α	sIL-15R α	Pozakomórkowy fragment IL-15R α (193 aa, 26 kDa)	[26, 27]
		T1	Pozakomórkowy fragment IL-15R α (182 aa)	[28]
		T2	Domena sushi + linker IL-15R α (85 aa)	[28]
		T3	Domena sushi IL-15R α (65 aa)	[28]
IL-15R	Przeciwciała monoklonalne przeciwko IL-15R	HuMik β 1	Humanizowane przeciwciało przeciwko IL-2R β	[29, 30]
		BF-IgG	Dwufunkcyjne przeciwciało przeciw podjednostkom α i β receptora dla IL-2, o aktywności również wobec IL-15R	[30]
		M161	Humanizowane przeciwciało przeciwko IL-15R α	[23]
	Mutanty IL-15	E64K	Wiązanie z IL-15R α , hamowanie dalszego wiązania z IL-2/IL-15R β i γ_c	[23]
		I68D	Wiązanie z IL-15R α , hamowanie dalszego wiązania z IL-2/IL-15R β i γ_c	[23]
		N65K	Wiązanie z IL-15R α , hamowanie aktywności biologicznej kompleksu IL-15 IL-15R α	[23]
		CRB-15	Białko fuzyjne mutant IL-15/Fc γ 2a	[31, 32]
	Immunotoksyny	IL-15-PEA293 (IT1)	Białko fuzyjne złożone z IL-15 i endotoksyny <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	[33]
Komórki z IL-15R		IL15M-PEA293 (IT2)	Białko fuzyjne złożone z antagonisty IL-15 i endotoksyny <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	[34]

jąc okres półtrwania IL-15 oraz umożliwiając jej *trans*-prezentację komórkom zawierającym heterodimer $\beta\gamma$.

Związki wiążące się z IL-15R

Działanie IL-15R można selektywnie zahamować poprzez zablokowanie specyficznej dla IL-15 podjednostki IL-15R α . Blokada pozostałych dwóch łańcuchów, IL-2/IL-15R β i γ_c , również zmniejsza aktywność IL-15, jednak, ponieważ mogą one być aktywowane przez inne cytokiny, zablokowanie ich hamuje także szlaki sygnałowe niespecyficzne dla IL-15. Do tego typu inhibitorów należy humanizowane przeciwciało HuMik β 1 skierowane przeciwko wspólnej dla IL-2 i IL-15 receptorowej podjednostce β . Oprócz hamowania aktywności IL-2 wykazuje ono także właściwości antagonistyczne wobec IL-15 [31,

32]. Podobne właściwości wykazuje dwufunkcyjne, humanizowane przeciwciało skierowane przeciwko IL-2R $\alpha\beta$, BF-IgG, które hamuje odpowiedź proliferacyjną limfocytów T indukowaną przez IL-15 [32]. Bardziej specyficzne właściwości względem IL-15 wykazuje natomiast przeciwciało M161 skierowane przeciwko IL-15R α . Praktycznie całkowicie hamuje ono wiązanie IL-15 do receptora [22].

Innym sposobem inhibicji IL-15R jest zastosowanie polipeptydów o budowie zbliżonej do IL-15. Zidentyfikowano kilka mutacji IL-15 wpływających na jej oddziaływanie z receptorem oraz na przekazywanie sygnału. Są one oznaczone symbolami E64K, N65K, I68D oznaczającymi miejsce mutacji oraz informującymi o rodzaju zamiany aminokwasu z zastosowaniem skrótów jednoliterowych [22]. Takie mutanty IL-15 wiążą się z IL-15R α z wysokim powinowac-

twem, blokując w ten sposób dostęp natywnej IL-15 do receptora, a przy tym nie powodują wyzwolenia sygnału [22,33].

Jedną z podstawowych trudności związanych z projektowaniem zmodyfikowanych cząsteczek IL-15 o właściwościach antagonistycznych względem IL-15R stanowi ich krótki okres półtrwania ($t_{1/2}$) *in vivo*. Problem ten można ominąć łącząc odpowiednio zmodyfikowaną IL-15 o właściwościach antagonistycznych z łańcuchem ciężkim przeciwciała IgG, co wykorzystano przy projektowaniu białka fuzyjnego CRB-15 [33]. Białko to okazało się wykazywać szerokie właściwości antagonistyczne względem aktywności IL-15 [16,34–36]. Co więcej, obecność łańcucha Fc nadaje cząsteczce również właściwości cytotoksyczne w stosunku do komórek prezentujących na swojej powierzchni IL-15R. Dzięki temu eliminowane są komórki uczestniczące w wiązaniu IL-15 i przekazywaniu sygnału przez IL-15R [36]. Podobne właściwości wykazują białka fuzyjne IL-15-PE Δ 295 (IT1) i IL-15M-PE Δ 295 (IT2) złożone z IL-15, bądź jej mutanta o właściwościach antagonistycznych i fragmentu egzotoksyny PE produkowanej przez pałeczkę ropy błękitnej *Pseudomonas aeruginosa* [37,38]. Egzotoksyna PE jest proenzymem, który dostaje się do wnętrza komórki na drodze endocytozy. Tam ulega aktywacji i poprzez inhibicję czynnika elongacji 2 (EF2, ang. *elongation factor*) hamuje syntezę białek prowadząc do śmierci komórki. Immunotoksyny te, dzięki wbudowanej IL-15, specyficznie rozpoznają komórki, na których powierzchni znajduje się IL-15R, a następnie za pomocą egzotoksyny PE prowadzą do ich apoptozy [39].

Inne metody hamowania aktywności IL-15

Oprócz leków biologicznych oddziałujących bezpośrednio z elementami kompleksu IL-15-IL-15R, znane są również cząsteczki modyfikujące aktywność IL-15 w inny sposób. Przykładem takiego związku jest deksametazon. Jest to lek przeciwzapalny i immunosupresyjny z grupy syntetycznych glikokortykosteroidów, który hamuje ekspresję podjednostki IL-15R α w jednójadrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC, ang. *peripheral blood mononuclear cells*) [40]. Innym lekiem o działaniu immunosupresyjnym i cytostatycznym jest antagonistą kwasu foliowego, metotreksat [41,42]. Badania dowiodły, że znacząco zmniejsza on wydzielanie IL-15 z fibroblastów izolowanych z błony maziowej stawów chorych z RZS [43].

Wszystkie stosowane dotychczas strategie hamowania IL-15, choć wydają się skuteczne, do dziś wykorzystywane są tylko w warunkach doświadczalnych. Wprawdzie pojawienie się na rynku leków biologicz-

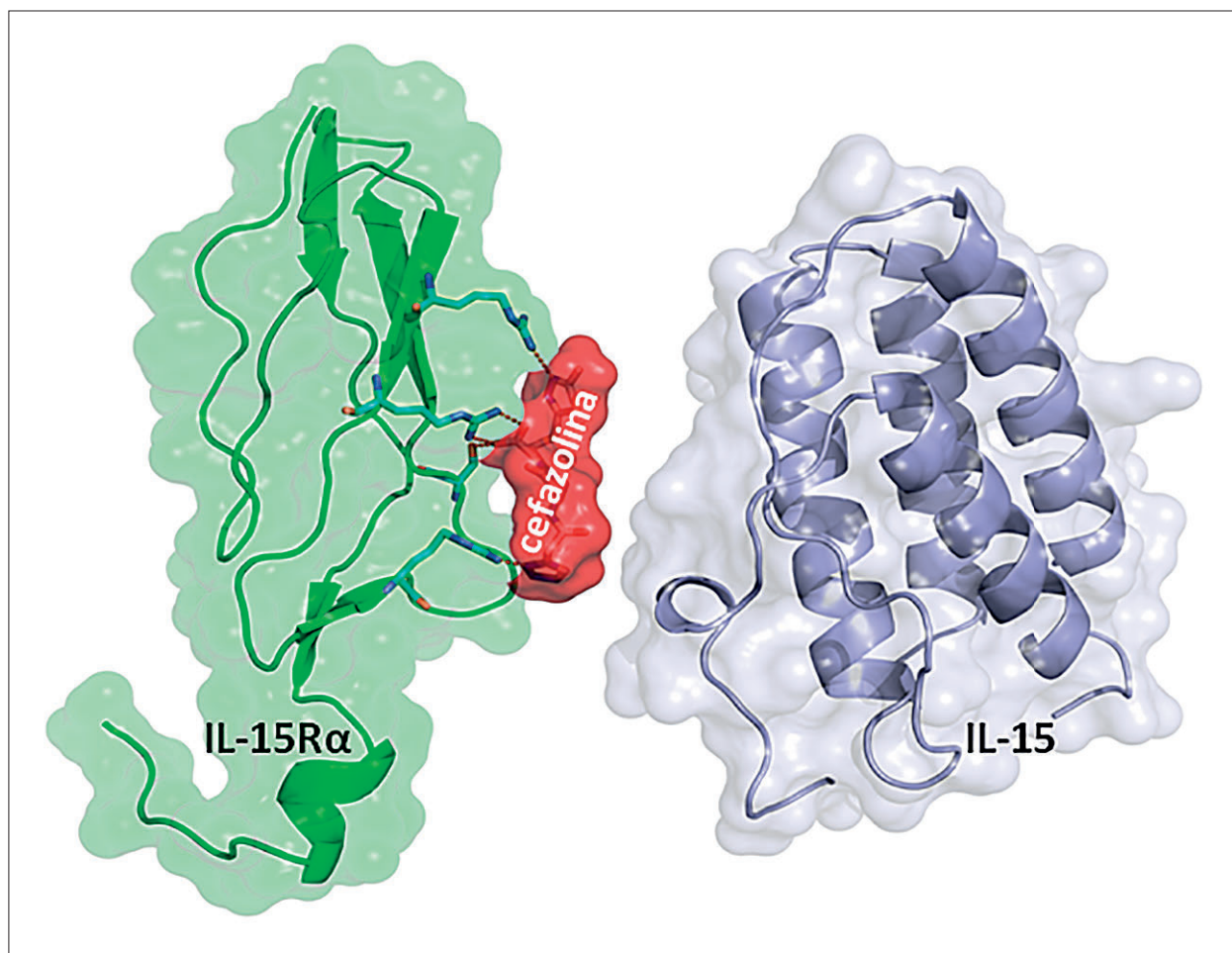
nych stanowi duży postęp w leczeniu chorób związanych z nadmierną ekspresją IL-15, takich jak RZS, jednak leki te są skuteczne w ograniczaniu objawów i spowalnianiu choroby tylko u około 30% pacjentów. Co więcej, nie są to leki celujące w IL-15, a hamujące inne cytokiny prozapalne. Ograniczone efekty terapeutyczne oraz wysokie koszty produkcji leków biologicznych sprawiają, że wciąż istnieje zapotrzebowanie na skuteczny lek nowej generacji.

Jedynie opisane dotychczas małe cząsteczki chemiczne o potencjalnym zastosowaniu w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów, działające prawdopodobnie na zasadzie interferencji w oddziaływanie pomiędzy IL-15 a receptorem IL-15R α , to pochodne fenylopirazoloanilidów. Należący do tej grupy związek Y-320 hamuje aktywację limfocytów T indukowaną przez IL-15 oraz ogranicza wywołane kolagenem zapalenie stawów u myszy i małą z rodziny makakowatych [44,45].

MODELOWANIE MOLEKULARNE POTENCJALNYCH INHIBITORÓW IL-15 I IL-15RA

Poznanie struktury IL-15 i jej receptora stworzyło możliwość wykorzystania innych, niż dotychczas metod poszukiwania inhibitorów IL-15. Model kompleksu IL-15-IL-15R α został opracowany z zastosowaniem spektrometrii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR, ang. *nuclear magnetic resonance*) [46] oraz badań krystalograficznych [19,20]. Dodatkowo w 2009 roku scharakteryzowano parametry termodynamiczne oddziaływań pomiędzy IL-15 i IL-15R α [21]. W przeciwieństwie do większości kompleksów typu cytokina-receptor, w miejscu wiązania IL-15 z IL-15R α znajduje się niewiele hydrofobowych reszt aminokwasów. Przeważają natomiast silne oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy zasadowymi resztami aminokwasów znajdującymi się w centrum aktywnym receptora, a kwaśnymi resztami aminokwasów występującymi na powierzchni IL-15.

Celem pierwszego etapu projektu finansowanego przez Naukową Fundację Polpharmy było wyselekcjonowanie potencjalnych inhibitorów IL-15 i IL-15R α przy pomocy modelowania komputerowego. Na podstawie trójwymiarowej struktury modelu kompleksu IL-15-IL-15R α opracowanej w oparciu o strukturę krystaliczną tego kompleksu (kod 2Z3Q z bazy danych Protein Data Bank) wyznaczono farmakofory miejsc wiążących w receptorze oraz ligandzie, czyli elementy ich budowy zawierające fragmenty biorące udział w istotnych oddziaływaniach pomiędzy tymi białkami. Poszukiwanie cząsteczek spełniających warunki narzucone przez farmakofo-



Rycina 1. Model fragmentu receptora IL-15Rα oraz IL-15 i sposób wiązania cefazoliny.

Model przedstawia fragment IL-15Rα (kolor zielony), IL-15 (kolor fioletowy) oraz cefazolinę (kolor czerwony) w potencjalnym miejscu wiązania z receptorem. Związanie cefazoliny w tym miejscu powoduje zablokowanie miejsca wiązania IL-15 z IL-15Rα.

ry przeprowadzono wśród około 20 milionów związków małowcząsteczkowych zebranych w bazie ZINC [47], która skupia dostępne handlowo i znane związki chemiczne. Pierwsza faza poszukiwań doprowadziła do uzyskania dwóch zbiorów zawierających po około 10 tysięcy potencjalnych inhibitorów liganda oraz receptora. Celem przeprowadzonych następnie obliczeń było sprawdzenie w sposób teoretyczny, które z wybranych związków najsilniej wiążą się z ligandem, bądź z receptorem. Dokowanie, czyli dopasowywanie wszystkich wyznaczonych uprzednio związków, przeprowadzono w programie GLIDE. Podczas dokowania miejsce wiązania na IL-15 bądź IL-15Rα pozostawało sztywne, natomiast wiążąca się cząsteczka posiadała możliwość zmian konformacyjnych poprzez modyfikacje wiązań rotacyjnych. Dla najsilniej oddziałujących z badanymi białkami 500 związków z obydwu grup przeprowadzono dodatkowe dokowania, w których indukcyjne dopasowanie, czyli możliwość zmian konformacyjnych zwiększających powinowactwo cząsteczek, było dozwolone dla obydwu oddziałujących partnerów: małowcząsteczkowego liganda i receptora białkowego bądź małow-

cząsteczkowego liganda i IL-15. Na Rycinie 1 przedstawiono model fragmentu receptora IL-15Rα oraz IL-15 i sposób wiązania cefazoliny, jednego z potencjalnych inhibitorów do receptora, którego aktywność biologiczną potwierdzono w badaniach *in vitro*.

Stosując wyżej opisane metody przesiewowe zidentyfikowano grupę 25 związków o silnym powinowactwie do IL-15 i IL-15Rα i potencjalnych właściwościach inhibitorów IL-15 lub IL-15Rα. Ich skuteczność w hamowaniu efektów biologicznych indukowanych przez IL-15 została zweryfikowana *in vitro* w kolejnym etapie badań.

OCENA SKUTECZNOŚCI WYBRANYCH ZWIĄZKÓW W BLOKOWANIU EFEKTÓW BIOLOGICZNYCH INDUKOWANYCH PRZEZ IL-15

Celem przeprowadzonych badań biologicznych było wyselekcjonowanie związków, które wykazują aktywność w hamowaniu efektów biologicznych wywołanych stymulacją IL-15. Jako model do analiz zasto-

Tabela 2. Wzory i nazwy chemiczne badanych inhibitorów IL-15 i IL-15R α

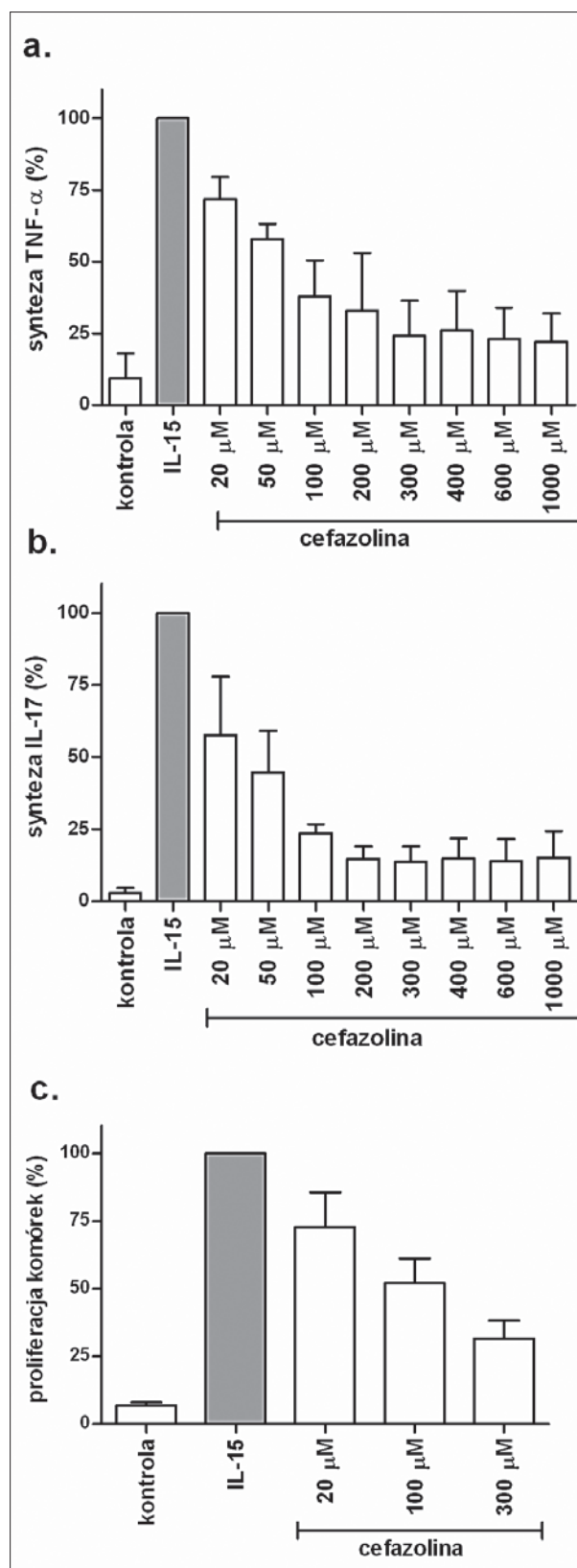
Wzór chemiczny, nazwa chemiczna (symbol)	Wzór chemiczny, nazwa chemiczna (symbol)
Cefazolina (cef)	Kwas 2-[(4- karboksybenzyl)karbamoilo] cykloheksanokarboksylowy (R6)
Kwas 2,9-diaminodekanodiowy (R1)	Kwas 3,5-bis[(2-karboksyetylo)karbamoilo] benzoesowy (R7)
Kwas 4-[(1-(4-fluorofenyl)-1<i>H</i>-tetrazol-5-ylo] sulfanylo)etylo benzoesowy (R2)	4-[(2-metoksykarbonyloetylo)-karbamoilo]metylo benzoesan metylu (R8)
2,4-dihydroksy-3-metylo benzoesan metylu (R3)	<i>N,N</i>-bis[(etyl-2-on)guanidyno]amina (L1)
Kwas 3-[(<i>E</i>)-2-karboksyetenilo]amino)-5-[(2<i>E</i>)-3-karboksyprop-2-enoilo]amino benzoesowy (R4)	<i>N''</i>,<i>N'''</i>-(2<i>E</i>, 4<i>E</i>)-2,4-bis(ylidenokarbohydrazonoamino)pentan (L2)
Kwas 2-[(4-karboksybenzyl)karbamoilo] bicyklo[2.2.1] heptanokarboksylowy (R5)	β-L-Alanylo-L-histydyna (L3)
	Propionamid 3-amino-<i>N</i>-2-(1<i>H</i>-imidazol-4-ylo) etylu (L4)

sowano komórki PBMC izolowane z krwi zdrowych dawców. Komórki PBMC pod wpływem stymulacji IL-15 syntetyzują szereg cytokin prozapalnych, w tym m.in. TNF- α i IL-17 [48]. Hipoteza badawcza zakładała, że zablokowanie IL-15 lub jej receptora spowoduje zahamowanie wydzielania TNF- α i IL-17 przez komórki PBMC stymulowane IL-15. W przeprowadzonych doświadczeniach komórki PBMC izolowano z krwi obwodowej zdrowych dawców metodą wirowania w gradiencie stężeń z wykorzystaniem buforu Lymphoprep (Axis-Shield, Norwegia), a następnie przenoszono na płytki 48-dółkowe w pożywkę RPMI 1640 zawierającej GlutaMax (Gibco, Wielka Brytania) oraz 10% surowicy bydlęcej (BIOMED, Polska), 10mM HEPES (Sigma-Aldrich, Niemcy) i antybiotyki (siarczan streptomycyny 1%, penicylan G sodu, 0,63%, amfoterycyna B, 0,0025%, PAA, Austria). W badaniach inhibitorów receptora przed dodaniem IL-15 (5 ng/ml) zastosowano 30 minutową preinkubację komórek z wybranymi związkami. Etap ten miał umożliwić ich związanie z IL-15R α . Z kolei potencjalne inhibitory liganda preinkubowano przez 30 minut z IL-15, aby umożliwić ich związanie z cytokiną, a następnie taką mieszaninę dodawano do zawiesiny komórek. Hodowlę prowadzono w stężeniu 2 mln komórek/ml w 0,5 ml pożywki. Pożywkę z komórek zbierano po 48 godzinach hodowli. Stężenie TNF- α i IL-17 w pożywkę oznaczono za pomocą testów immunoenzymatycznych ELISA (TNF- α : Quantikine DTA00C, R&D Systems, USA, IL-17: IL-17A High Sensitivity BMS2017HS, eBioscience, USA).

Jednym z efektów stymulacji PBMC przez IL-15 jest ich zwiększona proliferacja [2]. Wpływ wybranych związków na zależną od IL-15 proliferację komórek zbadano za pomocą testu oceniającego ilość bromodeoksyurydyny (BrdU) wbudowanej do jąder komórkowych (BrdU Cell Proliferation Assay, QIA58, Merck, Niemcy). Świeżo wyizolowane PBMC wysiewano na płytki 96-dółkowe w ilości 20 tysięcy na dółek, a następnie do hodowli dodawano badane związki i IL-15. Ilość wbudowanej BrdU mierzono po 4-dniowej hodowli.

Wpływ badanych związków na syntezę TNF- α w PBMC stymulowanych przez IL-15

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że pod wpływem badanych związków ekspresja TNF- α w komórkach PBMC stymulowanych IL-15 zmniejsza się. Wyraźny, zależny od stężenia efekt uzyskano dla 13 substancji przedstawionych w tabeli 2. Związki oznaczono symbolem zawierającym literę R lub L, dla potencjalnych inhibitorów odpowiednio receptora lub liganda oraz kolejnym numerem porząd-



Rycina 2. Wpływ cefazoliny na wywołaną przez IL-15 syntezę TNF- α (a) i IL-17 (b) przez PBMC oraz na indukowaną przez IL-15 proliferację PBMC (c). Wszystkie wyniki przedstawiono jako relatywną zmianę w odpowiedzi komórkowej odniesioną do komórek stymulowanych IL-15 (100%). Wykresy przedstawiają wartość średnią wyników uzyskanych dla trzech populacji komórek. Zaznaczono także standardowy błąd pomiaru (SEM).

kowym. Rycina 2a przedstawia wynik uzyskany dla cefazoliny, która jest antybiotykiem β -laktamowym z grupy cefalosporyn I generacji.

Wpływ badanych związków na indukowaną przez IL-15 syntezę IL-17 przez PBMC

Przeprowadzone badania wykazały, że pod wpływem badanych związków zmniejsza się ekspresja IL-17 w komórkach PBMC stymulowanych IL-15. Wyrażony efekt uzyskano dla tych samych substancji, które działały hamująco na ekspresję TNF- α indukowaną IL-15. Również w tym przypadku wszystkie analizowane związki wykazywały efekt zależny od stężenia. Wpływ cefazoliny na wywołaną przez IL-15 syntezę IL-17 przez PBMC przedstawiono na Rycinie 2b.

Wpływ badanych związków na zależną od IL-15 proliferację PBMC

Analizując wpływ badanych związków na proliferację PBMC indukowaną IL-15 ujawniono, że wszystkie substancje przedstawione w Tabeli 2 hamują tę odpowiedź komórkową. Doświadczenie prowadzono stosując związki w stężeniach nie wykazujących cytotok-

syczności. Wpływ cefazoliny na proliferację PBMC pod wpływem IL-15 przedstawiono na Rycinie 2c.

PODSUMOWANIE

W trakcie realizacji projektu zastosowano biodelowanie komputerowe do wyselekcjonowania grupy związków potencjalnie zdolnych do blokowania aktywności biologicznej IL-15. Analizy badań biologicznych *in vitro* doprowadziły do wybrania 13 związków skutecznie hamujących odpowiedź komórkową indukowaną IL-15. Dziewięć spośród tych związków, zgodnie z wynikami biodelowania, wykazuje działanie biologiczne poprzez blokowanie IL-15R α , natomiast pozostałe cztery wiążą się z IL-15. Co ciekawe, jednym z tych związków jest cefazolina, antybiotyk z grupy cefalosporyn, produkowany m.in. przez Zakłady Farmaceutyczne Polpharma. Wyselekcjonowane związki będą mogły stanowić podstawę do dalszych badań biologicznych *in vivo* oraz modyfikacji chemicznych prowadzących do zwiększenia ich aktywności. Związki te, po dokładnym przebadaniu, mogą stanowić podstawę do stworzenia skutecznego i niedrogo leku hamującego choroby zapalne i autoimmunologiczne, takie jak RZS.

Ramka 1. Stan wiedzy w chwili rozpoczęcia projektu

1. IL-15 jest cytokiną o pleiotropowym działaniu. Nadmierna jej ekspresja może prowadzić do wielu chorób, przede wszystkim autoimmunologicznych i zapalnych.
2. Wszystkie stosowane dotychczas strategie hamowania IL-15, choć wydają się skuteczne, do dziś wykorzystywane są tylko w warunkach doświadczalnych. Wprawdzie pojawienie się leków biologicznych stanowi duży postęp w leczeniu chorób związanych z nadmierną ekspresją IL-15, takich jak RZS, jednak leki te są skuteczne w ograniczaniu objawów i spowalnianiu choroby tylko u około 30% pacjentów i nie celują w IL-15, a w inne cytokiny prozapalne. Ograniczone efekty terapeutyczne oraz wysokie koszty produkcji leków biologicznych sprawiają, że wciąż istnieje zapotrzebowanie na skuteczny lek nowej generacji.

Ramka 2. Co przyniosła realizacja grantu Naukowej Fundacji Polpharmy

1. Zidentyfikowano szereg związków o potencjalnych właściwościach inhibitorów IL15 lub jej specyficznego receptora IL-15R α . Związki o najsilniejszym powinowactwie do IL-15 lub IL-15R α zostały przebadane pod kątem ich aktywności biologicznej wobec IL-15.
2. Wyselekcjonowano 13 związków, które hamują aktywność biologiczną IL-15. Jednym z nich jest antybiotyk β -laktamowy – cefazolina.
3. Przygotowano cztery zgłoszenia patentowe dotyczące zastosowania przebadanych związków w inhibicji aktywności biologicznej IL-15.

Ramka 3. Dalsze kierunki badań

1. Dalsze badania będą miały na celu ocenę skuteczności farmakologicznej *in vivo* związków chemicznych blokujących aktywność biologiczną IL-15 poszerzoną o wybrane badania toksykologiczne i farmakokinetyczne, których celem jest oszacowanie bezpieczeństwa stosowania badanego związku u ludzi.

PIŚMIENNICTWO

- Grabstein KH, Eisenman J, Shanebeck K, et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the β chain of the interleukin-2 receptor. *Science* 1994; 264: 965-8.
- Budagian V, Bulanov E, Paus R, et al. IL-15/IL-15 receptor biology: A guided tour through an expanding universe. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006; 17: 259-80.
- Nishimura H, Fujimoto A, Tamura N, et al. A novel autoregulatory mechanism for transcriptional activation of the IL-15 gene by a nonsecretable isoform of IL-15 generated by alternative splicing. *FASEB J* 2005; 19: 19-28.
- Pereno R, Giron-Michel J, Gaggero A, et al. IL-15/IL-15R α intracellular trafficking in human melanoma cells and signal transduction through the IL-15R α . *Oncogene* 2000; 19: 5153-62.
- Tagaya Y, Bamford RN, DeFilippis AP, et al. IL-15: A pleiotropic cytokine with diverse receptor/signaling pathways whose expression is controlled at multiple levels. *Immunity* 1996; 4: 329-36.
- Basak GW, Lasek W. Interleukina 15: Charakterystyka i aktywność w warunkach fizjologicznych. *Post Biol Kom* 2006; 33: 303-25.
- Reinecker HC, MacDermott RP, Mirau S, et al. Intestinal epithelial cells both express and respond to interleukin 15. *Gastroenterology* 1996; 111: 1706-13.
- Angiolillo AL, Kanegane H, Sgadari C, et al. Interleukin-15 promotes angiogenesis in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 233: 231-7.
- Yang L, Thornton S, Grom AA. Interleukin-15 inhibits sodium nitroprusside-induced apoptosis of synovial fibroblasts and vascular endothelial cells. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 3010-4.
- Villadsen LS, Schuurman J, Beurskens F, et al. Resolution of psoriasis upon blockade of IL-15 biological activity in a xenograft mouse model. *J Clin Invest* 2003; 112: 1571-80.
- Elder JT. IL-15 and psoriasis: another genetic link to Th17? *J Invest Dermatol* 2007; 127: 2495-7.
- Agostini C, Trentin L, Facco M, et al. Role of IL-15, IL-2, and their receptors in the development of T cell alveolitis in pulmonary sarcoidosis. *J Immunol* 1996; 157: 910-8.
- Kunz M, Ibrahim SM. Cytokines and cytokine profiles in human autoimmune diseases and animal models of autoimmunity. *Mediat Inflamm* 2009; 2009: 979258-77.
- McInnes IB, Al-Mughaies J, Field M, et al. The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis. *Nat Med* 1996; 2: 175-82.
- McInnes IB, Liew FY. Interleukin 15: A proinflammatory role in rheumatoid arthritis synovitis. *Immunol Today* 1998; 19: 75-9.
- Zheng XX, Gao W, Donskoy E, et al. An antagonist mutant IL-15/Fc promotes transplant tolerance. *Transplantation* 2006; 81: 109-16.
- Voll RE, Kalden JR. Do we need new treatment that goes beyond tumor necrosis factor blockers for rheumatoid arthritis? *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1051: 799-810.
- Šenolt L, Vencovský J, Pavelka K, et al. Prospective new biological therapies for rheumatoid arthritis. *Autoim Rev* 2009; 9: 102-7.
- Chirifu M, Hayashi C, Nakamura T, et al. Crystal structure of the IL-15-IL-15R α complex, a cytokine-receptor unit presented in trans. *Nature Immunol* 2007; 8: 1001-7.
- Olsen SK, Ota N, Kishishita S, et al. Crystal structure of the interleukin-15-interleukin-15 receptor α complex: Insights into trans and cis presentation. *J Biol Chem* 2007; 282: 37191-204.
- Sakamoto S, Caaveiro JMM, Sano E, et al. Contributions of Interfacial Residues of Human Interleukin15 to the Specificity and Affinity for Its Private α -Receptor. *J Mol Biol* 2009; 389: 880-94.
- Bernard J, Harb C, Mortier E, et al. Identification of an interleukin-15 α receptor-binding site on human interleukin-15. *J Biol Chem* 2004; 279: 24313-22.
- Finch D, Midha A, Buchanan C, et al. Identification of a potent anti-IL-15 antibody with opposing mechanisms of action in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 2011; 162: 480-90.
- Baslund B, Tvede N, Danneskiold-Samsøe B, et al. Targeting interleukin-15 in patients with rheumatoid arthritis: A proof-of-concept study. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 2686-92.
- Budagian V, Bulanov E, Orinska Z, et al. Reverse signaling through membrane-bound interleukin-15. *J Biol Chem* 2004; 279: 42192-201.
- Ruchatz H, Leung BP, Wei XQ, et al. Soluble IL-15 receptor α -chain administration prevents murine collagen-induced arthritis: A role for IL-15 in development of antigen-induced immunopathology. *J Immunol* 1998; 160: 5654-60.

27. Wei XQ, Orchardson M, Gracie JA, et al. The sushi domain of soluble IL-15 receptor α is essential for binding IL-15 and inhibiting inflammatory and allogenic responses in vitro and in vivo. *J Immunol* 2001; 167: 277-82.
28. Bouchaud G, Garrigue-Antar L, Solé V, et al. The Exon-3-Encoded Domain of IL-15R α Contributes to IL-15 High-Affinity Binding and Is Crucial for the IL-15 Antagonistic Effect of Soluble IL-15R α . *J Mol Biol* 2008; 382: 1-12.
29. Mortier E, Quémener A, Vusio P, et al. Soluble interleukin-15 receptor α (IL-15R α)-sushi as a selective and potent agonist of IL-15 action through IL-15R β / γ : Hyperagonist IL-15-IL-15R α fusion proteins. *J Biol Chem* 2006; 281: 1612-9.
30. Stoklasek TA, Schluns KS, Lefrançois L. Combined IL-15/IL-15R α immunotherapy maximizes IL-15 activity in vivo. *J Immunol* 2006; 177: 6072-80.
31. Tinubu SA, Hakimi J, Kondas JA, et al. Humanized antibody directed to the IL-2 receptor β -chain prolongs primate cardiac allograft survival. *J Immunol* 1994; 153: 4330-8.
32. Pilson RS, Levin W, Desai B, et al. Bispecific Humanized Anti-IL-2 Receptor $\alpha\beta$ Antibodies Inhibitory for Both IL-2- and IL-15-Mediated Proliferation. *J Immunol* 1997; 159: 1543-56.
33. Kim YS, Maslinski W, Zheng XX, et al. Targeting the IL-15 receptor with an antagonist IL-15 mutant/Fc γ 2a protein blocks delayed-type hypersensitivity. *J Immunol* 1998; 160: 5742-8.
34. Pettit DK, Bonnert TP, Eisenman J, et al. Structure-function studies of interleukin 15 using site-specific mutagenesis, polyethylene glycol conjugation, and homology modeling. *J Biol Chem* 1997; 272: 2312-8.
35. Ferrari-Lacraz S, Zheng XX, Fueyo AS, et al. CD8 $^{+}$ T cells resistant to costimulatory blockade are controlled by an antagonist interleukin-15/Fc protein. *Transplantation* 2006; 82: 1510-7.
36. Ferrari-Lacraz S, Zanelli E, Neuberger M, et al. Targeting IL-15 receptor-bearing cells with an antagonist mutant IL-15/Fc protein prevents disease development and progression in murine collagen-induced arthritis. *J Immunol* 2004; 173: 5818-26.
37. Niu YF, Mao XH. Construction and in vitro cytotoxic assay of a novel fusion toxin IL15-PE Δ 293. *Chung Hua Min Kuo Wei Sheng Wu Chi Mien I Hsueh Tsa Chih* 2004; 24: 991-5.
38. Niu YF, Zheng Y, Mao XH. Development of a fusion toxin IL15M-PE Δ 293 based on a receptor-specific IL-15 antagonist. *Chin J Biotechnol* 2005; 21: 42-6.
39. Wang D, Deng X, Leng X, et al. Interleukin-15 receptor-directed immunotoxins attenuate disease severity in rat adjuvant arthritis. *Mol Immunol* 2010; 47: 1535-43.
40. Chae DW, Nosaka Y, Strom TB, et al. Distribution of IL-15 Receptor α -Chains on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and Effect of Immunosuppressive Drugs on Receptor Expression. *J Immunol* 1996; 157: 2813-9.
41. Benedek TG. Methotrexate: From its introduction to non-oncologic therapeutics to anti-TNF- α . *Clin Exp Rheumatol* 2010; 28: S3-8.
42. Braun J, Rau R. An update on methotrexate. *Curr Opin Rheumatol* 2009; 21: 216-23.
43. Miranda-Carús ME, Balsa A, Benito-Miguel M, et al. IL-15 and the initiation of cell contact-dependent synovial fibroblast-T lymphocyte cross-talk in rheumatoid arthritis: Effect of methotrexate. *J Immunol* 2004; 173: 1463-76.
44. Chiba K. A new orally active anti-rheumatic drug targets IL-15 and IL-17. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 2007; 30: 375-82.
45. Ushio H, Ishibuchi S, Adachi K, et al. Phenylpyrazole anilides as potent inhibitor of IL-15 dependent T cell proliferation. Part 2: Discovery of a new drug candidate, Y-320. *Lett Drug Des Discov* 2008; 5: 292-6.
46. Lorenzen I, Dingley AJ, Jacques Y, et al. The structure of the interleukin-15 α receptor and its implications for ligand binding. *J Biol Chem* 2006; 281: 6642-7.
47. Irwin JJ, Sterling T, Mysinger MM, et al. ZINC: A free tool to discover chemistry for biology. *J Chem Inf Model* 2012; 52: 1757-68.
48. Ziolkowska M, Koc A, Luszczkiewicz G, et al. High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. *J Immunol* 2000; 164: 2832-8.

Kinaza białkowa ERK1/2 jako wewnątrzkomórkowy obiekt badań nad mechanizmem uzależnienia od kokainy i jako cel potencjalnej farmakoterapii tej choroby

The protein kinase ERK1/2 as an intracellular object of research on the mechanism of cocaine addiction and as a target of the potential pharmacotherapy of this brain disorder

Małgorzata Filip

Pracownia Farmakologii Uzależnień, Zakład Farmakologii, Instytut Farmakologii, PAN, Kraków

Naukowa Fundacja Polpharmy w 2009 roku przyznała zespołowi pracującemu pod kierunkiem doc. dr hab. Małgorzaty Filip grant na realizację projektu badawczego pt. *Kinaza białkowa ERK1/2 jako wewnątrz komórkowy obiekt badań nad mechanizmem uzależnienia od kokainy i jako cel potencjalnej farmakoterapii tej choroby.*

STRESZCZENIE

Celem projektu finansowanego przez Naukową Fundację Polpharmy było uzyskanie odpowiedzi na pytanie czy kinaza białkowa ERK1/2 odgrywa rolę w uzależnieniu od kokainy i czy inhibitory tej kinazy znajdują zastosowanie w farmakoterapii tej choroby mózgu. W badaniach zwrócono szczególną uwagę na procesy asocjacji bodźców bezwarunkowych (kokainy) i bodźców warunkowych kojarzonych z pobieraniem substancji uzależniającej – w modulacji powstałych asocjacji pamięciowych postuluje się potencjalną farmakoterapię uzależnień. W wyniku przeprowadzonych analiz farmakologicznych i molekularnych stwierdzono, że efekty nagradzające kokainy w modelu samopodawania zależą od aktywności kinazy białkowej ERK1/2, ponieważ wielokrotne podawanie inhibitora kinazy przed sesjami doświadczalnymi spowodowało zmniejszenie liczby naciśnień na dźwignię aktywną i liczbę pobieranych porcji kokainy u szczurów, natomiast sama kokaina indukowała zmiany w aktywności enzymu w różnych strukturach mózgu zwierząt. Blokada kinazy białkowej ERK1/2 w trakcie samopodawania kokainy i jej odstawienia nie odgrywa roli w przyspieszaniu wygaszenia zachowań poszukiwawczych u szczurów (brak znaczących zmian w liczbie naciśnień na dźwignię aktywną), ale hamuje nawrót do nałogu. Inhibitory kinazy białkowej ERK1/2 podawane w okresie intoksykacji kokainowej i/lub odstawienia mogą stanowić potencjalne leki w farmakoterapii uzależnienia od tej substancji psychoaktywnej.

Wpłynęło: 2013-10-08
Zaakceptowano: 2013-10-21
Opublikowano: 2013-12-31

Słowa kluczowe: kinaza białkowa ERK1/2 • kokaina • dożylne samopodawanie • wygaszanie zachowań poszukiwawczych • nawroty do nałogu • procedura sprzężenia „yoked” • Western blot

Adres do korespondencji:

Prof. dr hab. Małgorzata Filip
Pracownia Farmakologii Uzależnień,
Zakład Farmakologii, Instytut
Farmakologii, Polska Akademia
Nauk, ul. Smętna 12, 31-343 Kraków
e-mail: mal.fil@if-pan.krakow.pl

SUMMARY

The aim of the project supported by the Polpharma Scientific Foundation was to receive an answer if the protein kinase ERK1/2 plays a role in cocaine addiction and whether inhibitors of this kinase will find use in the pharmacotherapy of this brain disorder. We focused special attention on processes that associate unconditional (cocaine) and conditional cues linked with the

drug abuse – in the modulation of these established memory associations the potential pharmacotherapy of drug dependence is postulated. The results of this project with using pharmacological and molecular analyses indicate that the rewarding properties of cocaine in self-administration model depends on protein kinase ERK1/2 activity. In fact, repeated treatment with the selective kinase inhibitor attenuated the number of active lever presses and cocaine infusions in rats while cocaine per se induced changes in enzyme activity in several animal brain regions. The blockade of protein kinase ERK1/2 activity during cocaine self-administration or the drug withdrawal resulted in no changes in extinction of operant responding in rats (the lack of influence on active lever presses), however, such pharmacological manipulations reduced the relapse behavior. Inhibitors of protein kinase ERK1/2 applied during cocaine intoxication and/or its withdrawal may be regarded as potential pharmacological agents in drug addiction.

Kew words: protein kinase ERK1/2 • cocaine • intravenous self-administration • extinction of operant responding • relapse • “yoked” procedure • Western blot

WPROWADZENIE

Uzależnienie (ang. *addiction, dependence*) jest chorobą ośrodkowego układu nerwowego, która charakteryzuje się utratą kontroli nad natrętnym (kompulsywnym) poszukiwaniem i przyjmowaniem substancji uzależniającej. Utrata kontroli prowadzi do niebezpiecznych i szkodliwych następstw u osoby uzależnionej, zarówno w sferze psychicznej jak i somatycznej. Uzależnienie należy do chorób o charakterze przewlekłym; nawroty do nałogu pojawiają się po długich, trwających wiele lat okresach abstynencji.

Przyczynę uzależnienia należy wiązać ze zmianami zachodzącymi pod wpływem substancji psychoaktywnych w układach funkcjonalnych mózgu, mianowicie w układzie nagrody, układzie pobudzenia oraz w układzie poznawczym (kognitywnym). Spośród nich układ nagrody odgrywa zasadniczą rolę w inicjacji i podtrzymywaniu nałogu. Fizjologicznie układ ten zaangażowany jest w rozróżnianie przyjemności (kojarzonej z nagrodą) i bólu (odbieranego jako kara). Układ nagrody to ściśle określony układ ośrodków i szlaków neuronalnych, których drażnienie wywołuje odczucie subiektywnej przyjemności i w związku z tym dążenie do ponowienia bodźca. Tworzą go szlaki dopaminergiczne, biegnące z pola brzusznej nakrywki śródmózgowia do różnych struktur limbicznych, w tym do jądra półleżącego przegrody (szlak mezoakumbalny) i do kory przedczołowej (szlak meзокortyczny). Oba te szlaki dopaminowe kontrolują zachowania motywacyjne związane z działaniem zewnętrznych dodatnich bodźców wzmacniających (odczuwalnych jako przyjemne) i to właśnie im przypisuje się duże znaczenie w rozwoju uzależnień [1]. Pomimo iż dopamina decyduje o warto-

ściach wzmacniających bodźca odbieranego, w neurochemiczną regulację układu nagrody zaangażowane są też inne neuroprzekaźniki oraz zależne od tych neuroprzekaźników mechanizmy molekularne, polegające na zmianach adaptacyjnych na poziomie receptorowym, białek G i/lub wtórnych przekaźnikach. Pociągają one dalej za sobą kaskadę zmian w poziomie wewnątrzkomórkowych białek, a przede wszystkim kinaz i fosfataz. Efektem końcowym są zmiany w funkcji kanałów jonowych sodowych lub potasowych, zmiany poziomu tych jonów a także wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} , ekspresji czynników transkrypcyjnych oraz genów docelowych, determinujących stan aktywności funkcjonalnej komórek nerwowych.

Obecnie nie istnieje skuteczny sposób leczenia uzależnienia od kokainy, dlatego też zespoły naukowców na całym świecie prowadzą badania mające na celu wyjaśnienie mechanizmów powstawania tej choroby i – na bazie uzyskanych analiz molekularnych i neurochemicznych – stworzenie nowoczesnej, racjonalnej terapii hamującej nałóg [2].

Jedną z hipotez dotyczących procesu uzależnienia sformułowana na podstawie teorii profesora Barry’ego F. Everitt’a, wskazuje na udział procesów uczenia się i zapamiętywania jako czynników determinujących rozwój uzależnień. Zgodnie z tą teorią uzależnienie to choroba związana z nabytą asocjacją pomiędzy bodźcem warunkowym (substancja psychoaktywna o właściwościach nagradzających), a bodźcem warunkowym (kojarzonym ze środowiskiem, w którym substancja psychoaktywna jest przyjmowana) [3]. Taka nabyta asocjacja powoduje, że każda ponowna ekspozycja na bodziec warunkowy prowadzi do wyzwolenia automa-

tycznego odruchu poszukiwania substancji uzależniającej, a w modulację powstałych asocjacji pamięciowych ma ingerować potencjalna farmakoterapia uzależnienia od kokainy. Wyniki badań przedklinicznych wskazują na istotny udział wewnątrzkomórkowych kinaz białkowych ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) w modulowaniu śladów pamięciowych u zwierząt, przy czym warto także podkreślić, że aktywność kinaz białkowych ERK wpływa nie tylko na pamięć krótkotrwałą, ale i na konsolidację i rekonsolidację pamięci związanej z rozpoznaniem obiektów [4,5]. Rodzina kinaz białkowych ERK obejmując 8 izoform, przy czym do najlepiej poznanych należą izoforma 1 i 2 (ERK1/2). ERK1 i ERK2, będące w 84% identyczne w swej budowie, pełnią szereg funkcji regulujących procesy komórkowe; kinazy te ulegają aktywacji po pobudzeniu odpowiednich receptorów metabotropowych, np. receptorów dopaminowych czy glutaminianergicznych. Dane literaturowe wskazują, że modulacja kaskady kinazy białkowej ERK1/2 może wpływać na procesy utrwalania śladów pamięciowych powstałych podczas stosowania substancji uzależniających.

STAN WIEDZY W MOMENCIE ROZPOCZĘCIA PROJEKTU

U gryzoni zarówno jednorazowe jak i wielokrotne podania kokainy powodowały wzrost poziomu aktywnej, czyli ufosforylowanej, formy kinazy białkowej ERK1/2 w obrębie struktur związanych głównie z zakończeniami dopaminowego układu mezo-kortykolimbicznego (jądro półleżące przegrody, kora przedczołowa, jądro migdałowe) (Tabela 1), choć obserwowane zmiany zależały od schematu podawania substancji uzależniającej, badanej struktury mózgu i/lub procedury behawioralnej zastosowanej do modelowania uzależnienia. Proces fosforylacji kinazy białkowej ERK1/2 obserwowany u szczurów po wielokrotnych podaniach kokainy w modelu warunkowej preferencji miejsca lub kokainy w modelu samopodawania był hamowany przez selektywne inhibitory powyższej kinazy [4]. Te ostatnie substancje (np. PD98059, U0126, SL 327) umożliwiły przeprowadzenie analiz farmakologicznych oraz lepsze poznanie znaczenia enzymu w behawioralnych efektach kokainy (Tabela 2). I tak np. wykazano, iż SL 327 (inhibitor penetrujący do ośrodkowego układu nerwowego) po podaniach obwodowych lub PD98059 (inhibitor, który nie penetruje do ośrodkowego układu nerwowego) po podaniach do pola brzusznej narkotyki w modelu sensytyzacji behawioralnej indukowanej kokainą hamują nabywanie sensytyzacji, ale nie mają wpływu na jej ekspresję [Tabela 2]. Dla SL 327 opisano także brak wpływu na podstawową i indukowaną podaniem kokainy aktywność lokomotoryczną gryzoni [4]. Inne badania wskazywały na zaangażowanie kina-

zy białkowej ERK1/2 w procesy konsolidacji śladów pamięciowych związanych z kojarzeniem bodźców bezwarunkowych, takich jak nagradzający efekt substancji uzależniających, z bodźcami warunkowymi kojarzonymi z pobieraniem tej substancji. I tak, w modelu warunkowej preferencji miejsca SL 327 (podania obwodowe), U0126 i PD98059 (podania lokalne do jądra półleżącego przegrody) stosowane przed kokainą w trakcie nabywania preferencji hamują ekspresję efektów powyższych substancji uzależniających. Takich hamujących efektów inhibitorów kinazy białkowej ERK1/2 nie obserwowano w czasie ekspresji warunkowej preferencji miejsca indukowanej kokainą (Tabela 2). W przeciwieństwie do powyższych wyników, w modelu samopodawania kokainy zaobserwowano, iż lokalne zastosowanie U0126 do centralnego jądra migdałowego w 30. dniu odstawienia substancji uzależniającej redukowało nawrót zachowań poszukiwawczych indukowany prezentacją bodźców warunkowych kojarzonych z wcześniejszymi podaniami kokainy [30]. Wyniki tych badań wskazywały, że aktywacja kinazy ERK1/2 w różnych strukturach dopaminowego szlaku mezo-kortykolimbicznego jest niezbędna dla procesów konsolidacji śladów pamięciowych dotyczących bodźców warunkowych związanych z wielokrotnym pobraniem kokainy w czasie nabywania sensytyzacji lokomotorycznej i warunkowej preferencji miejsca oraz do rekonsolidacji śladów pamięciowych bodźców związanych z działaniem kokainy. Powyższe wnioski oparto na procedurach biernego podawania kokainy (przez eksperymentatora), a przeprowadzone do tej pory badania ograniczały się głównie do modelu warunkowej preferencji miejsca lub sensytyzacji lokomotorycznej wywoływanej podaniem kokainy. Brak efektów inhibitorów kinazy białkowej ERK1/2 w modelu samopodawania kokainy (aktywne pobieranie substancji uzależniającej przez zwierzęta) nie pozwoliło na uzyskanie pełnego obrazu dotyczącego zaangażowania powyższej kinazy w efekty motywacyjne/nagradzające kokainy. Nieznany był też wpływ blokady kinazy białkowej ERK1/2 na zachowania poszukiwawcze kokainy – czyli na kluczowe dla uzależnienia procesy.

CEL ORAZ OPIS PROJEKTU

W projekcie finansowanym przez Naukową Fundację Polpharmy badano wpływ blokady kaskady kinazy białkowej ERK1/2 na efekty nagradzające kokainy, wygaszanie reakcji instrumentalnej kojarzonej z samopodawaniem kokainy oraz nawrót zachowań poszukiwawczych kokainy u szczurów. Celem badań było uzyskanie odpowiedzi na pytanie czy kinaza białkowa ERK1/2 odgrywa rolę w uzależnieniu od kokainy i czy inhibitory tej kinazy znajdą zastosowanie w farmakoterapii uzależnienia kokainowego. Zwrócono szczególną uwagę na procesy asocjacji bodźców bezwarunkowych (koka-

Tabela 1. Rola kinazy białkowej ERK1/2 w uzależnieniu od kokainy – wyniki analiz molekularnych w chwili rozpoczęcia projektu

Model/procedura doświadczalna	Gatunek	Zmiany ufosforylowanej formy ERK1/2	Referencje
Kokaina (20 mg/kg, ip) x 1 dzień (5-20 min)	mysz	↑ (NAC, STR, HIP (CA1-3), PFC, BLA, CEA, BNST) Ø (VTA, SN, GP)	[6, 7]
Kokaina (20 mg/kg, ip) x 1 dzień (60 min)	mysz	Ø (NAC, STR)	[6]
Kokaina (15 mg/kg, ip) x 1 dzień	mysz	↑ (NAC, STR, CC)	[8]
Kokaina (20 mg/kg, ip) x 1 dzień	mysz	↑ (NAC, AMY)	[9]
Kokaina (20 mg/kg, ip) x 1 dzień	mysz	↑ (STR)	[10]
Kokaina (30 mg/kg, ip) x 1 dzień	mysz	↑ (STR)	[11, 12]
Kokaina (20 mg/kg, ip) x 1 dzień	mysz	↑ (NAC, STR)	[13]
Kokaina (20 mg/kg, ip) x 1 dzień	mysz	↑ (NAC)	[14]
Kokaina (0.5 mg/kg/infuzję, 4-godz. sesja) x 1 dzień	szczur	↑ (NAC, STR, BLA, CEA, HIP) Ø (PFC, PMC)	[15]
Kokaina (20 mg/kg, ip) x 7 dni (5-20 min)	mysz	↑ (NAC, STR)	[6]
Kokaina (15 mg/kg, ip) x 10 dni oraz 12-14 godz. odstawienia	mysz	↑ (NAC, STR)	[6]
Kokaina (20 mg/kg, ip) x 6 dni; warunkowa preferencja miejsca	mysz	↑ (NAC, STR, PFC)	[16]
Kokaina (3 mg/kg, ip) x 3 dni; warunkowa preferencja miejsca	mysz	↑ (NAC, VTA)	[17]
Kokaina (20 mg/kg, ip) x 1 dzień	szczur	↑ (STR)	[18]
Kokaina (20 mg/kg, ip) x 1 dzień oraz 2 godz. odstawienia	szczur	Ø (VTA)	[19]
Kokaina (15 mg/kg, dwa razy dziennie, ip) x 10 dni oraz 12-14 godz. odstawienia	szczur	↑ (VTA) Ø (SN, FC, NAC)	[19]
Kokaina (15 mg/kg, ip) x 7 dni oraz 3 tygodnie odstawienia i kokaina (10 mg/kg, ip); sensytyzacja lokomotoryczna	szczur	↑ (NAC)	[20]
Kokaina (15 mg/kg, ip) x 7 dni oraz 7 dni odstawienia i kokaina (15 mg/kg, ip); sensytyzacja lokomotoryczna	szczur	↑ (NAC, STR)	[21]
Kokaina (15 mg/kg, ip) x 7 dni oraz 7 dni odstawienia i kokaina (20 mg/kg, ip); sensytyzacja lokomotoryczna	szczur	↑ (NAC)	[14]
Kokaina (10 mg/kg, ip) x 9 dni; warunkowa preferencja miejsca	szczur	↑ (NACc) Ø (NACs)	[22]
Kokaina (20 mg/kg, ip) x 9 dni oraz 30 min. odstawienia	szczur	↑ (STR)	[23]
Kokaina (20 mg/kg, ip) x 9 dni oraz 4 godz. odstawienia	szczur	Ø (STR)	[23]
Kokaina (0.5 mg/kg/infuzję, iv) x 3 tygodnie samopodawania	szczur	↑ (NAC, STR, BLA, CEA, HIP) Ø (NAC, STR)	[15]
Kokaina (0.5 mg/kg/infuzję, iv) x 3 tygodnie bierne („yoked”) podawanie	szczur	↑ (NAC, STR, BLA, CEA, HIP) Ø (NAC, STR)	[15]
Kokaina (0.5 mg/kg/infuzję, iv) x 6-11 tygodni samopodawania oraz 1 dzień odstawienia i nawrót wywołany bodźcem warunkowym	szczur	Ø (CEA) Ø (BLA)	[24]
Kokaina (0.5 mg/kg/infuzję, iv) x 6-11 tygodni samopodawania oraz 30 dni odstawienia i nawrót wywołany bodźcem warunkowym	szczur	↑ (CEA) Ø (BLA)	[24]

Tabela 1. Rola kinazy białkowej ERK1/2 w uzależnieniu od kokainy – wyniki analiz molekularnych w chwili rozpoczęcia projektu

Model/procedura doświadczalna	Gatunek	Zmiany ufosforylowanej formy ERK1/2	Referencje
Kokaina (0.2 mg/infuzję, iv) x 10 dni oraz 22 godzin odstawienia i nawrót wywołany bodźcem warunkowym	szczur	↓ (NAC)	[25]

↑ – wzrost ufosforylowanej formy kinazy białkowej ERK1/2; ↓ spadek ufosforylowanej formy kinazy białkowej ERK1/2; Ø – brak zmian.

AMY – ciało migdałowe, BLA – jądro podstawno-boczne ciała migdałowego, BNST – jądro łożyskowe prążka krańcowego, CC – kora obręczy, CEA – jądro przyśrodkowe ciała migdałowego, FC – kora czołowa, GP – gałka biała, HIP – hipokamp, NACc – rdzeń jądra półleżącego przegrody, NACs – skorupa jądra półleżącego przegrody, PFC – kora przedczołowa, PMC – pierwszorzędowa kora ruchowa, SN – substancja czarna, STR – grzbietowe prążkowie, VTA – pole brzuszne nakrywki

Tabela 2. Rola kinazy białkowej ERK1/2 w uzależnieniu od kokainy – wyniki analiz behawioralnych w chwili rozpoczęcia projektu

Model/procedura doświadczalna	Gatunek	Zmiana funkcji kinazy białkowej ERK1/2	Efekt kokainy	Referencje
Hyperaktywność lokomotoryczna	mysz	↓ (SL 327, ip)	↓	[6]
	mysz	↓ (SL 327, ip)	Ø	[13,26]
	szczur	↓ (PD 98059, VTA)	Ø	[27]
Sensytyzacja lokomotoryczna: faza nabywania	mysz	↓ (SL 327, ip)	↓	[7,16,28]
	mysz	↓ knock-out	↑	[28]
	szczur	↓ (PD 98059, VTA)	↓	[27]
Sensytyzacja lokomotoryczna: faza ekspresji	mysz	↓ (SL 327, ip)	Ø	[7]
Warunkowa preferencja miejsca: faza nabywania	mysz	↓ (SL 327, ip)	↓	[16]
	mysz	↓ knock-out	↑	[28]
Warunkowa preferencja miejsca: faza ekspresji	mysz	↓ (SL 327, ip)	Ø (bez kokainy) ↓ (z kokainą)	[16]
	szczur	↓ (U0126, NACc)	↓	[22]
Warunkowa preferencja miejsca: faza rekonsolidacji	szczur	↓ (U0126, NACc) ↓ (PD98059, NACc)	↓ ↓	[22]
Samopodawanie	szczur	↓ (U0126, CEA)	Ø	[24]
Nawrót zachowań poszukiwawczych wywołany przez bodziec warunkowy	szczur	↓ (U0126, VTA)	Ø	[29]
	szczur	↓ (U0126, BLA)	Ø	[24]
	szczur	↓ (U0126, CEA)	↓	[24]

↑wzrost; ↓spadek; Ø – brak zmian.

BLA – jądro podstawno-boczne ciała migdałowego, CEA – jądro śródkowe ciała migdałowego, NACc – rdzeń jądra półleżącego przegrody, VTA – pole brzuszne nakrywki

iny) i bodźców warunkowych kojarzonych z pobieraniem substancji uzależniającej – w modulacji powstałych asocjacji pamięciowych postuluje się potencjalną farmakoterapię uzależnień. W badaniach zastosowano model doświadczalny, który polega na utrwaleniu odpowiedniej reakcji instrumentalnej (np. naciśnięcie na dźwignie umieszczone w klatce Skinnera) wzmacnianej podaniami kokainy. W tej metodzie o ilości dostarczonej substancji uzależniającej decyduje samo zwierzę,

a określona liczba naciśnień na dźwignię aktywną wiąże się z uruchomieniem pompy infuzyjnej i dożylną iniekcją narkotyku poprzez zaimplantowany do żyły szyjnej górnej szczura kateter; każdej infuzji kokainy towarzyszył bodziec warunkowy (światło i dźwięk). W porównaniu do innych modeli uzależnienia, samopodawanie kokainy najdokładniej odzwierciedla proces wejścia w nałóg, a zachowania obserwowane w tym modelu są wysoce wrażliwe na manipulacje zmiennych środo-

wiskowych i farmakologicznych [31]. Co więcej, samopodawanie kokainy wykorzystywane jest także do badania głodu narkotycznego – efekt ocenia się podczas przywrócenia reakcji kojarzonej z pobieraniem kokainy (naciskanie na dźwignię aktywną) po okresie jej odstawienia [32]. Do realizacji projektu wykorzystano także inną innowacyjną w świetle aktualnego stanu wiedzy procedurę doświadczalną („yoked”). Procedura ta umożliwia oddzielenie motywacyjnych efektów związanych z aktywnym pobieraniem kokainy od efektów farmakologicznych kokainy (czynne i biernie pobieranie kokainy przez zwierzęta) (Ryc. 1).

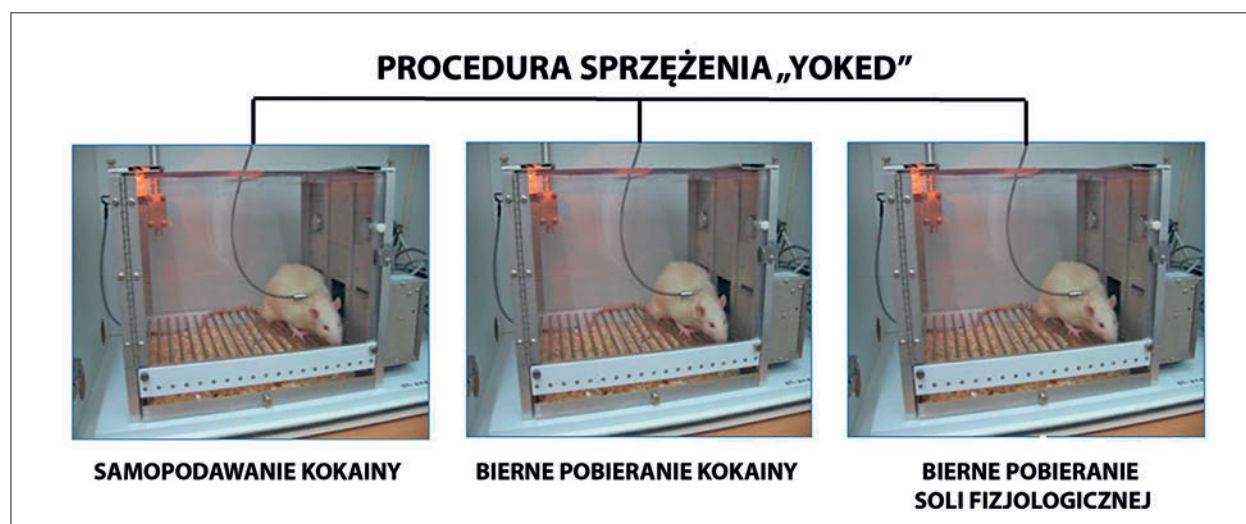
PODSUMOWANIE UZYSKANYCH WYNIKÓW ORAZ WNIOSKI

W przeprowadzonych eksperymentach *ex vivo* z wykorzystaniem połączonych metod behawioralnych (patrz wyżej) oraz metod molekularnych (Western blot) oceniano zmiany w aktywności kinazy białkowej ERK1/2 w różnych strukturach mózgu (kora przedczołowa, hipokamp, grzbietowe prążkowie oraz jądro leżące przegrody) pobranych od zwierząt eksponowanych na kokainę i podczas jej odstawienia (1., 3. i 10. dzień wygaszenia reakcji instrumentalnej). Jak wykazano, w fazie samopodawania kokainy nastąpił istotny (o 45%) wzrost ufosforylowanej formy kinazy białkowej ERK1/2 w hipokampie zwierząt biernie otrzymujących kokainę, podczas gdy w 1. dniu wygaszenia odnotowano spadek o 66 i 35% ufosforylowanej formy kinazy białkowej ERK1/2 w korze przedczołowej szczurów, odpowiednio, aktywnie i biernie otrzymujących kokainę (Tabela 3). Trzeci dzień odstawienia pobierania kokainy charakteryzował się spadkiem ufosforylowanej formy kinazy białkowej ERK1/2 w hipokampie szczurów aktywnie (o 34%) oraz biernie (o 25%) pobierających kokainę, jak również w jądrze pólężącym przegrody (o 40%)

tylko w grupie zwierząt biernie otrzymujących kokainę. W 10. dniu odstawienia nie zaobserwowano zmian w ekspresji ufosforylowanej formy kinazy białkowej ERK 1/2. Całkowita forma kinazy białkowej ERK1/2 nie ulegała zmianom w żadnej analizowanej strukturze bez względu na czas w jakim pobrano tkanki. Uzyskane wyniki potwierdzają wpływ kokainy na aktywność kinazy białkowej ERK1/2 oraz udział tego enzymu w asocjacji bodźca bezwarunkowego (kokaina) i warunkowego (światło i dźwięk połączone z iniekcją kokainy).

W kolejnym etapie badań przeprowadzono analizy farmakologiczne, w których podjęto próbę odpowiedzi na pytanie czy inhibitor kinazy białkowej ERK1/2 zmniejsza objawy głodu narkotycznego i zapobiega nawrotom do nałogu. Takie sytuacje kliniczne dobrze obrazują wygaszanie reakcji samopodawania i przywrócenie zachowań poszukiwawczych u szczurów poddanych wcześniej procedurze samopodawania kokainy. Jak wykazano, wielokrotnie podawany SL 327 przed sesjami doświadczalnymi osłabiał (ok. 30%) nagradzające efekty kokainy, a hamujące efekty tego inhibitora nie ulegały tolerancji podczas jego wielokrotnych (6 dni) podań (Tabela 4). SL 327 podawany po sesjach doświadczalnych nie zmieniał efektów odpowiedzi zwierząt. Innymi słowy wykazano, że blokada enzymu nie zmieniała konsolidacji asocjacji pomiędzy bodźcem bezwarunkowym, a warunkowym. SL 327 podawany w trakcie samopodawania kokainy przed i po sesji doświadczalnej hamował nawrót do nałogu indukowany bodźcem warunkowym (ale nie kokainą), natomiast nie przyspieszał wygaszania reakcji instrumentalnej w fazie wygaszania [33].

W innej serii doświadczeń blokada kinazy białkowej ERK1/2 w trakcie wygaszenia (iniekcje kokainy zastąpiono iniekcjami soli fizjologicznej) reakcji instrumentalnej nie zmieniała – w porównaniu z grupami



Rycina 1. Procedura sprzężenia „yoked”

Tabela 3. Rola kinazy białkowej ERK1/2 w uzależnieniu od kokainy – wyniki analiz molekularnych (Western blot) uzyskane podczas realizacji projektu Naukowej Fundacji Polpharmy

Model/procedura doświadczalna	Samopodawanie kokainy	Odstawienie kokainy		
		1 dzień	3 dzień	10 dzień
Aktywne pobieranie kokainy (0.5 mg/kg/iniekcję) x 14 dni	Ø (PFC, HIP, NAC, STR)	↓ (PFC) Ø (HIP, NAC, STR)	↓ (HIP) Ø (PFC, NAC, STR)	Ø (PFC, HIP, NAC, STR)
Bierne („yoked”) pobieranie kokainy (0.5 mg/kg/iniekcję) x 14 dni	↑ (HIP) Ø (PFC, NAC, STR)	↓ (PFC) Ø (HIP, NAC, STR)	↓ (PFC, HIP, NAC) Ø (STR)	Ø (PFC, HIP, NAC, STR)

↑ – wzrost ufosforylowanej formy kinazy białkowej ERK1/2; ↓ spadek ufosforylowanej formy kinazy białkowej ERK1/2; Ø – brak zmian.

HIP – hipokamp, NAC – jądro półleżące przegrody, PFC – kora przedczołowa, STR – grzbietowe prążkowie

Tabela 4. Rola kinazy białkowej ERK1/2 w uzależnieniu od kokainy – wyniki analiz behawioralnych i farmakologicznych z użyciem inhibitora kinazy uzyskane podczas realizacji projektu Naukowej Fundacji Polpharmy

Model/procedura doświadczalna	Samopodawanie kokainy	Odstawienie kokainy	Nawrót zachowań poszukiwawczych	
			kokaina (ip)	światło + dźwięk
Samopodawanie kokainy (iv); SL 327 podawany (6 dni) przed sesjami doświadczalnymi	↓	Ø	Ø	↓
Samopodawanie kokainy (iv); SL 327 podawany (6 dni) po sesjach doświadczalnych	Ø	Ø	Ø	↓
Samopodawanie kokainy (iv); SL 327 podawany (6 dni) przed sesjami doświadczalnymi w trakcie odstawienia		Ø	Ø	↓
Samopodawanie kokainy (iv); SL 327 podawany (6 dni) po sesjach doświadczalnych w trakcie odstawienia		Ø	↓	Ø

↓ – spadek; Ø – brak zmian

kontrolnymi otrzymującymi w sposób analogiczny rozpuszczalnik – liczby naciśnień na dźwignię aktywną. Co ciekawe, aplikowany przez 6 dni przed sesjami doświadczalnymi w fazie wygaszania, SL 327 osłabiał przywrócenie reakcji naciskania indukowanej bodźcem warunkowym, natomiast stosowany wielokrotnie po sesjach wygaszania, hamował nawrót wywołany przez obwodowe podanie kokainy (Tabela 4). Efekty SL 327 wydają się być specyficzne, gdyż ten inhibitor nie zmieniał liczby naciśnień na dźwignię nieaktywną i tylko nieznacznie zmniejszał podstawową aktywność lokomotoryczną u zwierząt naiwnych.

Wyniki uzyskane w tej części pracy pozostają w pewnej sprzeczności z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi, w których wykazano, że podanie inhibitora kinazy białkowej ERK1/2 przed kokainą w modelu sensytyzacji lokomotorycznej zahamowało lokomotoryczne odpowiedzi samej kokainy, jak i środowiska [16]. Warto jednak podkreślić, że modele samopodawania i warunkowa preferencja miejsca, pomimo iż oba stosowane w badaniach nad nagradzającymi własnościami

kokainy, różnią się sposobem aplikowania narkotyku (aktywne przez samo zwierzę vs. bierne przez eksperymentatora) oraz neuroanatomicznym podłożem zaangażowanym w taki efekt [2]. Być może te właśnie przyczyny powodują odmienną odpowiedź zwierząt po podaniu SL 327.

Reasumując, otrzymane w projekcie wyniki wskazują, że:

- Efekty nagradzające kokainy zależą od aktywności kinazy białkowej ERK1/2, ponieważ wielokrotne podawanie inhibitora kinazy przed sesjami doświadczalnymi spowodowało zmniejszenie liczby naciśnień na dźwignię aktywną i liczbę pobieranych porcji kokainy u szczurów.
- Blokada kinazy białkowej ERK1/2 w trakcie samopodawania kokainy i jej odstawienia nie odgrywa roli w przyspieszaniu wygaszenia zachowań poszukiwawczych u szczurów (brak znaczących zmian w liczbie naciśnień na dźwignię aktywną).

- Zablockowanie kinazy białkowej ERK1/2 w trakcie samopodawania kokainy nie wpływa na nawrót zachowań poszukiwawczych wywołanych podaniem kokainy u szczurów, a w związku z tym inhibitory tego enzymy tylko podawane w okresie intoksykacji kokainowej (czyli razem z kokainą) mogą stanowić potencjalne leki w farmakoterapii uzależnienia od tej substancji psychoaktywnej.
- Zablockowanie kinazy białkowej ERK1/2 w trakcie wygaszenia reakcji instrumentalnej zmniejsza nawrót do nałogu wywołany bodźcem warunkowym i bezwarunkowym (substancja uzależniająca).

ZESPÓŁ REALIZUJĄCY PROJEKT

W realizacji projektu brali udział: prof. dr hab. Edmund Przegaliński, dr Małgorzata Frankowska, mgr Joanna Miszkiewicz, Agata Suder oraz Ewa Nowak z Pracowni Farmakologii Uzależnień, Instytutu Farmakologii PAN, Kraków; prof. dr hab. Bogusława Budziszewska oraz mgr Jan Detka z Zakładu Neuroendokrynologii Doświadczalnej, Instytutu Farmakologii PAN, Kraków; dr Anita Rutkowska oraz mgr Agnieszka Pijanowska z Katedry Toksykologii, Wydziału Farmaceutycznego, UJ CM, Kraków.

PIŚMIENNICTWO

- Kostowski W, Herman Z. Farmakoterapia. Warszawa, Wydawnictwo Lekarskie PZWL; 2008. str. 227-31, ISBN 978-83-200-3726-5.
- Filip M, Zaniewska M, Frankowska M i wsp. The importance of the adenosine A(2A) receptor-dopamine D(2) receptor interaction in drug addiction. *Curr Med Chem* 2012;19: 317-55.
- Kostowski W. Podstawowe mechanizmy i teorie uzależnień. *Alkoholizm i Narkomania* 2006;19: 139-68.
- Girault JA, Valjent E, Caboche J, Herve D. ERK2: a logical AND gate critical for drug-induced plasticity? *Curr Opin Pharmacol* 2007;7: 77-85.
- Thomas MJ, Kalivas PW, Shaham Y. Neuroplasticity in the mesolimbic dopamine system and cocaine addiction. *Br J Pharmacol*, 2008;154: 327-42.
- Valjent E, Corvol JC, Pages C i wsp. Involvement of the extracellular signal-regulated kinase cascade for cocaine-rewarding properties. *J Neurosci* 2000;20: 8701-9.
- Valjent E, Pascoli V, Svenningsson P i wsp. Regulation of a protein phosphatase cascade allows convergent dopamine and glutamate signals to activate ERK in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102: 491-6.
- Fasano S, Pittenger C, Brambilla R. Inhibition of CREB activity in the dorsal portion of the striatum potentiates behavioral responses to drugs of abuse. *Front Behav Neurosci* 2009;3: 29.
- Radwanska K, Caboche J, Kaczmarek L. Extracellular signal-regulated kinases (ERKs) modulate cocaine-induced gene expression in the mouse amygdala. *Eur J Neurosci* 2005;22: 939-48.
- Radwanska K, Valjent E, Trzaskos J i wsp. Regulation of cocaine-induced activator protein 1 transcription factors by the extracellular signal-regulated kinase pathway. *Neuroscience* 2006;137: 253-64.
- Zhang L, Lou D, Jiao H i wsp. Cocaine-induced intracellular signaling and gene expression are oppositely regulated by the dopamine D1 and D3 receptors. *J Neurosci* 2004;24: 3344-54.
- Jiao H, Zhang L, Gao F i wsp. Dopamine D(1) and D(3) receptors oppositely regulate NMDA – and cocaine-induced MAPK signaling via NMDA receptor phosphorylation. *J Neurochem* 2007;103: 840-8.
- Corbille AG, Valjent E, Marsicano G i wsp. Role of cannabinoid type 1 receptors in locomotor activity and striatal signaling in response to psychostimulants. *J Neurosci* 2007;27: 6937-47.
- Marin MT, Berkow A, Golden SA i wsp. Context-specific modulation of cocaine-induced locomotor sensitization and ERK and CREB phosphorylation in the rat nucleus accumbens. *Eur J Neurosci* 2009;30: 1931-40.
- Edwards S, Graham DL, Bachtell RK, Self DW. Region-specific tolerance to cocaine-regulated cAMP-dependent protein phosphorylation following chronic self-administration. *Eur J Neurosci* 2007;25: 2201-13.
- Valjent E, Corbille AG, Bertran-Gonzalez J i wsp. Inhibition of ERK pathway or protein synthesis during reexposure to drugs of abuse erases previously learned place preference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103: 2932-7.
- Narasimhaiah R, Kamens HM, Picciotto MR. Effects of galanin on cocaine-mediated conditioned place preference and ERK signaling in mice. *Psychopharmacology* 2009;204: 95-102.
- Jenab S, Festa ED, Nazarian A i wsp. Cocaine induction of ERK proteins in dorsal striatum of Fischer rats. *Brain Res Mol Brain Res* 2005;142: 134-8.
- Berhow MT, Hiroi N, Nestler EJ. Regulation of ERK (extracellular signal regulated kinase), part of the neurotrophin signal transduction cascade, in the rat mesolimbic dopamine system by chronic exposure to morphine or cocaine. *J Neurosci* 1996;16: 4707-15.
- Yoon HS, Kim S, Park HK, Kim JH. Microinjection of CART peptide 55-102 into the nucleus accumbens blocks both the expression of behavioral sensitization and ERK phosphorylation by cocaine. *Neuropharmacology* 2007;53: 344-51.

21. Mattson BJ, Bossert JM, Simmons DE i wsp. Cocaine-induced CREB phosphorylation in nucleus accumbens of cocaine-sensitized rats is enabled by enhanced activation of extracellular signal-related kinase, but not protein kinase A. *J Neurochem* 2005;95: 1481-94.
22. Miller CA, Marshall JF. Molecular substrates for retrieval and reconsolidation of cocaine-associated contextual memory. *Neuron* 2005;47: 873-84.
23. Lee DK, Bian S, Rahman MA i wsp. Repeated cocaine administration increases N-methyl-D-aspartate NR1 subunit, extracellular signal-regulated kinase and cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation and glutamate release in the rat dorsal striatum. *Eur J Pharmacol* 2008;590: 157-62.
24. Lu L, Hope BT, Dempsey J i wsp. Central amygdala ERK signaling pathway is critical to incubation of cocaine craving. *Nat Neurosci* 2005;8: 212-9.
25. Berglind WJ, See RE, Fuchs RA i wsp. A BDNF infusion into the medial prefrontal cortex suppresses cocaine seeking in rats. *Eur J Neurosci* 2007;26:757-66.
26. Valjent E, Corvol JC, Trzaskos JM, i wsp. Role of the ERK pathway in psychostimulant-induced locomotor sensitization. *BMC Neurosci* 2006;7: 20.
27. Pierce RC, Pierce-Bancroft AF, Prasad BM. Neurotrophin-3 contributes to the initiation of behavioral sensitization to cocaine by activating the Ras/Mitogen-activated protein kinase signal transduction cascade. *J Neurosci* 1999;19: 8685-95.
28. Ferguson SM, Fasano S, Yang P i wsp. Knockout of ERK1 enhances cocaine-evoked immediate early gene expression and behavioral plasticity. *Neuropsychopharmacology* 2006;31: 2660-8.
29. Lu L, Dempsey J, Liu SY i wsp. A single infusion of brain-derived neurotrophic factor into the ventral tegmental area induces long-lasting potentiation of cocaine seeking after withdrawal. *J Neurosci* 2004;24: 1604-11.
30. Lu L, Uejima JL, Gray SM i wsp. Systemic and central amygdala injections of the mGluR(2/3) agonist LY379268 attenuate the expression of incubation of cocaine craving. *Biol Psychiatry* 2007; 61: 591-8.
31. Drummond DC, Tiffany ST, Glautier S, Remington B. Addictive behaviours: cue exposure theory and practice. West Sussex, England, Wiley; 1995.
32. de Wit H, Stewart J. Reinstatement of cocaine-reinforced responding in the rat. *Psychopharmacology* 1981;75: 134-43.
33. Filip M., Nowak E., Pijanowska A., Czyżyk J. An inhibitor of ERK1/2 kinase acts as a potent modulator of conditioned aspects of drug-seeking behaviour in rats. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 2011, 21, Suppl. 3, S589-S590. ***Publikacja powstała w wyniku realizacji grantu Naukowej Fundacji Polpharmy.***

W poszukiwaniu podłoża genetycznego astmy oskrzelowej z nadwrażliwością na aspirynę

In search of genetic background for aspirin-induced asthma

Dorota Kacprzak,
Rafał Pawliczak

Zakład Immunopatologii, Katedra Alergologii, Immunologii i Dermatologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Naukowa Fundacja Polpharmy w 2008 roku przyznała zespołowi pracującemu pod kierunkiem prof. dr hab. Rafała Pawliczaka grant na realizację projektu badawczego pt.: *Analiza ekspresji genów metodą whole genome scan w przebiegu astmy oskrzelowej z nadwrażliwością na aspirynę i niesteroidowe leki przeciwzapalne, astmy oskrzelowej bez nadwrażliwości, możliwości farmakologicznej interwencji i ewaluacji ryzyka.*

STRESZCZENIE

Nadwrażliwość na aspirynę charakteryzuje się szeregiem objawów klinicznych ze strony układu oddechowego, skóry i niekiedy przewodu pokarmowego pojawiających się w ciągu kilkunastu minut do kilku godzin po zażyciu aspiryny bądź innych niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Zaś astma obok przewlekłego zapalenia błony śluzowej oskrzeli i zatok obocznych nosa oraz polipów nosa stanowi główny element tzw. triady aspirynowej. Wiedza dotycząca patogenezy astmy aspirynowej jak dotąd przede wszystkim opiera się na farmakologicznym mechanizmie działania leku, a mianowicie hamowaniu enzymu kaskady kwasu arachidonowego – cyklooksygenazy (COX-1 i COX-2) i w konsekwencji zachwiania równowagi między syntezą eikozanoidów szlaku cyklooksygenazy o działaniu rozkurczającym mięśniówkę mięśni gładkich oskrzeli (PGE₂), a syntezą prozapalnych eikozanoidów szlaku lipooksygenazy (kwas 15-hydroksyeikozatetraenowy (15-HETE), leukotrieny cysteinylowe) z przewagą dla tych ostatnich. Jednakże teoria ta nie tłumaczy występowania nadwrażliwości na aspirynę tylko u niektórych pacjentów chorych na astmę oskrzelową. Dlatego też celem projektu było poszukiwanie przypuszczalnie odmiennego podłoża genetycznego pomiędzy chorymi na astmę aspirynową w porównaniu do astmatyków bez nadwrażliwości i osób zdrowych metodą *whole genome scan*.

Słowa kluczowe: astma aspirynowa • aspiryna • PBMC • mikromacierze • *whole genome scan*

Wpłynęło: 2013-08-30
Zaakceptowano: 2013-09-12
Opublikowano: 2013-12-31

Adres do korespondencji:

Prof. dr. hab. n. med. Rafał Pawliczak
Zakład Immunopatologii,
Katedra Alergologii,
Immunologii i Dermatologii
Uniwersytet Medyczny w Łodzi,
ul. Żeligowskiego 7/9, 90-752, Łódź,
Poland, e-mail: rafal.pawliczak@csk.umed.lodz.pl

ABSTRACT

Aspirin hypersensitivity is characterized by a number of clinical symptoms of respiratory, (sometimes gastrointestinal tract) and skin occurring within several minutes to a few hours after ingestion of aspirin or other nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Asthma next to chronic bronchial mucosa and nasal polyps is a major component of the aspirin triad. One hypothesis explaining the pathogenesis of aspirin induced asthma (AIA) is the cyclooxygenase theory. According to it, aspirin inhibits intracellular COX enzymes, inhibiting prostaglandin biosynthesis. In turn, inhibition of COX causes an imbalance between the synthesis of eicosanoids originating from the cyclooxygenase pathway,

which have smooth muscle relaxant properties, in favour of the synthesis of lipoxigenase pathway eicosanoids shrinking bronchitis (15 – hydroxyeicosatetraenoic acid (15-HETE), cysteinyl leukotriens – cysLTs). However, this theory does not explain the prevalence of aspirin hypersensitivity only in some patients with asthma. Therefore, the aim of the research was looking for possibly different genetic background between patients with AIA compared to asthmatic patients without aspirin hypersensitivity and healthy volunteers using *whole genome scan*.

Key words: aspirin hypersensitivity • aspirin • PBMC • microarrays • *whole genome scan*

WSTĘP

Prosta acetylowa pochodna kwasu salicylowego – aspiryna jest pierwszym lekiem uzyskanym w sposób syntetyczny, a nie wyizolowanym z surowców występujących w przyrodzie – stąd jej syntezę uznaje się za początek nowoczesnego przemysłu farmaceutycznego. Pomimo 110-letniej historii stosowana jest masowo jako środek przeciwbólowy, przeciwgorączkowy, przeciwzapalny, wykazujący właściwości przeciwzakrzepowe, a także ostatnio odkryte działanie przeciwnowotworowe.

Jednak obok wielu korzystnych właściwości farmakologicznych aspiryny znajdują się i takie, które mogą być przyczyną poważnych konsekwencji zdrowotnych jak np. astmy aspirynowej.

Astma oskrzelowa z nadwrażliwością na aspirynę jest niealergicznym fenotypem astmy charakteryzującym się dodatkowo przewlekłym, eozynofilowym nieżytu nosa i zatok przynosowych, często wraz z towarzyszącymi polipami nosa, w którym aspiryna nie jest czynnikiem inicjującym lecz zaostrzającym toczący się proces zapalny leżący u podłoża choroby astmatycznej. Szacuje się, że częstość występowania tej choroby w populacji ogólnej wynosi od 0,6-2,5% [1,2]. Natomiast w zależności od badanej populacji i zastosowanych metod diagnostycznych, w populacji osób dorosłych, chorych na astmę oskrzelową wraz z występującymi polipami nosa nawet do 21% [3]. Rodzinne występowanie tej jednostki chorobowej szacuje się na 1-6% przypadków [4,5].

Przebieg naturalny astmy oskrzelowej z nadwrażliwością na aspirynę (*aspirin-induced asthma*, AIA) jest charakterystyczną sekwencją objawów rozpoczynającą się między 3 a 4 dekadą życia od przewlekłego nieżytu nosa, przechodząc dalej w zapalenie zatok przynosowych i polipy nosa, kończąc na astmie oskrzelowej z nadwrażliwością na aspirynę lub inne niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ). Reakcja na leki pojawia się w przeciągu od kilkunastu minut do kilku godzin i obejmuje takie objawy jak skurcz oskrzeli, uczucie ucisku w klatce piersiowej, świsty, wodnisty wyciek z nosa, blo-

kada nosa, kichanie, świąd, łzawienie oczu, przekrwienie spojówek. Może również pojawić się pokrzywka, która obok astmy jest najczęstszą manifestacją nadwrażliwości. Zdarzają się także objawy ze strony układu pokarmowego takie jak: nudności, wymioty czy ból brzucha. Jednak najcięższą reakcją niepożądaną jest zagrożająca życiu wstrząs anafilaktyczny.

Jednoznaczne rozpoznanie nadwrażliwości na aspirynę opiera się jak na razie tylko na podstawie testów prowokacyjnych, gdzie „złotym standardem” pozostaje doustny test z aspiryną naśladujący naturalną ekspozycję, charakteryzujący się najwyższą czułością (89%) i specyficznością (93%) [6]. Jednakże zgodnie z wytycznymi European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) i Global Allergy and Asthma European Network (GA²LEN) w pierwszej kolejności zalecane jest przeprowadzenie próby inhalacyjnej lub donosowej. Jeśli zaś ich wynik pozostanie negatywny, a wywiad wskazuje na nadwrażliwość na NLPZ, wówczas konieczne jest przeprowadzenie próby doustnej celem postawienia ostatecznej diagnozy [6].

PATOGENEZA ASTMY ASPIRYNOWEJ

Według Prof. Szczeklika i wsp., pojawienie się skurczu oskrzeli wraz z pozostałymi objawami towarzyszącymi po podaniu aspiryny nie jest konsekwencją reakcji ze strony układu immunologicznego, a efektem farmakologicznym działania leku, jakim jest zahamowanie syntezy metabolitów kwasu arachidonowego szlaku cyklo-oxygenazy (COX) [7]. Enzym ten występuje w postaci dwóch izoform: konstytutywnej COX-1 i indukowanej w ciągu 2 do 6 godzin poprzez cytokiny, bodźce zapalne oraz czynniki wzrostu – COX-2. Za słusznością powyższej teorii przemawia fakt, że tylko te NLPZ, których mechanizm działania polega na hamowaniu przede wszystkim COX-1 i w dużo mniejszym stopniu COX-2, wywołują skurcz oskrzeli u chorych na AIA [8]. Aspiryna, acetylując serynę w pozycji 530 łańcucha aminokwasowego COX-1, powoduje zmianę konformacji białka. Zmieniona struktura przestrzenna centrum aktywnego

uniemożliwia interakcje enzymu z cząsteczką kwasu arachidonowego [9]. W konsekwencji dochodzi do zahamowania syntezy metabolitów kwasu arachidonowego szlaku cyklooksigenazy - prostaglandyn i tromboksanów [10-12]. Pomimo zablokowania szlaku cyklooksigenazowego kwas arachidonowy pozostaje źródłem eikozanoidów powstających przy udziale lipoksygenaz i cytochromu P450. COX-1 i COX-2 różnią się wrażliwością na hamowanie przez aspirynę ze względu na odmienną budowę centrum aktywnego. Obecność w COX-2 waliny zamiast izoleucyny w pozycji 523 łańcucha aminokwasowego sprawia, że kanał centrum aktywnego tej izoformy enzymu jest szerszy i jego acetylacja zmienia jedynie specyficzność reakcji [13]. Zatem acetylacja COX powoduje zachwianie równowagi między syntezą eikozanoidów szlaku cyklooksigenazy o działaniu rozkurczającym mięśniówkę gładką oskrzeli (PGE₂), a syntezą eikozanoidów szlaku lipoksygenazy kurczącymi oskrzelą (15-HETE, LTB₄, leukotrieny cysteinylowe), na korzyść tych ostatnich. I tak też, u pacjentów chorych na astmę związaną z nadwrażliwością na aspirynę - w porównaniu z pacjentami chorymi na astmę, tolerującymi aspirynę - stwierdzano większe stężenia leukotrienów cysteinylowych i ich metabolitów w moczu, w popłuczynach oskrzelikowo - pęcherzykowych (ang. *bronchoalveolar lavage fluid*, BAL), w kondensacie powietrza wydechowego, a także w popłuczynach nosowych [14-17]. Ortolan i wsp. wykazali wzrost stężenia LTC₄ w popłuczynach nosowych po prowokacji donosowej z aspiryną u pacjentów z triadą aspirynową [18]. Ferreri i wsp. [19], podczas prowokacji doustnej, obok wzrostu stężenia LTC₄ opisali spadek syntezy PGE₂. Zespoły Pawliczak, Kowalski i wsp. [15] oraz Picado i wsp. [20] otrzymały podobne wyniki dotyczące wzrostu stężenia leukotrienów cysteinylowych w popłuczynach nosowych po prowokacji z aspiryną. Ponadto w wyniku inkubacji z aspiryną zaobserwowano wzrost wytwarzania 15-HETE tylko przez komórki nabłonka nosa i leukocyty krwi obwodowej pochodzące od osób nadwrażliwych na ASA [21].

Kolejną obserwacją poczynioną u pacjentów nadwrażliwych na aspirynę jest zmniejszone wytwarzanie lipoksyn (*lipoxin*, LX) – innych metabolitów kwasu arachidonowego o działaniu przeciwzapalnym, naturalnych antagonistów prostaglandyn i leukotrienów. Aspiryna acetyluje COX-2, przekierowuje jej aktywność katalityczną z wytwarzania prostaglandyn i tromboksanu na produkcję 15-epi-lipoksyny A₄, czyli ATL (*aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4*). Obecność ATL wykazano również u osób, którym nie podano aspiryny, co wskazuje, że COX-2 może być acetylowane poprzez endogenne czynniki acetylujące np. 15-HETE i/lub ATL, sugerując dodatkowy związek ze ścieżką cytochromu P450. Jednakże, u osób chorych na astmę ciężką stężenie lipoksyny A₄ jest bardzo niskie, podobnie jest u pacjentów chorych na astmę z nadwrażliwością na ASA,

w porównaniu do pacjentów chorych na astmę oskrzelową z tolerancją na aspirynę [22,23].

Ostatnio w literaturze poświęca się dużo uwagi markerom stresu oksydacyjnego, który jak wiadomo obok przewlekłego procesu zapalnego jest ważnym elementem patogenezy astmy. W przypadku AIA niezwykle ważne jest zwrócenie uwagi na 8-izoprostany, syntetyzowane z kwasu arachidonowego w reakcji peroksydacji, na drodze niezależnej od COX, których zwiększoną produkcję stwierdzono w kondensacie wydychanego powietrza u astmatyków z nadwrażliwością na aspirynę, nie leczonych glikokortykosteroidami w porównaniu do pacjentów chorych na astmę oskrzelową z nadwrażliwością na ASA z włączoną steroidoterapią i osób zdrowych [24]. W tym samym badaniu wykazano istotną korelację dodatnią pomiędzy 8-izo-PGF_{2α} i cysLTs w kondensacie wydychanego powietrza u chorych z AIA zwracając uwagę na możliwą zależność dwóch odrębnych procesów: stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego.

Ponieważ jedynie u osób z AIA aspiryna wywołuje niealergiczną reakcję nadwrażliwości, można by postulować istnienie w tej grupie chorych pewnych wyjściowych, genetycznych odrębności w metabolizmie kwasu arachidonowego. Dlatego też celem badania było określenie czy i jak zmienia się ekspresja genów w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC) pacjentów chorych na astmę oskrzelową z nadwrażliwością na aspirynę po inkubacji z aspiryną lizynową w porównaniu z pacjentami chorymi na ciężką postać astmy oskrzelowej bez nadwrażliwości na ASA oraz z osobami zdrowymi, a także jakie znaczenie w patogenezie astmy z nadwrażliwością na ASA mogą mieć ewentualne produkty tych genów w odniesieniu do aplikacji diagnostycznych, klinicznych i farmakologicznych.

ANALIZA EKSPRESJI GENÓW W KOMÓRKACH KRWI OBWODOWEJ OSÓB CHORYCH NA ASTMĘ ASPIRYNOWĄ METODĄ *WHOLE GENOME SCAN* – OBECNY STAN WIEDZY

Wyniki dotychczas opublikowanych badań dotyczących różnych chorób w tym układu immunologicznego wskazują, że analiza ekspresji genów w komórkach krwi obwodowej pozwala na określenie specyficznego profilu ekspresji genów. Zaś w celu jego oznaczenia niewątpliwie użytecznym narzędziem badawczym od końca lat 90tych ubiegłego wieku pozostają mikromacierze cDNA, które pozwalają na jednoczesną analizę dziesiątek tysięcy transkryptów. Popularność tej metody jest nie tylko rezultatem jej szerokich możliwości aplikacyjnych, ale również zasobów uzyskiwanych informacji. Jednakże przygotowując eksperyment mikromacierzowy trzeba liczyć się z niezwykle trudną interpretacją

wyników ze względu na możliwość powstawania „szumów” mogących zagłuszyć prawidłowy obraz profilu ekspresji badanych genów. Dlatego też coraz częściej w literaturze rozważana jest kwestia walidacji mikromacierzy przede wszystkim na poziomie mRNA poprzez *real time* PCR. Wykazano, że korelacja pomiędzy wynikami mikromacierzy i RT-PCR, których ekspresja ulega zmianie więcej niż 2-krotnie jest często silna i zbliżona do 90% [25]. Natomiast częstym jest zanik tej korelacji pomiędzy wynikami otrzymanymi obiema metodami w sytuacji, gdy wynik z analizy mikromacierzy sugeruje niższy niż dwukrotną zmianę w poziomie ekspresji badanego genu, np. dla 1,4-krotnej zmiany w poziomie regulacji genu korelacja ta wynosi już tylko 40% [26]. Istnieje również możliwość sprawdzenia uzyskanych rezultatów na poziomie proteomu wykorzystując np. metodę Western blot. Zważywszy jednak na niecałkowitą korelację pomiędzy ekspresją na poziomie proteomu, a ekspresją na poziomie transkryptomu, często nie obserwuje się oczekiwanych ilościowych zmian na poziomie białka, które korespondowałyby z otrzymanymi danymi mikromacierzowymi [27].

Biorąc pod uwagę rozwój badań naukowych w obszarze astmy oskrzelowej z nadwrażliwością na aspirynę wykorzystujących eksperymenty mikromacierzowe nie można stwierdzić, że jest to kierunek wystarczająco perspektywny. W latach 2005 – 2012 w literaturze pojawiły się zaledwie 3 badania z użyciem mikromacierzy, których celem była analiza profilu ekspresji genów w krwi obwodowej u chorych na AIA w porównaniu do ATA, w tym 2 badania były zwalidowane metodą RT-PCR. Jedno z tych badań wykonano również z zamiarem porównania profilu ekspresji genów w polipach nosa u chorych na AIA do profilu genetycznego przewlekłego zapalenia zatok. Warto wspomnieć, iż w chwili rozpoczęcia projektu opublikowano wnioski z 2 badań naukowych bazujących na danych uzyskanych za pomocą mikromacierzy (Tabela 1).

Devouassoux i wsp. [28] badając ekspresję ponad 22.000 genów w krwi obwodowej potwierdzili zmianę 1 z nich,

a mianowicie genu kodującego galaktynę-10 – wykazano bowiem istotnie statystyczny, około dwukrotny wzrost ekspresji galaktyny-10 u osób chorych na astmę oskrzelową z nadwrażliwością na aspirynę w porównaniu do astmatyków bez nadwrażliwości i osób zdrowych. Jednakże, wyniki te nie zostały potwierdzone w innym, niezależnym badaniu, w którym wskazano na wręcz mniejszą ekspresję galaktyny-10 w PBMC u pacjentów z AIA w porównaniu do ATA i osób zdrowych [29]. Udowodniony zaś został istotnie statystyczny wzrost ekspresji galaktyny-10 w popłuczynach z nosa pochodzących od pacjentów z AIA w porównaniu do ATA [29]. Galaktyna-10, zwana również kryształem Charcota-Leydena (CLC), należy do rodziny wiążących β -galaktozydy lektyn produkowanych przez takie komórki układu immunologicznego zaangażowane w procesy alergiczne jak eozynofile, bazofile, limfocyty T CD4⁺CD25⁺ (T_{reg}) [30-32]. Pomimo, że dokładna funkcja tego białka nie została opisana, przypuszcza się, że ekspresja CLC jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania limfocytów regulatorowych [31], „strażników” tolerancji obwodowej, hamujących działanie limfocytów pomocniczych, jak i wydzielanie przez nie cytokin prozapalnych [33,34]. Dowiedzono także, że zmienność genetyczna w obrębie promotora CLC u osób chorych na alergiczny nieżyt nosa w porównaniu do osób zdrowych ma wpływ na regulację transkrypcji i skutkuje zwiększonym poziomem ekspresji genu [35].

W drugim badaniu mikromacierzowym mającym na celu analizę ekspresji genów w PBMC u pacjentów z AIA w porównaniu do ATA, spośród 34.560 badanych transkryptów 2 geny spełniające kryteria $p < 0,001$ i ≥ 8 -krotny *fold change* zostały potwierdzone za pomocą RT-PCR – CNKSR3 i SPTBN2 [36]. Jednakże, żaden z tych genów nie wykazał powiązania ze stanem zapalnym, aktywnością układu immunologicznego czy fenotypem astmy aspirynowej.

W badaniu Sekigawa i wsp. [37] analizującym zmiany w profilu ekspresji genów w polipach nosa u astmatyków nadwrażliwych na aspirynę porównując go do

Tabela 1. Tabela 1. Stan wiedzy w chwili rozpoczęcia projektu – analiza ekspresji genów we krwi obwodowej u osób chorych na astmę oskrzelową z nadwrażliwością na aspirynę w porównaniu do pacjentów z astmą oskrzelową bez nadwrażliwości i zdrowych ochotników.

Autorzy	Liczność grup (n = mikromacierze+RT-PCR)	Warunki stymulacji z aspiryną	Wyniki
Choi S i wsp.	AIA n=1+0 ATA n=1+0	PBMCs inkubowane 1h z aspiryną lizynową o stężeniu 50µg/ml	Spośród niemal 4000 transkryptów znaleziono 19 genów, których ekspresja różniła się w sposób istotny statystycznie pomiędzy AIA i ATA
Devouassoux G i wsp. (5)	AIA n=13+15 ATA n=13+25 ZDROWI n=0+27	PB bez stymulacji aspiryną	Spośród około 22000 transkryptów przedstawiono 1 (Galaktyna - 10), którego ekspresja różniła się w sposób istotny statystycznie pomiędzy AIA vs. ATA

profilu ekspresji genów u chorych na przewlekłe zapalenie zatok, spośród 146 genów zaangażowanych w proces zapalny potwierdzono istotnie statystyczną zmianę 2 z nich – *INDO* i *IL1R2*. Zaobserwowano ponad 4-krotny wzrost ekspresji *INDO* i około 2,5-krotny wzrost ekspresji *IL1R2* u pacjentów z AIA w porównaniu do osób z przewlekłym zapaleniem zatok. *INDO* koduje enzym 2,3-dioksydazę indoloaminy zaangażowaną w katabolizm tryptofanu do kinureniny, zaś degradacja tryptofanu w makrofagach skutkuje inhibicją proliferacji limfocytów T [38]. Aktywacja *INDO* następuje pod wpływem interferonów (IFNs) i cytokin prozapalnych tj. IL1 [39], zaś supresja pod wpływem takich czynników jak TGF- β i IL4 [40,41]. Wykazano również, że stymulacja komórek jednojądrzastych krwi obwodowej osób zdrowych aspiryną wywiera efekt inhibujący na IFN- γ a tym samym na *INDO* hamując degradację tryptofanu [42]. Z kolei, w normalnych warunkach *IL1R2* jest odpowiedzialny za hamowanie przyłączania się IL1 do receptora w ludzkich monocytach powodując zmniejszenie aktywności COX-2, nie wywierając wpływu na COX-1 [43]. Zaś w przypadku osób chorych na astmę oskrzelową z nadwrażliwością na aspirynę wykazano istnienie form polimorficznych (SNPs, *single nucleotide polymorphisms*) genów *INDO* i *IL1R2*, które prawdopodobnie wpływają na zmianę regulacji ich transkrypcji [37].

ANALIZA EKSPRESJI GENÓW W KOMÓRKACH JEDNOJĄDRZASTYCH KRWI OBWODOWEJ OSÓB CHORYCH NA ASTMĘ ASPIRYNOWĄ METODĄ WHOLE GENOME SCAN – WYNIKI BADAŃ WŁASNYCH

Objawy astmy oskrzelowej z nadwrażliwością na aspirynę nie są konsekwencją aktywacji układu immunologicznego przez aspirynę, a jedynie jej farmakologiczną właściwością wpływającą na zablokowanie syntezy prostaglandyn. W zgodzie z tym, wyniki badań własnych dotyczących analizy globalnych profili ekspresji genów w PBMC u osób z astmą aspirynową z wykorzystaniem techniki mikromacierzy częściowo potwierdzają tę tezę.

Rozpoznanie astmy u chorych potwierdzono w oparciu o wytyczne GINA 2006. U chorych przeprowadzony został także wywiad w kierunku alergii, zaburzeń w obrębie klatki piersiowej, w tym niedawnych infekcji dróg oddechowych oraz w kierunku palenia tytoniu. U wszystkich chorych w celu zmierzenia funkcji płuc została wykonana spirometria. Wszyscy pacjenci zostali także poddani testom skórnym z zestawem powszechnych aeroalergenów. Chorzy na astmę oskrzelową uczestnicy badania zostali także poproszeni przed wykonaniem spirometrii o nieprzyjmowanie broncho-

dilatatorów przynajmniej 8 godzin przed badaniem, przy zachowaniu przyjmowania wziewnych lub systemowych glikokortykosteroidów. Bronchospastyczna postać nadwrażliwości na aspirynę była definiowana zgodnie z wytycznymi EAACI/GA²LEN. Wszyscy pacjenci chorzy na astmę oskrzelową z nadwrażliwością na aspirynę zostali włączeni do badania, jeżeli mieli dodatnią doustną próbę prowokacyjną z aspiryną w ciągu ostatnich 6 miesięcy przed rozpoczęciem projektu. Zaś pacjenci chorzy na astmę tolerujący aspirynę, oraz osoby zdrowe z grupy kontrolnej, zostali zakwalifikowani do badania, jeżeli mieli negatywny wywiad w kierunku aspiryny i innych NLPZ również w ciągu, co najmniej ostatnich 6 miesięcy przed rozpoczęciem projektu.

Od pacjentów pobrano po 54 ml krwi obwodowej, a następnie wyizolowano leukocyty na drodze rozdzielania w gradiencie stężeń. Komórki zostały zastymulowane zarówno roztworem aspiryny lizynowej o stężeniu 2 μ M, jak i roztworem lizyny o stężeniu 20 μ M jako kontrolą negatywną (37°C, 30 min), po czym wyizolowano z nich całkowite RNA i przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji celem uzyskania cDNA do dalszych etapów doświadczenia – mikromacierzy i RT-PCR.

Analiza statystyczna wyników pochodzących z mikromacierzy pozwoliła na:

- znalezienie 344 genów, których różnica w ekspresji pomiędzy grupą pacjentów chorych na astmę oskrzelową z nadwrażliwością na ASA i pacjentów chorych na astmę bez nadwrażliwości była zmieniona w sposób istotny statystycznie. Z grupy tej wyszczególniono 24 geny, których ekspresja genów po inkubacji z ASA była zmieniona istotnie statystycznie dwa lub więcej razy w porównaniu do kontroli;
- znalezienie 501 genów, których różnica w ekspresji była zmieniona w sposób istotnie statystyczny pomiędzy pacjentami chorymi na astmę oskrzelową z nadwrażliwością na aspirynę, a ochotnikami zdrowymi, przy czym 69 genów wykazało zmianę ekspresji co najmniej dwukrotnie;
- znalezienie 488 genów, których różnica w ekspresji była zmieniona w sposób istotnie statystyczny pomiędzy pacjentami chorymi na astmę oskrzelową bez nadwrażliwości na aspirynę i ochotnikami zdrowymi, z czego dla 33 genów różnica ta zmieniła się co najmniej dwukrotnie.

Do kolejnego etapu projektu wyodrębniono zatem 18 genów, których zmiana ekspresji pomiędzy dwoma wybranymi grupami (AIA vs ATA – *BMP2*, *CSF1*, *DOCK9*, *GAB3*, *MARVELD1*, *TRIP6*; AIA vs ZDROWI – *CD1A*, *CNPY3*, *CXCL11*, *ERAS*, *FOSL1*, *FOXF1*, *KLHDC2*, *MAPIS*, *MARVELD1*, *PARVG*, *PTPRB*, *TLR7*) była co najmniej dwukrotna i których udział w procesach zapalnych został potwierdzony w literaturze.

Jednakże, różnice te nie zostały potwierdzone za pomocą badania RT-PCR tj. nie wykazano istotnych statystycznie różnic w ekspresji genów po stymulacji aspiryną lizynową w porównaniu do lizyny jako kontroli negatywnej. Dlatego też, dane uzyskane w trakcie realizacji projektu można podsumować następująco:

Ekspozycja na aspirynę nieznacznie zmienia globalne profile ekspresji genów u osób z AIA w PBMC w relacji do grup kontrolnych: ATA i osób zdrowych. Jednakże wśród tych profili nie znaleziono genów mających związek z fenotypem choroby, których zmiana zostałaby potwierdzona na poziomie mRNA i okazałaby się istotna statystycznie.

Brak istotnych różnic w profilu ekspresji genów w PBMC pomiędzy osobami chorymi na AIA, a grupą pacjentów chorych na ATA i osobami zdrowymi po stymulacji aspiryną może również świadczyć o tym, że nadwrażliwość na aspirynę nie ma charakteru systemowego, ogólnoustrojowego, ponieważ w tym przypadku PBMCs nie odzwierciedlają procesów zapalnych zachodzących podczas ekspozycji na lek. Warto nadmienić, że w literaturze większość badań naukowych analizujących podłoże genetyczne w astmie aspirynowej obserwuje potwierdzone, istotnie statystyczne zmiany ekspresji pojedynczych genów badając np. popłuczyny z nosa, wycinki z polipów nosa co sugeruje charakter miejscowy tej jednostki chorobowej.

WNIOSKI

Patogeneza astmy oskrzelowej z nadwrażliwością na aspirynę niewątpliwie dalej będzie pozostawać w obszarze zainteresowań badaczy i inspiracją do poszukiwania coraz to bardziej wyrafinowanych odpowiedzi. Jak dotąd wiadomo, że objawy nadwrażliwości na aspirynę nie korelują z upośledzeniem funkcjonowania układu immunologicznego, ani też jak dowiedliśmy nie mają związanego z tym podłoża genetycznego. Możliwe, że sama aspiryna nie powoduje znacznych zmian na poziomie mRNA lecz w dalszej obróbce potranskrypcyjnej i po translacji oraz mo-

dyfikacji białek. Dlatego też, niezwykle ważne byłoby sprawdzenie przedstawionych tendencji metodą *whole proteome analysis* za pomocą chociażby mikromacierzy białkowych, zarówno przed jak i po stymulacji aspiryną PBMCs pacjentów z AIA *versus* ATA i zdrowi. Niewątpliwie dalsza obserwacja interakcji wybranych białek mogłaby wnieść duży wkład w konstrukcji molekularnych szlaków sygnałowych wyjaśniających patomechanizm powstawania nadwrażliwości na aspirynę.

OSOBY BIORĄCE UDZIAŁ W REALIZACJI PROJEKTU BADAWCZEGO

Prof. dr hab. n. med. Rafał Pawliczak, Prof. dr hab. Andrzej Bednarek, Dr n. med. Joanna Wieczfńska, Dr n. med. Milena Sokołowska, Dr n. med. inż. Karolina Pospiech, Dr n. med. Izabela Kupryś- Lipińska, Dr n. med. Magdalena Nowakowska, Dr n. med. Emilia Łuczak, Mgr inż. Dorota Kacprzak.

PRACE, KTÓRE POWSTAŁY W WYNIKU REALIZACJI BADAŃ FINANSOWANYCH Z GRANTU FUNDACJI

Komunikaty zjazdowe:

„Microarray studies of genes involved in pathogenesis of aspirin-induced asthma” zaprezentowany podczas sesji plakatowej EAACI 11th Immunology Winter School w Pichl (Austria) w dniach 27-30 stycznia 2013 roku

“High – throughput functional analysis of genes involved in aspirin-induced asthma”, prezentacja ustna odbyła się podczas EAACI & WAO World Allergy & Asthma Congress w Mediolanie (Włochy) w dniach 22-26 czerwca 2013 roku

“Microarray studies as a useful tool for identifying genes involved in aspirin-induced asthma” zaprezentowany podczas sesji plakatowej EAACI Allergy School “The place of omics in the diagnostic lab update on allergy & clinical immunology laboratory methods” w Greiswald (Niemcy) w dniach 7-11 października 2013 roku

Tabela 2. Co przyniosła realizacja grantu Naukowej Fundacji Polpharmy – Analiza ekspresji genów w krwi obwodowej u osób chorych na astmę oskrzelową z nadwrażliwością na aspirynę w porównaniu do pacjentów z astmą oskrzelową bez nadwrażliwości i zdrowych ochotników.

Liczebność grup (n= mikromacierze+RT-PCR)	Warunki stymulacji z aspiryną	Wyniki
AIA n=6+5 ATA n=3+4 ZDROWI n=4+11	PBMCs inkubowane 0,5h z aspiryną lizynową o stężeniu 2µM (37°C)	Pośród niemal 35000 transkryptów nie znaleziono genu związanego z fenotypem choroby, którego zmiana okazałaby się istotna statystycznie pomiędzy AIA vs ATA, zdrowi po zastosowaniu mikromacierzy i RT-PCR

LITERATURA

- Gomes E, Cardoso MF, Praca F, et al. Self-reported drug allergy in a general adult Portuguese population. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2004;34(10):1597-601.
- Kasper L, Sladek K, Duplaga M, et al. Prevalence of asthma with aspirin hypersensitivity in the adult population of Poland. *Allergy*. 2003;58(10):1064-6.
- Jenkins C, Costello J, Hodge L. Systematic review of prevalence of aspirin induced asthma and its implications for clinical practice. *Bmj*. 2004;328(7437):434.
- Szczeklik A, Nizankowska E, Duplaga M. Natural history of aspirin-induced asthma. AIANE Investigators. European Network on Aspirin-Induced Asthma. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*. 2000;16(3):432-6.
- Berges-Gimeno MP, Simon RA, Stevenson DD. The natural history and clinical characteristics of aspirin-exacerbated respiratory disease. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2002;89(5):474-8.
- Nizankowska-Mogilnicka E, Bochenek G, Mastalerz L, et al. EAACI/GA2LEN guideline: aspirin provocation tests for diagnosis of aspirin hypersensitivity. *Allergy*. 2007;62(10):1111-8.
- Szczeklik A, Gryglewski RJ, Czerniawska-Mysik G. Relationship of inhibition of prostaglandin biosynthesis by analgesics to asthma attacks in aspirin-sensitive patients. *British medical journal*. 1975;1(5949):67-9.
- Szczeklik A, Nizankowska E, Bochenek G, et al. Safety of a specific COX-2 inhibitor in aspirin-induced asthma. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2001;31(2):219-25.
- Thuresson ED, Lakkides, K. M., Rieke, C. J., Sun, Y., Wingerd, B. A., Micielli, R., Mulichak, A. M., Malkowski, M. G., Garavito, R. M., Smith, W. L. Prostaglandin endoperoxide H synthase-1: the functions of cyclooxygenase active site residues in the binding, positioning, and oxygenation of arachidonic acid. *J Biol Chem*. 2001;276(13):10347-57.
- Szczeklik A, Gryglewski RJ, Czerniawska-Mysik G. Clinical patterns of hypersensitivity to nonsteroidal anti-inflammatory drugs and their pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol*. 1977;60(5):276-84.
- Toogood JH. Aspirin intolerance, asthma, prostaglandins, and cromolyn sodium. *Chest*. 1977;72(2):135-7.
- Szczeklik A. Mechanism of aspirin-induced asthma. *Allergy*. 1997;52(6):613-9.
- Mancini JA, Vickers, P. J., O'Neill, G. P., Boily, C., Falgueryret, J. P., Riendeau, D. Altered sensitivity of aspirin-acetylated prostaglandin G/H synthase-2 to inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Mol Pharmacol*. 1997;51(1):52-60.
- Kumlin M, Dahlen, B., Bjorck, T., Zetterstrom, O., Granstrom, E., Dahlen, S. E. Urinary excretion of leukotriene E4 and 11-dehydro-thromboxane B2 in response to bronchial provocations with allergen, aspirin, leukotriene D4, and histamine in asthmatics. *Am Rev Respir Dis*. 1992;146(1):96-103.
- Kowalski ML, Sliwinska-Kowalska, M., Igarashi, Y., White, M. V., Wojciechowska, B., Brayton, P., Kaulbach, H., Rozniecki, J., Kaliner, M. A. Nasal secretions in response to acetylsalicylic acid. *J Allergy Clin Immunol*. 1993;91(2):580-98.
- Sladek K, Dworski, R., Soja, J., Sheller, J. R., Nizankowska, E., Oates, J. A., Szczeklik, A. Eicosanoids in bronchoalveolar lavage fluid of aspirin-intolerant patients with asthma after aspirin challenge. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;149(4 Pt 1):940-6.
- Antczak A, Montuschi, P., Kharitonov, S., Gorski, P., Barnes, P. J. Increased exhaled cysteinyl-leukotrienes and 8-isoprostane in aspirin-induced asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166(3):301-6.
- Ortolani C, Mirone, C., Fontana, A., Folco, G. C., Miodonna, A., Montalbetti, N., Rinaldi, M., Sala, A., Tedeschi, A., Valente, D. Study of mediators of anaphylaxis in nasal wash fluids after aspirin and sodium metabisulfite nasal provocation in intolerant rhinitic patients. *Ann Allergy*. 1987;59(5 Pt 2):106-12.
- Ferreri NR, Howland, W. C., Stevenson, D. D., Spiegelberg, H. L. Release of leukotrienes, prostaglandins, and histamine into nasal secretions of aspirin-sensitive asthmatics during reaction to aspirin. *Am Rev Respir Dis*. 1988;137(4):847-54.
- Picado C, Ramis, I., Rosello, J., Prat, J., Bulbena, O., Plaza, V., Montserrat, J. M., Gelpi, E. Release of peptide leukotriene into nasal secretions after local instillation of aspirin in aspirin-sensitive asthmatic patients. *Am Rev Respir Dis*. 1992;145(1):65-9.
- Kowalski ML, Pawliczak, R., Wozniak, J., Siuda, K., Poniatowska, M., Iwaszkiewicz, J., Kornatowski, T., Kaliner, M. A. Differential metabolism of arachidonic acid in nasal polyp epithelial cells cultured from aspirin-sensitive and aspirin-tolerant patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(2 Pt 1):391-8.
- Sanak M, Levy, B. D., Clish, C. B., Chiang, N., Gronert, K., Mastalerz, L., Serhan, C. N., Szczeklik, A. Aspirin-tolerant asthmatics generate more lipoxins than aspirin-intolerant asthmatics. *Eur Respir J*. 2000;16(1):44-9.
- Kupczyk M, Antczak A, Kuprys-Lipinska I, et al. Lipoxin A4 generation is decreased in aspirin-sensitive patients in lysine-aspirin nasal challenge in vivo model. *Allergy*. 2009;64(12):1746-52.
- Antczak A, Montuschi P, Kharitonov S, et al. Increased exhaled cysteinyl-leukotrienes and 8-isoprostane in aspirin-induced asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2002;166(3):301-6.
- Dallas PB, Gottardo NG, Firth MJ, et al. Gene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR -- how well do they correlate? *BMC genomics*. 2005;6:59.

26. Morey JS, Ryan JC, Van Dolah FM. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biological procedures online*. 2006;8:175-93.
27. Rajeevan MS, Ranamukhaarachchi DG, Vernon SD, et al. Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies. *Methods*. 2001;25(4):443-51.
28. Devouassoux G, Pachot A, Laforest L, et al. Galectin-10 mRNA is overexpressed in peripheral blood of aspirin-induced asthma. *Allergy*. 2008;63(1):125-31.
29. Negrete-Garcia MC, Jimenez-Torres CY, Alvarado-Vasquez N, et al. Galectin-10 is released in the nasal lavage fluid of patients with aspirin-sensitive respiratory disease. *TheScientificWorldJournal*. 2012;2012:474020.
30. Giembycz MA, Lindsay MA. Pharmacology of the eosinophil. *Pharmacological reviews*. 1999;51(2):213-340.
31. Kubach J, Lutter P, Bopp T, et al. Human CD4+CD25+ regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin-10 as a novel marker essential for their anergy and suppressive function. *Blood*. 2007;110(5):1550-8.
32. Ackerman SJ, Weil GJ, Gleich GJ. Formation of Charcot-Leyden crystals by human basophils. *The Journal of experimental medicine*. 1982;155(6):1597-609.
33. Dieckmann D, Bruett CH, Ploettner H, et al. Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]. *The Journal of experimental medicine*. 2002;196(2):247-53.
34. Jonuleit H, Schmitt E, Kakirman H, et al. Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *The Journal of experimental medicine*. 2002;196(2):255-60.
35. Bryborn M, Hallden C, Sall T, et al. CLC- a novel susceptibility gene for allergic rhinitis? *Allergy*. 2010;65(2):220-8.
36. Shin S, Park JS, Kim YJ, et al. Differential gene expression profile in PBMCs from subjects with AERD and ATA: a gene marker for AERD. *Molecular genetics and genomics : MGG*. 2012;287(5):361-71.
37. Sekigawa T, Tajima A, Hasegawa T, et al. Gene-expression profiles in human nasal polyp tissues and identification of genetic susceptibility in aspirin-intolerant asthma. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2009;39(7):972-81.
38. Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, et al. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *The Journal of experimental medicine*. 1999;189(9):1363-72.
39. Babcock TA, Carlin JM. Transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in interferon-treated epithelial cells. *Cytokine*. 2000;12(6):588-94.
40. Yuan W, Collado-Hidalgo A, Yufit T, et al. Modulation of cellular tryptophan metabolism in human fibroblasts by transforming growth factor-beta: selective inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA synthetase gene expression. *Journal of cellular physiology*. 1998;177(1):174-86.
41. MacKenzie CR, Gonzalez RG, Kniep E, et al. Cytokine mediated regulation of interferon-gamma-induced IDO activation. *Advances in experimental medicine and biology*. 1999;467:533-9.
42. Schroecksnadel K, Frick B, Winkler C, et al. Aspirin downregulates homocysteine formation in stimulated human peripheral blood mononuclear cells. *Scandinavian journal of immunology*. 2005;62(2):155-60.
43. Porreca E, Reale M, Di Febbo C, et al. Down-regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) by interleukin-1 receptor antagonist in human monocytes. *Immunology*. 1996;89(3):424-9.

Związek zmienności występującej w całym genomie (Genome-wide association) ze stopniem przerostu mięśnia lewej komory serca u chorych ze zwężeniem zastawki aortalnej oraz z jego regresją po operacji wszczepienia zastawki aortalnej

Impact of genetic variation on myocardial hypertrophy in patients with aortic valve stenosis and on its regression after aortic valve replacement surgery. A whole genome approach

Grzegorz Placha¹,
Ewa Orłowska-
Baranowska²

¹ Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych Nadciśnienia Tętniczego i Angiologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

² Klinika Wad Nabytych Serca, Instytut Kardiologii, Warszawa

Naukowa Fundacja Polpharmy w 2009 roku przyznała zespołowi pracującemu pod kierunkiem dr Grzegorza Placha grant na realizację projektu badawczego pt.: *Wpływ zmienności występującej w całym genomie (Genome-wide association) na stopień przerostu mięśnia lewej komory serca u chorych ze zwężeniem zastawki aortalnej oraz na jego regresję po operacji wszczepienia zastawki aortalnej.*

STRESZCZENIE

Objawowe zwężenie zastawki aortalnej (trzeciej pod względem częstości patologii układu sercowo naczyniowego) powoduje przerost mięśnia lewej komory serca, który jest niezależnym czynnikiem ryzyka zgonu. Z uwagi na brak korelacji między stopniem zwężenia zastawki aortalnej a przerostem mięśnia lewej komory serca wysunięto hipotezę, że jest on uwarunkowany czynnikami genetycznymi. Po operacji wymiany zastawki następuje redukcja zwiększonej masy lewej komory, ale istnieje grupa chorych, u których nie dochodzi do regresji przerostu. Niepełna redukcja przerostu jest przyczyną upośledzenia funkcji rozkurczowej lewej komory, co prowadzi do niewydolności krążenia oraz zwiększa prawdopodobieństwo zgonu z przyczyn sercowych. Można wysunąć hipotezę, że dynamika i stopień redukcji przerostu mięśnia lewej komory są również determinowane przez czynniki genetyczne. Celem projektu było określenie wpływu zmienności genetycznej występującej w całym genomie na stopień przerostu mięśnia lewej komory serca u chorych ze zwężeniem zastawki aortalnej oraz na jego regresję po operacji wszczepienia zastawki aortalnej. Badanie wykazało, że kilkanaście obszarów genomu (7q31, 1p36, 5q14, 2p24, 1q32, 4q13) wykazuje związek z przerostem lewej komory serca oraz z regresją masy mięśnia lewej komory po wymianie zastawki (4q12, 15q21, 14q22, 12q22). Uzyskane wyniki mogą mieć istotne implikacje kliniczne w zakresie kwalifikacji do zabiegu wymiany zastawki, mogłyby również wpływać na indywidualizację leczenia farmakologicznego znanymi lekami po operacji a przez to przyczyniać się do zmniejszenia kosztów leczenia szpitalnego, jak również może umożliwić poszukiwanie nowych, skuteczniejszych leków.

Słowa kluczowe: badanie całego genomu • przerost serca • lewa komora serca • zmienność genetyczna • polimorfizm • regresja przerostu lewej komory • zwężenie zastawki aortalnej

Wpłynęło: 2013-12-20
Zaakceptowano: 2013-12-25
Opublikowano: 2013-12-31

Adres do korespondencji:
dr n. med. Grzegorz Placha
Katedra i Klinika Chorób
Wewnętrznych Nadciśnienia
Tętniczego i Angiologii,
Warszawski Uniwersytet Medyczny,
ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa,
e-mail: grzegorz.placha@wum.edu.pl

SUMMARY

Symptomatic aortic valve stenosis (the third most frequent pathology of the cardiovascular system) causes left-ventricle myocardial hypertrophy, which is an independent risk factor for death. Due to the lack of correlation between the degree of aortic valve stenosis and left-ventricle myocardial hypertrophy, a hypothesis has been formulated that it is conditioned by genetic factors. Following valve replacement surgery, the increased mass of the left ventricle is reduced but for a group of patients no regression of hypertrophy occurs. Incomplete reduction of the hypertrophy impairs diastolic function of the left ventricle, which leads to circulatory insufficiency and increases likelihood of death resulting from heart problems. A hypothesis may be formulated that the dynamics and degree of reduction of the left-ventricle hypertrophy are also genetically determined. The aim of the project was to determine the impact of genetic variation occurring in the whole genome on the degree of the left-ventricle hypertrophy for patients with aortic valve stenosis and on its regression after aortic valve replacement surgery. Study revealed that several genomic regions (7q31, 1p36, 5q14, 2p24, 1q32, 4q13) were associated with the left-ventricle hypertrophy and with the regression of left-ventricle muscle mass after aortic valve replacement (4q12, 15q21, 14q22, 12q22). These results could have important clinical implications for qualifying patients for valve replacement surgery, it could also help personalize pharmacological treatment with known drugs after surgery and thereby contribute to reducing the cost of hospital treatment, as well as facilitate the search for new, more effective drugs.

Key words: genome wide study • cardiac hypertrophy • left ventricle • genetic variability • polymorphism • regression of left ventricular hypertrophy • aortic stenosis

WSTĘP

Zwężenie zastawki aortalnej jest trzecią pod względem częstości (po nadciśnieniu tętniczym i chorobie niedokrwiennej serca) patologią układu sercowo-naczyniowego i obejmuje 5% osób po 75 roku życia. Objawowe zwężenie zastawki aortalnej powoduje wzrost ciśnienia skurczowego w lewej komorze i w konsekwencji wyrównawczy koncentryczny przerost jej mięśnia [1]. Przerost mięśnia lewej komory jest niezależnym czynnikiem ryzyka zgonu [2]. Stopień przerostu mięśnia serca lewej komory u chorych ze zwężeniem zastawki aortalnej może być bardzo różny - od prawidłowej masy komory do ciężkiego jej przerostu i wykazuje tylko niewielką korelację z powierzchnią zastawki [3]. Z uwagi na brak wyraźniej zależności między stopniem zwężenia zastawki aortalnej a przerostem mięśnia lewej komory serca wysunięto hipotezę, że jest on uwarunkowany czynnikami genetycznymi [4]. Badania przeprowadzone w rodzinach potwierdzają tę hipotezę wykazując wysoki (od 0.24 do 0.32) współczynnik dziedziczenia masy lewej komory w populacji ogólnej [5,6]. Operacja wymiany zastawki na sztuczną prowadzi do redukcji gradientu ciśnień w drodze odpływu

i usuwa przyczynę przerostu mięśnia lewej komory. Oczekiwanym skutkiem leczenia operacyjnego jest redukcja patologicznie zwiększonej masy lewej komory. Jednak nie u wszystkich chorych, pomimo usunięcia mechanicznej przeszkody w drodze odpływu lewej komory dochodzi do regresji przerostu w oczekiwanym okresie [7]. Niepełna redukcja przerostu jest przyczyną upośledzenia funkcji rozkurczowej lewej komory, co prowadzi do niewydolności krążenia oraz zwiększa prawdopodobieństwo zgonu z przyczyn sercowych [1]. Przyczyna braku przewidywanej regresji przerostu jest nieznana, nie wykazano związku z współistnieniem choroby wieńcowej, rozmiarem sztucznej zastawki czy gradientem skurczowym ciśnień przez sztuczną zastawkę [8]. Można wysunąć hipotezę, że dynamika i stopień redukcji przerostu mięśnia lewej komory są również determinowane przez czynniki genetyczne.

Brak skutecznego leczenia farmakologicznego, które mogłoby być alternatywą do leczenia operacyjnego szczególnie u chorych zdyskwalifikowanych od leczenia operacyjnego jak również brak skutecznego leczenia wspomagającego regresję u chorych po operacji, skłania do poszukiwania mechanizmów

patofizjologicznych a w szczególności uwarunkowań genetycznych, których wykrycie ułatwiłoby indywidualizację leczenia znanymi lekami oraz umożliwiło poszukiwanie nowych metod leczenia.

W literaturze istnieje tylko kilka sprzecznych ze sobą doniesień dotyczących wpływu zmienności genetycznej na stopień przerostu lewej komory serca u chorych ze zwężeniem zastawki aortalnej i tylko jedna praca dotycząca wpływu czynnika genetycznego na regresję przerostu lewej komory serca po operacji wymiany zastawki aortalnej. Wykazano związek polimorfizmu insercyjno-delecyjnego (D/I) genu enzymu konwertującego angiotensynę II (hACE) oraz polimorfizmu T174M genu angiotensynogenu (hAGT) z masą mięśnia lewej komory serca u 60 chorych ze zwężeniem zastawki aortalnej, nie wykazano natomiast takiego związku dla polimorfizmu A1166C genu receptora typu 1 dla angiotensyny II (hAGTR1) [9]. W kolejnym badaniu z udziałem 82 chorych potwierdzono wpływ polimorfizmu D/I w hACE na przerost lewej komory jak również stwierdzono odmienną dynamikę regresji przerostu po operacji w zależności od genotypu [4]. Brak związku polimorfizmów T704C w hAGT, A1166C w hAGTR1, G-1905A w genie chymazy sercowej A (CMA1), T-344C w genie syntazy aldosteronu (hCYP11B2) z przerostem lewej komory serca stwierdzono u 105 chorych ze zwężeniem zastawki aortalnej [10]. Nasz zespół badawczy wykazał na dużej, liczącej 392 chorych, grupie związek polimorfizmu D/I hACE z przerostem lewej komory, który jest zależny od płci i występuje tylko u mężczyzn [11] oraz brak związku polimorfizmu G+1675A w genie receptora typu 2 dla angiotensyny II hAGTR2 [12].

W cytowanych powyżej publikacjach łatwo dostrzec ograniczenia wynikające z dwóch przyczyn:

- 1) bardzo mała liczebność ocenianych grup (wyjątek stanowią doniesienia naszego zespołu) uniemożliwia prawidłową analizę uwzględniającą w modelu statystycznym poza badanymi polimorfizmami wpływ płci, maksymalnego gradientu przez zastawkę i innych zmiennych klinicznych.
- 2) badanie jedynie genów kandydatów, najczęściej tylko wybiórczych polimorfizmów w genie, wybranych na podstawie dostępnej literatury i znanych mechanizmów patofizjologicznych, bez możliwości poszukiwania nowych genów i mutacji warunkujących przerost serca.

Biorąc pod uwagę wyżej wymienione ograniczenia dotychczas opublikowanych badań celem projektu

było określenie, wpływu zmienności w całym genomie na stopień przerostu mięśnia lewej komory serca u chorych ze zwężeniem zastawki aortalnej oraz na jego regresję po operacji wszczepienia zastawki aortalnej oraz weryfikacja uzyskanych wyników na dużej grupie chorych z uwzględnieniem w analizie statystycznej wpływu czynników klinicznych oraz analizy haplotypów. Zastosowana metoda, oceniająca jednocześnie 500 000 markerów genetycznych, umożliwiła analizę zmienności całego genomu bez hipotezy *a priori* czyli bez ograniczeń charakterystycznych dla badania genów kandydatów.

METODOLOGIA

Badana grupa

Grupę badaną stanowili chorzy hospitalizowani w Klinice Wad Nabytych Serca Instytutu Kardiologii. Kryterium włączenia do badania: a) rozpoznanie istotnego zwężenia zastawki aortalnej, na podstawie badania podmiotowego, przedmiotowego, potwierdzone badaniem echokardiograficznym, b) wiek 30-75 lat. Kryterium wykluczenia z badania: współistniejące: a) umiarkowana lub istotna niedomykalność zastawki aortalnej, b) wady pozostałych zastawek, c) wywiad wyczynowego uprawiania sportu w przeszłości. Chorzy mieli wykonane przed zabiegiem oraz w okresie obserwacji pooperacyjnej standardowe badania Echo, EKG, znany jest typ i rozmiar wszczepionej zastawki, przebieg okresu pooperacyjnego, okresu obserwacji odległych oraz stosowane leczenie farmakologiczne. Podczas wizyty kontrolnej, która odbyła się po 12-24 miesiącach od operacji wymiany zastawki, uzyskano dane kliniczne (stan kliniczny, wydolność krążenia, stosowane leki) oraz wykonano standardowe badanie Echo. Projekt uzyskał zgodę komisji bioetycznej. Wszyscy badani wyrazili pisemną zgodę na udział w badaniu.

Metody oceny przerostu serca

W badaniu echokardiograficznym oceniane były następujące parametry: a) wymiary jam serca, b) grubość przegrody międzykomorowej i ściany tylnej, c) względna grubość mięśnia, d) frakcja wyrzutowa, e) gradient średni i maksymalny przez zastawkę aortalną. Masa mięśnia lewej komory serca została obliczona za pomocą wzoru [13] i indeksowana do powierzchni ciała obliczonej ze wzoru [14].

Metody genetyczne i bioinformatyczne

Z uwagi na wysoki koszt mikromacierzy genomowych, do analizy genetycznej została zastosowana ekonomiczna i skuteczna metoda pulowania (ang.

pooling) poszczególnych próbek DNA [15,16] oddzielnie dla grupy badanej (z największym przerostem) i oddzielnie dla grupy kontrolnej (z najmniejszym przerostem). Poszczególne puli są tworzone dwukrotnie w celu kompensacji błędów w pipetowaniu i każda z tak utworzonych mieszanin jest analizowana na płytkach mikromacierzowych. Specjalny algorytm pozwala na odczyt sygnału dla alleli poszczególnych polimorfizmów a ich wzajemny stosunek umożliwia oszacowanie z dużą dokładnością częstości występowania danego allelu w puli oraz ocenę statystyczną różnic w częstości występowania alleli poszczególnych polimorfizmów między grupą badaną, a grupą kontrolną [15,16]. Kluczowym etapem dla metody pulowania jest bardzo dokładny pomiar i normalizacja stężenia DNA od poszczególnych chorych.

Izolacja DNA

DNA wyizolowano z krwi pełnej metodą opartą na trawieniu krwi proteinazą K a następnie na rozdzieleniu od białek i oczyszczeniu DNA na łożach silikonowych. W celu uzyskania DNA o odpowiedniej czystości i stężeniu powyżej 50ng/uL, zastosowano kolumny do wirowania z prędkością 10 000 G z łożem silikonowym firmy Qiagen. Wstępna ocena stężenia DNA metodą spektrofotometryczną ujawniła odpowiednie stężenia 50-150ng/uL dla większości próbek DNA.

Dokładny pomiar stężenia DNA

Homogenność stężenia DNA między analizowanymi próbkami jest warunkiem koniecznym i krytycznym dla metod genotypowania przy użyciu pulowanego DNA. Dla oznaczenia stężenia DNA stosowano początkowo pomiar za pomocą metody fluorymetrycznej przy użyciu barwnika PicoGreen, który nie dał niestety powtarzalnych wyników, następnie zastosowano pomiar ilości kopii genu dla RNAzy P w danej próbce i odnoszoną ją do krzywej standardowej, przy pomocy techniki pomiaru kwasów nukleinowych w czasie rzeczywistym (Real-time PCR). Pomiar dla każdej próbki DNA wykonano w duplikacie. Metoda z RNAzą P dała bardzo powtarzalne wyniki. W celu minimalizacji błęd pipetowania stosowano podczas oznaczeń biorobota Janus firmy Perkin Elmer.

Normalizacja stężenia DNA

Uzyskane roztwory DNA rozcieńczono do stężenia 50ng/uL za pomocą buforu Tris z EDTA. W celu minimalizacji błęd pipetowania stworzono specjalny program do normalizacji DNA dla biorobota Janus firmy Perkin Elmer.

Wybór chorych do poszczególnych grup badanych

Przy użyciu pakietu statystycznego SAS System wersji 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, USA) napisano program kwalifikujący z bazy danych chorych do następujących grup:

Badanie przekrojowe dla oceny wpływu zmienności w całym genomie na stopień przerostu mięśnia lewej komory serca u chorych ze zwężeniem zastawki aortalnej: 120 chorych (w tym 60 kobiet i 60 mężczyzn) o niskiej masie serca oraz 120 chorych (w tym 60 kobiet i 60 mężczyzn) ze znacznym przerostem mięśnia lewej komory serca.

Badanie powtórzonych pomiarów (follow-up, longitudinal analysis) dla zbadania związku zmienności w całym genomie z regresją przerostu mięśnia serca po operacji wszczępienia zastawki aortalnej u chorych ze zwężeniem zastawki aortalnej: 120 (w tym 60 kobiet i 60 mężczyzn) chorych o niskiej regresji przerostu oraz 120 chorych (w tym 60 kobiet i 60 mężczyzn) o dużej redukcji masy serca.

Pulowanie DNA

Dla poszczególnych grup (osobno dla kobiet i mężczyzn) stworzono pulę DNA. W celu minimalizacji błęd pipetowania stworzono specjalny program do pulowania DNA dla biorobota Janus firmy Perkin Elmer.

Genotypowanie przy użyciu mikromacierzy

60 kobiet i 60 mężczyzn z najwyższym LVMI zostało losowo przydzielonych do jednej z czterech pul i podobnie 60 kobiet i 60 mężczyzn z najniższą masą serca zostało losowo zakwalifikowanych do jednej z czterech pul, zostały zastosowane osobne puli dla mężczyzn i kobiet. DNA zawarte w poszczególnych pulach zostało poddane procedurom zgodnie z zaleceniami producenta, aby umożliwić hybrydyzację DNA do mikromacierzy 250K Sty i 250K Nsp (GeneChip® Mapping 500K Arrays, Affymetrix, USA) i odczyt w dedykowanym skanerze (GeneChip® Scanner 3000). Plik zawierający intensywność sygnału dla poszczególnych typów sond (CEL) został wygenerowany za pomocą dedykowanego programu (GeneChip® Genotyping Analysis Software GTYPE v4.0).

Analiza bioinformatyczna danych z mikromacierzy

Pliki zawierające intensywność sygnału z każdej mikromacierzy zostały wykorzystane do obliczenia współczynnika RAS (relative allelic score) z uwzględnieniem wszystkich dostępnych dla da-

nego polimorfizmu zestawów sond (24 lub 40) przy użyciu programu SNPMap [17], a formatowanie uzyskanej bazy danych wykonano za pomocą programu SAS uzyskując pełną informację liczącą 51 000 000 rekordów.

Analiza statystyczna wyników z mikromacierzy

Analizę związku RAS dla poszczególnych polimorfizmów z ocenianym fenotypem wykonano przy użyciu modelu statystycznego wykorzystującego modele mieszane (mixed models) [18] zawarte w procedurze PROC MIXED w pakiecie statystycznym SAS. Wykonano osobno obliczenia dla badania przekrojowego (przerost) oraz badania pomiarów powtórzonych (regresja przerostu), dla grup o skrajnym rozkładzie badanej cechy, z uwzględnieniem wpływu płci, jako wpływ losowy (random) uwzględniono w modelu przynależność do danej mikromacierzy.

Weryfikacja mikromacierzy – wybór polimorfizmów

Z uwagi na wysokie ryzyko uzyskania wyniku fałszywie pozytywnego przy oznaczaniu dużej ilości polimorfizmów przy zastosowaniu mikromacierzy, a szczególnie metody oznaczania pulowanego DNA zastosowano następujące zastrzeżone kryteria wyboru polimorfizmów do weryfikacji, zgodnie z pracą opublikowaną w Nature Genetics [16]: a) SNP występuje wśród 200 najwyżej uszeregowanych za pomocą współczynnika istotności statystycznej, uzyskane go z analizy mikromacierzy, b) polimorfizm znajduje się w bliskiej odległości (<50 kb) od znanego lub hipotetycznego (na podstawie dostępnych RNA lub EST) genu, c) co najmniej połowa polimorfizmów znajdujących się w silnym niezrównoważeniu sprzężeń, ocenianym za pomocą współczynnika korelacji ($r^2 > 0,8$), z badanym polimorfizmem ma współczynnik istotności statystycznej o wartości poniżej 10tego procentyla obliczonego dla wszystkich testowanych polimorfizmów.

Weryfikacja mikromacierzy – genotypowanie metodą real-time

Oznaczanie polimorfizmów zostało przeprowadzone za pomocą metody pomiaru kwasów nukleinowych w czasie rzeczywistym (Real-time PCR), z sondami TaqMan (AppliedBiosystems, USA) wykonanymi na zamówienie przez producenta przy użyciu aparatu ViiA7 (AppliedBiosystems, USA) z blokiem 384-studzienkowym oraz dedykowanych odczynników zgodnie z protokołem dostarczoną przez producenta. Dla kontroli jakości genotypowania 10% próbek zostało oznaczonych w duplikatach, dla prezentowanych wyników zgodność duplikatów wynosiła 100%.

Do pracy z płytkami w formacie 384-studzienkowym użyto stacji pipetującej (biorobota) Janus Integrator (Perkin Elmer, USA).

Weryfikacja mikromacierzy – analiza statystyczna

Polimorfizmy zostały ocenione pod względem odstępstw od równowagi Hardy-Weinberga za pomocą programu Haploview 4.2 (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>), przyjęto, że na istotne odstępstwo od równowagi wskazuje współczynnik istotności $p < 0,05$.

a) Badanie przekrojowe dla oceny wpływu zmienności genetycznej na stopień przerostu mięśnia lewej komory serca u chorych ze zwężeniem zastawki aortalnej:

Analizowaną cechą fenotypową był indeks masy lewej komory serca, zmienna ta z uwagi na rozkład odbiegający od normalnego została przekształcona za pomocą logarytmu naturalnego i stanowiła w dalszych analizach zmienną zależną. Dla wyboru najlepszych zmiennych niezależnych (epidemiologicznych i klinicznych) opisujących w modelu zmienną zależną zastosowano procedurę PROC GLMSELECT i kryterium informacji Schwarz'a (Schwarz Bayesian Information-SBS). Uogólnione modele liniowe (GLM, Generalized Linear Models) zostały wykorzystane w celu oceny związku zmiennych niezależnych o rozkładach zarówno ciągłych jak i dyskretnych ze zmienną zależną LVMI o rozkładzie ciągłym. Dla potrzeb analizy statystycznej genotypy poszczególnych polimorfizmów zostały oznaczone jako liczba kopii rzadkiego allelu, tj. 0 – homozygota dla częstego allelu, 1 – heterozygota, 2 – homozygota dla rzadkiego allelu. Związek poszczególnych polimorfizmów z cechą fenotypową oceniano dla trzech modeli genetycznych: addytywnego, dominującego i recesywnego. Oprócz efektu genetycznego, uwzględniono również zmienne kliniczne takie jak: płeć i wiek (tzw. prosty model) lub płeć, wiek, waga, frakcja wyrzutowa, maksymalny gradient przez zastawkę (tzw. pełny model). Analizy wykonano przy użyciu pakietu statystycznego SAS 9.2. (SAS Institute Inc., Cary, USA).

b) Badanie powtórzonych pomiarów (follow-up, longitudinal analysis) dla zbadania związku zmienności genetycznej z regresją przerostu mięśnia serca po operacji wszczepienia zastawki aortalnej u chorych ze zwężeniem zastawki aortalnej:

Różnice pomiędzy grupami chorych o danym genotypie, a zmianą indeksu masy lewej komory serca w czasie (longitudinal analysis) oceniano za pomocą modeli mieszanych dostępnych w procedurze PROC MIXED zawartej w pakiecie statystycznym SAS.

Aby zoptymalizować model statystyczny badano dla ocenianej zmiennej zależnej rozkład kowariancji w czasie. W tym celu porównano różne modele przestrzenne (Spatial) i wybrano najlepszy (Spatial-Power) za pomocą kryterium informacji Akaike'a (Akaike's Information Criterion). W modelu użyto opcji empirycznego obliczania wariancji w celu oszacowania błędu standardowego współczynników regresji. Zastosowano kodowanie genotypów i oceniano modele genetyczne tak jak opisano powyżej dla GLM. Oprócz efektu genetycznego, uwzględniono również zmienne kliniczne takie jak: płeć, wiek oraz przedoperacyjną masę lewej komory serca – wyrażoną jako logarytm naturalny z indeksu masy lewej komory (lnLVMII). Do obliczeń statystycznych użyto pakietu statystycznego SAS System wersji 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, USA).

WYNIKI

Wyniki weryfikacji dla badania przekrojowego oceniającego wpływ zmienności genetycznej na stopień przerostu mięśnia lewej komory serca u 648 chorych ze zwężeniem zastawki aortalnej przedstawia Tabela 1. Prezentowane wyniki weryfikacji dla badania przekrojowego pokazują, że wszystkie wybrane do weryfikacji markery wykazują związek z przerostem serca u badanych chorych ($p < 0,05$). Najistotniejsze wyniki uzyskały markery z obszarów genomu: 7q31 (model prosty $p = 9,2 \times 10^{-5}$; model pełny $p = 6,8 \times 10^{-6}$), 5q14 (model prosty $p = 6,7 \times 10^{-4}$; model pełny $p = 8,4 \times 10^{-3}$) oraz 2p24 (model prosty $p = 1,1 \times 10^{-3}$; model pełny $p = 6,9 \times 10^{-4}$).

Wyniki weryfikacji badania powtórzonych pomiarów badającego związek zmienności genetycznej z regresją przerostu mięśnia serca po operacji wszczepienia zastawki aortalnej u 446 chorych ze zwężeniem zastawki aortalnej zawiera Tabela 2. Wyniki weryfikacji badania powtórzonych pomiarów wykazują, że 5 z 6 wybranych do weryfikacji markerów wykazuje związek z redukcją przerostu serca u badanych chorych ($p < 0,05$). Najistotniejsze wyniki uzyskały markery z obszarów genomu: 4q12 ($p = 2,6 \times 10^{-4}$) oraz 15q21 ($p = 1,8 \times 10^{-3}$).

CO PRZYNIOSŁA REALIZACJA GRANTU NAUKOWEJ FUNDACJI POLPHARMY

Badania prowadzone w ramach projektu Naukowej Fundacji Polpharmy wykazały związek kilkudziesięciu obszarów genomu ze stopniem przerostu mięśnia lewej komory serca u chorych ze zwężeniem zastawki aortalnej oraz jego regresję po operacji wszczepienia zastawki aortalnej. Uzyskane pozytywne wyniki dla 20

wybranych obszarów genomu zostały potwierdzone na dużej grupie chorych. Wyznaczone przez badanie całego genomu regiony zawierają znane geny o ustalonym dla patofizjologii serca znaczeniu, ale również geny o nieopisanym związku z patologią mięśnia serca czy nawet nowe, nie opisane jak dotąd geny. Do dalszych badań wybrano obszary genomu o największym związku z przerostem serca i po wykonaniu szczegółowych badań genetycznych (badanie haplotypów) oraz oceny transkryptów znanych jak również nieznanymi genów występujących w tym obszarze za pomocą sekwencjonowania RNA (transkryptomu) tkanki serca od chorych poddawanych wymianie zastawki aortalnej wyselekcjonowano geny, które modulują przerost serca. Dokładne sekwencjonowanie tych genów ujawniło kilka znanych polimorfizmów jak również nowych mutacji, które mogą wpływać na funkcje genu. Obecnie trwają badania funkcjonalne mające pokazać, który z wytypowanych polimorfizmów oraz w jaki sposób wpływa na funkcję genu a przez to na przerost serca. Po zakończeniu badań funkcjonalnych wyniki będą opublikowane. Przykładem genu o ustalonym znaczeniu dla patofizjologii serca jest chymaza (CMA1), a badania prowadzone w ramach projektu wykazały, że polimorfizmy i haplotypy w obrębie genu chymazy mają związek ze stopniem przerostu mięśnia lewej komory serca u chorych ze zwężeniem zastawki aortalnej [19-21].

DALSZE KIERUNKI BADAŃ

Uzyskane w ramach projektu Naukowej Fundacji Polpharmy wyniki wskazują na silny związek wielu obszarów genomu z przerostem serca, które zostało poddane przeciążeniu ciśnieniowemu. Wyniki z projektu umożliwiły uzyskanie dodatkowego finansowania i dlatego kolejne obszary genomu są dokładnie badane za pomocą metodologii opracowanej podczas realizacji projektu i mającej na celu wskazanie nie tylko funkcjonalnego polimorfizmu, ale także mechanizmu w jaki wpływa on na gen i patomechanizm przerostu serca.

Uzyskane wyniki mogą mieć istotne implikacje kliniczne w zakresie kwalifikacji do zabiegu wymiany zastawki np. obciążający genotyp jednego polimorfizmu (lub układ alleli dla panelu polimorfizmów) mógłby decydować o wcześniejszej kwalifikacji do operacji, celem skrócenia okresu przeciążenia lewej komory i dalszego rozwoju przerostu – w konsekwencji nie w pełni odwracalnego, mógłby również wpływać na indywidualizację leczenia farmakologicznego po operacji. Wyjaśnienie funkcji nowych, jeszcze nie opisanych, genów modulujących przerost serca może dać podstawy do badań nad nowymi lekami.

Tabela 1. Weryfikacja wyników z mikromacierzy dla badania przekrojowego.

Lp.	obszar genomu	współczynnik istotności p						
		mikromacierze n=240		panel weryfikacyjny n=648				
		case/control		GLM model prosty*		GLM model pełny**		
		MIN vs. MAX		model genetyczny		model genetyczny		
		różnica w RAS	addytywny	dominujący	recesywny	addytywny	dominujący	recesywny
1	7q31	2,071E-09	9,17E-05	0,00041	0,00423	6,77E-06	3,76E-05	0,00122
2	1p36	3,080E-08	0,00105	0,00653	0,00897	0,00136	0,01293	0,00525
3	5q14	1,417E-07	0,00113	0,03061	0,00067	0,00693	0,05422	0,00837
4	2p24	4,014E-11	0,00156	0,00111	0,18176	0,00085	0,00069	0,13007
5	1q32	1,121E-08	0,00195	0,01680	0,00604	0,00738	0,03742	0,01819
6	4q13	1,962E-09	0,00293	0,01403	0,01766	0,02123	0,04596	0,08780
7	15q23	7,541E-06	0,01185	0,08666	0,01497	0,02516	0,14603	0,02441
8	9p21	7,684E-08	0,01912	0,01644	0,29156	0,18101	0,13909	0,70827
9	2q13	6,609E-09	0,02092	0,00628	0,72867	0,01743	0,00766	0,92620
10	3p25	8,682E-07	0,02201	0,02177	0,26453	0,03910	0,05191	0,21295
11	18q21	5,913E-07	0,02845	0,04002	0,19631	0,01981	0,02842	0,17382
12	17q23	9,340E-05	0,03335	0,03160	0,26833	0,06873	0,08959	0,23775
13	3q28	6,270E-08	0,03449	0,10476	0,06252	0,01371	0,06122	0,02779
14	4q28	2,147E-10	0,03480	0,19271	0,00543	0,01686	0,08691	0,00863
15	12q12	2,821E-08	0,04647	0,01888	0,60324	0,30496	0,21101	0,83073
16	6q26	4,717E-08	0,09696	0,01093	0,44211	0,20557	0,03343	0,35829

GLM - analiza zmiennej zależnej lnLVMl przy użyciu uogólnionych modeli liniowych

* model prosty uwzględnia wiek i płeć

** model pełny uwzględnia wiek, płeć, maksymalny gradient przez zastawkę, wagę

Tabela 2. Weryfikacja wyników z mikromacierzy dla badania powtórzonych pomiarów (follow-up). Weryfikacja wyników z mikromacierzy dla badania powtórzonych pomiarów (follow-up).

Lp.	obszar genomu	współczynnik istotności p			
		mikromacierze n=240		panel weryfikacyjny n=446	
		case/control		MIXED MODELS*	
		MIN vs. MAX		model genetyczny	
		różnica w RAS	addytywny	dominujący	recesywny
1	4q12	1,956E-11	0,00071	0,02668	0,00026
2	15q21	2,417E-08	0,00181	0,00418	0,03305
3	14q22	3,223E-09	0,01045	0,02352	0,07999
4	12q22	1,049E-07	0,01773	0,01638	0,17731
5	8q22	5,354E-10	0,09374	0,45293	0,04023
6	2p14	1,184E-10	0,14601	0,11002	0,68956

*analiza pomiarów powtórzonych, przy użyciu modeli mieszanych, z uwzględnieniem płci, wieku i przedoperacyjnej masy

LITERATURA

1. Lund O, Erlandsen M: Changes in left ventricular function and mass during serial investigations after valve replacement for aortic stenosis. *J Heart Valve Dis*, 2000 Jul; 9(4): 583-93.
2. Levy D, Garrison RJ, Savage DD i wsp.: Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med*, 1990 May 31; 322(22): 1561-6.
3. Griffith MJ, Carey CM, Byrne JC i wsp.: Echocardiographic left ventricular wall thickness: a poor predictor of the severity of aortic valve stenosis. *Clin Cardiol*, 1991 Mar; 14(3): 227-31.
4. Dellgren G, Eriksson MJ, Blange I i wsp.: Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism influences degree of left ventricular hypertrophy and its regression in patients undergoing operation for aortic stenosis. *Am J Cardiol*, 1999 Oct 15; 84(8): 909-13.
5. Harshfield GA, Grim CE, Hwang C i wsp.: Genetic and environmental influences on echocardiographically determined left ventricular mass in black twins. *Am J Hypertens*, 1990 Jul; 3(7): 538-43.
6. Post WS, Larson MG, Myers RH i wsp.: Heritability of left ventricular mass: the Framingham Heart Study. *Hypertension*, 1997 Nov; 30(5): 1025-8.
7. Monrad ES, Hess OM, Murakami T i wsp.: Time course of regression of left ventricular hypertrophy after aortic valve replacement. *Circulation*, 1988 Jun; 77(6): 1345-55.
8. Murakami T, Kikugawa D, Endoh K i wsp.: Left ventricular mass regression after implantation of St. Jude Medical cardiac valves in small aortic roots. *Artif Organs*, 1998 Sep; 22(9): 740-5.
9. Wong KK, Summers KM, Burstow DJ, West MJ: Genetic variants of proteins from the renin angiotensin system are associated with pressure load cardiac hypertrophy. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1996 Jun-Jul; 23(6-7): 587-90.
10. Ortlepp JR, Breithardt O, Ohme F i wsp.: Lack of association among five genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and cardiac hypertrophy in patients with aortic stenosis. *Am Heart J*, 2001 Apr; 141(4): 671-6.
11. Orłowska-Baranowska E, Placha G, Gaciong Z i wsp.: Influence of ACE I/D genotypes on left ventricular hypertrophy in aortic stenosis: gender-related differences. *J Heart Valve Dis*, 2004 Jul; 13(4): 574-81.
12. Orłowska-Baranowska E, Placha G, Baranowski R i wsp.: Can angiotensin II +1675 G/A type 2 receptor gene polymorphism be a marker of left ventricular hypertrophy in patients with aortic stenosis? *J Heart Valve Dis*, 2007 Sep; 16(5): 495-503.
13. Devereux RB, Reichek N: Echocardiographic determination of left ventricular mass in man. Anatomic validation of the method. *Circulation*, 1977 Apr; 55(4): 613-8.
14. Wang Y, Moss J, Thisted R. Predictors of body surface area. *J Clin Anesth*, 1992 Jan-Feb; 4(1): 4-10.
15. Hanson RL, Craig DW, Millis MP i wsp.: Identification of PVT1 as a candidate gene for end-stage renal disease in type 2 diabetes using a pooling-based genome-wide single nucleotide polymorphism association study. *Diabetes*, 2007 Apr; 56(4): 975-83.
16. van der Zanden LE, van Rooij IA, Feitz WF i wsp.: Common variants in DGKK are strongly associated with risk of hypospadias. *Nat Genet*, [Research Support, Non-U.S. Gov't], 2011 Jan; 43(1): 48-50.
17. Davis OS, Plomin R, Schalkwyk LC: The SNPMap package for R: a framework for genome-wide association using DNA pooling on microarrays. *Bioinformatics*, [Research Support, N.I.H., Extramural]
18. Research Support, Non-U.S. Gov't], 2009 Jan 15; 25(2): 281-3.
19. Davis OS, Butcher LM, Docherty SJ i wsp.: A three-stage genome-wide association study of general cognitive ability: hunting the small effects. *Behav Genet*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Twin Study], 2010 Nov; 40(6): 759-67.
20. Orłowska-Baranowska E, Góra J, Baranowski R i wsp.: Common genetic polymorphisms and haplotypes of chymase gene affect left ventricular hypertrophy in male patients with symptomatic aortic stenosis. *European Heart Journal*, 2013; 34: 2604. **Publikacja powstała w wyniku realizacji grantu Naukowej Fundacji Polpharmy**
21. Orłowska-Baranowska E, Góra J, Baranowski R i wsp.: Association of the Common Genetic Polymorphisms and Haplotypes of the Chymase Gene with Left Ventricular Mass in Male Patients with Symptomatic Aortic Stenosis. - manuscript submitted for publication. 2013. **Publikacja powstała w wyniku realizacji grantu Naukowej Fundacji Polpharmy**
22. Góra J: Związek zmienności genetycznej w obrębie locus genu chymazy z przerostem lewej komory serca u osób ze zwężeniem zastawki aortalnej [rozprawa doktorska].: Warszawski Uniwersytet Medyczny; 2012. **Publikacja powstała w wyniku realizacji grantu Naukowej Fundacji Polpharmy**

Nieprzestrzeganie przez pacjentów zaleceń terapeutycznych podczas leczenia hiperlipidemii – częstość, przyczyny, możliwości poprawy

Non-adherence to hyperlipidemia treatment – prevalence, reasons, possible interventions

Przemysław Kardas

I Zakład Medycyny Rodzinnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Naukowa Fundacja Polpharmy w 2007 roku przyznała zespołowi pracującemu pod kierunkiem prof. Przemysława Kardasa grant na realizację projektu badawczego pt. *Wpływ kompleksowej STRATegii edukacyjno-behawioralnej na przestrzeganie zaleceń terapeutycznych podczas leczenia hiperlipemizującego statynami w warunkach opieki zdrowotnej.*

STRESZCZENIE

Cel: W przypadku asymptomatycznych schorzeń przewlekłych szczególnie często dochodzi do nieprzestrzegania zaleceń terapeutycznych. Celem niniejszego badania było określenie częstości nieprzestrzegania zaleceń terapeutycznych podczas leczenia hiperlipidemii, oraz poznanie wpływu wybranych czynników związanych z pacjentem, lekarzem i terapią na przestrzeganie zaleceń terapeutycznych podczas leczenia tej choroby. W badaniu postanowiono również ocenić skuteczność interwencji edukacyjno-behawioralnej na poprawę systematyczności przyjmowania leków obniżających stężenie cholesterolu.

Metody: Obydwie części projektu przeprowadzono w warunkach podstawowej opieki zdrowotnej. Część ankietową badania przeprowadzono pod postacią otwartego badania kwestionariuszowego wśród pacjentów z rozpoznaną hiperlipidemią. Skuteczność interwencji zweryfikowano w ramach otwartego, prospektywnego, randomizowanego badania klinicznego wśród pacjentów z nieleczoną dotychczas hiperlipidemią. Pacjenci z obu grup otrzymali zalecenie przyjmowania simwastatyny, a dodatkowo pacjenci z grupy interwencji otrzymywali ulotki edukacyjne podczas każdej wizyty (co 8 tygodni); proszono ich również o wybranie rutynowej czynności wykonywanej wieczorem, w celu przypominania im o konieczności przyjęcia leku. Okres obserwacji wynosił 48 tygodni. Pierwszorzędownym punktem końcowym było przestrzeganie zaleceń terapeutycznych, wyrażone jako współczynnik posiadania leków (*medication possession ratio*, MPR).

Wyniki: Do badania ankietowego włączono 255 pacjentów, których średni wiek (+/- SD) wynosił 60,2 +/- 10,3 lat. Spośród badanych 25,1% przyznało, że zwykle zdarza się im opuszczanie niektórych dawek leków obniżających stężenie cholesterolu, a jedynie 61,6% badanych realizowało w pełni zalecenia terapii. Główną motywacją pacjentów do stosowania leków hiperlipemizujących była chęć obniżenia stężenia cholesterolu. Na systematyczność leczenia nie wpływały badane cechy demograficzne. Brak efektywnej komunikacji pomiędzy lekarzem i pacjentem stanowił natomiast ważny powód nieprzestrzegania zaleceń terapeutycznych. Badani często deklarowali motywę finansową jako powód nieprzestrzegania zaleceń terapeutycznych podczas leczenia hiperlipidemii. Do badania klinicznego włączono 198 pa-

Wpłynęło: 2013-12-18
Zaakceptowano: 2013-12-25
Opublikowano: 2013-12-31

Adres do korespondencji:
dr hab. med. prof. nadzw.
Przemysław Kardas,
I Zakład Medycyny Rodzinnej
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
ul. Narutowicza 60 90-136 Łódź
e-mail: przemyslaw.kardas@umed.lodz.pl

pacjentów o średnim wieku $59,6 \pm 9,1$ lat. Ramiona badania różniły się poziomem przestrzegania zaleceń terapeutycznych: średni MPR ($\pm$ SD) wynosił $95,4 \pm 53,7\%$ w grupie interwencji i $81,7 \pm 31,0\%$ w grupie kontrolnej ($p < 0,05$).

Wnioski: Nieprzestrzeganie zaleceń terapeutycznych podczas leczenia hiperlipidemii jest problemem bardzo częstym. Uzyskane wyniki wskazują, że właściwa komunikacja pomiędzy lekarzem i pacjentem może odegrać szczególnie istotną rolę w motywowaniu pacjentów do systematycznego leczenia tego schorzenia. Użycie właściwych informacji może mieć w tym procesie kluczowe znaczenie. Poprawy przestrzegania zaleceń można również oczekiwać stosując niedrogie leki hipolipemizujące. Prosta, niedroga interwencja edukacyjno-behawioralna okazała się skuteczna w zwiększaniu przestrzegania zaleceń terapeutycznych podczas profilaktycznego stosowania statyn w warunkach ambulatoryjnych.

Słowa kluczowe: nieprzestrzeganie zaleceń terapeutycznych • hiperlipidemia • komunikacja lekarz-pacjent • statyny • simvastatyna

SUMMARY

Aim: Medication non-adherence is a frequent phenomenon in asymptomatic chronic conditions. The aim of this study was to assess the prevalence of medication non-adherence to hyperlipidemia treatment. Study aimed also at the assessment of the effect of selected patient-, doctor-, and therapy-related factors on the level of patient adherence in this condition, and the assessment of effectiveness of educational-behavioural intervention on patient adherence to lipid lowering medication.

Methods: Both parts of this projects were conducted in primary care conditions. The survey was an open-label questionnaire study in the patients diagnosed with hyperlipidemia. Assessment of intervention took part in open, prospective, randomized trial among patients with untreated hyperlipidemia. Patients in both arm of this trial were prescribed simvastatin. Patients from intervention arm received educational leaflets at every visit (every 8 weeks), they were also asked to choose one routine evening activity as a reminder for drug intake. Follow up lasted 48 weeks. Primary endpoint was patient adherence, expressed with medication possession ratio (MPR).

Results: As many as 255 outpatients aged 60.2 ± 10.3 (mean $\pm$ SD) took part in the survey. Out of them, 25.1% admitted that they usually skip some doses of their lipid lowering drugs. Only 61,6% of patients were fully adherent, taking their lipid lowering drugs everyday within the week prior to the survey. The major source of their motivation to take their drugs was their hope to lower the level of cholesterol. The demographic parameters assessed in this study had no effect over the level of adherence. An ineffective doctor-patient communication was an important trigger for low adherence. Patients often pointed at financial constrains as a reason for low adherence. Most of the informational messages assessed by the patients were found to raise their motivation to systematic treatment with hypolipemic drugs, with some assessed that way by over 80% of respondents. One hundred and ninety eight patients aged 59.6 ± 9.1 years took part in the clinical trial. Trial arms differed in their level of adherence: mean $\pm$ SD MPR was $95.4 \pm 53.7\%$ and $81.7 \pm 31.0\%$, respectively, for intervention and control group ($P < 0.05$).

Results: Non-adherence to lipid lowering medication is a frequent problem. This study suggests that effective doctor-patient communication may play an important role in rising patients' motivation to systematic treatment of this condition. Using right messages may play a crucial role in this process. Better adherence might be also obtained with prescribing affordable drugs. Simple inexpensive educational-behavioral intervention proved to be effective in enhancing adherence to preventive statin use in outpatient settings.

Keywords: patient adherence • hyperlipidemia • doctor-patient communication • statins • simvastatin

WPROWADZENIE

Hiperlipidemia jest schorzeniem o bardzo dużym rozpowszechnieniu w Polsce - wyniki badania WOBASZ wskazują, że występuje ona z częstością 67% wśród mężczyzn, i 64% wśród kobiet [1]. Hiperlipidemia jest jednym z najważniejszych czynników ryzyka miażdżycy, a w konsekwencji – wysokiej chorobowości i śmiertelności sercowo-naczyniowej i mózgowo-naczyniowej. Skuteczne leczenie hiperlipidemii ma zatem podstawowe znaczenie w pierwotnej i wtórnej profilaktyce kardiologicznej. Za obserwowany w Polsce w ostatnich latach spadek umieralności z powodu choroby wieńcowej w największym stopniu odpowiadało zmniejszenie się rozpowszechnienia czynników ryzyka, w tym aż w 39% przypadków związane to było z redukcją średniego stężenia cholesterolu [2]. Efektywność leczenia hiperlipidemii w Polsce jest jednak nadal daleka od pożądanej. W badaniu WOBASZ wykazano, że z jej powodu leczony jest jedynie co 10 chory, a leczeni skutecznie stanowią zaledwie 3% chorych mężczyzn i 2% chorych kobiet [1].

Jednym z ważnych czynników, który odpowiada za taki stan rzeczy, jest *nieprzestrzeganie zaleceń terapeutycznych*, w piśmiennictwie polskim określane terminem angielskim *non-compliance*, a także coraz częściej nowszym - *non-adherence*. Zjawisko to polega na stosowaniu przez pacjentów przepisanych leków niezgodnie z zaleceniami otrzymanymi od pracowników medycznych. Problem ten występuje z różną częstością i w różnym nasileniu w zależności od wielu czynników, w tym – od jednostki chorobowej i rodzaju przepisanego leku. Światowa Organizacja Zdrowia w swoim raporcie ocenia, że przeciętnie dotyczy ono około 50% pacjentów, leczących się z powodu chorób przewlekłych [3]. Wiele wskazuje na to, że w przypadku leczenia hipolipemizującego, nieprzestrzeganie zaleceń terapeutycznych osiąga nawet jeszcze wyższe wartości. Obserwacje amerykańskie wskazują, że po 6 miesiącach leczenia zadawalająco przestrzega zaleceń terapeutycznych zaledwie 36% pacjentów przyjmujących leki hipolipemizujące [4], a w ciągu pierwszego roku co trzeci pacjent przerywa leczenie całkowicie [5]. Obserwacje poczy-

nione w Polsce potwierdzają te niekorzystne tendencje: analiza danych dotyczących realizacji recept na statyny wykazała, że zaledwie 12% pacjentów leczy się tymi lekami systematycznie (spełnia kryterium wykupienia recepty na co najmniej 80% zaleconych dawek) [6].

NASTĘPSTWA NIEPRZESTRZEGANIA ZALECEŃ TERAPEUTYCZNYCH W HIPERLIPIDEMII

Podstawowym następstwem nieprzestrzegania zaleceń terapeutycznych jest nieskuteczność prowadzonego leczenia, a co za tym idzie, nie osiąganie przez pacjentów możliwych do osiągnięcia korzyści, udokumentowanych w starannie przeprowadzonych badaniach klinicznych. W wielu badaniach, w szczególności badaniach dużych populacji, opartych o analizę realizacji recept na leki stosowane w chorobach przewlekłych, przyjmuje się arbitralnie wartość 80% przyjętych dawek za wartość różnicującą pacjentów przestrzegających zaleceń terapeutycznych od pacjentów nieprzestrzegających tych zaleceń. Jak jednak wskazują najnowsze analizy, pacjenci osiągają dodatkowe korzyści przyjmując co najmniej 90% przepisanych dawek leków hipolipemizujących, w porównaniu z tradycyjnie akceptowanym poziomem odciążenia wynoszącym 80% [7]. Oznacza to jednak, że pacjent może względnie bezpiecznie opuścić zaledwie trzy dawki leku w ciągu przeciętnego miesiąca.

Nieprzestrzeganie zaleceń terapeutycznych w hiperlipidemii prowadzi do istotnego obniżenia skuteczności leczenia, wzrostu ryzyka incydentów sercowo-naczyniowych i zgonów [8-10]. Jak zaobserwowano, pacjenci nie stosujący się do zaleceń podczas leczenia statynami mieli o blisko 40% większe ryzyko incydentu sercowo-naczyniowego podczas 3-letniej obserwacji, w porównaniu z pacjentami stosującymi się do zaleceń [11]. Niesystematyczne stosowanie leków hipolipemizujących może prowadzić do podobnych wyników leczenia, jak nie stosowanie tych leków w ogóle [12,13].

Mając na uwadze wspomniane następstwa nieprzestrzegania zaleceń terapeutycznych, wskazane jest

opracowanie interwencji, prowadzących do poprawy przestrzegania przez pacjentów zaleceń terapeutycznych podczas leczenia hipolipemizującego tak w profilaktyce pierwotnej, jak i wspólnej. Jak jednak wykazał Peterson i wsp. w przeprowadzonej przez siebie metaanalizie, dotychczas testowane interwencje miały niewielki wpływ na przestrzeganie zaleceń terapeutycznych podczas leczenia hiperlipidemii [14]. W związku z powyższym, w ramach projektu STRATuS (Wpływ kompleksowej STRATegii edukacyjno-behawioralnej na przestrzeganie zaleceń terapeutycznych podczas leczenia hipolipemizującego statynami w warunkach podstawowej opieki zdrowotnej, grant 39/2008 Naukowa Fundacja Polpharmy) postanowiono zbadać rozpowszechnienie nieprzestrzegania zaleceń terapeutycznych podczas leczenia hiperlipidemii oraz jego uwarunkowania, w tym wpływ wybranych czynników związanych z pacjentem, lekarzem i terapią na przestrzeganie zaleceń terapeutycznych. Następnie, na tej podstawie, postanowiono opracować prostą interwencję edukacyjno-behawioralną, i przetestować jej skuteczność w warunkach podstawowej opieki zdrowotnej w Polsce.

ROZPOWSZECHNIENIE I UWARUNKOWANIA NIEPRZESTRZEGANIA ZALECEŃ TERAPEUTYCZNYCH PODCZAS LECZENIA HIPERLIPIDEMII

W celu oceny rozpowszechnienia nieprzestrzegania zaleceń terapeutycznych podczas leczenia hiperlipidemii, a także poznania jego uwarunkowań, przeprowadzono otwarte badanie ankietowe wśród pacjentów podstawowej opieki zdrowotnej na terenie województwa łódzkiego. Do badania włączani byli pacjenci ambulatoryjni z rozpoznaną hiperlipidemią, z powodu której lekarz prowadzący przepisał im dowolny lek obniżający stężenie cholesterolu. Włączeni do badania pacjenci otrzymywali do samodzielnego wypełnienia opracowany na potrzeby niniejszego badania anonimowy kwestionariusz. Kwestionariusz ten opracowany został na podstawie przeglądu literatury oraz doświadczenia autora, a zmodyfikowany po przeanalizowaniu wyników badania pilotażowego wśród ochotników. Zawierał on pytania dotyczące cech demograficznych, pytania dotyczące leczenia lekami obniżającymi stężenie cholesterolu, oraz zakresu i powodów niestosowania się podczas tego leczenia do zaleceń terapeutycznych oraz 17 twierdzeń, co do których badani mieli się wypowiedzieć, jak bardzo przekonują ich one do systematycznego zażywania leków obniżających poziom cholesterolu.

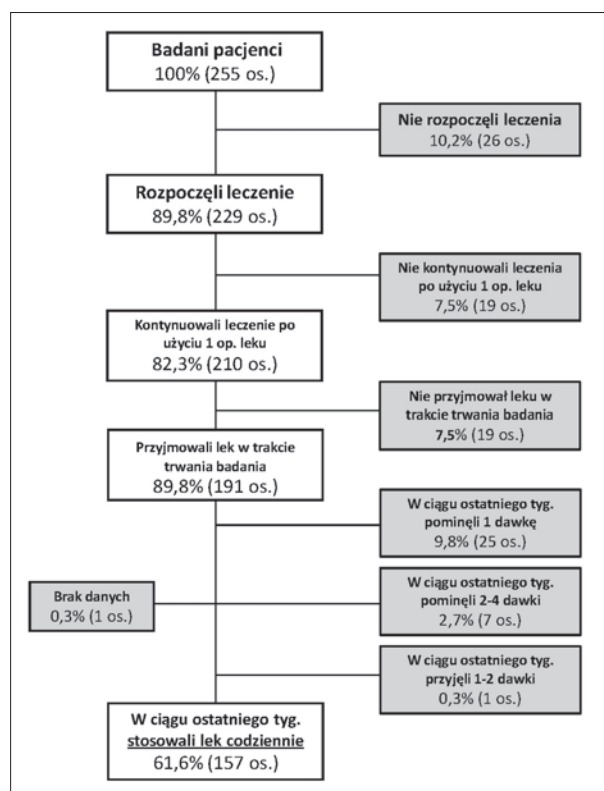
W badaniu wzięło udział 255 pacjentów, których średni wiek wynosił 60,2 +/- 10,3 lat. Wyjściowe stężenie

cholesterolu u badanych wynosiło 273,8 +/- 50,5 mg%. Najczęściej stosowaną wśród badanych klasą leków hipolipemizujących były statyny (53,0% chorych), a spośród nich - simwastatyna (31,4%). Wystąpienia działań niepożądanych podczas stosowania leków hipolipemizujących doświadczyło jedynie 9,0% badanych – były to przede wszystkim działania niepożądane ze strony przewodu pokarmowego (4,8%) oraz bóle głowy (1,3%), żaden z badanych nie podawał natomiast bólów mięśniowych.

Realizacja leczenia

Jedna czwarta badanych (25,1%) przyznała, że „zwykle zdarza się im opuszczanie niektórych dawek leków obniżających stężenie cholesterolu”. Jako najczęstszy powód respondenci wymieniali zapomnienie (46 osób), a znacznie rzadziej – działania niepożądane (4 osoby) i obiektywne trudności wynikające z okresowego przebywania poza miejscem zamieszkania (3 osoby).

Rysunek 1 szczegółowo obrazuje deklarowaną przez pacjentów realizację leczenia. Ponad 10% pacjentów w ogóle nie rozpoczęło zaproponowanego leczenia hipolipemizującego, a zbliżony odsetek (7,5%) przerwał leczenie po zużyciu pierwszego opakowania leku, najczęściej motywując to względami finansowymi. Pacjenci, którzy przerywali leczenie na późniejszym etapie, motywowali to z kolei najczęściej decyzją lekarza,



Rysunek 1. Realizacja zaleceń terapeutycznych co do przyjmowania leków obniżających stężenie cholesterolu przez respondentów badania

Tabela 1. Powody podjęcia przez respondentów leczenia hipolipemizującego oraz oczekiwania w stosunku do tego leczenia

Co przekonało Panią/Pana do rozpoczęcia leczenia hipolipemizującego? **	%
Podwyższony poziom cholesterolu	31,9
Chęć bycia zdrowym, uniknięcia chorób	28,8
Zły stan zdrowia, obecność chorób	14,8
Lekarz	12,7
Obecność objawów chorobowych	5,7
Inne	1,7
Brak odpowiedzi	4,4
Czego przede wszystkim spodziewa się Pani/Pan w wyniku leczenia lekiem obniżającym stężenie cholesterolu? **§	
Obniżenia/normalizacji poziomu cholesterolu	58,8
Uniknięcia następstw miażdżycy	36,1
Poprawy stanu zdrowia	27,5
Lepszego samopoczucie	12,9
Dłuższego życia	2,7
Inne	3,1

* pytanie otwarte, # dotyczy osób, które zadeklarowały rozpoczęcie leczenia hipolipemizującego, N = 229, § respondenci mieli możliwość udzielenia więcej, niż jednej odpowiedzi – procenty nie sumują się więc do 100%

Tabela 2. Przyczyny, dla których, według respondentów, część ludzi przerywa leczenie lekami obniżającymi stężenie cholesterolu[§]

Przyczyna	N	%
Powody finansowe	78	30,6
Brak wiedzy o chorobie i jej skutkach, nieświadomość konsekwencji posiadania wysokiego cholesterolu	44	17,3
Brak przywiązywania wagi do leczenia, lekceważenie zagrożenia, nie zależy im na własnym zdrowiu	38	14,9
Zapominanie	27	10,6
Brak systematyczności, cierpliwości, lenistwo, niedbalstwo	22	8,6
Brak widocznych i odczuwalnych efektów leczenia	17	6,7
Brak chęci do dalszego leczenia	15	5,9
Wobec obniżonego poziomu cholesterolu i/lub lepszego samopoczucia chorym wydaje się, że są wyleczeni	10	3,9
Z powodu działań niepożądanych leków - obecnych lub spodziewanych	9	3,5
Brak czasu, zapracowanie	8	3,1
Brak wiary w skuteczność terapii	7	2,7
Zbyt długotrwałe leczenie, chorych przeraża perspektywa przyjmowania leku do końca życia	6	2,4
Brak motywacji do leczenia („wysoki cholesterol nie boli”)	4	1,6
Przyjmowanie równocześnie wielu innych leków	2	0,8
Inne	10	3,9
Nie wie	32	12,5
Brak odpowiedzi	39	15,3

[§] respondenci mieli możliwość udzielenia więcej, niż jednej odpowiedzi – procenty nie sumują się więc do 100%; N=255 osób

problemami finansowymi, lub działaniami niepożądanymi. Ostatecznie mniej, niż 2/3 badanych (61,6%) zadeklarowało pełną realizację zaleceń terapii (co oceniono na podstawie ich deklaracji dotyczącej codziennego przyjmowania leku obniżającego stężenie cholesterolu w ciągu tygodnia poprzedzającego badanie).

Motywacja do leczenia

Zdecydowana większość badanych deklarowała przywiązywanie dużej wagi do podwyższonego poziomu cholesterolu (41,6% uznawało to za stan bardzo poważny, a 46,3% - za poważny).

Tabela 3. Rodzaj pomocy, jakiej respondenci oczekiwali od lekarza, aby konsekwentnie realizować zaleconą terapię lekami obniżającymi stężenie cholesterolu

Rodzaj pomocy	N	%
Częste badania poziomu cholesterolu	92	36,1
Udzielenie wyczerpujących informacji o przepisany leku i/lub chorobie	15	5,9
Obecnie otrzymuje odpowiednią pomoc, nie wymaga dodatkowej	14	5,5
Dobór dobrych leków	13	5,1
Kontrole stanu zdrowia	7	2,7
Skuteczna terapia	6	2,4
Motywacja	5	2,0
Tańsze leki	4	1,6
Kontynuacja leczenia	2	0,8
Szybka pomoc	2	0,8
Poinformowanie o właściwej diecie	2	0,8
Inna odpowiedź	12	4,7
Trudno powiedzieć	6	2,4
Brak odpowiedzi	75	29,4
RAZEM	255	100,0

Jako powód, który przekonał ich do rozpoczęcia leczenia hipolipemizującego pacjenci, którzy rozpoczęli to leczenie, podawali przede wszystkim podwyższonego poziomu cholesterolu (31,9%), chęć bycia zdrowym i uniknięcia chorób (28,8%), oraz zły stan zdrowia (14,8) (Tabela 1). Podobne były oczekiwania badanych, związane z prowadzonym leczeniem: dotyczyły one przede wszystkim normalizacji stężenia cholesterolu, a także uniknięcia następstw miażdżycy i poprawy stanu zdrowia. Zwraca uwagę, że tylko 2,7% badanych jako swoje oczekiwanie dotyczące skutków leczenia hipolipemizującego wymieniło oczekiwanie dłuższego życia.

Wyjściowe stężenie cholesterolu u pacjentów, którzy leczenie rozpoczęli oraz nie rozpoczęli tego leczenia, było podobne (odpowiednio: 274,5 +/- 51,3 mg% i 264,2 +/- 27,6 mg%; $p > 0,05$).

Na pytanie dotyczące tego, czy wieczorna pora przyjmowania leków, wskazana w przypadku niektórych leków obniżających stężenie cholesterolu, jest porą wygodną, 79,2% badanych odpowiedziało pozytywnie. Jedynie 16,5% badanych uznało, że jest to pora niewygodna, a spośród najczęściej podawanych wyjaśnień znalazły się argumenty, że „wieczorem łatwiej jest zapomnieć o dawce leku i ją pominąć” (10 osób) oraz że „rano lepiej się pamięta” (4 osoby).

Badanych zapytano również, dlaczego część ludzi przerywa leczenie lekami obniżającymi stężenie cholesterolu. Odpowiedzi zawarto w Tabeli 2, do najczęstszych należały: powody finansowe, brak wie-

dzy o chorobie i jej skutkach, nieświadomość konsekwencji posiadania wysokiego poziomu cholesterolu oraz brak przywiązywania wagi do leczenia. Zwraca uwagę, że zaledwie 3,5% badanych jako przyczynę przerywania leczenia wskazywało na działania niepożądane stosowanych leków.

Odpowiedzi na pytanie, jakiej pomocy oczekiwali respondenci od lekarza, aby konsekwentnie realizować zaleconą terapię lekami obniżającymi stężenie cholesterolu zawarto w Tabeli 3; na pierwszym miejscu znalazło się częste kontrolowanie poziomu cholesterolu (36,1% wskazań).

Dziewięć spośród 17 twierdzeń, przedstawionych badanym do oceny w części trzeciej kwestionariusza, „raczej przekonywało” lub „całkowicie przekonywało” do systematycznego stosowania leków obniżających stężenie cholesterolu co najmniej 75% badanych, a najbardziej przekonujące komunikaty zostały ocenione w ten sposób przez 81,2% respondentów.

Rozumienie celów leczenia

Nie wszyscy z badanych deklarowali pełne poznanie i zrozumienie celów leczenia lekami obniżającymi stężenie cholesterolu: 87,5% podało, że lekarz poinformował ich, co jest celem prowadzonego leczenia, 83,5% deklarowało rozumienie celu terapii lekiem obniżającym stężenie cholesterolu, ale już tylko 75,7% twierdziło, że lekarz poinformował ich, jak długo należy się tym lekiem leczyć. Spośród badanych, 76,9% przeczy-

tało ulotkę zawartą w opakowaniu przepisane leku, ale aż 22,0% badanych znalazło tam niepokojące informacje, w tym przede wszystkim: informacje odnośnie możliwości uszkodzenia mięśni (10 osób), możliwości uszkodzenia wątroby (5 osób) oraz innych działań niepożądanych (25 osób).

Spośród osób, które zadeklarowały, że w momencie prowadzenia badania przyjmowały leki hipolipemizujące, 60,7% uznało leczenie za skuteczne, a podstawową miarą skuteczności prowadzonego leczenia było dla nich obniżenie się stężenia cholesterolu oraz lepsze samopoczucie (odpowiednio: 81,9% i 33,6% wskazań). Jedynie 3,1% osób, kontynuujących leczenie w momencie badania, uznało je za nieskuteczne, we wszystkich przypadkach w związku z brakiem obniżenia się poziomu cholesterolu.

Badanym zadano również pytanie, jak długo należy się leczyć lekiem obniżającym stężenie cholesterolu. Zwraca uwagę, że zaledwie co czwarty respondent (26,7%) wskazywał, że leczenie to prowadzić należy „do końca życia”, a niemal 25% badanych było przekonane, że leczenie to nie jest bezterminowe (tj. należy je prowadzić „do obniżenia cholesterolu”, „do osiągnięcia efektu”, „do poprawy stanu zdrowia” lub przez określony okres czasu – respondenci podawali tu okresy wynoszące od 3 miesięcy do kilku lat).

Zależność kontynuacji leczenia od innych parametrów

Nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności pomiędzy żadnym z uwzględnionych w badaniu parametrów demograficznych (tj. płcią, wiekiem, miejscem zamieszkania, poziomem wykształcenia oraz statusem zawodowym badanych) a kontynuacją leczenia w chwili prowadzenia badania ($p > 0,05$). Na kontynuację leczenia nie wpływała też istotnie opinia badanych na temat powagi stanu, jakim jest podwyższony poziom cholesterolu, obecność lub brak choroby wieńcowej, uzyskanie od lekarza informacji, jak długo należy leczyć się lekiem obniżającym stężenie cholesterolu, obecność działań niepożądanych leczenia hipolipemizującego, opinia badanych na temat wygody przyjmowania leków hipolipemizujących wieczorem oraz fakt podejmowania przez badanych działań, ułatwiających im przyjmowanie leku hipolipemizującego wieczorem. Na kontynuację leczenia istotnie statystycznie wpływało natomiast:

- przekazanie choremu przez lekarza informacji na temat tego, co jest celem leczenia,
- rozumienie celów terapii lekami obniżającymi stężenie cholesterolu,
- przeczytanie ulotki zawartej w opakowaniu leku hipolipemizującego,

- pozytywna opinia badanych na temat skuteczności prowadzonego leczenia hipolipemizującego,
- częstość wizyt u lekarza POZ: najczęściej kontynuowali leczenie pacjenci, odbywający wizyty u lekarza POZ co miesiąc (82%), co dwa miesiące (79%), lub pół roku (75%), rzadziej pacjenci odwiedzający lekarza co dwa tygodnie lub częściej (60%), a najrzadziej ci, którzy odwiedzali lekarza raz w roku lub rzadziej (31%) ($p < 0,01$).

WPLYW INTERWENCJI EDUKACYJNO-BEHAWIORALNEJ NA PRZESTRZEGANIE ZALECEŃ TERAPEUTYCZNYCH PODCZAS LECZENIA HIPERLIPIDEMII

W oparciu o wyniki uzyskane w pierwszym badaniu, opracowano interwencję, mającą na celu poprawę przestrzegania zaleceń terapeutycznych podczas leczenia hiperlipidemii. Jej element edukacyjny opierał się na specjalnie zaprojektowanych materiałach drukowanych, zawierających informacje pozytywnie zweryfikowane co do ich oddziaływania na wzrost motywacji do systematycznego leczenia hiperlipidemii. Kolejne z zestawu tych materiałów badani otrzymywali podczas każdej wizyty kontrolnej (to jest co 8 tygodni, począwszy od rozpoczęcia badania). Towarzyszył temu element behawioralny, polegający na poproszeniu badanych o wybranie czynności rutynowo wykonywanej wieczorem, w celu przypominania im o konieczności przyjęcia leku. Podczas każdej wizyty kontrolnej, lekarz prowadzący miał za zadanie zapytać pacjenta, czy wybrana przez niego czynność przypominająca sprawdza się w praktyce, a w przypadku jej nieskuteczności, ustalić z pacjentem inną czynność przypominającą.

Skuteczność tej interwencji edukacyjno-behawioralnej przetestowano w ramach randomizowanego badania klinicznego. Do badania włączani byli pacjenci ambulatoryjni z nieleczoną hipercholesterolemią (cholesterol całkowity $\geq 250\text{mg\%}$), w wieku 40-80 lat. Włączeni do badania pacjenci otrzymali zalecenie przyjmowania simwastatyny, w wyjściowej dawce 20 mg jeden raz na dobę, wieczorem (*Simvastrol, Polpharma*). Dawkę simwastatyny zwiększano do 40 mg jeden raz na dobę, wieczorem, jeśli poziom cholesterolu całkowitego po upływie 16 lub 32 tygodni leczenia wynosił $\geq 250\text{mg\%}$. Przydzielano do grupy interwencji lub do grupy kontrolnej, która otrzymywała zwykłą opiekę, odbywał się w sposób losowy, z zachowaniem stosunku 1:1. Okres obserwacji wynosił 48 tygodni.

Pierwszorzędownym punktem końcowym było przestrzeganie zaleceń terapeutycznych, wyrażone za pomocą współczynnika posiadania leków (*medication possession ratio*, MPR), który obliczany był za pomo-

cą ilorazu liczby dni, podczas których w wyniku przepisania kolejnych recept pacjent był w posiadaniu simwastatyny, do całkowitej liczby dni okresu obserwacji. Dodatkowo, oceniany był także odsetek pacjentów kontynuujących leczenie oraz długość nieprzerwanego leczenia.

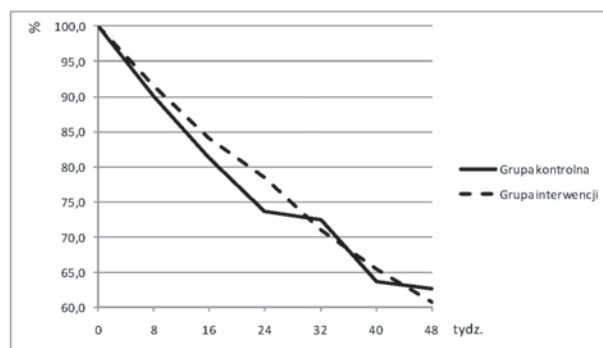
Do badania włączono 198 pacjentów, których średni wiek wynosił $59,6 \pm 9,1$ lat. Badane grupy nie różniły się pomiędzy sobą w zakresie płci, wieku, wagi, wzrostu, współczynnika masy ciała oraz wyjściowych parametrów lipidogramu.

Pacjenci z grupy interwencji wybierali różne czynności w celu przypominania im o konieczności systematycznego przyjmowania leków, najczęściej była to kolacja (53,3%). Podczas kolejnych wizyt, pacjenci uznawali wybrane przez siebie czynności przypominające o konieczności przyjęcia leku za przydatne w ponad 90% przypadków. Podczas pierwszej wizyty kontrolnej, to jest po 8 tygodniach obserwacji, jedynie 6% pacjentów kontynuujących badanie dokonało zmiany wybranej przez siebie czynności na inną, podczas kolejnych wizyt odsetek ten był jeszcze niższy.

Odsetek pacjentów kontynuujących terapię malał wraz z długością obserwacji do nieco ponad 60% i był porównywalny w obu grupach (Rys. 2). Średni czas kontynuacji terapii wynosił 35,5 tyg. w grupie kontrolnej i 36,1 tyg. w grupie interwencji ($p > 0,05$). Badane grupy różniły się istotnie pod względem poziomu przestrzegania zaleceń terapeutycznych: średnia wartość MPR ($\pm$ SD) wynosiła $95,4 \pm 53,7\%$ w grupie interwencji i $81,7\% \pm 31,0\%$ w grupie kontrolnej ($p < 0,05$). Nie zaobserwowano istotnego zróżnicowania MPR w zależności od płci ani wieku w żadnej z badanych grup, ani dla całości badanych, z wyjątkiem grupy kontrolnej, w której MPR osiągał większe wartości wśród osób starszych (odpowiednio $92,0 \pm 22,7\%$ wśród pacjentów w wieku 65 i więcej lat, w porównaniu z $78,2 \pm 32,7\%$ wśród młodszych badanych, $p < 0,05$).

W obu grupach obserwowano systematyczny spadek poziomu cholesterolu całkowitego, LDL-cholesterolu i trójglicerydów, przy względnie stałym poziomie HDL-cholesterolu. Na etapie zakończenia 48-tygodniowej obserwacji, badane grupy nie różniły się pomiędzy sobą wartością żadnego z powyższych parametrów ($p > 0,05$).

Objawy niepożądane wystąpiły u łącznie 20,7% badanych, z podobną częstością w obu grupach (odpowiednio: 22,4% w grupie interwencji oraz 18,7% w grupie kontrolnej, $p < 0,05$). Najczęściej miały one charakter łagodnych dolegliwości ze strony przewodu pokarmowego. W żadnej z badanych grup przestrzeganie zaleceń terapeutycznych, wyrażone za pomocą MPR, nie było



Rysunek 2. Zmiana odsetka badanych kontynuujących leczenie simwastatyną, w zależności od przydziału do grupy badania klinicznego

istotnie zróżnicowane w zależności od występowania lub braku działań niepożądanych.

DYSKUSJA

Nieprzestrzeganie zaleceń terapeutycznych jest jedną z podstawowych barier rozwoju współczesnej medycyny. To ono odpowiedzialne jest za rozbieżność efektywności terapii, obserwowanej w praktyce, z wynikami osiąganymi w ściśle kontrolowanych warunkach randomizowanych badań klinicznych. Pacjenci, nie stosujący się do zaleceń terapeutycznych, nie osiągają możliwych do osiągnięcia korzyści. Co więcej, w zwiększony sposób korzystają z usług medycznych i są źródłem dodatkowych kosztów [15]. Koszty te oceniane są w Niemczech na co najmniej 10 mld euro rocznie [16]. Według ostrożnych szacunków autora, koszty ponoszone w związku z nieprzestrzeganiem zaleceń terapeutycznych z budżetu powszechnego systemu opieki zdrowotnej w Polsce mogą wynosić około 6 mld zł rocznie.

Badania prowadzone w Polsce potwierdzają wysoką częstość nieprzestrzegania zaleceń terapeutycznych, nawet w przypadku pacjentów chorujących na choroby objawowe, takie jak choroba wieńcowa [17,18]. Nieprzestrzeganie zaleceń terapeutycznych jest jednak szczególnie częste w przypadku schorzeń przewlekłych o charakterze asymptomatycznym, w przypadku których prowadzone leczenie nie przynosi bezpośrednich, zauważalnych przez pacjenta efektów [19]. Do najczęstszych schorzeń tego typu należy hiperlipidemia, która z racji swoich poważnych następstw, ma jednocześnie istotne znaczenie społeczne. Mając na uwadze wysokie rozpowszechnienie tego schorzenia w Polsce [20] oraz społeczną skalę następstw zdrowotnych (choroba wieńcowa, zawały, udary, zaburzenia krążenia obwodowego, zgony) i pozazdrowotnych tej choroby, zapewnienie odpowiednio wysokiego poziomu przestrzegania zaleceń terapeutycznych podczas terapii tego schorzenia staje się istotną potrzebą społeczną. Tymczasem,

jak wykazała analiza danych dotyczących realizacji recept w lubuskim oddziale NFZ, zaledwie 12% pacjentów leczy się statynami systematycznie, przyjmując co najmniej 80% zaleconych dawek [6]. Stwierdzony w niniejszym badaniu poziom przestrzegania zaleceń terapeutycznych – zaledwie około 60% badanych, którzy stwierdzili, że realizowali w pełni zalecenia terapii lekiem obniżającym stężenie cholesterolu w trakcie tygodnia poprzedzającego badanie – jest potwierdzeniem tej reguły.

Osiągnięcie poprawy przestrzegania zaleceń terapeutycznych w przypadku hiperlipidemii jest zatem szczególnie ważne. W ramach niniejszego projektu podjęto próbę odpowiedzi na pytania dotyczące przyczyn nieprzestrzegania zaleceń terapeutycznych podczas leczenia tej choroby oraz skutecznych metod profilaktycznych i naprawczych. Jest to o tyle ważne, że w wielu badaniach wykazano zmniejszoną o 30-50% śmiertelność wśród pacjentów systematycznie stosujących leki hipolipemizujące, w porównaniu z pacjentami nie przestrzegającymi zaleceń terapii [16,21].

Zwraca uwagę, że do podjęcia leczenia lekiem hipolipemizującym skłaniało badanych pacjentów przede wszystkim wysokie stężenie cholesterolu. Ich oczekiwania co do leczenia obejmowały obniżenie jego stężenia, a oczekiwania co do pomocy ze strony lekarza – częste kontrole poziomu cholesterolu. Spodziewane wydłużenie życia nie było natomiast argumentem, skłaniającym badanych do leczenia - zaledwie co 40-ty badany podał taką motywację! Miarą skuteczności prowadzonego leczenia było według badanych przede wszystkim obniżenie się stężenia cholesterolu, a świadectwem jego nieskuteczności – brak takiego efektu. Znaczna część badanych nie została poinformowana przez lekarzy prowadzących, jak długo należy leczyć się lekiem hipolipemizującym, być może zatem dlatego jedynie co 4-ty pacjent uważał, że leczenie takie należy prowadzić bezterminowo.

Wbrew oczekiwaniom, pacjenci nie wskazywali na wieczorną porę przyjmowania leku hipolipemizującego jako realną barierę w realizacji tego leczenia. Z innych badań wiadomo jednak, że przyjmowanie leków wieczorem napotyka znacznie więcej problemów podczas realizacji, niż stosowanie tych samych leków w godzinach porannych [22].

Co ważne, działania niepożądane nie były doświadczane przez badanych często – podało je łącznie zaledwie 9,0% badanych, a jeszcze rzadziej wskazywane były one przez badanych jako przyczyna, dla której ludzie przerywają leczenie hipolipemizujące. Podobnie, nie pojawiały się one potem często w ramach randomizowanego badania klinicznego, w którym do leczenia hi-

perlipidemii wykorzystano simwastatynę. Dla odmiany pacjenci przerywający leczenie najczęściej wskazywali na problemy finansowe, tą samą przyczynę wymieniali respondenci także na pierwszym miejscu wśród przyczyn, dla których w ich mniemaniu, inni ludzie przerywają leczenie hipolipemizujące. Wskazuje to zatem na generalnie bardzo dobrą tolerancję leków hipolipemizujących oraz na potencjalną rolę, jaką w przestrzeganiu zaleceń terapeutycznych odegrać może stosowanie leków niedrogich. W wielu badaniach zaobserwowano bowiem, że zwiększenie dostępności finansowej leków poprawia przestrzeganie zaleceń terapeutycznych [16]. Podkreślić należy, że w chwili obecnej wszystkie ważniejsze leki hipolipemiczne mają na polskim rynku dostępne wersje generyczne, co pozwala zaoferować pacjentom wysokiej jakości leczenie w przystępnej cenie.

Zwraca również uwagę, że wśród parametrów, różniących prawdopodobieństwo kontynuacji leczenia, nie znalazł się żaden z parametrów demograficznych, w przeciwieństwie do parametrów związanych z komunikacją lekarz-pacjent (przekazanie choremu przez lekarza informacji na temat tego, co jest celem leczenia) oraz rozumienia celowości prowadzonej terapii. Komunikacja ta jest szczególnie efektywna, gdy bezpośrednio podejmuje temat przestrzegania zaleceń terapeutycznych. Jak wykazano w niedawnym przeglądzie systematycznym, szczególnie dobre efekty dają te interwencje zmierzające do poprawy przestrzegania zaleceń terapeutycznych, które uwzględniają współpracę z pacjentem w oparciu o informacje odnośnie realizacji terapii, uzyskiwane dzięki obiektywnej ocenie przestrzegania zaleceń terapeutycznych [23]. Należy zatem mieć nadzieję, że wprowadzany w Polsce system elektronicznego konta pacjenta oraz elektronicznych recept ułatwi lekarzom, farmaceutom i pacjentom choć przybliżony wgląd w realizację zaleceń terapeutycznych i tym samym, stanie się dobrym punktem wyjścia do wdrażania takich interwencji w codziennej praktyce.

Sytuacja ta zmusza do poszukiwania interwencji poprawiających przestrzeganie przez pacjentów zaleceń terapeutycznych podczas leczenia hipolipemizującego. Prowadzone w tym celu badania nie przyniosły jednak dotychczas w pełni zadawalających efektów. Jak podkreślają autorzy meta-analizy, obecne metody poprawy przestrzegania zaleceń terapeutycznych w przypadku schorzeń przewlekłych są najczęściej skomplikowane i mało skuteczne. Zaobserwowano, że w przypadku leczenia przewlekłego, największą skuteczność w poprawie przestrzegania zaleceń terapeutycznych osiągają interwencje złożone [24]. Wychodząc z tego założenia, w niniejszym projekcie poddano ocenie skuteczność interwencji złożonej z elementów edukacyjnych (materiały informacyjne dystrybuowane wśród pacjentów) oraz behawioralnych (zaadoptowanie rutynowej czyn-

ności mającej przypominać o konieczności przyjęcia leku). Jak wykazało badanie, ta niedroga i relatywnie prosta interwencja przyczyniła się do istotnej poprawy przestrzegania zaleceń terapeutycznych, wyrażonego za pomocą MPR.

W opublikowanym niedawno przeglądzie systematycznym, oceniającym wpływ różnych interwencji na przestrzeganie zaleceń terapeutycznych podczas leczenia statynami, zidentyfikowano łącznie 11 badań, wykorzystujących 4 kategorie interwencji: 1. uproszczenie schematu leczenia, 2. edukację pacjentów 3. wzmocnienie pacjentów i przypomnienia 4. złożone podejście behawioralne. Z tych czterech kategorii w ocenie autorów najbardziej obiecujące okazało się wzmocnienie pacjentów i przypomnienia, zastosowane w 6 badaniach, spośród których w 4 przypadkach wykazano istotną statystycznie poprawę przestrzegania zaleceń terapeutycznych [25].

Podkreślić należy, że z cytowanego powyżej przeglądu systematycznego wynika, iż element behawioralny interwencji, zastosowany w niniejszym projekcie, czyli zaadoptowanie przez pacjentów rutynowej czynności przypominającej o konieczności przyjęcia leku, nie był dotychczas wykorzystywany w interwencjach zmierzających do poprawy przestrzegania leczenia hipolipemizującego i ma charakter innowacyjny. Jego rola jest tym większa, że zastosowana w niniejszym badaniu simwastatyna, podobnie jak i inne statyny, jest lekiem, który powinien być przyjmowany w godzinach wieczornych. Pomimo wymogu przyjmowania zaledwie jednej dawki dobowej, fakt ten sprzyja nieprzestrzeganiu zaleceń terapeutycznych pod postacią opuszczenia pojedynczych dawek leku. Wieczorne dawki leku przyjmowane są bowiem przez pacjentów mniej systematycznie, niż dawki przyjmowane w godzinach porannych [22].

Interpretując wyniki niniejszego projektu, należy być świadomym jego ograniczeń. I tak jednoośrodkowy charakter badania klinicznego oraz ograniczona liczebność badanych narzucają oczywiste ograniczenia. W badaniu nie brano również pod uwagę, czy pacjenci przyjmowali simwastatynę w prewencji pierwotnej, czy wtórnej, choć kryterium włączenia sprowadzające się do nieleczzonego, podwyższonego poziomu cholesterolu, pośrednio faworyzowało prewencję pierwotną. Z innych badań wiadomo natomiast, że w prewencji pierwotnej częściej dochodzi do całkowitego przerwania leczenia hipolipemizującego, niż w prewencji wtórnej [5, 26]. Zastosowana w niniejszym badaniu procedura, polegająca na ocenie liczby i czasu wystawienia recept, a nie liczby i czasu ich realizacji, wynikała z braku pełnej komputeryzacji systemu obsługi recept w Polsce, co nie pozwala w praktyce na uzyskanie danych o realizacji recept przez indywidualnego pacjenta. Sytuacja ta

może ulec zmianie w przyszłości, wraz z wprowadzeniem na szeroką skalę systemu e-recept. Wreszcie brak obserwowanego wpływu zastosowanej interwencji na parametry lipidogramu można wiązać z faktem, że liczebność badanych została wyliczona z myślą o pierwszorzędownym punkcie końcowym.

Opisane ograniczenia nie zmniejszają wagi, ani praktycznej użyteczności obserwowanych wyników. Osiągnięta dzięki interwencji edukacyjno-behawioralnej poprawa przestrzegania zaleceń terapeutycznych może bowiem prowadzić do zwiększenia skuteczności leczenia hipercholesterolemii, zapobiegania jej powikłaniom, a pośrednio – do wzrostu zdrowotności społeczeństwa, zmniejszenia umieralności, w tym zwłaszcza, dzięki skutecznej pierwotnej i wtórnej profilaktyce choroby wieńcowej, zmniejszenia nadumieralności mężczyzn, wydłużenia się średniej długości życia w Polsce, a także zmniejszenia wydatków na leczenie powikłań hipercholesterolemii, w tym zwłaszcza wydatków ponoszonych na hospitalizacje spowodowane ostrymi zespołami wieńcowymi i udarami, a także wydatków na zabiegi kardiologii interwencyjnej, oraz wydatków związanych z niezdolnością do pracy i pobieraniem rent chorobowych przez pacjentów chorujących na choroby o etiologii miażdżycowej. Udowodniono bowiem, że oprócz ewidentnych korzyści zdrowotnych, poprawa przestrzegania zaleceń terapeutycznych podczas leczenia hiperlipidemii wiedzie do redukcji kosztów ponoszonych przez systemy opieki zdrowotnej [15]. Dodatkowa możliwość zastosowania praktycznego uzyskanych wyników wiąże się z faktem, że na bazie doświadczeń zdobytych podczas realizacji niniejszego projektu, przygotować będzie można analogiczne strategie zmierzające do polepszenia przestrzegania zaleceń terapeutycznych w warunkach ambulatoryjnej opieki zdrowotnej podczas leczenia innych chorób przewlekłych o charakterze cywilizacyjnym, w tym zwłaszcza chorób skąpoobjawowych, takich jak nadciśnienie czy cukrzyca typu 2.

PODSUMOWANIE

Projekt STRATuS został zakończony, a jego wyniki zostały ogłoszone drukiem [27, 28]. W ogólnym podsumowaniu wyników należy stwierdzić, że:

Znaczna część pacjentów (blisko 40%) badanych w badaniu ankietowym nie przestrzegała zaleceń terapeutycznych podczas terapii hiperlipidemii.

Główną motywacją pacjentów do stosowania leków hipolipemizujących była w tym przypadku chęć obniżenia stężenia cholesterolu, a ich oczekiwania dotyczyły częstego badania jego poziomu.

Na przestrzeganie zaleceń nie wpływały badane cechy demograficzne. Brak efektywnej komunikacji pomiędzy lekarzem i pacjentem stanowił natomiast ważny powód nieprzestrzegania zaleceń terapeutycznych. W szczególności, znaczna część pacjentów nie znała właściwych ram czasowych leczenia lekami hipolipemizującymi.

Badani deklarowali motywów finansowe jako częsty powód nieprzestrzegania zaleceń terapeutycznych podczas leczenia hiperlipidemii. Wskazuje to na potencjalną rolę, jaką w poprawie przestrzegania zaleceń terapeutycznych odegrać może stosowanie leków niedrogich.

Prosta, niedroga interwencja edukacyjno-behawioralna okazała się skuteczna w zwiększaniu przestrzegania zaleceń terapeutycznych podczas profilaktycznego sto-

sowania statyn w warunkach ambulatoryjnych. Biorąc pod uwagę, że pacjenci osiągają korzyści z leczenia hipolipemizującego, pod warunkiem co najmniej 2-letniego ciągłego leczenia, wyniki te mogą mieć istotne znaczenie kliniczne i ekonomiczne.

PODZIĘKOWANIE

Badania zostały sfinansowane ze środków Naukowej Fundacji Polpharmy, w ramach grantu 39/2008 (STRATUs - Wpływ kompleksowej STRATegii edukacyjno-behawioralnej na przestrzeganie zaleceń terapeutycznych podczas leczenia hipolipemizującego statynami w warunkach podstawowej opieki zdrowotnej). Sponsor nie brał udziału w projektowaniu i przeprowadzeniu badania, nie miał również wpływu na interpretację jego wyników.

Ramka 1. Stan wiedzy w chwili rozpoczęcia projektu

- Systematyczność leczenia przez pacjentów schorzeń przewlekłych jest daleka od oczekiwań.
- Pacjenci szczególnie często nie stosują się do zaleceń terapeutycznych podczas terapii schorzeń bezobjawowych.
- Nieprzestrzeganie zaleceń terapeutycznych wiedzie do poważnych konsekwencji zdrowotnych i ekonomicznych.

Ramka 2. Co przyniosła realizacja grantu Naukowej Fundacji Polpharmy

- Poprawa komunikacji lekarz-pacjent oraz stosowanie niedrogich leków może przyczynić się do poprawy przestrzegania zaleceń terapeutycznych podczas leczenia hiperlipidemii.
- Użycie odpowiednich informacji może poprawić motywację pacjentów do systematycznego leczenia hiperlipidemii.
- Opracowana w ramach badania realizowanego w oparciu o grant prosta interwencja edukacyjno-behawioralna poprawia przestrzeganie zaleceń podczas hiperlipemii i może stanowić podstawę opracowania podobnych interwencji do zastosowania w przypadku innych schorzeń cywilizacyjnych.

Ramka 3. Dalsze kierunki badań

Planowane jest wykorzystanie wyników grantu przy opracowaniu ogólnopolskiego systemu monitorowania i wczesnego wykrywania nieprzestrzegania zaleceń terapeutycznych na podstawie systemu Internetowego Konta Pacjenta i e-recept.

PIŚMIENICTWO

- Pająk A, Wiercińska E, Polakowska M, Kozakiewicz K, Kaczmarczyk-Chałas K, Tykarski A, Gaździk D, Zdrojewski T. Rozpowszechnienie dyslipidemii u mężczyzn i kobiet w wieku 20–74 lat w Polsce. Wyniki programu WOBASZ. *Kardiologia Polska* 2005; 63: 6 (supl. 4): S1-6.
- Bandosz P, O'Flaherty M, Drygas W, Rutkowski M, Koziarek J, Wyrzykowski B, Bennett K, Zdrojewski T, Capewell S. Decline in mortality from coronary heart disease in Poland after socioeconomic transformation: modelling study. *BMJ*. 2012; 344: d81
- Sabate E (red). Adherence to long-term therapies: evidence for action. Geneva, World Health Organization, 2003.36.
- Chapman RH, Benner JS, Petrilla AA, Tierce JC, Collins SR, Battleman DS, Schwartz JS. Predictors of adherence with antihypertensive and lipid-lowering therapy. *Arch Intern Med* 2005; 165(10): 1147-52.
- Jackevicius CA, Mamdani M, Tu JV. Adherence with statin therapy in elderly patients with and without acute coronary syndromes. *JAMA* 2002; 288(4): 462-7.
- Wiśniowska B, Skowron A. Evaluation of patients' adherence to statins in Poland. *Curr Med Res Opin*. 2011; 27(1): 99-105.
- Watanabe JH, Bounthavong M, Chen T. Revisiting the medication possession ratio threshold for adherence in lipid management. *Curr Med Res Opin*. 2013 Mar;29(3):175-80.
- Perreault S, Dragomir A, Blais L, Bérard A, Lalonde L, White M, Pilon D. Impact of better adherence to statin agents in the primary prevention of coronary artery disease. *Eur J Clin Pharmacol*. 2009; 65(10): 1013-24.
- Rasmussen JN, Chong A, Alter DA. Relationship between adherence to evidence-based pharmacotherapy and long-term mortality after acute myocardial infarction. *JAMA*. 2007; 297(2): 177-86.
- McGinnis BD, Olson KL, Delate TM, Stolcpart RS. Statin adherence and mortality in patients enrolled in a secondary prevention program. *Am J Manag Care*. 2009 Oct;15(10):689-95.
- Poluzzi E, Piccinni C, Carta P, Puccini A, Lanzoni M, Motola D, Vaccheri A, De Ponti F, Montanaro N. Cardiovascular events in statin recipients: impact of adherence to treatment in a 3-year record linkage study. *Eur J Clin Pharmacol*. 2011; 67(4): 407-14.
- Bouchard MH, Dragomir A, Blais L, Bérard A, Pilon D, Perreault S. Impact of adherence to statins on coronary artery disease in primary prevention. *Br J Clin Pharmacol* 2007; 63(6): 698-708.
- Ho PM, Magid DJ, Masoudi FA, McClure DL, Rumsfeld JS. Adherence to cardioprotective medications and mortality among patients with diabetes and ischemic heart disease. *BMC Cardiovasc Disord*. 2006; 6: 48., doi:10.1186/1471-2261-6-48.
- Peterson AM, Takiya L, Finley R. Meta-analysis of interventions to improve drug adherence in patients with hyperlipidemia. *Pharmacotherapy*. 2003 Jan;23(1):80-7.
- Roebuck MC, Liberman JN, Gemmill-Toyama M, Brennan TA. Medication adherence leads to lower health care use and costs despite increased drug spending. *Health Aff* 2011; 30(1): 91-9.
- Laufs U, Rettig-Ewen V, Böhm M. Strategies to improve drug adherence. *Eur Heart J*. 2011; 32(3): 264-8.
- Kardas P. Compliance, Clinical Outcome, And Quality Of Life Of Patients With Stable Angina Pectoris Receiving Once Daily Betaxolol Versus Twice Daily Metoprolol: A Randomized Controlled Trial. *Vas Health Risk Manag* 2007; 3(2): 235-42.
- Kardas P. Comparison Of Once Daily Versus Twice Daily Oral Nitrates In Stable Angina Pectoris. *Am J Cardiol* 2004; 94: 213-6.
- DiMatteo MR. Variations in patients' adherence to medical recommendations: a quantitative review of 50 years of research. *Med Care* 2004; 42(3): 200-9.
- Konduracka E, Józwiak J, Mastaj M, Lukas W, Tykarski A, Szczepaniak-Chicheł L, Piwowarska W. Rozpowszechnienie i niska skuteczność leczenia dyslipidemii w prewencji pierwotnej i wtórnej choroby niedokrwiennej serca na poziomie lekarzy medycyny rodzinnej - wyniki ogólnopolskiego badania epidemiologicznego LIPIDOGRAm 2004. *Przegl Lek* 2008; 65(12): 834-7.
- Ansell BJ. Not getting to goal: the clinical costs of noncompliance. *J Manag Care Pharm* 2008; 14(6 Suppl B): 9-15.
- Mengden T, Binswanger B, Spühler T, Weisser B, Vetter W. The use of self-measured blood pressure determinations in assessing dynamics of drug compliance in a study with amlodipine once a day, morning versus evening. *J Hypertens*. 1993; 11(12): 1403-11.
- Demonceau J, Ruppert T, Kristanto P, Hughes DA, Fargher E, Kardas P, De Geest S, Dobbels F, Lewek P, Urquhart J, Vrijens B; for the ABC project team. Identification and Assessment of Adherence-Enhancing Interventions in Studies Assessing Medication Adherence Through Electronically Compiled Drug Dosing Histories: A Systematic Literature Review and Meta-Analysis. 2013; 73(6): 545-62.
- Haynes RB, Ackloo E, Sahota N, McDonald HP, Yao X. Interventions for enhancing medication adherence. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008 Apr 16;(2):CD000011.
- Schedlbauer A, Davies P, Fahey T. Interventions to improve adherence to lipid lowering medication. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010 Mar 17;(3):CD004371.
- Tsuyuki RT, Bungard TJ. Poor adherence with hypolipidemic drugs: a lost opportunity. *Pharmacotherapy*. 2001 May;21(5): 576-82.
- Kardas P. Prevalence and reasons for non-adherence to hyperlipidemia treatment. *Central European Journal of Medicine*, 2013; 8(5): 539-47.
- Kardas P. An education-behavioural intervention improves adherence to statins. *Cent Eur J Med* 2013; 8(5): 580-5.

Postępy Polskiej Medycyny i Farmacji. Zeszyty Naukowej Fundacji Polpharmy (dalej **Zeszyty**) to czasopismo naukowe publikujące przeglądowe i pogładowe prace naukowe powstałe w oparciu o projekty badawcze finansowane ze środków Naukowej Fundacji Polpharmy. Tematyka prac publikowanych w czasopiśmie obejmuje szereg zagadnień z zakresu medycyny i farmacji. **Celem publikacji jest prezentacja osiągnięć Autorów projektów finansowanych przez Fundację w odniesieniu do stanu wiedzy w obszarze nauki, którego dotyczył realizowany projekt.**

Skład Rady Naukowej gwarantuje wysoki poziom publikowanych prac.

Postępy Polskiej Medycyny i Farmacji będą ukazywać się raz w roku. Redakcja przyjmuje do druku artykuły w języku polskim lub angielskim, przy czym tytuł, streszczenie, słowa kluczowe i afiliacje powinny być dodatkowo napisane w języku angielskim (lub polskim w przypadku prac anglojęzycznych).

Redakcja **Postępów Polskiej Medycyny i Farmacji** uznaje zasady zawarte w *Deklaracji Helsińskiej* i w związku z tym oczekuje od autorów, aby wszelkie badania wykonane z udziałem człowieka zostały przeprowadzone zgodnie z tymi zasadami.

REGULAMIN RECENZOWANIA I PRZYJMOWANIA PRAC

Redakcja rozpatruje nadesłane prace, które zostaną uznane przez recenzentów i redaktorów za właściwe pod względem tematyki i stanowiące oryginalny wkład do postępu w nauce i/lub praktyce klinicznej lub posiadają pożądane walory dydaktyczne (szkoleniowe). Podpis pierwszego autora pod oświadczeniem jest równoznaczny ze stwierdzeniem, że:

- złożona praca jest własna,
- wszyscy autorzy wyrażają zgodę na publikację przedstawionego materiału.

Otrzymany manuskrypt jest na wstępie oceniany przez zespół redakcyjny **Postępów Polskiej Medycyny i Farmacji** pod względem poprawności przygotowania manuskryptu, dokumentacji fotograficznej, obecności zgody wszystkich autorów na publikację. Manuskrypty niekompletne będą zwracane autorom do uzupełnienia bez analizy merytorycznej.

Manuskrypt, co do którego nie ma uwag wstępnych, zostaje opatrzony kolejnym numerem, o którym informuje się autora korespondencyjnego. Maszynopis każdej pracy poddaje się recenzjom. Kompetentnych recenzentów wyznacza Redaktor Naczelny. Recenzenci przygotowują opinie, które zawierają uzasadnione zalecenia i sugestie poprawek i uzupełnień treści i formy artykułu. Recenzje są anonimowe.

Dyskwalifikacja nadesłanego maszynopisu wymaga dwóch negatywnych recenzji. Redaktor Naczelny zastrzega sobie prawo odmowy druku pracy zawierającej wyniki badań, w których nie

przestrzegano zasad etycznych eksperymentu klinicznego sformułowanych w deklaracji Światowego Zgromadzenia Medycznego w Helsinkach w r. 1964, w Tokio w 1975 i w zaleceniach Światowej Organizacji Zdrowia w 1982 r.

Ostateczna decyzja o przyjęciu pracy do druku lub jej odrzuceniu należy do uprawnień Rady Naukowej i nie podlega odwołaniu. Podjętych decyzji Rada Naukowa nie musi uzasadniać.

Proces recenzowania pracy nie powinien trwać dłużej niż 3-4 tygodnie, jednak Redakcja nie może zagwarantować określonego terminu podjęcia decyzji.

ZEZWOLENIA NA DRUK

Materiałom wykorzystanym z innych źródeł musi towarzyszyć pisemna zgoda pierwszego autora, jak i wydawcy pierwotnej publikacji, w której materiał ten został opublikowany, w których wyrażona jest zgoda na przedruk na łamach **Postępów Polskiej Medycyny i Farmacji**.

W stosunku do prac, które są w trakcie przygotowania do druku należy uzyskać zgodę na piśmie od autorów, osoby, jak również Redakcji czasopisma, które udostępniło dane niepublikowane lub informacje ustne wykorzystywane w artykule.

POUFNOŚĆ INFORMACJI O PACJENCIE

Zmiana danych biograficznych pacjenta w celu ochrony tożsamości stanowi manipulację danych i nie powinna mieć miejsca. Niemniej jednak autorzy prac naukowych mają obowiązek ochraniać dane osobowe pacjenta. Publikować należy wyłącznie informacje o znaczeniu naukowym czy klinicznym. W związku z tym, jeżeli zawarte w artykule informacje umożliwiają w jakikolwiek sposób ustalenie tożsamości badanej osoby, autorzy muszą uzyskać pisemną zgodę tej osoby lub jej opiekuna na opublikowanie jej wyników, w tym zdjęć fotograficznych, obrazów radiologicznych i innych przed złożeniem pracy do druku. Szczegóły dotyczące rasy, pochodzenia etnicznego, kulturowego i religii osoby badanej powinny być podane wyłącznie w przypadku, gdy, zdaniem autora, wywierają wpływ na przebieg choroby i/ lub leczenia dyskutowanego w danym tekście.

PRAWA AUTORSKIE

Po akceptacji pracy do druku autorzy przekazują prawa autorskie Naukowej Fundacji Polpharmy. Od momentu akceptacji pracy do druku w **Postęпах Polskiej Medycyny i Farmacji** informacji w niej zawartych nie wolno ujawnić w prasie do czasu ukazania się numeru czasopisma, w którym artykuł występuje.

Po akceptacji pracy do druku złożone materiały stają się własnością Naukowej Fundacji Polpharmy i nie mogą się ukazywać w innej publikacji bez pisemnej zgody Naukowej Fundacji Polpharmy.

Za datę przyjęcia do druku uważa się datę nadesłania ostatecznej wersji artykułu. Redakcja dostarcza jeden egzemplarz czasopisma każdemu autorowi opublikowanej pracy.

ODPOWIEDZIALNOŚĆ CYWILNA

Wydawca i Rada Naukowa czynią wszelkie starania, aby zapewnić rzetelność informacji, opinii i stwierdzeń zawartych w artykule ukazującym się w **Postęпах Polskiej Medycyny i Farmacji**. Niemniej jednak za treść artykułów i reklam odpowiada wyłącznie autor, sponsor lub firma marketingowa. Zgodnie z powyższym ani Wydawca, ani Rada Naukowa, ani Naukowa Fundacja Polpharmy nie ponoszą odpowiedzialności za skutki ewentualnych nierzetelności.

Redakcja stara się zapewnić w zakresie publikacji rzetelność dawkowania leków i innych danych ilościowych. Jednakowoż Redakcja zaleca czytelnikom, aby wszystkie metody i techniki polegające na podawaniu leków opisane w **Postęпах Polskiej Medycyny i Farmacji**, były stosowane wyłącznie zgodnie z instrukcjami i zaleceniami producentów leków lub sprzętu, wydanymi w kraju danego czytelnika.

KATEGORIE ARTYKUŁÓW

Redakcja **Postępów Polskiej Medycyny i Farmacji** przyjmuje do druku:

- **Prace Przeglądowe**, tj. doniesienia przedstawiające obecny stan wiedzy na dany temat, ze szczególnym uwzględnieniem bieżących kontrowersji, podejścia teoretycznego i praktycznego do zagadnienia, nierozwiązanych problemów itp., uwzględniające właściwie dobrane piśmiennictwo.
- **Prace Poglądowe**: opisy dotyczące ważnych zagadnień, kontrowersji i opinii w medycynie i farmacji, teksty dydaktyczne (szkoleniowe).
- **Krótkie Doniesienia**: opisy wybranych rozwiązań klinicznych w przypadku konkretnych problemów, ewentualnie nowe odkrycia jeszcze niepotwierdzone eksperymentalnie.

INSTRUKCJA DLA AUTORÓW

Niniejszy regulamin jest zgodny z wytycznymi opracowanymi przez Wspólny Komitet Wydawców Czasopism Biomedycznych, opublikowanymi w opracowaniu pt.: „Jednolite wymagania dotyczące prac złożonych do druku w czasopismach biomedycznych” (Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals N Eng J Med 1997; 336: 309-15; www.acponline.org/journals/resource/unifreq.htm).

PRZYGOTOWYWANIE I NADSYŁANIE MANUSKRYPTÓW

Tekst

Manuskrypt powinien być przygotowany w dowolnej wersji Microsoft Word. Tekst należy pisać czcionką 12-punktową *Times New Roman* z odstępami półtorej linii pomiędzy wierszami.

Tabele

Tabele można nadsyłać w dowolnej wersji edytora tekstowego Microsoft Word, bądź arkusza kalkulacyjnego Microsoft Excel.

Wykresy

Wykresy lub diagramy powinny być nadesłane w postaci plików:

- Microsoft Word (wklejone rysunki),
- prezentacji Microsoft Power Point,
- wykresów arkusza kalkulacyjnego Microsoft Excel,
- graficznych o rozszerzeniach *.jpg, *.gif, *.tiff

Każdy wykres czy diagram powinien być zawarty w oddzielnym pliku. W przypadku użycia jakiegokolwiek innego oprogramowania (np. statystycznego), prosimy o kontakt z redakcją w celu uzgodnienia szczegółów dot. wybranego formatu wykresu.

Ryciny

Ryciny powinny być przygotowane w rozdzielczości 300 dpi lub większej, w formacie *.tiff, *.eps, *.psd

Strona tytułowa

Praca powinna posiadać stronę tytułową, na której znajdują się następujące informacje:

- pełny tytuł artykułu w języku polskim i angielskim
- imię i nazwisko każdego autora (bez tytułów), jednostkę organizacyjną każdego autora (miejsce pracy)
- streszczenie w języku polskim i angielskim
- 3-6 słów kluczowych w języku polskim i angielskim
- imię i nazwisko, tytuł, adres, numer telefonu i/lub faksu, e-mail autora, który odpowiada za przygotowanie pracy do druku
- źródła wsparcia materialnego w postaci grantów i dotacji, subwencji, sprzętu, leków itp.

Streszczenia

Streszczenia nie powinny przekraczać 250 słów.

W tekście pracy należy zamieścić w postaci wyodrębnionych tabel następujące zestawienia:

1. Stan wiedzy w chwili rozpoczęcia projektu
2. Co przyniosła realizacja grantu Naukowej Fundacji Polpharmy
3. Dalsze kierunki badań (opcjonalnie)

Przed piśmiennictwem, w razie potrzeby, można załączyć **Podziekowania**, w których podkreśla się wkład wszystkich osób, które pomagały w prowadzeniu badań i które nie spełniają kryteriów włączenia do zespołu autorów, np. asystenci, technicy, kierownicy jednostek dający tylko ogólne wsparcie. Autorzy mają obowiązek ujawnić fakt otrzymywania wsparcia finansowego lub materialnego.

Piśmiennictwo zawiera pozycje z literatury ponumerowane w kolejności ich występowania w tekście (*styl Vancouver*), wybrane pod względem ważności, aktualności i dostępności. Pozycje występujące po raz pierwszy w tabelach lub rycinach należy ponumerować tak, aby utrzymać kolejność z pozycjami cytowanymi w tekście.

DOPUSZCZALNE FORMATY CYTOWANIA

We wszystkich przypadkach prosimy zwrócić uwagę na stosowane znaki interpunkcyjne, oddzielające poszczególne pola bibliograficzne cytowanej pozycji. Źródła internetowe z racji łatwości zmian czy korekt powinny zawierać datę pobrania bądź przejrzenia pliku. Podając listę autorów należy użyć zwrotu „i wsp.”, jeśli ilość autorów cytowanej pozycji jest wyższa niż 3.

Typowy artykuł w czasopiśmie

Lichtenstein GR, Hanauer SB, Sandborn WJ. Management of Crohn's disease in adults. *Am J Gastroenterol* 2009;104:465-83.

Ten sam artykuł z uwagi na pomyłki redakcyjne z opublikowaną później erratą

Koffler D, Reidenberg MM. Antibodies to nuclear antigens in patients treated with procainamide or acetylprocainamide [errata opublikowana w: *N Engl J Med*, 1979;302:322-5]. *N Engl J Med*, 1979: 301:1382-5.

Artykuł opublikowany wyłącznie elektronicznie

Drayer DE, Koffler D. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* [periodyk online] 1995 Jan-Mar [cytowany 1996.06.05]; 1(1): [24 ekrany]. Dostępny pod adresem URL:<http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>

Artykuł bez autora

Cancer in South Africa [tekst redakcyjny]. *S Afr Med J* 1994;84:15.

Monografia z określonym(i) autorem(ami)

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. II wyd. Albany (NY): Delmar Publishers; 1996.

Książka redagowana

Norman U, Redfern SJ, redd. Mental health care for elderly people. Nowy Jork: Churchill Livingstone; 1996.

Książka wydana przez organizację

Institute of Medicine (US). Looking at the future of the Medical program. Waszyngton: The Institute; 1992.

Rozdział w książce

Phillips SJ, Whisnant JR. Hypertension and stroke. W: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. II wyd. Nowy Jork: Raven Press; 1995. str. 465-78.

Materiały kongresowe

Kimura J, Shibasaki H, redd. Recent advances in clinical neurophysiology. Materiały z X Międzynarodowego Kongresu EMG i Neurofizjologii Klinicznej; 1995.10.15-19; Kyoto, Japonia. Amsterdam: Elsevier; 1996.

Referat

Bengtsson S, Solheim BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical information. W: Lun KG, Oegoulet P, Piemme TE, Rienhoff O, redd. MEDINFO 92. Materiały z VII Światowego Kongresu nt. Informatyki Medycznej; 1992.09.6-10; Genewa, Switzerland.

Nie należy cytować, na ogół, abstraktów, jak również „niepublikowanych danych” oraz „informacji ustnej”. Jeżeli jednak są one niezbędne (dotyczą własnych wyników zamieszczonych w pracach będących lub szykowanych do druku), można je włączyć do tekstu w odpowiednim miejscu.

TABELE I ILUSTRACJE

Tabele mają swoje numeracje w kolejności występowania pierwszego odwołania w tekście oraz krótki tytuł. W nagłówkach kolumn stosuje się krótkie hasła lub skróty. Wskazany jest najprostszy możliwy układ tabeli, bez zbędnych poziomych lub pionowych linii podziału. Wyjaśnienia, w tym tłumaczenia niestandardowych skrótów, należy umieścić w przypisach pod tabelą, nie zaś w samej tabeli. Dolne przypisy pod tabelą należy ponumerować odrębnie, zaczynając od 1 dla każdej tabeli. Należy się upewnić, czy każda tabela jest wymieniona w tekście.

Należy przedstawić pomiary statystyczne odmienności, jak np. odchylenie standardowe, standardowy błąd pomiaru średniej. Jeżeli dane pochodzą z innego źródła opublikowanego lub niepublikowanego, należy uzyskać zgodę i podać źródło w pełnym cytacie.

Ryciny i zdjęcia powinny być wykonane profesjonalnie; nie-dopuszczalne są napisy ręczne. Redakcja przyjmuje ryciny i zdjęcia w formie elektronicznej w możliwie najwyższej jakości (rozdzielczości, min 300 dpi). Litera, cyfry i symbole muszą być wszędzie jasne i równomierne, i mieć taki rozmiar, aby po zmniejszeniu w celu drukowania pozostały czytelne. Tytuły i wyjaśnienia należy pisać w podpisach, nie zaś na samych rycinach.

Ryciny powinny być ponumerowane w kolejności występowania pierwszego odwołania w tekście. Należy się upewnić, czy każda rycina jest wymieniona w tekście. Jeżeli dana rycina została już opublikowana, należy podać źródło i uzyskać pisemną zgodę osoby mającej prawa autorskie na przedruk materiału, za wyjątkiem dokumentów stanowiących dobro publiczne. Zdjęcia mogą być kolorowe lub czarno-białe. Redakcja drukuje standardowo zdjęcia w postaci czarno-białej. Istnieje możliwość wydrukowania zdjęcia w pełnym kolorze, po konsultacji z Redakcją.

Zdjęcia mikroskopowe powinny mieć wewnętrzne oznaczenie skali. Używane w zdjęciu mikroskopowym symbole, strzałki i litery powinny być w kolorze kontrastującym z tłem. W przypadku fotografii badanych osób albo należy ukryć tożsamość, albo uzyskać pisemną zgodę na opublikowanie zdjęcia. Redakcja przyjmuje zdjęcia w formie elektronicznej w możliwie najwyższej jakości (rozdzielczości, min 300 dpi).

Legendy pod rycinami należy numerować cyframi arabskimi odpowiadającymi kolejnym rycinom.

Jednostki miary. Pomiar długości, wysokości, wagi i objętości powinny być podane w jednostkach metrycznych (np. metr, kilogram, litr i inne) lub w systemie dziesiętnym (np. decymetry). Temperatura musi być podana w stopniach Celsjusza. Ciśnienie tętnicze powinno być podane w milimetrach słupa rtęci. Wszystkie kliniczne pomiary hematologiczne i chemiczne powinny być podane w systemie metrycznym według Międzynarodowego Systemu Miar (SI). Alternatywne jednostki, niepodlegające z tego systemu, powinny być dodane w nawiasach.

Skróty i symbole. Redakcja wymaga stosowania jedynie standardowych skrótów. Nie należy używać skrótów w tytule i w streszczeniach. Pełna wersja terminu, dla którego używa się danego skrótu, musi być podana przed pierwszym wystąpieniem skrótu w tekście, za wyjątkiem standardowych jednostek miar.

WYSŁANIE ARTYKUŁU DO CZASOPISMA

Autorzy są proszeni o przesłanie manuskryptu drogą elektroniczną na adres: postepy@indexcopernicus.com

Manuskryptowi powinien towarzyszyć list przewodni podpisany, w miarę możliwości, przez wszystkich autorów. List ten powinien zawierać:

- 1. Oświadczenie**, dotyczące statusu danej pracy, faktu, że nie była dotąd opublikowana, albo została opublikowana częściowo w innej redakcji, według wytycznych zawartych powyżej,
- 2. Zaświadczenie**, ujawniające istnienie ewentualnych związków finansowych (w tym informacje dotyczące np. grantu, z podaniem źródła i numeru grantu) lub powiązań mogących budzić zastrzeżenia,
- 3. Oświadczenie**, że wszyscy autorzy czytali i potwierdzili, że określone powyżej wymagania dotyczące współautorstwa zgodnie z powyższym zostały spełnione oraz, że każdy autor uważa, że złożony tekst stanowi rzetelną pracę wszystkich wymienionych autorów,
- 4. Dane personalne, adres i telefony głównego autora**, który odpowiada za porozumiewanie się z pozostałymi autorami w sprawach dotyczących ewentualnych korekt i końcowego zatwierdzenia „szczotki” autorskiej do druku (jeżeli autor nie poda odrębnego adresu do korespondencji dla czytelników, adres ten zostanie wydrukowany na końcu opublikowanej pracy jako „adres do korespondencji”).

Należy załączyć również zgody na przedruki opublikowanych materiałów, na wykorzystanie reprodukcji publikowanych materiałów, na użycie zdjęć lub podawanie danych o osobach, których tożsamość można ustalić oraz zgody na imienne wyróżnienie osób za ich wkład.

Redakcja **Postępów Polskiej Medycyny i Farmacji** uważa w/w warunki za spełnione, jeżeli złożony zostanie podpis pierwszego autora.

KOMPLET MATERIAŁÓW NALEŻY PRZESŁAĆ DO REDAKCJI NA ADRES:

Index Copernicus Sp. z o.o.

*Redaktor Naczelny, Postępy Polskiej Medycyny i Farmacji
ul. Żurawia 6/12, 00-503 Warszawa*

tel. (22) 420 32 73

lub e-mailem: postepy@indexcopernicus.com

Jesteśmy największym polskim producentem leków i substancji farmaceutycznych. Naszym mottem jest hasło „Ludzie pomagają Ludziom”. Od prawie 80 lat cieszymy się zaufaniem lekarzy i pacjentów, wytwarzając leki wysokiej jakości, bezpieczne i skuteczne.



JESTEŚMY DUMNI Z NASZYCH OSIĄGNIĘĆ:

- jesteśmy NUMEREM 1 na polskim rynku farmaceutycznym
- umacniamy swą pozycję w regionie Europy Środkowo-Wschodniej i Azji Środkowej
- jesteśmy jedną z najbardziej innowacyjnych firm w Polsce według Instytutu Nauk Ekonomicznych PAN
- inwestujemy w leki biotechnologiczne i stworzyliśmy nowoczesne laboratorium w Gdańskim Parku Naukowo-Technologicznym
- pomagamy ludziom nauki poprzez Naukową Fundację Polpharmy
- popularyzujemy wiedzę o zdrowiu, realizując liczne programy edukacyjne
- wspieramy wartościowe projekty kulturalne



Zakłady Farmaceutyczne Polpharma SA
ul. Pelplińska 19, 83-200 Starogard Gdański
tel. +48 58 563 16 00
fax +48 58 562 23 53

Polpharma Biuro Handlowe Sp. z o.o.
ul. Bobrowiecka 6, 00-728 Warszawa
tel. +48 22 364 61 00
fax +48 22 364 61 02

www.polpharma.pl



