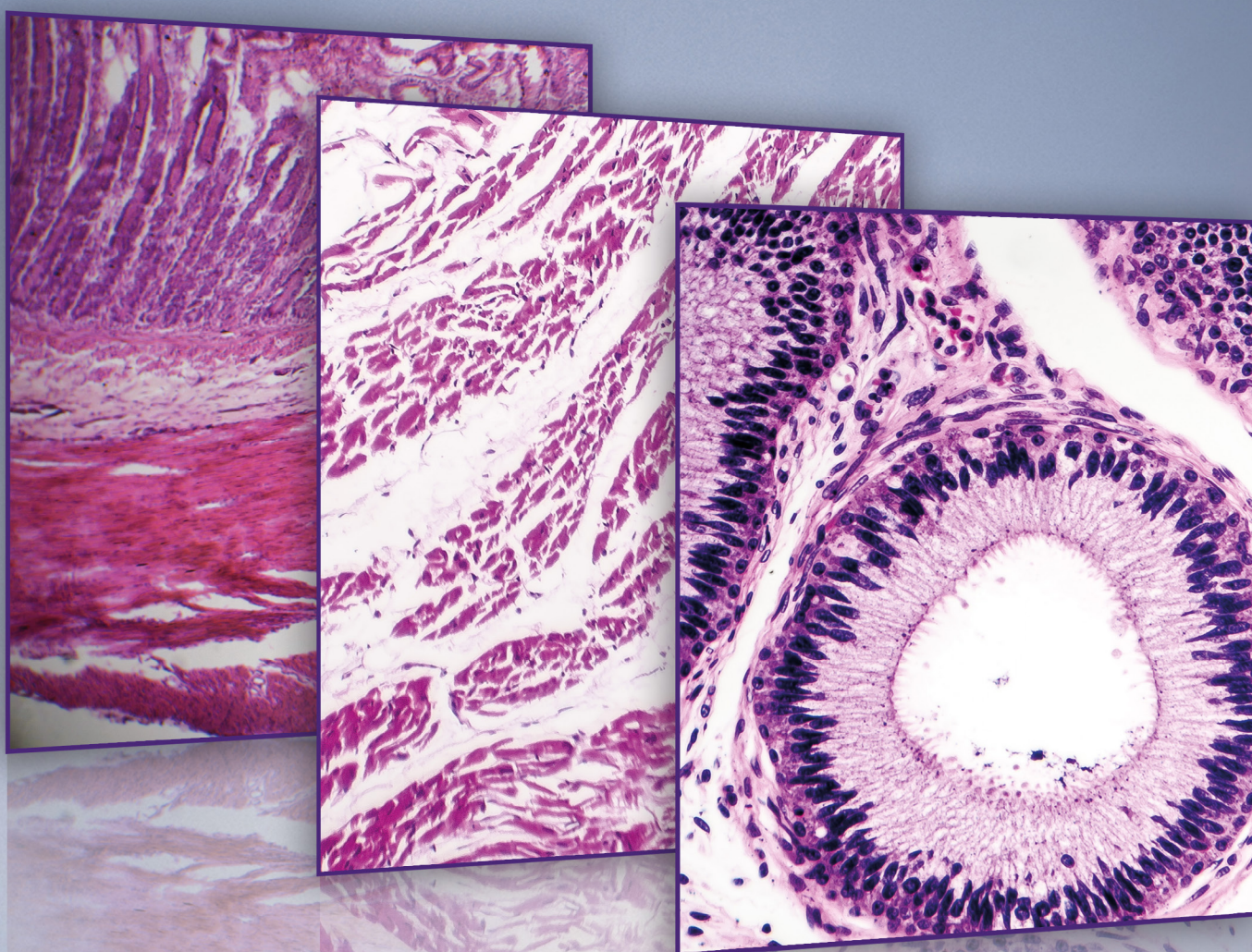


POSTĘPY POLSKIEJ MEDYCYNY I FARMACJI

Zeszyty Naukowej Fundacji Polpharmy



NAUKOWA
FUNDACJA
POLPHARMY

POMAGAMY LUDZIOM NAUKI



20 lat

Naukowej Fundacji Polpharmy

Głównym celem Fundacji jest finansowanie realizacji projektów badawczych o wyjątkowym znaczeniu dla rozwoju medycyny i farmacji, podejmowanych przez akademickie ośrodki naukowe i instytucje badawczo-rozwojowe.

Od momentu powołania Fundacja przyznała:

78 grantów o łącznej wartości **24 033 262 zł**,

51 nagród o łącznej wartości **84 000 zł**,

66 stypendiów naukowych dla doktorantów
o wartości **660 000 zł**.



NAUKOWA
FUNDACJA
POLPHARMY

www.polpharma.pl/naukowa-fundacja-polpharmy

POSTĘPY POLSKIEJ MEDYCYNY I FARMACJI

ADVANCES IN POLISH MEDICINE
AND PHARMACOLOGICAL SCIENCES

Tom 8, 2021



NAUKOWA
FUNDACJA
POLPHARMY

WARSZAWA 2021

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 • Przewodnicząca Rady Naukowej Naukowej Fundacji Polpharmy
**prof. dr hab. Janina Stępińska, Narodowy Instytut Kardiologii Stefana kardynała Wyszyńskiego
– Państwowy Instytut Badawczy, Warszawa-Anin**

Editorial Board • Rada Naukowa

prof. dr hab. Edward Franek
prof. dr hab. Zbigniew Gaciong
prof. dr hab. Piotr Kuna
prof. dr hab. Grzegorz Opolski
prof. dr hab. Adam Płaźnik
prof. dr hab. Jarosław Reguła
prof. dr hab. Kazimierz Roszkowski-Śliż
prof. dr hab. Janina Stępińska
prof. dr hab. Jerzy Szaflik
prof. dr hab. Mirosław Wielgoś
prof. dr hab. Katarzyna Życińska

Honourable Editorial Board • Honorowa Rada Naukowa

prof. dr hab. Waldemar Banasiak
prof. dr hab. Stefan Chłopicki
prof. dr hab. Grzegorz Gryniewicz
prof. dr hab. Marek Jarema
prof. dr hab. Roman Lorenc
prof. dr hab. Edmund Przeglasiński
prof. dr hab. Kazimierz Roszkowski-Śliż
prof. dr hab. Jacek Rożniecki
prof. dr hab. Jacek Spławiński
prof. dr hab. Cezary Szczylik
prof. dr hab. Marian Zembala

Editorial office • Redakcja
Assistant Editor • Redaktor Prowadzący
Paweł Stypułkowski
pawel.stypulkowski@indexcopernicus.com

Associate Editor • Kolegium Redakcyjne
Bożenna Płatos
bozenna.platos@polpharma.com

Publisher • Wydawca

INDEX  COPERNICUS
I N T E R N A T I O N A L

Index Copernicus sp. z o.o.
ul. Kasprzaka 31A/184 • 01-234 Warszawa
e-mail: office@indexcopernicus.com
www.indexcopernicus.com

Published for • Wydawane dla



President • Prezes Zarządu
dr Wojciech Kuźmierkiewicz
Vice-president • Wiceprezes Zarządu
Agata Łapińska-Kołodzińska
Board Member • Członek Zarządu
dr Beata Kamosińska-Przybylska

Naukowa Fundacja Polpharmy
ul. Bobrowiecka 6 • 00-728 Warszawa
tel.: 22 364 63 13 • e-mail: fundacja@polpharma.com
www.polpharma.pl/naukowa-fundacja-polpharmy
www.ppmf.online

ISSN 1234-5678

rocznik

Indeksowane w: Index Copernicus Journals Master List

500 egz.

Grafika na okładce pochodzi ze strony: <https://pl.dreamstime.com/>

© Naukowa Fundacja Polpharmy. Wszystkie prawa zastrzeżone.

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

Spis treści • Table of contents

- 6 Słowo wstępne**
Editorial
Zbigniew Gaciong
- 9 Wpływ dostępności żelaza na zmiany strukturalne komórek mięśni szkieletowych oraz komórek mięśnia sercowego**
The influence of iron availability on the structural changes of skeletal muscle cells and cardiac muscle cells
Kamil A. Kobak
- 15 Wykorzystanie modelowania populacyjnego do optymalizacji dawkowania leków stosowanych w anestezjologii i intensywnej terapii**
The use of population modeling to optimize dosing of drugs used in anaesthesiology and intensive care
Agnieszka Borsuk-de Moor, Paweł Wiczling
- 23 Czynniki ryzyka wystąpienia raka jelita grubego u pacjentów po kolonoskopii przesiewowej**
Risk factors of colorectal cancer after screening colonoscopy
Paulina Wieszczy, Michał F. Kamiński, Jarosław Reguła
- 29 Stopień realizacji protokołu opieki okołoperacyjnej ERAS (*Enhanced Recovery After Surgery*) a wyniki leczenia pacjentów operowanych z powodu raka jelita grubego**
The impact of compliance with Enhanced Recovery After Surgery (ERAS) protocol on short and long-term outcomes in patients after laparoscopic colorectal cancer surgery
Magdalena Pisarska-Adamczyk
- 35 Multifunkcyjny preparat sztucznej śliny – wyzwania i potrzeby**
Multifunctional artificial saliva preparation – challenges and needs
Katarzyna Niemirowicz-Laskowska, Joanna Mystkowska, Dawid Łysik, Sylwia Chmielewska, Łukasz Suprewicz, Karol Skłodowski, Piotr Deptuła, Jan Ryszard Dąbrowski, Robert Bucki
- 45 Strategie poprawiające profil bezpieczeństwa terapii CAR-T**
Strategies to improve the safety profile of CAR-T therapy
Agnieszka Graczyk-Jarzynka



Słowo wstępne

Prof. dr hab. n. med. Zbigniew Gaciong

*Przewodniczący Rady Naukowej
Postępów Polskiej Medycyny i Farmacji,
Redaktor Naczelny*

Szanowani Państwo!

Mija właśnie dziesięć lat od ukazania się pierwszego numeru *Postępów Polskiej Medycyny i Farmacji*, wydawnictwa, które zawiera publikacje powstałe w wyniku realizacji projektów naukowych, finansowanych przez Naukową Fundację Polpharmy.

Jednym z celów Fundacji jest wspieranie najzdolniejszych młodych badaczy poprzez stypendia dla słuchaczy studiów doktoranckich. W numerze znalazły się cztery publikacje laureatów VII edycji konkursu w roku 2018/2019. Jednym z nich jest dr Kamil Kobak z Samodzielnej Pracowni Badań Układu Krążenia Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Badania, w których uczestniczy doktorant, dotyczą roli niedoboru żelaza w powstawaniu zmian strukturalnych i funkcjonalnych w mięśniach pacjentów z niewydolnością serca. Zespół, którego członkiem jest dr Kobak, wykazał, że podawanie żelaza zapobiega atrofii miocytów, zwłaszcza w warunkach niedotlenienia. Powyższe wyniki stały się podstawą do nadania tytułu doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu laureatowi, ponadto zostały opublikowane w *International Journal of Molecular Medicine*.

W tej samej edycji konkursu laureatką została mgr Agnieszka Borsuk-De Moor z Zakładu Biofarmacji i Farmakokinetiki, Katedry Biofarmacji i Farmakodynamiki, Wydziału Farmaceutycznego, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Celem tej rozprawy doktorskiej było opracowanie modelu

dawkowania leków w specjalnych populacjach pacjentów. Wyniki badań pozwolą na opracowanie optymalnych schematów dawkowania leków u pacjentów w ciężkim stanie, ze szczególnym uwzględnieniem niemowląt i dzieci. Wyniki powstałe w trakcie realizacji przewodu doktorskiego laureatki zostały opublikowane w *Antimicrobiological Agents and Chemotherapy*, *Journal of Clinical Pharmacology*.

Wśród zdobywców stypendiów dla doktorantów znaleźli się także lekarze prowadzący badania w dziedzinie onkologii.

Rak jelita grubego jest częstym nowotworem, któremu można zapobiegać lub wykrywać jego wczesne postacie poprzez wykonanie przesiewowej kolonoskopii. Dr n. med. Paulina Wieszczy z Katedry i Kliniki Gastroenterologii, Hepatologii i Onkologii Klinicznej CMKP w Warszawie analizowała dane zebrane w trakcie Programu Badań Przesiewowych Raka Jelita Grubego, który objął 236 089 pacjentów. Doktorantka potwierdziła znaczenie jakości badania dla skutecznej prewencji nowotworu, wykazała ponadto, że – w oparciu o określone kryteria gruczolaka – można zidentyfikować grupę chorych podwyższonego ryzyka raka, wymagających intensywnego nadzoru, co pozwala na optymalizację populacyjnych badań przesiewowych. Wyniki zostały opublikowane w *Gastroenterology* oraz *Best Practice in Research – Clinical Gastroenterology*. Dr n. med. Magdalena Pisarska-Adamczyk oceniła

wpływ stosowania protokołu opieki okołoperacyjnej ERAS (*Enhanced Recovery After Surgery*) na wczesne odległe wyniki leczenia chirurgicznego raka okrężnicy. Do badania włączano kolejnych 400 pacjentów leczonych w II Katedrze Chirurgii Ogólnej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, a wyniki tych obserwacji ukazały się w międzynarodowych pismach, takich jak *International Journal of Surgery*, *Journal of Clinical Medicine*, *World Journal of Surgery* i złożyły się na rozprawę doktorską laureatki.

W 2015 roku jednym z laureatów XIV edycji konkursu na projekt badawczy była dr Katarzyna Niemirowicz z Samodzielnej Pracowni Technik Mikrobiologicznych i Nanobiomedycznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Celem Jej projektu było opracowanie preparatu sztucznej śliny, odzwierciedlającego w jak największym stopniu właściwości śliny naturalnej, zarówno w aspekcie właściwości mechanicznych, jak i biologicznych. W ramach przeprowadzonych badań opracowano skład chemiczny oraz przeprowadzono szczegółowe badania parametrów fizykochemicznych i reologicznych preparatów sztucznej śliny, zawierających mucyny oraz oceniono ich właściwości mikrobiologiczne i biokompatybilności *in vitro* na liniach wybranych komórek fizjologicznych.

Bez wątpienia terapia chimerycznymi komórkami wyposażonymi w receptor skierowany wybiórczo na komórki nowotworowe (CAR-T) jest przełomem w leczeniu w onkologii. Terapia daje szansę na wydłużenie życia, a nawet wyleczenie choroby u osób, u których wyczerpane zostały dostępne

metody postępowania. CAR-T wykorzystuje własny układ odpornościowy pacjenta i zaawansowaną inżynierię genetyczną, aby walczyć z nowotworami dzięki zmodyfikowanym genetycznie limfocytom T. Niestety, terapia CAR-T często związana jest z szeregiem działań niepożądanych.

Dr Agnieszka Graczyk-Jarzynka została laureatką XVI edycji konkursu, której tematem był: „Rozwój i optymalizacja procesów w biotechnologii medycznej”. Jej projekt ma na celu zwiększenie profilu bezpieczeństwa terapii wykorzystujących komórki efektorowe, zmodyfikowane receptorem CAR. Autorka zamierza wykorzystać do tego różne strategie, takie jak: optymalizacja budowy samego receptora CAR, wykorzystanie przejściowej transfekcji do modyfikacji komórek efektorowych, uzyskanie zdalnej kontroli nad limfocytami CAR-T w organizmie chorego czy „autonomiczną” kontrolę potencjału cytotoksycznego. Powyższe strategie zostały omówione w zamieszczonej pracy.

Zapraszam do lektury
Prof. dr hab. n. med. Zbigniew Gaciong



Wpływ dostępności żelaza na zmiany strukturalne komórek mięśni szkieletowych oraz komórek mięśnia sercowego

The influence of iron availability on the structural changes of skeletal muscle cells and cardiac muscle cells

Kamil A. Kobak

Samodzielna Pracownia Badań Układu Krążenia, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Streszczenie

W prezentowanej pracy zbadano wpływ zarówno ograniczonej, jak i zwiększonej dostępności żelaza na morfologię, strukturę oraz ekspresję genów zaangażowanych w proces atrofii mięśniowej w miocytach szkieletowych, hodowanych w warunkach hipoksji, imitujących niedotlenienie występujące w patofizjologii NS. Wykazano, że niedobór żelaza w warunkach *in vitro* (w szczególności w połączeniu z niedotlenieniem) ma szkodliwy wpływ na miocyty szkieletowe, co manifestuje się atroficznymi zmianami morfologii komórek, maladaptacyjną przebudową strukturalną komórek oraz zwiększoną ekspresją markerów atrofii mięśniowej. Co więcej, pokazano, że zwiększona dostępność żelaza dla niniejszych komórek zdaje się posiadać cechy protekcyjne w kontekście powyższych zmian. Dodatkowo, w oparciu o dane kliniczne i najnowsze modele eksperymentalne, opisano niekorzystne zmiany strukturalne oraz funkcjonalne zachodzące w mięśniu sercowym w warunkach niedoboru żelaza, a także omówiono potencjalne patomechanizmy stojące za nimi.

Słowa kluczowe: metabolizm żelaza, niedobór żelaza, suplementacja żelazem

Abstract

In the presented study, the influence iron availability on the cell morphology and structure was examined in skeletal myocytes cultured under normoxic and hypoxic conditions. The study showed that iron deficiency *in vitro* (especially in combination with hypoxia) has a detrimental effect on skeletal myocytes. Cellular dysfunction was manifested by atrophic changes in cell morphology, structural remodeling of cells and increased expression of muscle atrophy markers. Interestingly, increased iron availability appeared to have some protective properties in the context of aforementioned changes. Moreover, based on clinical data and recent transgenic models, structural and functional abnormalities in iron-deficient cardiac muscle were described and the potential pathomechanisms behind them have been discussed.

Keywords: iron deficiency, iron metabolism, iron supplementation

Wpłynęło: 20-02-2021

Zaakceptowano: 06-06-2021

Opublikowano: 11-06-2021

DOI: 10.5604/01.3001.0014.9184

Adres do korespondencji

dr n. med. i n. o zdr. Kamil A. Kobak,
Samodzielna Pracownia Badań Układu
Krążenia, Uniwersytet Medyczny
im. Piastów Śląskich we Wrocławiu,
ul. Borowska 213, 50-556 Wrocław,
e-mail: kamkobak@gmail.com

WPROWADZENIE

Niewydolność serca (NS) jest schorzeniem o złym rokowaniu oraz stanowi jedno z największych wyzwań zdrowotnych, jak i społeczno-ekonomicznych, jakie stoją przed współczesną cywilizacją [1, 2]. Istotnym elementem patofizjologii tej choroby są zmiany strukturalne (remodeling) na poziomie komórkowym oraz makroskopowym, zachodzące zarówno w mięśniu sercowym [3], jak i w mięśniach szkieletowych [4, 5]. Prowadzą one do niezdolności mięśnia sercowego do poprawnego funkcjonowania jako pompy, a także swoistej miopatii szkieletowej, objawiającej się poważną nietolerancją wysiłku [6, 7]. Zarówno spadek, masy mięśniowej jak i pogorszona tolerancja wysiłku fizycznego są niezależnymi czynnikami rokowniczymi i wiążą się ze zwiększoną śmiertelnością oraz podwyższonym ryzykiem ponownej hospitalizacji w wyniku zaostrzeń NS [8–11]. W obliczu wysokiej zachorowalności na NS istotne znaczenie mają badania dotyczące nowych, celowanych terapii, ukierunkowanych na poprawę jakości życia i zmniejszenie kardynalnych objawów tej choroby.

Żelazo, będąc kofaktorem licznych białek oraz enzymów, jest zaangażowane w wiele niezbędnych dla przeżycia procesów komórkowych, takich jak metabolizm energetyczny, obrona antyoksydacyjna czy transport i magazynowanie tlenu [12]. W związku z tym, zarówno nadmiar, jak i niedobór żelaza (*iron deficiency*, ID) prowadzą do zaburzeń strukturalnych oraz funkcjonalnych w różnych typach komórek. Duże wymagania energetyczne kardiomiocytów budujących serce oraz miocytów budujących mięśnie szkieletowe czyni je szczególnie wrażliwymi na zmiany w dostępności żelaza. Wykazano, że zarówno ograniczenie dostępu komórek do żelaza, jak i jego nadmiar w warunkach *in vitro* mają szkodliwy wpływ na żywotność zarówno kardiomiocytów, jak i miocytów szkieletowych [13, 14]. Co więcej, szczególnie negatywny wpływ mają warunki ID i prowadzą one do zaburzeń metabolicznych, dysfunkcji mitochondriów oraz nasilenia procesów apoptotycznych [14, 15].

Najnowsze dane kliniczne wykazują, że współistnienie ID u pacjentów z NS jest bardzo częste i wiąże się z zaburzeniami w funkcjonowaniu mięśnia sercowego, zwiększoną męczliwością mięśni szkieletowych oraz pogorszoną tolerancją wysiłku, niezależnie od współistniejącej niedokrwistości [16, 17]. Co więcej, wykazano, że dożylna suplementacja żelazem u pacjentów z NS poprawia wydolność fizyczną oraz jakość życia, a także redukuje ryzyko ponownej hospitalizacji [18–21]. Jednakże

mechanizmy molekularne oraz komórkowe stojące zarówno za szkodliwym wpływem ID, jak i korzystnym efektem suplementacji żelazem u chorych pozostają w dużej mierze niezbadane.

Wpływ dostępności żelaza na zmiany strukturalne komórek mięśni szkieletowych

Żelazo pełni szczególnie ważną rolę w fizjologii mięśni szkieletowych, które zużywają ok. 10–15% jego całkowitej puli dostępnej organizmowi oraz posiadają unikatowy wewnątrzkomórkowy system kontrolujący metabolizm tego pierwiastka [22]. Poprawne funkcjonowanie mięśni szkieletowych wiąże się z dużym zapotrzebowaniem na energię, co pośrednio uzasadnia związek między ID a dysfunkcją mięśni u pacjentów z NS. Badania eksperymentalne sugerują, iż ID upośledza działanie mięśni u tych chorych, pogłębiając postęp procesu atrofii oraz pogarszając funkcjonowanie uszkodzonych już mitochondriów, co przekłada się na upośledzenie energetyki miocytów szkieletowych [23–25].

Badania nad wpływem zmiennej dostępności żelaza na zmiany strukturalne komórek mięśni szkieletowych zostały przedstawione w publikacji: „Iron limitation promotes the atrophy of skeletal myocytes, whereas iron supplementation prevents this process in the hypoxic conditions” mojego autorstwa [26].

Badania wykonano *in vitro*, na modelu szczurzych miocytów szkieletowych (linia komórkowa L6G8C5), które hodowano przez 48 godzin: 1) w warunkach normoksji bądź 2) w warunkach hipoksji, przy zredukowanym, optymalnym lub zwiększonym stężeniu żelaza w środowisku hodowlanym. Następnie dokonano analizy wewnątrzkomórkowego poziomu stężenia żelaza oraz oceniono morfologię komórek. Ponadto zmierzono ekspresję następujących genów związanych z atrofią mięśniową: dwóch specyficznych markerów *Atrogin-1* oraz *MuRF1*, przełącznika molekularnego związanego z równowagą pomiędzy atrofią a hipertrofią – *SMAD4* oraz białka budującego mięśniowe filamenty pośrednie typu III – *desminy*. W warunkach niedoboru żelaza komórki wykazywały zmienioną, atroficzną morfologię, a także znacząco podwyższony poziom ekspresji *Atrogin-1* oraz *MuRF1* zarówno w warunkach normoksji, jak i hipoksji (wszystkie $P < 0,05$). Powyższe zmiany mogą wskazywać na aktywację szlaku ubikwitynowo-proteasomowego związanego z degradacją białek. Obniżona dostępność żelaza połączona z warunkami niedotlenienia spowodowała również spadek ekspresji *SMAD4* ($P < 0,001$), sugerując zmiany w homeostazie komórek, prowadzące do atrofii. Natomiast komórki wystawione na zwiększone stężenie żelaza w warunkach

niedotlenienia wykazywały się obniżoną ekspresją obu markerów atrofii (wszystkie $P < 0,05$). Poziom ekspresji *desminy* był zwiększony w przypadku zarówno zwiększonego, jak i zmniejszonego stężenia żelaza, jednakże jej nadekspresja była największa w przypadku łączonych warunków niedoboru żelaza z niedotlenieniem (wszystkie $P < 0,05$). Co więcej, zwiększona ekspresja *Atroginy-1* oraz *MuRF1* w warunkach hipoksji powiązana była ze zwiększoną ekspresją *receptora transferyny 1*, odzwierciedlającego zwiększone zapotrzebowanie komórek na żelazo (odpowiednio $R = 0,76$, $P < 0,01$ oraz $R = 0,86$, $P < 0,01$).

Podsumowując, połączone warunki hipoksji oraz niedoboru żelaza miały najbardziej niekorzystny wpływ na funkcjonowanie miocytów szkieletowych hodowanych w warunkach *in vitro*. Wyrazem sumy negatywnego oddziaływania tych czynników na komórki były, w ich morfologii, spowodowane nasileniem procesów atrofii. Natomiast zwiększona dostępność żelaza w hodowli miocytów szkieletowych wskazywała na antyatroficzne właściwości tego pierwiastka na komórki poddane niedotlenieniu. Powyższe badania mogą stanowić częściowe wyjaśnienie molekularnych zmian towarzyszących dysfunkcji mięśni szkieletowych, charakterystycznych dla obrazu klinicznego obserwowanego u chorych z NS i niedoborem żelaza.

Wpływ niedoboru żelaza na zmiany strukturalne oraz funkcjonalne w mięśniu sercowym

W obrębie mięśnia sercowego zarówno nadmiar, jak i niedobór żelaza prowadzą do niekorzystnych zmian funkcjonalnych oraz strukturalnych. W przypadku przeładowania żelazem dochodzi do toksyczności tkankowej indukowanej przez stres oksydacyjny, włóknienia oraz kardiomiopatii [27]. W przypadku ID badania eksperymentalne wykazały znaczące dysfunkcje mięśnia sercowego, które na poziomie komórkowym manifestują się zmianami w ich morfologii, upośledzeniem funkcjonowania mitochondriów, a także zaburzeniami metabolicznymi [28–31]. Co więcej, bezpośrednie pomiary stężenia żelaza w mięśniu sercowym pacjentów z NS wykazały znacząco obniżony poziom tego pierwiastka w lewej komorze w porównaniu do ludzi zdrowych, niezależnie od współwystępowania anemii [32].

W pracy przeglądowej mojego autorstwa: „Structural and functional abnormalities in iron-depleted heart” (Kobak i wsp. [33]) opisano zaburzenia strukturalne oraz funkcjonalne zachodzące w mięśniu sercowym w warunkach niedoboru żelaza. W oparciu o dane kliniczne, a także komórkowe i zwierzęce modele eksperymentalne, stopniowo omówiono

patologiczne zmiany zachodzące w niewydolnym sercu na poziomie molekularnym, komórkowym, aż do poziomu makroskopowego. Do tej pory niezwykle trudno było zdefiniować rzeczywiste konsekwencje lokalnego ID w mięśniu sercowym niezależnie od systemowego ID lub/i niedokrwistości. Jednak dzięki wykorzystaniu najnowszych modeli zwierząt transgenicznym stało się to możliwe. Dokładnie omówiono i porównano modele systemowego niedoboru żelaza wywołanego dietą ubogą w żelazo oraz 3 modele transgeniczne oparte na (1) uniemożliwieniu importu żelaza do komórki (*knock-out* receptora transferynowego w kardiomiocytach [34]); (2) uniemożliwieniu inhibicji eksportu żelaza z komórki (*knock-out* hepcydyny w kardiomiocytach [35]); (3) oraz zaburzeniach ogólnych mechanizmów regulujących metabolizm żelaza w komórce (*knock-out* IRP1/2 w kardiomiocytach [36]). Najważniejszym wnioskiem płynącym z niniejszej analizy jest to, że lokalny niedobór żelaza w mięśniu sercowym prowadzi do zaburzeń strukturalno-funkcjonalnych oraz zwiększonej śmiertelności, niezależnie od systemowego niedoboru żelaza lub/i niedokrwistości. Co więcej, suplementacja żelazem łagodzi ten niekorzystny fenotyp w omówionych modelach zwierzęcych, co jest spójne z wynikami badań nad dożylną suplementacją żelazem u pacjentów z NS i ID.

PODSUMOWANIE

Podsumowując, otrzymane wyniki przyczyniły się do rozwoju wiedzy na temat istotnego wpływu dostępności żelaza na funkcjonowanie i morfologię komórek mięśni szkieletowych oraz mięśnia serca. Wykazano, że ID ma szkodliwy wpływ na morfologię oraz strukturę miocytów szkieletowych, indukując przemiany prowadzące do atrofii mięśniowej. Ponadto zwiększony dostęp żelaza do komórek mięśniowych wykazuje efekt ochronny, zapobiegając niniejszym zmianom atroficznym, co jest szczególnie widoczne w warunkach niedotlenienia. Dodatkowo, opierając się na wynikach badań klinicznych oraz zaawansowanych modelach transgenicznym, wskazano na szereg dowodów związanych z niekorzystnym wpływem niedoboru żelaza na funkcjonowanie oraz strukturę mięśnia sercowego. Co najważniejsze, po raz pierwszy wykazano, że niekorzystne zaburzenia strukturalne oraz funkcjonalne w obrębie mięśnia sercowego, narażonego na ID, zachodzą niezależnie od współistnienia systemowego ID oraz niedokrwistości. Wyniki niniejszej pracy stanowią kolejne uzasadnienie szkodliwości ID u chorych z NS, a także korzyści ze stosowania u nich dożylną terapii suplementacji żelazem.

PODZIĘKOWANIA

Serdecznie dziękuję promotorowi prof. dr hab. n. med. Ewie Jankowskiej za inspirację i opiekę merytoryczną oraz za wieloletnią, owocną współpracę. Promotorowi pomocniczemu dr Monice Kaszturze dziękuję za produktywnie dyskusje, pomoc merytoryczną i wsparcie, na które mogłem liczyć w każdej sytuacji. Prof. dr hab. n. med. Piotrowi Ponikowskiemu dziękuję za stworzenie ośrodka promującego rozwój młodych naukowców.

Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską mgr inż. Kamila Kobaka pt.: „Wpływ dostępności żelaza na zmiany strukturalne komórek mięśni szkieletowych oraz komórek mięśnia sercowego” (promotor: prof. dr hab. n. med. Ewa Jankowska) oraz podstawę opracowania niniejszego artykułu:

- Kobak K.A., Radwańska M., Dziegala M., Kasztura M., Josiak K., Banasiak W., Ponikowski P., Jankowska E.A.: Structural and functional abnormalities in iron-depleted heart. *Heart Fail Rev.* 2018; 3: 1–9.
- Kobak K.A., Kasztura M., Dziegala M., Bania J., Kapuśniak V., Banasiak W., Ponikowski P., Jankowska E.A.: Iron limitation promotes the atrophy

of skeletal myocytes, whereas iron supplementation prevents this process in the hypoxic conditions. *Int J Mol Med.* 2018; 41(5): 2678–2686.

FINANSOWANIE

Prezentowana praca doktorska otrzymała wsparcie finansowe w ramach stypendium naukowego przyznanego przez Naukową Fundację Polpharmy w 2019 roku.

Badania zostały zrealizowane w ramach grantów:

- SONATA BIS przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki na podstawie decyzji nr 2012/05/E/NZ5/00590 pod tytułem: „Niedobór żelaza a dysfunkcja mięśni szkieletowych w niewydolności serca”.
- OPUS przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki na podstawie decyzji nr UMO-2014/13/B/NZ5/03146 pod tytułem: „Znaczenie gospodarki żelazowej dla odpowiedzi immunologicznej i remodelingu mięśnia sercowego u chorych z zapaleniem mięśnia sercowego i pozapalną nie-niedokrwinną kardiomiopatią rozstrzeniową”.

PIŚMIENNICTWO

1. Mosterd A., Hoes A.W.: Clinical epidemiology of heart failure. *Heart* 2007; 93(9): 1137–1146.
2. Ziaeian B., Fonarow G.C.: Epidemiology and aetiology of heart failure. *Nat Rev Cardiol.* 2016; 13(6): 368–378.
3. Cohn J.N., Ferrari R., Sharpe N.: Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: A consensus paper from an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2000; 35(3): 569–582.
4. Cohen S., Nathan J.A., Goldberg A.L.: Muscle wasting in disease: Molecular mechanisms and promising therapies. *Nat Rev Drug Discov.* 2014; 14(1): 58–74.
5. Jackman R.W., Kandarian S.C.: The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol – Cell Physiol.* 2004; 287(4): C834–43.
6. Anker S.D., Steinborn W., Strassburg S.: Cardiac cachexia. *Ann Med.* 2004; 36(7): 518–529.
7. Loncar G., Springer J., Anker M. i wsp.: Cardiac cachexia: hic et nunc. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2016; 7(3): 246–260.
8. Ciccoira M., Davos C.H., Francis D.P. i wsp.: Prediction of mortality in chronic heart failure from peak oxygen consumption adjusted for either body weight or lean tissue. *J Card Fail.* 2004; 10(5): 421–426.
9. de Groote P., Dagorn J., Soudan B. i wsp.: B-type natriuretic peptide and peak exercise oxygen consumption provide independent information for risk stratification in patients with stable congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 43(9): 1584–1589.
10. Cohn J.N., Johnson G.R., Shabetai R. i wsp.: Ejection fraction, peak exercise oxygen consumption, cardiothoracic ratio, ventricular arrhythmias, and plasma norepinephrine as determinants of prognosis in heart failure. The V-HeFT VA Cooperative Studies Group. *Circulation* 1993; 87(6 Suppl.): VI5–VI6.
11. Jankowska E.A., Pietruk-Kowalczyk J., Zymliński R. i wsp.: The role of exercise ventilation in clinical evaluation and risk stratification in patients with chronic heart failure. *Kardiologia Pol.* 2003; 59(8): 115–127.
12. Cairo G., Bernuzzi F., Recalcati S.: A precious metal: Iron, an essential nutrient for all cells. *Genes Nutr.* 2006; 1(1): 25–39.
13. Kasztura M., Dziegala M., Kobak K. i wsp.: Both iron excess and iron depletion impair viability of rat H9C2 cardiomyocytes and L6G8C5 myocytes. *Kardiologia Pol.* 2017; 75(3): 267–275.
14. Dziegala M., Kasztura M., Kobak K. i wsp.: Influence of the availability of iron during hypoxia on the genes associated with apoptotic activity and local iron metabolism in rat H9C2 cardiomyocytes and L6G8C5 skeletal myocytes. *Mol Med Rep.* 2016; 14(4): 3969–77.

15. Dziegala M., Kobak K., Kasztura M. i wsp.: Iron Depletion Affects Genes Encoding Mitochondrial Electron Transport Chain and Genes of NonOxidative Metabolism, Pyruvate Kinase and Lactate Dehydrogenase, in Primary Human Cardiac Myocytes Cultured upon Mechanical Stretch. *Cells* 2018; 7(10): 175.
16. Klip I.T., Comin-Colet J., Voors A. i wsp.: Iron deficiency in chronic heart failure: An international pooled analysis. *Am Heart J*. 2013;165(4): 575–582.e3.
17. Jankowska E.A., Rozentryt P., Witkowska A. i wsp.: Iron deficiency: an ominous sign in patients with systolic chronic heart failure. *Eur Heart J*. 2010; 31: 1872–1880.
18. Okonko D.O., Grzeslo A., Witkowski T. i wsp.: Effect of intravenous iron sucrose on exercise tolerance in anemic and nonanemic patients with symptomatic chronic heart failure and iron deficiency. *J Am Coll Cardiol*. 2008; 51(2): 103–112.
19. Anker S.D., Comin Colet J., Filippatos G. i wsp.: Ferric Carboxymaltose in Patients with Heart Failure and Iron Deficiency. *N Engl J Med*. 2009; 361(25): 2436–2448.
20. Filippatos G., Farmakis D., Colet J.C. i wsp.: Intravenous ferric carboxymaltose in iron-deficient chronic heart failure patients with and without anaemia: a subanalysis of the FAIR-HF trial. *Eur J Heart Fail*. 2013; 15(11): 1267–1276.
21. Ponikowski P., Kirwan B.-A., Anker S.D. i wsp.: Ferric carboxymaltose for iron deficiency at discharge after acute heart failure: a multicentre, double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet* 2020; 396(10266): 1895–1904.
22. Robach P., Cairo G., Gelfi C. i wsp.: Strong iron demand during hypoxia-induced erythropoiesis is associated with down-regulation of iron-related proteins and myoglobin in human skeletal muscle. *Blood* 2007; 109(11): 4724–4731.
23. Finch C.A., Miller L.R., Inamdar A.R. i wsp.: Iron deficiency in the rat. Physiological and biochemical studies of muscle dysfunction. *J Clin Invest*. 1976; 58(2): 447–453.
24. Davies K.J.A., Maguire J.J., Brooks G.A.: Muscle mitochondrial bioenergetics, oxygen supply, and work capacity during dietary iron deficiency and repletion. *Am J Physiol – Endocrinol Metab*. 1982; 5(6): E418–27.
25. Cartier L.-J., Ohira Y., Chen M. i wsp.: Perturbation of Mitochondrial Composition in Muscle by Iron Deficiency implications regarding regulation of mitochondrial assembly. *J Biol Chem*. 261(29): 13827–32.
26. Kobak K., Kasztura M., Dziegala M. i wsp.: Iron limitation promotes the atrophy of skeletal myocytes, whereas iron supplementation prevents this process in the hypoxic conditions. *Int J Mol Med*. 2018; 41(5): 2678–2686.
27. Gujja P., Rosing D.R., Tripodi D.J. i wsp.: Iron overload cardiomyopathy: Better understanding of an increasing disorder. *J Am Coll Cardiol*. 2010; 56(13): 1001–1012.
28. Blayney L., Bailey-Wood R., Jacobs A. i wsp.: The effects of iron deficiency on the respiratory function and cytochrome content of rat heart mitochondria. *Circ Res*. 1976; 39(5): 744–748.
29. Dong F., Zhang X., Culver B. i wsp.: Dietary iron deficiency induces ventricular dilation, mitochondrial ultrastructural aberrations and cytochrome c release: Involvement of nitric oxide synthase and protein tyrosine nitration. *Clin Sci*. 2005; 109(3): 277–286.
30. Lemieux H., Semsroth S., Antretter H. i wsp.: Mitochondrial respiratory control and early defects of oxidative phosphorylation in the failing human heart. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011; 43(12): 1729–1738.
31. Garnier A., Zoll J., Fortin D. i wsp.: Control by circulating factors of mitochondrial function and transcription cascade in heart failure. *Circ Heart Fail*. 2009; 2(4): 342–350.
32. Melenovsky V., Petrak J., Mracek T. i wsp.: Myocardial iron content and mitochondrial function in human heart failure: a direct tissue analysis. *Eur J Heart Fail*. 2017; 19(4): 522–530.
33. Kobak K.A., Radwańska M., Dziegala M. i wsp.: Structural and functional abnormalities in iron-depleted heart. *Heart Fail Rev*. 2019; 24(2): 269–277.
34. Xu W., Barrientos T., Mao L. i wsp.: Lethal Cardiomyopathy in Mice Lacking Transferrin Receptor in the Heart. *Cell Rep*. 2015; 13(3): 533–545.
35. Lakhal-Littleton S., Wolna M., Chung Y.J. i wsp.: An essential cell-autonomous role for hepcidin in cardiac iron homeostasis. *Elife* 2016; 5: e19804.
36. Haddad S., Wang Y., Galy B. i wsp.: Iron-regulatory proteins secure iron availability in cardiomyocytes to prevent heart failure. *Eur Heart J*. 2016; 38(5): ehv333.

Wykorzystanie modelowania populacyjnego do optymalizacji dawkowania leków stosowanych w anestezjologii i intensywnej terapii

The use of population modeling to optimize dosing of drugs used in anaesthesiology and intensive care

Agnieszka
Borsuk-De Moor,
Paweł Wiczling

Zakład Biofarmacji i Farmakokinetyki, Katedra Biofarmacji i Farmakodynamiki,
Wydział Farmaceutyczny, Gdański Uniwersytet Medyczny

Przeprowadzone badania były finansowane ze środków grantu naukowego Naukowej Fundacji Polpharmy, grantu dla Młodych Naukowców Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (zadanie badawcze nr 01-0370/08/529), projektu badawczego nr 2014/15/N/NZ7/03028 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki oraz projektu POWR.03.02.00-00-1026/17-00 współfinansowanego ze środków Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014–2020 Europejskiego Funduszu Społecznego.

Streszczenie

Skuteczna farmakoterapia wymaga zastosowania odpowiedniej dawki leku, która pozwala zmaksymalizować efektywność terapii przy minimalizacji działań niepożądanych. Trudności w doborze dawki wynikają z różnic międzypersonalnych w farmakokinetyce i farmakodynamice leków. Modelowanie populacyjne opisuje procesy farmakokinetyczne i farmakodynamiczne w populacji, uwzględniając zależności występujące u każdego pacjenta, różnice pomiędzy pacjentami oraz wpływ zmiennych towarzyszących na farmakokinetykę i farmakodynamikę leku. Celem badań było opracowanie modeli populacyjnych dla leków stosowanych w anestezjologii i intensywnej terapii w specjalnych populacjach pacjentów. Farmakokinetyka sufentanylu została opisana w populacji niemowląt i dzieci po podaniu zewnątrzoponowym i dożylnym. Wyznaczona stała szybkości absorpcji z przestrzeni zewnątrzoponowej sugeruje powolne wchłanianie systemowe sufentanylu oraz możliwość wystąpienia kinetyki *flip-flop*, która powoduje wolniejszy spadek stężeń w osoczu po zakończeniu podawania leku w porównaniu do podania dożylnego. Wykazano również zależność klirensu metabolicznego od masy ciała oraz wieku. Model populacyjny dla farmakokinetyki tygocykliny został opracowany dla pacjentów z sepsą lub wstrząsem septycznym. Nie wykryto zależności parametrów farmakokinetycznych od cech pacjentów, a oszacowana zmienność międzypersonalna i między okazjami dla klirensu była niewielka. Sugeruje to, że u pacjentów krytycznie chorych do uzyskania jednolitej ekspozycji na lek wystarczające jest stosowanie uniwersalnej dawki. Farmakokinetyka kaspofunginy została opisana w populacji pacjentów krytycznie chorych. Klirens i objętość kompartmentu centralnego wykazały systematyczny wzrost w czasie, który nie został wyjaśniony przez zmienne towarzyszące. Oszacowany wzrost wartości klirensu dla trzech kolejnych dawek skutkuje istotnym klinicznie zmniejszeniem ekspozycji na lek. Opracowane modele populacyjne rozszerzają wiedzę o farmakokinetyce sufentanylu, tygocykliny i kaspofunginy. Symulacje oparte na stworzonych modelach mogą stanowić pomoc w procesie podejmowania decyzji o doborze dawkowania.

Wpłynęło: 08-02-2021
Zaakceptowano: 06-06-2021
Opublikowano: 11-06-2021

DOI: 10.5604/01.3001.0014.9188

Adres do korespondencji

dr n. farm. Agnieszka Borsuk-De Moor, Zakład Biofarmacji i Farmakokinetyki, Katedra Biofarmacji i Farmakodynamiki, Wydział Farmaceutyczny, Gdański Uniwersytet Medyczny, al. Gen. J. Hallera 107, 80-416 Gdańsk, tel. 58 349 14 93, e-mail: agnieszkabe@gumed.edu.pl

Słowa kluczowe: anestezjologia, farmakokinetyka, intensywna terapia, modelowanie populacyjne

Abstract

Effective pharmacotherapy requires an adequate drug dose that maximizes the effectiveness of therapy while minimizing adverse effects. Difficulties in dose selection arise from interindividual differences in drug pharmacokinetics and pharmacodynamics. Population modeling describes pharmacokinetic and pharmacodynamic processes in a population, taking into account the relationships in each patient, differences between patients, and the influence of covariates on drug pharmacokinetics and pharmacodynamics. The aim of this study was to develop population models for drugs used in anesthesiology and intensive care in special patient populations. The pharmacokinetics of sufentanil was described in infants and children after epidural and intravenous administration. The estimated absorption rate constant from the epidural space suggests slow systemic absorption of sufentanil and the possibility of *flip-flop* kinetics, which results in a slower decline in plasma concentrations at the end of drug administration compared with intravenous administration. The dependence of metabolic clearance on body weight and age was also demonstrated. A population model for the pharmacokinetics of tigecycline was developed for patients with sepsis or septic shock. No relationship between pharmacokinetic parameters and patient characteristics was detected, and the estimated interindividual and inter-occasion variability for clearance was small. This suggests that a universal dose is sufficient to achieve homogeneous drug exposure in critically ill patients. The pharmacokinetics of caspofungin was described in critically ill patients. The clearance and volume of central compartment showed systematic increase over time that was not explained by the covariates. The estimated increase in clearance values for three consecutive doses results in a clinically relevant reduction in drug exposure. The developed population models extend the knowledge of the pharmacokinetics of sufentanil, tigecycline, and caspofungin. Simulations based on these models can aid the dosing decision-making process.

Keywords: anesthesiology, intensive care, pharmacokinetics, population modeling

WSTĘP

Optymalizacja farmakoterapii opiera się na doborze odpowiedniego leku, a następnie dobraniu jego dawki w taki sposób, aby uzyskać efekt terapeutyczny przy jednoczesnej minimalizacji działań niepożądanych [1]. Trudności w prowadzeniu terapii wynikają ze zróżnicowanej odpowiedzi pacjentów na tę samą dawkę leku, co spowodowane jest zmiennością międzyosobniczą w procesach farmakokinetycznych (zależność stężenia leku od czasu) oraz farmakodynamicznych (zależność efektu działania leku od jego stężenia). Źródła tej zmienności stanowią: cechy demograficzne pacjenta, czynniki genetyczne, współistniejące choroby, przyjmowane leki etc. Poznanie

zależności pomiędzy cechami pacjenta a wartościami parametrów farmakokinetycznych i farmakodynamicznych jest kluczowe dla indywidualizacji dawkowania leków i tym samym zwiększenia bezpieczeństwa oraz efektywności terapii [2]. Zmienność w procesach farmakokinetycznych i farmakodynamicznych oraz ich związek ze zmiennymi charakteryzującymi pacjenta opisywane są w sposób ilościowy przy pomocy modeli populacyjnych. Modele te opisują zarówno zależność występującą u każdego pacjenta (np. zależność stężenia leku we krwi od czasu po podaniu dawki), jak i różnice w tej zależności pomiędzy pacjentami. Na podstawie wiedzy uzyskanej z opracowanego modelu populacyjnego można opracować schematy dawkowania oparte o zmienne charakteryzujące

pacjenta, a także zaproponować indywidualną dawkę dla konkretnego pacjenta na podstawie pojedynczych oznaczeń stężeń leku, które można uzyskać w praktyce klinicznej. Jest to rozwinięcie klasycznego podejścia do monitorowania stężeń leku, które ogranicza się do odpowiedzi na pytanie, czy oznaczone stężenie leku u pacjenta znajduje się w zakresie stężeń terapeutycznych [3].

Pacjenci, dla których dobór odpowiedniej dawki jest najbardziej istotny to jednocześnie pacjenci, od których najtrudniej uzyskać odpowiednie dane. Przykładem takich populacji są dzieci czy krytycznie chorzy, u których najbardziej prawdopodobne są odchylenia w farmakokinetyce leków w porównaniu do zdrowych dorosłych ochotników, dla których wyznaczana jest farmakokinetyka leku w badaniach klinicznych. Trudności w doborze optymalnej dawki w populacji pediatrycznej są spowodowane tym, że dzieci nie są po prostu małymi dorosłymi – w ich organizmie zachodzą aktywnie procesy wzrostu i dojrzewania, które wyraźnie wpływają przede wszystkim na farmakokinetykę leków [4–6]. Najważniejsze narządy organizmu nie tylko zwiększają swoje rozmiary, lecz także dojrzewają do pełnienia swoich funkcji. Zmiany w masie ciała u dzieci często nie odzwierciedlają zmian w farmakokinetyce, dlatego obliczanie dawki dla dzieci na podstawie dawkowania dla osób dorosłych przy pomocy liniowej ekstrapolacji na podstawie masy ciała może zakończyć się niepowodzeniem terapii. Ponieważ większość leków stosowanych w pediatrii nie posiada rejestracji do stosowania w tej populacji, a dawkowanie jest często dobierane jedynie w oparciu o doświadczenie klinicysty, badania nad farmakokinetyką i farmakodynamiką leków prowadzone w populacji pediatrycznej odgrywają zasadniczą rolę w celu poprawy bezpieczeństwa terapii [7]. Pacjenci krytycznie chorzy są heterogenną populacją, u której procesy chorobowe powodują stan zagrożenia życia, a zmiany patofizjologiczne są na tyle zaawansowane, że mogą zmieniać farmakokinetykę leków w porównaniu do zdrowych ochotników czy innych grup hospitalizowanych pacjentów [8]. Zwiększona całkowita woda organizmu oraz objętość płynu zewnątrzkomórkowego powodują wzrost objętości dystrybucji dla leków hydrofilowych, a więc obniżone stężenie maksymalne i przedłużony biologiczny okres półtrwania [9]. U pacjentów we wstrząsie dochodzi do zmniejszenia przepływu krwi przez wątrobę, co zmniejsza klirens wątrobowy dla leków o wysokim współczynniku ekstrakcji wątrobowej. Szczególnie częste u chorych krytycznie pacjentów są interakcje lekowe wpływające na aktywność cytochromu P450. Proces wydalania leków z organizmu może zostać zaburzony poprzez zaburzenia pracy nerek, które obejmują procesy takie jak zmniejszona filtracja

kłębuszkowa, zmiany w pH moczu czy zmieniona aktywność transporterów leków [8, 9]. Opis farmakokinetyki leków w grupie pacjentów krytycznie chorych jest niezbędny do ustalenia właściwego dawkowania podczas terapii ratującej życie.

Anestezjologia jest specjalnością lekarską, która zajmuje się znieczuleniem, leczeniem bólu oraz intensywną terapią. Decyzje podejmowane przez anestezjologa mają na celu ochronę, regulację i utrzymanie krytycznych funkcji życiowych i wymagają: rozległej wiedzy o funkcjonowaniu organizmu, zmianach zachodzących w stanach zagrożenia życia, możliwych formach terapii, charakterystyce leków, obszernych informacji na temat charakterystyki i stanu pacjenta. Większość leków stosowanych w anestezji podawanych jest w celu osiągnięcia natychmiastowego efektu, a czas działania musi być znany z dokładnością do kilku minut, tak aby zapewnić bezpieczny przebieg zabiegu operacyjnego [10]. Anestezjolog dobiera rodzaj leku, dawkę i sposób podania na podstawie charakterystyki pacjenta, a następnie dopasowuje dawkowanie na podstawie różnicy pomiędzy obserwowanym a oczekiwanym efektem oraz w kontekście przeprowadzanej operacji i charakterystyki pacjenta. Modele populacyjne są ważnym elementem wspomagającym proces podejmowania decyzji jako źródło wiedzy o farmakokinetyce i farmakodynamice leków stosowanych w anestezjologii. Grupą leków stosowanych w intensywnej terapii, dla której modele populacyjne są szczególnie cennym źródłem informacji, są leki przeciwdrobnoustrojowe. Pacjenci krytycznie chorzy są populacją szczególnie narażoną na infekcje ze względu na ciężkie stany chorobowe, które predysponują do wystąpienia infekcji. Częstą przyczyną hospitalizacji na oddziale intensywnej terapii jest sama infekcja, powikłana ogólnoustrojowym procesem zapalnym (sepsa). Efekty terapii przeciwdrobnoustrojowej dla ciężkich infekcji u krytycznie chorych są obecnie niezadowalające, dodatkowo narasta problem lekooporności drobnoustrojów, która spowodowana jest między innymi niekontrolowanym stosowaniem leków przeciwdrobnoustrojowych oraz nieprawidłowym ich dawkowaniem [11]. Jednym z elementów poprawy wyników leczenia infekcji u pacjentów krytycznie chorych oraz walki z rosnącą lekoopornością mikroorganizmów jest optymalizacja dawkowania z wykorzystaniem modeli populacyjnych. Dopasowując dawkę na podstawie informacji z modelu, można osiągnąć pożądaną ekspozycję na lek u danego pacjenta [12]. Wyzwaniem dla optymalizacji dawkowania leków przeciwdrobnoustrojowych jest ich farmakodynamika, która nie opisuje wpływu leku na organizm człowieka, ale wpływ leku na mikroorganizm, który powoduje zakażenie [13]. Dlatego do opracowania

schematu dawkowania niezbędne są nie tylko dane z populacyjnych modeli farmakokinetycznych, lecz także identyfikacja patogenów będących przyczyną zakażenia oraz charakterystyka ich lekowrażliwości. W zależności od lekowrażliwości, docelowa ekspozycja na lek – zapewniająca skuteczność terapii przeciwko konkretnemu patogenowi – jest inna [12]. Wrażliwość patogenu wyrażana jest najczęściej przy pomocy wartości minimalnego stężenia hamującego (*minimal inhibitory concentration*, MIC), które definiowane jest jako najniższe stężenie leku hamujące widoczny wzrost mikroorganizmów [13]. Zależności farmakokinetyczno-farmakodynamiczne (*pharmacokinetic/pharmacodynamic*, PK/PD) są opisywane przy pomocy wskaźników PK/PD, które łączą wartość opisującą ekspozycję na lek z wartością MIC. Na podstawie farmakokinetycznego modelu populacyjnego można wygenerować wartości wskaźników PK/PD po podaniu określonej dawki i dla zdefiniowanego zakresu wartości MIC. Odsetek wysymulowanych pacjentów, dla których wartości wskaźnika PK/PD są powyżej pewnej zdefiniowanej wartości (celu PK/PD), zwany jest prawdopodobieństwem osiągnięcia celu (*probability of target attainment*, PTA) dla każdej wartości MIC i może być wykorzystany jako pomoc w podejmowaniu decyzji klinicznych.

Celem badań było opracowanie modeli populacyjnych dla wybranych leków stosowanych w anestezjologii i intensywnej terapii w specjalnych populacjach pacjentów, dla których dane z badań klinicznych są ograniczone. Modele te miały opisać farmakokinetykę leków, jej zmienność w badanych populacjach oraz wyjaśnienie części zmienności przy pomocy zmiennych charakteryzujących pacjenta.

FARMAKOKINETYKA SUFENTANYLU PODAWANEGO ZEWNĄTRZOPONOWO I DOŻYLNIE U DZIECI I NIEMOWLĄT

Sufentanył jest opioidowym lekiem przeciwbólowym o krótkim działaniu, coraz szerzej stosowanym w pediatrii [14]. Dobór odpowiedniego dawkowania sufentanylu jest istotny ze względu na niebezpieczeństwo wystąpienia działań niepożądanych, w tym depresji oddechowej, na którą najbardziej narażone są najmłodsze dzieci [15]. Efekt działania sufentanylu oraz prawdopodobieństwo wystąpienia działań niepożądanych są skorelowane z jego wchłanianiem systemowym, stąd wiedza o procesie wchłaniania jest istotnym elementem w procesie doboru dawki przy podaniu pozanaczyniowym [16–18].

W badaniu retrospektywnym do analizy wykorzystano 2 wcześniej opublikowane zestawy danych: obserwacje

stężeń sufentanylu w osoczu u 20 niemowląt w wieku od 3 do 36 miesięcy, którym podawano sufentanył w postaci wlewu zewnątrzoponowego z 0,2% roztworem ropiwakainy oraz obserwacje stężeń sufentanylu w osoczu u 41 dzieci w wieku od 0 do 17 lat, które otrzymywały sufentanył w postaci długotrwałego wlewu dożylnego [19, 20]. Ponieważ w badaniach prowadzonych w populacji niemowląt istnieją znaczne ograniczenia co do liczby i objętości pobieranych próbek krwi, dane uzyskane z tej populacji sprawiają trudności w oszacowaniu wszystkich parametrów modelu populacyjnego. Połączenie ubogich, lecz drogocennych danych z populacji niemowląt z obszerniejszymi danymi, pochodzącymi z długotrwałych wlewów dożylnych u dzieci w zakresie wieku obejmującym całą populację pediatryczną, pozwoliło na zbudowanie informatywnego modelu populacyjnego.

Farmakokinetyka sufentanylu została opisana przy pomocy modelu dwukompartimentowego z absorpcją 1. rzędu z przestrzeni zewnątrzoponowej, a zmienność międzypersoniczna została oszacowana dla: klirensu eliminacji, klirensu międzykompartimentowego, objętości kompartimentu peryferyjnego oraz stałej szybkości absorpcji. W modelu uwzględniono wpływ rozmiaru ciała na parametry klirensu i objętości z wykorzystaniem modelu allometrycznego o wykładnikach teoretycznych, co wyjaśniło dużą część zmienności międzypersonicznej (45% zmienności w klirensie metabolicznym, 32% zmienności w klirensie międzykompartimentowym i 37% zmienności w objętości kompartimentu peryferyjnego).

Ponieważ połączone dane opisywały pacjentów w wieku od 3 miesięcy do 18 lat, udało się wyznaczyć zależność klirensu metabolicznego od wieku w postaci funkcji Hilla, co nie powiodło się przy analizie każdego z badań osobno. Wyznaczenie zależności klirensu od wieku jest istotne w kontekście doboru odpowiedniej dawki sufentanylu dla najmłodszych pacjentów, gdyż świadczy o tym, że dawkowanie powinno być oparte nie tylko o masę ciała, ale również o wiek. Dodatkowo zidentyfikowana została grupa pacjentów o znacznie wyższym klirensie niż w pozostałej populacji, co może sugerować znaczny wpływ dodatkowych czynników, takich jak polimorfizm genetyczny (aktywność CYP3A4 i CYP3A5) czy rzut serca na eliminację leku.

Dzięki połączeniu dwóch zestawów danych udało się oszacować stałą szybkość absorpcji sufentanylu z przestrzeni zewnątrzoponowej. Uzyskane wyniki sugerują powolne wchłanianie sufentanylu, a także możliwość wystąpienia kinetyki *flip-flop* (proces wchłaniania wolniejszy od procesu eliminacji).

Tego procesu nie udałooby się wykryć przy analizie danych tylko z podania zewnątrzoponowego, gdyż nie byłoby możliwości odniesienia do podania dożylnego. Zjawisko kinetyki *flip-flop* zachodziło u wszystkich pacjentów po podaniu zewnątrzoponowym w fazie α (głównie proces dystrybucji), natomiast w fazie β (głównie proces eliminacji) zjawisko to zachodziło u niektórych pacjentów, gdyż stałe szybkości absorpcji i eliminacji były do siebie zbliżone.

Powolna absorpcja systemowa sufentanyłu powoduje brak nagłego wzrostu stężenia w osoczu po podaniu zewnątrzoponowym, zmniejszając ryzyko efektów ubocznych, związanych ze stężeniami szczytowymi. Obecność kinetyki *flip-flop* zmienia interpretację spadku stężenia po zakończeniu podawania leku do przestrzeni zewnątrzoponowej, ponieważ faza α szybkiego spadku stężenia jest nieobecna, gdyż jest maskowana przez powolną absorpcję. W związku z tym spadek stężeń jest wolniejszy, niż wynikałoby to z modelu dwukompartamentowego. Poziomy stężeń sufentanyłu po zakończeniu podawania leku są istotne ze względu na to, że determinują one moment, w którym można bezpiecznie odłączyć wentylację mechaniczną, aby pacjent rozpoczął spontaniczny oddech. Bez uwzględnienia kinetyki *flip-flop* można oczekiwać, że stężenia te spadną szybciej i na tej podstawie wentylacja mechaniczna zostanie odłączona zbyt wcześnie, co może stanowić zagrożenie dla zdrowia i życia pacjenta [21].

FARMAKOKINETYKA TYGECYKLINY U PACJENTÓW Z SEPSĄ LUB WSTRZĄSEM SEPTYCZNYM

Tygecyklina jest antybiotykiem glicylocyklinowym, o budowie chemicznej zbliżonej do tetracykliny i działaniu bakteriostatycznym [22]. Stosowana jest często poza wskazaniami rejestracyjnymi jako antybiotyk ostatniej szansy u pacjentów z zakażeniami wielolekoopornymi. W ostatnim czasie pojawiły się doniesienia kwestionujące bezpieczeństwo stosowania tygecykliny (zwiększona śmiertelność), co spowodowało wydaniem przez Agencję Żywności i Leków (*Food and Drug Administration*, FDA) ostrzeżenia i zaleceń co do ograniczenia stosowania tygecykliny tylko do sytuacji, gdy nie ma możliwości zastosowania innej terapii [23]. Jednak inne badania sugerują, że dawka tygecykliny zaproponowana przez producenta może być zbyt niska w populacji krytycznie chorych, co może być przyczyną niepowodzenia terapii i wyższej śmiertelności pacjentów [24].

W przeprowadzonym obserwacyjnym badaniu klinicznym zastosowano zwiększoną dawkę tygecykliny

w terapii zakażeń u pacjentów krytycznie chorych z sepsą lub wstrząsem septycznym. Model farmakokinetyczny dla tygecykliny został opracowany dla stosunkowo dużej populacji pacjentów krytycznie chorych (37) z dużą liczbą pomiarów stężeń (942), co jest dość rzadkie w badaniach na oddziałach intensywnej terapii. Dodatkowo pacjenci badani byli przez 3 kolejne dni, dzięki czemu – oprócz zmienności parametrów pomiędzy pacjentami – udało się wyznaczyć zmienność parametrów w obrębie jednego pacjenta podczas kolejnych podań leku. Farmakokinetyka tygecykliny została opisana modelem dwukompartamentowym ze zmiennością międzyosobniczą oszacowaną dla klirensu, objętości kompartmentu centralnego i peryferyjnego oraz zmiennością między okazjami oszacowaną dla klirensu i objętości kompartmentu peryferyjnego.

Klirens tygecykliny został oszacowany z dużą precyzją i był zgodny z wartościami opublikowanymi w literaturze oraz podanymi przez producenta leku. Oznacza to, że u pacjentów krytycznie chorych, mimo zmian patofizjologicznych, wartość klirensu nie ulega znaczącej zmianie. Oszacowana zmienność międzyosobnicza klirensu była niewielka (17,3%), podobnie jak zmienność klirensu w obrębie pacjenta pomiędzy okazjami (14,4%). Klirens jest najistotniejszym parametrem dla dawkowania tygecykliny, ponieważ jej skuteczność jest skorelowana z wartością wskaźnika *AUC/MIC* (stosunek pola pod krzywą zależności stężenie-czas w ciągu 24 godzin do MIC); (*area under the curve*, AUC). Podczas poszukiwania kowariant nie została wykryta zależność indywidualnych parametrów od cech pacjentów, takich jak: wiek, masa ciała, stężenie albumin oraz prokalcytoniny, rzut serca, objętość dializy, etc. Zależność taka, nawet jeśli zostałaby zidentyfikowana, miałaby niewielkie znaczenie kliniczne, ponieważ istotność kliniczną przyjmuje się wtedy, gdy zmienność międzyosobnicza zmniejsza się o około 20% po uwzględnieniu zależności ze zmienną towarzyszącą. Przy uzyskanych niskich wartościach zmienności międzyosobniczej nie udałooby się tego osiągnąć.

Otrzymane wyniki sugerują, że dawkowanie tygecykliny u pacjentów krytycznie chorych powinno być jednorodne ze względu na farmakokinetykę, a dobór dawki powinien opierać się na analizie wrażliwości patogenu powodującego zakażenie. Jeśli dawkę dobierze się na podstawie wartości MIC dla zasiedlającego patogenu, pacjenci będą mieli wystarczająco jednorodną ekspozycję na lek bez uwzględniania cech osobniczych pacjenta. Opracowany model ma dużą zdolność predykcyjną i może być użyty do dalszych badań symulacyjnych, oceniających prawdopodobieństwo osiągnięcia celu dla tej grupy pacjentów [25].

FARMAKOKINETYKA KASPOFUNGINY U KRYTYCZNIE CHORYCH PACJENTÓW

Systemowe infekcje grzybicze są częstym problemem u pacjentów na oddziałach intensywnej terapii i dotyczą zarówno pacjentów o normalnej, jak i obniżonej odporności immunologicznej [26]. Ciężki stan pacjenta, wiele procedur medycznych oraz szerokie zastosowanie antybiotykoterapii predysponują do rozwinęcia infekcji grzybiczej. Kaspofungina jest lekiem przeciugrzybiczym z grupy echinokandyn, często stosowanym w intensywnej terapii ze względu na bezpieczeństwo terapii [27]. W związku z narastającą opornością na leki z grupy echinokandyn, niezbędne są badania nad ich farmakokinetyką i farmakodynamiką w celu odpowiedniego doboru schematów dawkowania. Dane dotyczące farmakokinetyki kaspofunginy u osób krytycznie chorych są ograniczone, szczególnie dla populacji wymagającej pozaustrojowych terapii wspomagających funkcje życiowe.

Na podstawie danych od 30 krytycznie chorych pacjentów opracowano model populacyjny, w którym farmakokinetyka kaspofunginy została opisana modelem dwukompartментowym. Zmienność międzyosobnicza została oszacowana dla klirensu, objętości kompartmentu centralnego i peryferyjnego. Uwzględniona została też kowariancja między klirensem a objętością kompartmentu centralnego. Stężenia kaspofunginy monitorowane były dla trzech kolejnych dawek leku, jednak uwzględnienie zmienności parametrów między okazjami nie polepszyło istotnie dopasowania modelu. Model ze zmiennością między okazjami został wykorzystany jednak do diagnostyki modelu. Żadna ze zmiennych towarzyszących, obejmujących zmienne demograficzne, opisujące stan kliniczny oraz prowadzenie terapii pozaustrojowej, nie została zidentyfikowana jako predyktor indywidualnych wartości parametrów farmakokinetycznych. Klirens i objętość kompartmentu centralnego wykazały jednak systematyczną zmianę w czasie, która nie została wyjaśniona przez inne zmienne towarzyszące. Nie wyjaśniła jej też próba zastosowania modelu uwzględniającego nieliniowość.

W ostatecznym modelu do opisu zmiany parametrów w czasie wykorzystane zostały trzy osobne wartości

klirensu i objętości kompartmentu centralnego dla każdego podania dawki kaspofunginy. Wartości obu parametrów wzrastały dla każdej kolejnej okazy. Ponieważ skuteczność kaspofunginy opisywana jest przez wartości wskaźnika AUC/MIC , zmieniające się w czasie wartości klirensu mogą mieć wpływ na skuteczność terapii. Obliczając ekspozycję na lek na podstawie trzech oszacowanych wartości klirensu, wzrost klirensu skutkuje spadkiem wartości AUC o 24% pomiędzy pierwszą a drugą dawką i o 44% pomiędzy pierwszą a trzecią dawką. Dodatkowo, porównując wartości AUC/MIC , otrzymane na podstawie trzech oszacowanych wartości klirensu i standardowej dawki podtrzymującej 50 mg, w żadnym przypadku nie zostaje osiągnięta literaturowa wartość wskaźnika AUC/MIC skorelowana z sukcesem terapeutycznym.

Otrzymane wyniki sugerują konieczność przeprowadzenia dalszych badań w kierunku niestacjonarności farmakokinetyki kaspofunginy, gdyż oszacowany wzrost wartości klirensu dla trzech kolejnych dawek skutkuje istotnym klinicznie zmniejszeniem ekspozycji na lek. Zmiany w wartościach parametrów mogą być spowodowane procesem, który nie był monitorowany w tym badaniu i który może być również powodem istotnej statystycznie kowariancji między klirensem a objętością kompartmentu centralnego [28].

WNIOSKI

Opracowane modele populacyjne rozszerzają wiedzę o farmakokinetyce sufentanylu, tygocykliny i kaspofunginy w specjalnych populacjach pacjentów. Opisane zależności, takie jak wpływ masy ciała i wieku na farmakokinetykę sufentanylu u dzieci oraz wykryte zjawiska, takie jak kinetyka *flip-flop* sufentanylu po podaniu zewnątrzoponowym czy niestacjonarność farmakokinetyki kaspofunginy, są cennym źródłem informacji o profilu stężenie-czas oraz bezpieczeństwie i efektywności terapii z wykorzystaniem badanych leków. Symulacje oparte na stworzonych modelach mogą być pomocne w procesie podejmowania decyzji o doborze dawkowania w praktyce klinicznej.

PIŚMIENNICTWO

1. Morse B.L., Kim R.B.: Is personalized medicine a dream or a reality? *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2015; 52(1): 1–11.
2. Shargel L., Wu-Pong S., Yu A.B.C.: Application of Pharmacokinetics to Clinical Situations. W: *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*. 6th wyd. McGraw-Hill Education; 2012: 565–614.
3. Owen J.S., Fiedler-Kelly J.: The Practice of Pharmacometrics. W: *Introduction to Population Pharmacokinetic / Pharmacodynamic Analysis with Nonlinear Mixed Effects Models*. John Wiley & Sons, Inc; 2014: 1–8.
4. Moore P.: Children are not small adults. *Lancet* 1998; 352(9128): 630.

5. Lu H., Rosenbaum S.: Developmental Pharmacokinetics in Pediatric Populations. *J Pediatr Pharmacol Ther.* 2014; 19(4): 262–76.
6. Holford N., Heo Y.-A., Anderson B.: A Pharmacokinetic Standard for Babies and Adults. *J Pharm Sci.* 2013; 102(9): 2941–52.
7. De Cock R.F.W., Piana C., Krekels E.H.J., Danhof M., Allegaert K., Knibbe C.A.J.: The role of population PK-PD modelling in paediatric clinical research. *Eur J Clin Pharmacol* 2011; 67(Suppl. 1): 5–16.
8. Blot S.I., Pea F., Lipman J.: The effect of pathophysiology on pharmacokinetics in the critically ill patient – Concepts appraised by the example of antimicrobial agents. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014; 77: 3–11.
9. Roberts D.J., Hall R.I.: Drug absorption, distribution, metabolism and excretion considerations in critically ill adults. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2013; 9: 1067–84.
10. Gambús P.L., Trocóniz I.F.: Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling in anaesthesia. *Br J Clin Pharmacol.* 2015; 79(1): 72–84.
11. Vincent J.L., Rello J., Marshall J., Silva E., Anzueto A., Martin C.D. i wsp.: International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA* 2009; 302(21): 2323–9.
12. Roberts J.A., Roger C., De Waele J.J.: Personalized antibiotic dosing for the critically ill. *Intensive Care Med.* 2019; 45(5): 715–718.
13. Nielsen E.I., Friberg L.E.: Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of antibacterial drugs. *Pharmacol Rev.* 2013; 65(3): 1053–90.
14. Lundeborg S., Roelofse J.A.: Aspects of pharmacokinetics and pharmacodynamics of sufentanil in pediatric practice. *Pediatr Anesth.* 2011; 21(3): 274–9.
15. Morton N.S.: Prevention and control of pain in children. *Br J Anaesth.* 1999; 83(1): 118–29.
16. Kokki H., Ruuskanen A., Karvinen M.: Comparison of epidural pain treatment with sufentanil-ropivacaine infusion with and without epinephrine in children. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2002; 46(6): 647–53.
17. Miguel R., Barlow I., Morrell M., Scharf J., Sanusi D., Fu E.: A prospective, randomized, double-blind comparison of epidural and intravenous sufentanil infusions. *Anesthesiology* 1994; 81(2): 346–52.
18. Hansdóttir V., Woestenborghs R., Nordberg G.: The pharmacokinetics of continuous epidural sufentanil and bupivacaine infusion after thoracotomy. *Anesth Analg.* 1996; 83(2): 401–6.
19. Wołoszczuk-Gebicka B., Grabowski T., Borucka B., Karas-Trzeciak M.: Pharmacokinetics of sufentanil administered with 0.2% ropivacaine as a continuous epidural infusion for postoperative pain relief in infants. *Paediatr Anaesth.* 2014; 24(9): 962–7.
20. Bartkowska-Śniatkowska A., Bienert A., Wiczling P., Rosada-Kurasińska J., Zielińska M., Warzybok J. i wsp.: Pharmacokinetics of sufentanil during long-term infusion in critically ill pediatric patients. *J Clin Pharmacol.* 2016; 56(1): 109–15.
21. Borsuk A., Wołoszczuk-Gębicka B., Bartkowska-Śniatkowska A., Rosada-Kurasińska J., Bienert A., Wiczling P.: Flip-Flop Phenomenon in Epidural Sufentanil Pharmacokinetics: A Population Study in Children and Infants. *J Clin Pharmacol.* 2017; 57(9): 1194–206.
22. Tygacil [package insert], Wyeth Pharmaceuticals Inc., Philadelphia, PA 19101; June 2016 [Internet]. [cytowane 28 wrzesień 2017]. Dostępne na: <http://labeling.pfizer.com/ShowLabeling.aspx?id=491>
23. Food and Drug Administration. FDA Drug Safety Communication: FDA warns of increased risk of death with IV antibacterial Tygacil (tigecycline) and approves new Boxed Warning [Internet]. [cytowane 14 grudzień 2017]. Dostępne na: <https://www.fda.gov/drugs/drugsafety/ucm369580.htm>
24. Burkhardt O., Rauch K., Kaefer V., Hadem J., Kielstein J.T., Welte T.: Tigecycline possibly underdosed for the treatment of pneumonia: a pharmacokinetic viewpoint. *Int J Antimicrob Agents.* 2009; 34(1): 101–2.
25. Borsuk-De Moor A., Rypulak E., Potręć B., Piwowarczyk P., Borys M., Sysiak J. i wsp.: Population pharmacokinetics of high-dose tigecycline in patients with sepsis or septic shock. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; 62(4): e02273–17.
26. De Pascale G., Tumbarello M.: Fungal infections in the ICU: advances in treatment and diagnosis. *Curr Opin Crit Care* 2015; 21(5): 421–9.
27. Bader J.C., Bhavnani S.M., Andes D.R., Ambrose P.G.: We can do better: a fresh look at echinocandin dosing. *J Antimicrob Chemother.* 2018; 73(Suppl. 1): i44–i50.
28. Borsuk-De Moor A., Sysiak-Sławecka J., Rypulak E., Borys M., Piwowarczyk P., Raszewski G. i wsp.: Nonstationary Pharmacokinetics of Caspofungin in ICU Patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020; 64(9): e00345–20.

Czynniki ryzyka wystąpienia raka jelita grubego u pacjentów po kolonoskopii przesiewowej

Risk factors of colorectal cancer after screening colonoscopy

Paulina Wieszczy,
Michał F. Kamiński,
Jarosław Reguła

Katedra i Klinika Gastroenterologii, Hepatologii i Onkologii Klinicznej,
Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

Źródło finansowania

Badania prowadzone w ramach rozprawy doktorskiej, będącej podstawą poniższej publikacji, były finansowane ze środków Fundacji Naukowej Polpharmy, Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego, Fundacji Fulbrighta, Fundacji na rzecz Nauki Polskiej, Polskiej Fundacji Gastroenterologii, Ministerstwa Zdrowia, KG Jebsen Foundation i Norwegian Research Council.

Streszczenie

W dobie populacyjnych programów przesiewowych w kierunku raka jelita grubego ważna jest ocena ich jakości i skuteczności. Jednym z podstawowych kryteriów jakości programu przesiewowego jest ryzyko wystąpienia raka jelita grubego w okresie między kolonoskopią przesiewową a badaniem kontrolnym.

Poniższa publikacja ma na celu przedstawienie wyników pracy doktorskiej dr n. med. Pauliny Wieszczy, stypendystki Naukowej Fundacji Polpharmy. Celem pracy doktorskiej było zbadanie i omówienie zależności między ryzykiem raka jelita grubego po kolonoskopii przesiewowej a definicją grup ryzyka oraz jakością badania.

Analizę ryzyka wystąpienia raka jelita grubego po usunięciu gruczolaków w kolonoskopii przesiewowej wykonano z wykorzystaniem baz danych Programu Badań Przesiewowych Raka Jelita Grubego oraz Krajowego Rejestru Nowotworów. jakość kolonoskopii przesiewowej została omówiona w oparciu o dowody literaturowe dotyczące współczynnika wykrywalności gruczolaków (*adenoma detection rate*, ADR). Łącznie do analiz ryzyka raka jelita grubego włączono 236,089 pacjentów, gdzie u 17,7% wykryto co najmniej jednego gruczolaka w badaniu przesiewowym. W czasie obserwacji (mediana 7 lat, maksimum 14 lat) u 439 pacjentów zdiagnozowano raka jelita grubego. Wykazano, że definiując grupę wysokiego ryzyka jako pacjentów z gruczolakami o średnicy ≥ 20 mm lub dysplazją dużego stopnia, a nie jako pacjentów z ≥ 3 gruczolakami lub gruczolakiem o średnicy ≥ 10 mm, z dysplazją dużego stopnia lub komponentem kosmkowym (obecna definicja), można zredukować liczbę pacjentów wymagających intensywnego nadzoru o 74% bez wpływu na ryzyko w grupie niskiego ryzyka. W wyniku przeglądu literatury znaleziono trzy badania, które jednoznacznie wykazały, że wraz ze wzrostem ADR endoskopisty w sposób istotny statystycznie spada ryzyko raka jelita grubego.

Podsumowując, w przypadku ograniczenia grupy wysokiego ryzyka do pacjentów z gruczolakami o średnicy ≥ 20 mm lub dysplazją dużego stopnia, możliwa jest bardziej optymalna opieka nad pacjentami

Wpłynęło: 11-01-2021

Zaakceptowano: 06-06-2021

Opublikowano: 11-06-2021

DOI: 10.5604/01.3001.0014.9192

Adres do korespondencji

Dr n. med. Paulina Wieszczy,
Katedra i Klinika Gastroenterologii,
Hepatologii i Onkologii Klinicznej,
Centrum Medyczne Kształcenia
Podyplomowego,
ul. Roentgena 5, 02-781 Warszawa,
tel. 22 5463 044,
e-mail: paulina.wieszczy@cmkp.edu.pl

o istotnie zwiększonym ryzyku raka jelita grubego. Istnieją dowody naukowe na istotną rolę ADR endoskopisty jako kluczowego parametru jakości kolonoskopii.

Słowa kluczowe: badania przesiewowe, endoskopia, jakość, kolonoskopia, rak jelita grubego

Abstract

In the era of populational screening programs for colorectal cancer, evaluation of their quality and efficacy becomes an important issue. One of the main criteria taken into account when assessing the quality of a screening program is related to the risk of colorectal cancer diagnosis in the period between the screening colonoscopy and the control examination.

The objective of this article was to present the results of the doctoral research carried out by dr. Paulina Wieszcz, a beneficiary of the Polpharma Scientific Foundation scholarship. The objective of the doctoral dissertation was to investigate and discuss the relationship between the definition of risk groups as well as the quality of the screening colonoscopy and the risk of colorectal cancer after the screening colonoscopy.

The risk of colorectal cancer after adenoma removal at the screening colonoscopy was assessed using data obtained from the Colorectal Cancer Screening Program and the National Cancer Registry. The quality of the screening colonoscopy was assessed on the basis of literature search regarding the adenoma detection rates (ADR).

A total of 236.089 patients were included in colorectal cancer risk analyses, 17.7% of patients had at least one adenoma detected at screening colonoscopy. Over the follow-up period (median of 7 years, maximum 14 years), colorectal cancer was diagnosed in 439 patients. It was demonstrated that when the high-risk group was defined as patients with adenomas ≥ 20 mm in diameter or high grade dysplasia rather than patients with ≥ 3 adenomas or adenomas ≥ 10 mm in diameter, with high grade dysplasia or villous component (current definition), the number of patients requiring intensive surveillance can be reduced by 74% without any impact on the colorectal cancer risk in the low-risk group. The literature search revealed a total of three studies which clearly showed that the risk of colorectal cancer significantly decreased with the increase in the endoscopist's ADR.

To conclude, restricting the high-risk group to patients with adenomas ≥ 20 mm in diameter or high-grade dysplasia allows to optimize care for patients at increased risk of colorectal cancer. Scientific evidence is available for the important role of endoscopist's ADR as a key quality parameter for colonoscopy.

Keywords: endoscopy, colorectal cancer, colonoscopy, quality, screening

WPROWADZENIE

Rak jelita grubego jest obecnie drugim u kobiet i trzecim u mężczyzn najczęstszym nowotworem w Polsce i na świecie [1]. W 2017 roku stanowił on odpowiednio 9,9% i 12,3% wszystkich zachorowań na nowotwory u kobiet i u mężczyzn. W liczbach bezwzględnych oznacza to ponad 18 tys. zachorowań i ponad 12 tys. zgonów tylko w 2017 roku.

Rak jelita grubego rozwija się ze zmian łagodnych (tzw. *polipów*) w procesie trwającym około 7–10 lat. Dzięki tak długiemu okresowi rozwoju oraz występowaniu zmian przednowotworowych, możliwe jest prowadzenie skutecznych badań przesiewowych w kierunku raka jelita grubego. Badania te z jednej strony mają na celu prewencję zachorowania na raka jelita grubego poprzez usuwanie zmian przednowotworowych, a z drugiej strony wykrywanie choroby we wczesnym stadium.

Jednym z parametrów mówiących o jakości programów przesiewowych jest ryzyko wystąpienia raka interwałowego [2, 3]. Rak interwałowy to rak, który jest diagnozowany w czasie między badaniem przesiewowym a badaniem kontrolnym. Wśród wielu czynników, które mogą modulować ryzyko wystąpienia raka jelita grubego, wymienia się z jednej strony jakość kolonoskopii przesiewowej, zaś drugiej strony intensywność badań kontrolnych [4]. Jednym z najbardziej rozpoznawalnych parametrów jakości kolonoskopii przesiewowej jest współczynnik wykrywalności gruczolaków (*adenoma detection rate*, ADR). Uważa się, że parametr ten jest miarą dokładności, z jaką endoskopista ogląda jelito.

Na podstawie zmian wykrytych przez endoskopistę w trakcie badania, pacjenci klasyfikowani są do grupy niskiego i wysokiego ryzyka. Następnie, na podstawie przypisania do grupy ryzyka, wydawane są zalecenia dotyczące nadzoru, a więc czasu, po jakim pacjent powinien powtórzyć badanie. Obecnie zaleca się, aby pacjenci, u których w czasie kolonoskopii przesiewowej wykryto i usunięto 1–2 gruczolaki cewkowe <10 mm średnicy (grupa niskiego ryzyka), wykonali badanie kontrolne po 5–10 latach, a pacjenci, u których wykryto i usunięto ≥ 3 gruczolaki lub ≥ 1 gruczolak kosmkowy lub z dysplazją dużego stopnia lub ≥ 10 mm średnicy (grupa wysokiego ryzyka), wykonali badanie kontrolne po 3 latach [5].

Poniższa publikacja ma na celu przedstawienie wyników pracy doktorskiej dr n. med. Pauliny Wieszczy, stypendystki Naukowej Fundacji Polpharmy. Praca doktorska została zrealizowana w Katedrze i Klinice Gastroenterologii, Hepatologii i Onkologii Klinicznej Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie.

MATERIAŁ I METODY

W pierwszej części pracy badano zależność między cechami gruczolaków wykrytych i usuniętych w ramach kolonoskopii przesiewowej a ryzykiem raka jelita grubego w przyszłości. Do tego celu wykorzystano bazę Programu Badań Przesiewowych, w szczególności do analiz włączono wszystkie kolonoskopie przesiewowe wykonane w Polsce w latach 2000–2011. Dane te połączono z bazą Krajowego Rejestru Nowotworów w celu identyfikacji wszystkich rozpoznanych raka jelita grubego (ICD10: C18–C20) i zgonów w okresie od badania przesiewowego do 31 grudnia 2014 roku. Wśród analizowanych czynników ryzyka raka jelita grubego były: średnica, typ histologiczny, stopień dysplazji oraz liczba wykrytych i usuniętych gruczolaków oraz wiek pacjenta w dniu

kolonoskopii przesiewowej, płeć oraz historia raka jelita grubego wśród krewnych pierwszego stopnia. Analizy przeprowadzono z wykorzystaniem modeli proporcjonalnych hazardów Coxa oraz standaryzowanych współczynników zachorowalności (SIR). Raportowano również ilorazy hazardów (HR) oraz odpowiadające im 95% przedziały ufności (PU). Zależność między ryzykiem raka jelita grubego a czasem obserwacji przedstawiono za pomocą wykresów skumulowanego hazardu Neslona-Aalena.

W drugiej części pracy dokonano przeglądu literatury na temat zależności między ADR endoskopisty a ryzykiem raka jelita grubego. Wszystkie znalezione badania zostały omówione, a ich wyniki zostały porównane między sobą.

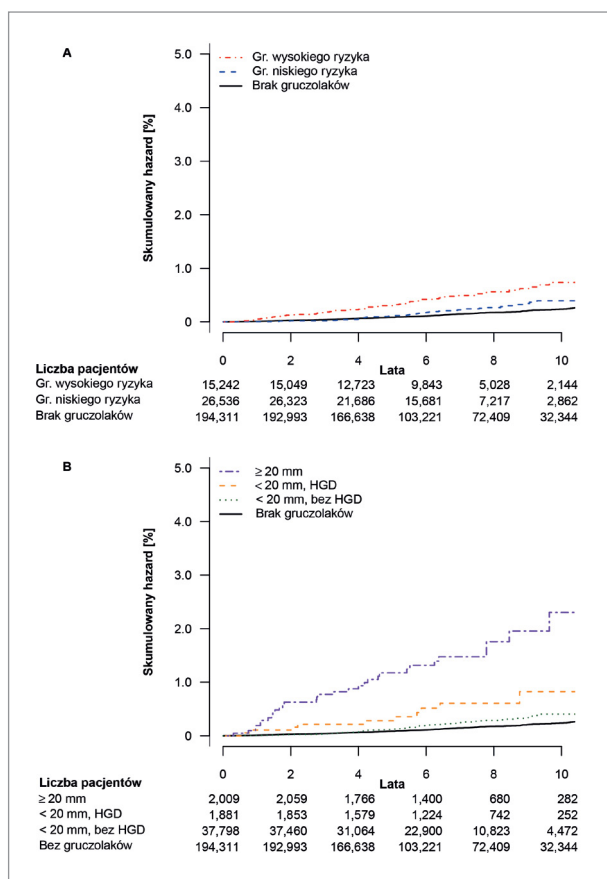
WYNIKI

Zależność między cechami gruczolaków a ryzykiem raka jelita grubego

Do analiz ryzyka wystąpienia raka jelita grubego po kolonoskopii przesiewowej włączono 236 089 pacjentów, gdzie u 41 778 (17,7%) wykryto co najmniej jednego gruczolaka. Zgodnie z obecnie obowiązującą definicją grup ryzyka, 26 536 (63,5%) pacjentów z gruczolakami zostało zakwalifikowanych do grupy niskiego ryzyka, zaś 15 242 (36,5%) do grupy wysokiego ryzyka. W czasie obserwacji (mediana 7 lat, maksimum 14 lat) wykryto 439 raków jelita grubego (0,19%, 26,3/100 000 pacjento-lat obserwacji).

Przeprowadzone analizy wykazały, że jedynie dwa czynniki w sposób istotny statystycznie wpływały na zwiększenie ryzyka jelita grubego, tj. średnica ≥ 20 mm (HR 9,25, 95% PU 6,39–13,39, względem pacjentów bez gruczolaków w kolonoskopii przesiewowej) i dysplazja dużego stopnia (HR 3,58, 95% PU 1,96–6,54). Co więcej, tylko te dwie grupy pacjentów cechowało ryzyko raka jelita grubego większe lub porównywalne z ryzykiem populacyjnym (odpowiednio SIR 2,07, 95% PU 1,40–2,93 oraz SIR 0,79, 95% PU 0,39–1,41).

Dla porównania, w grupie pacjentów niskiego ryzyka, wg obecnie obowiązującej definicji, ryzyko wystąpienia raka jelita grubego po kolonoskopii było 65% niższe niż ryzyko populacyjne (SIR 0,35, 95% PU 0,51–0,82), a w grupie pacjentów wysokiego ryzyka 35% niższe (SIR 0,65, 95% PU 0,51–0,82) niż ryzyko populacyjne. W grupie pacjentów bez gruczolaków w kolonoskopii przesiewowej ryzyko raka jelita grubego było ponad 70% niższe niż ryzyko populacyjne (SIR 0,27, 95% PU 0,24–0,30).



Ryc. 1. Skumulowany hazard wystąpienia raka jelita grubego.

Panel A. Obecnie obowiązująca definicja grup ryzyka, tj. grupa wysokiego ryzyka: ≥ 3 gruczolaki lub ≥ 1 gruczolak kosmkowy lub z dysplazją dużego stopnia lub ≥ 10 mm średnicy, grupa niskiego ryzyka: 1-2 gruczolaki cewkowe < 10 mm średnicy.

Panel B. Proponowany nowy podział na grupy ryzyka.

HGD – dysplazja dużego stopnia

Definiując grupę wysokiego ryzyka jako pacjentów z gruczolakami o średnicy ≥ 20 mm lub dysplazją dużego stopnia, a nie jako pacjentów z ≥ 3 gruczolakami lub gruczolakiem o średnicy ≥ 10 mm z dysplazją dużego stopnia lub komponentem kosmkowym (obecna definicja), można zredukować liczbę pacjentów wymagających intensywnego nadzoru o 74%, tj. z 15,242 (36,5% pacjentów z gruczolakami) do 3,980 (9,5% pacjentów z gruczolakami), nie zwiększając ryzyka raka po kolonoskopii u pacjentów z grupy niskiego ryzyka. Skumulowany hazard wystąpienia raka jelita grubego w obecnie obowiązujących i nowych grupach ryzyka można znaleźć na ryc. 1A i 1B.

Szczegółowe wyniki można znaleźć w pracy [6]: Wieszczy P. i wsp.: Colorectal Cancer Incidence and Mortality After Removal of Adenomas During Screening Colonoscopies. *Gastroenterology* 2019; 158(4): 875–883.e5.

Zależność między ADR endoskopisty a ryzykiem raka jelita grubego

W literaturze istnieją dwa badania pokazujące zależność między ADR endoskopisty a ryzykiem raka jelita grubego po kolonoskopii [2, 7] oraz jedno pokazujące analogiczną zależność w sigmoidoskopii [8]. Dwa z wymienionych badań dotyczą jedynie badań przesiewowych [2, 8], a jedno dotyczy zarówno badań przesiewowych, badań kontrolnych, jak i badań diagnostycznych [7].

W wymienionych badaniach wykazano istotny spadek ryzyka raka jelita grubego wśród pacjentów zbadanych przez endoskopistów z $ADR \geq 20\%$ w przypadku kolonoskopii przesiewowej oraz dystalnym $ADR \geq 7\%$ w przypadku sigmoidoskopii przesiewowej. Dodatkowo zaobserwowano również istotny spadek ryzyka zgonu z powodu raka jelita grubego dla $ADR \geq 28\%$.

Szczegółowe wyniki przeglądu literatury można znaleźć w pracy [9]: Wieszczy P. i wsp.: Adenoma detection rate and risk of colorectal cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2017; 31(4): 441–446.

WNIOSKI

Największe ryzyko raka jelita grubego wystąpiło u pacjentów z gruczolakami o średnicy ≥ 20 mm lub z dysplazją dużego stopnia. Ograniczając się tylko do tych cech, liczba pacjentów w grupie wysokiego ryzyka zmniejsza się o 74% bez wpływu na grupę niskiego ryzyka. Redefiniując grupy ryzyka, możliwe jest bardziej optymalne wykorzystanie środków przeznaczonych na badania kontrolne.

Istnieją trzy niezależne badania pokazujące, że wraz ze wzrostem ADR endoskopisty spada ryzyko zachorowania i zgonu z powodu raka jelita grubego.

PIŚMIENNICTWO

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A.: Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018; 68(6): 394–424.
2. Kaminski M.F., Regula J., Kraszewska E., Polkowski M., Wojciechowska U., Didkowska J. i wsp.: Quality indicators for colonoscopy and the risk of interval cancer. *N Engl J Med.* 2010; 362(19): 1795–803.
3. Rutter M.D., Beintaris I., Valori R., Chiu H.M., Corley D.A., Cuatrecasas M. i wsp.: World Endoscopy Organization Consensus Statements on Post-Colonoscopy and Post-Imaging Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 2018; 155(3): 909–925.e3.
4. Kaminski M.F., Thomas-Gibson S., Bugajski M., Bretthauer M., Rees C.J., Dekker E. et al.: Performance measures for lower gastrointestinal endoscopy: a European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Quality Improvement Initiative. *Endoscopy* 2017; 49(4): 378–97.
5. Winawer S.J., Zauber A.G., Fletcher R.H., Stillman J.S., O'Brien M.J., Levin B. i wsp.: Guidelines for colonoscopy surveillance after polypectomy: a consensus update by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer and the American Cancer Society. *Gastroenterology* 2006; 130(6): 1872–85.
6. Wieszczy P., Kaminski M.F., Franczyk R., Loberg M., Kobiela J., Rupinska M. i wsp.: Colorectal Cancer Incidence and Mortality After Removal of Adenomas During Screening Colonoscopies. *Gastroenterology* 2020; 158(4): 875–83.e5.
7. Corley D.A., Jensen C.D., Marks A.R., Zhao W.K., Lee J.K., Doubeni C.A. i wsp.: Adenoma detection rate and risk of colorectal cancer and death. *N Engl J Med.* 2014; 370(14): 1298–306.
8. Rogal S.S., Pinsky P.F., Schoen R.E.: Relationship between detection of adenomas by flexible sigmoidoscopy and interval distal colorectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2013; 11(1): 73–8.
9. Wieszczy P., Regula J., Kaminski M.F.: Adenoma detection rate and risk of colorectal cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2017; 31(4): 441–6.

Stopień realizacji protokołu opieki okołoperacyjnej ERAS (*Enhanced Recovery After Surgery*) a wyniki leczenia pacjentów operowanych z powodu raka jelita grubego

The impact of compliance with Enhanced Recovery After Surgery (ERAS) protocol on short and long-term outcomes in patients after laparoscopic colorectal cancer surgery

Magdalena
Pisarska-Adamczyk

II Katedra Chirurgii Ogólnej, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum,
Kraków, Polska

Finansowanie

Prezentowana praca doktorska otrzymała wsparcie finansowe w ramach stypendium naukowego przyznanego przez Naukową Fundację Polpharmy w 2019 roku.

Streszczenie

Chorych na raka jelita grubego poddaje się rozległym zabiegom resekcyjnym, co wiąże się z urazem dla organizmu, który jest proporcjonalny do rodzaju i wielkości przeprowadzanej interwencji. Dodatkowo u chorych onkologicznych w przebiegu choroby zasadniczej dochodzi do znacznego zmniejszenia rezerw organizmu. Wyznacznikiem urazu jest wzrost insulinooporności, która wpływa na opóźnienie rekonwalescencji i ryzyko powikłań pooperacyjnych. Stąd od kilku lat wprowadza się postępowanie zmierzające do zmniejszenia urazu związanego z przeprowadzanym zabiegiem – służy temu zastosowanie nowoczesnego kilkunastoelementowego protokołu opieki okołoperacyjnej. Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu stopnia realizacji protokołu ERAS na krótkoterminowe wyniki leczenia pacjentów operowanych z powodu raka jelita grubego, ocena możliwości utrzymania wysokiej realizacji przez kolejne lata od jego wprowadzenia, a także związek pomiędzy stopniem jego realizacji a odległymi wynikami onkologicznymi. Badaniem objęci zostali pacjenci operowani z powodu raka jelita grubego, u których opieka okołoperacyjna prowadzona była w oparciu o 16-elementowy protokół ERAS. Wykazano, że stosowanie protokołu ERAS poprawia krótkoterminowe wyniki leczenia pacjentów operowanych laparoskopowo z powodu gruczolakoraka jelita grubego: przyspiesza rekonwalescencję oraz zmniejsza zapotrzebowanie na leki opioidowe, redukuje odsetek powikłań pooperacyjnych i skraca czas trwania hospitalizacji. Wpływ protokołu ERAS na wyniki krótkoterminowe koreluje ze stopniem jego realizacji. Im wyższa jego realizacja, tym lepsze krótkoterminowe wyniki leczenia. Utrzymanie wysokiego stopnia realizacji protokołu przez dłuższy czas jest możliwe, mimo że z czasem dochodzi do jego niewielkiego obniżenia. Nie ma to jednak niekorzystnego wpływu na wyniki krótkoterminowe. Wydaje się, że stopień realizacji protokołu ERAS może również wpływać na wyniki długoterminowe. Niski stopień realizacji protokołu ERAS, obok wysokiego stopnia zaawansowania nowotworu oraz powikłań pooperacyjnych, jest niezależnym czynnikiem pogarszającym odległe wyniki leczenia onkologicznego.

Wpłynęło: 10-03-2021
Zaakceptowano: 06-06-2021
Opublikowano: 11-06-2021

DOI: 10.5604/01.3001.0014.9195

Adres do korespondencji
dr n. med. Magdalena Pisarska-Adamczyk, II Katedra Chirurgii Ogólnej, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków, ul. Świętej Anny 12, 31-008 Kraków, e-mail: magdalena.pisarska@uj.edu.pl

Słowa kluczowe: opieka okołoperacyjna, protokół ERAS, rak jelita grubego

Abstract

Patients undergoing surgery for colorectal cancer are a special group of patients. Not only performed resections are extensive, but also the underlying disease significantly depletes regenerative capacities of the body. It is well known that every surgical procedure is associated with an injury, the size of which is proportional to the type and extent of the intervention. The size of surgical trauma in postoperative period is proportional to the increase in insulin resistance which delays convalescence and increases the risk of postoperative complications. Hence, for several years, a specific program had been developed and introduced to reduce trauma associated with the surgery and its adverse consequences. The use of a modern multimodal care protocol for *Enhanced Recovery After Surgery* (ERAS) served this purpose. The aim of the study was to determine the impact of compliance to ERAS protocol on short-term results in a group of patients operated for colorectal cancer. In the next stage, it was checked whether it is possible to maintain high compliance of the protocol for a long time. Finally, I tried to determine the relationship between the compliance and distant oncological results. Consecutive patients with colon or rectal cancer undergoing laparoscopic resection were included in the study. In all patients the 16-item ERAS protocol was applied. The use of ERAS protocol improves short-term results: accelerates convalescence, reduces morbidity and reduces the length of hospital stay. However, its impact on short-term results correlates with the level of protocol implementation. The higher compliance with the protocol, the better the short-term results. Maintaining a high level of implementation of the protocol is possible despite the slight decrease over time. However, this has no adverse effect on short-term results. The compliance with ERAS protocol seems to also affect long-term results. Low compliance with ERAS protocol, along with the higher stage of cancer and postoperative complications, is an independent factor worsening long-term survival.

Keywords: colorectal cancer, ERAS protocol, perioperative care

WPROWADZENIE

Chorzy operowani z powodu raka jelita grubego stanowią szczególną grupę pacjentów. Na ogół poddawani są oni rozległym zabiegom resekcyjnym, a w przebiegu choroby zasadniczej dochodzi u nich do znacznego zmniejszenia rezerw organizmu. Powszechnie wiadomo, że każdy zabieg chirurgiczny wiąże się z urazem, którego wielkość jest proporcjonalna do rodzaju i rozległości przeprowadzanej interwencji. Wyznacznikiem wielkości urazu chirurgicznego w okresie pooperacyjnym jest wzrost insulinooporności, który jest zjawiskiem niekorzystnym, ponieważ opóźnia rekonwalescencję, a także zwiększa ryzyko powikłań pooperacyjnych [1, 2]. Ich wystąpienie negatywnie wpływa na odległe wyniki leczenia poprzez opóźnienie leczenia uzupełniającego [3–5]. Stąd od kilku lat wprowadza się

postępowanie zmierzające do zmniejszenia urazu okołoperacyjnego. Oprócz stosowania minimalnie inwazyjnych technik operacyjnych służy temu zastosowanie nowoczesnego wieloczynnikowego protokołu opieki okołoperacyjnej (*Enhanced Recovery After Surgery*, ERAS) [6]. Okazuje się, że zastosowanie kilkunastu istotnych elementów w okresie okołoperacyjnym działa synergistycznie, zmniejszając uraz wywołany zabiegiem operacyjnym, obniża insulinooporność, ogranicza czas katabolizmu organizmu związanego z zabiegiem, co w konsekwencji prowadzi do przyspieszenia rekonwalescencji [7–9].

Do najważniejszych elementów ERAS należą: odpowiednie przygotowanie do zabiegu (m.in. rezygnacja z palenia tytoniu i nadużywania alkoholu, wprowadzenie regularnego wysiłku fizycznego, poprawa stanu odżywienia), brak rutynowego przygotowania

Tab. I. Protokół ERAS stosowany w Klinice Chirurgii Endoskopowej, Metabolicznej oraz Nowotworów Tkanek Miękkich

1. Rozmowa i konsultacje przedoperacyjne (przygotowanie pacjenta do zabiegu: szczegółowe informacje odnośnie do zabiegu i opieki okołoperacyjnej, zalecenia odnośnie do rezygnacji z palenia papierosów i spożywania alkoholu, wprowadzenie regularnej aktywności fizycznej, zaangażowanie pacjenta w proces leczenia)
2. Podaż bogatego w węglowodany płynu 2 h przed operacją (pełna dieta w dniu poprzedzającym zabieg, rano 2 h przed zabiegiem 400 ml 12,5% bogatowęglowodanowego napoju Nutricia PreOp®)
3. Rezygnacja z rutynowego przygotowywania jelita przed zabiegiem (jelito przygotowywane przed niską przednią resekcją odbytnicy, planowanym wyłonieniem ileostomii odbarczającej)
4. Zastosowanie odpowiedniego rodzaju znieczulenia (brak premedykacji, krótko działające leki znieczulające, znieczulenie nasiękowe miejsc wkłucia trokarów, blokada mięśni brzucha – TAP block, w wybranych przypadkach znieczulenie zewnątrzoponowe – ZOP)
5. Małoinwazyjne techniki operacyjne
6. Profilaktyka antybiotykowa (doustna dzień przed zabiegiem oraz dożylna w dniu zabiegu)
7. Unikanie rutynowego pozostawiania zgłębników nosowo-żołądkowych
8. Unikanie rutynowego stosowania drenów (wyjątki: zabiegi w obrębie trzustki, niska przednia resekcja odbytnicy)
9. Profilaktyka pooperacyjnych nudności i wymiotów (stałe dawki leków w ciągu pierwszej doby po zabiegu, do wyboru ondansetron 8 mg, deksametazon 8 mg, metoklopramid 10 mg dożylnie)
10. Profilaktyka przeciwzakrzepowa (enoksaparyna 40 mg podskórnie od wieczoru poprzedzającego zabieg)
11. Pooperacyjna tlenoterapia bierna (4–6 l/min) w dobie zabiegu operacyjnego
12. Zbilansowana podaż płynów i sodu w okresie okołoperacyjnym (do 2500 ml płynów i 70 mmol sodu)
13. Usunięcie cewnika z pęcherza moczowego w pierwszej dobie pooperacyjnej
14. Leczenie przeciwbólowe (unikanie podaży opioidów, stałe leczenie przeciwbólowe przez 48 h po zabiegu, kontynuacja ZOP (jeśli był stosowany)
15. Wczesne uruchomienie (siadanie i wstawanie jeszcze w dobie zabiegu, spędzenie w kolejnych dobach co najmniej 6 h poza łóżkiem)
16. Wczesne włączenie doustnej diety w okresie pooperacyjnym (doustny suplement pokarmowy wieczorem w dobie zabiegu, wprowadzenie diety doustnej w pierwszej dobie pooperacyjnej)

jelita grubego, podanie bogatowęglowodanowego napoju 2 godziny przed zabiegiem, brak premedykacji, rezygnacja z rutynowo stosowanego zgłębnika nosowo-żołądkowego i drenów, wybór minimalnie inwazyjnych technik operacyjnych, modyfikacja pooperacyjnego leczenia bólu, profilaktyka pooperacyjnych nudności i wymiotów, zapobieganie hipotermii w trakcie i tuż po zabiegu, wczesne usuwanie cewnika z pęcherza moczowego, zbilansowana śródoperacyjna podaż płynów, wczesne uruchomienie i żywienie doustne, stałe monitorowanie realizacji protokołu.

W swoich początkowych założeniach protokół ERAS dedykowany był zabiegom kolorektalnym [10]. Od czasu jego wprowadzenia w latach 90. XX wieku przez duńskiego profesora chirurgii H. Kehleta wykazano jednak, że może być z powodzeniem stosowany nie tylko w chirurgii jelita grubego, lecz także u pacjentów poddanych zabiegom w obrębie innych narządów [11–13]. Udowodniono, że protokół ERAS w chirurgii kolorektalnej przyczynia się do zmniejszenia częstotliwości występowania powikłań pooperacyjnych nawet o 40% [14–16]. W głównej mierze odnosi się to do powikłań niechirurgicznych (np. zapaleń płuc, zakażeń układu moczowego) przy niezmiennym odsetku powikłań chirurgicznych (np. nieszczelności zespołów czy zakażeń miejsca operowanego). Wdrożenie protokołu ERAS znacząco przyspieszyło rekonwalescencję pacjentów, a tym samym skróciło czas trwania hospitalizacji średnio o 3–5 dni [8, 17–19]. Należy również wspomnieć, że jego wprowadzenie nie wiązało się z żadnymi niekorzystnymi skutkami dla pacjentów. Zarówno odsetek śmiertelności, jak i częstotliwość ponownych przyjęć do szpitala były porównywalne w stosunku do grupy pacjentów, których opieka okołoperacyjna opierała się na tradycyjnych założeniach [20]. Protokół ERAS składający się z kilkunastu elementów nie zawsze udaje się realizować w całości. Przedmiotem badań nadal pozostaje wpływ stopnia jego realizacji na wyniki krótkoterminowe, takie jak parametry rekonwalescencji, odsetek powikłań czy czas pobytu w szpitalu po zabiegu. Przyjęcie protokołu ERAS jako rutynowego schematu opieki okołoperacyjnej jest możliwe, choć niektórzy autorzy podają w wątpliwość, czy wysoki poziom jego realizacji jest osiągalny w dłuższej perspektywie. Wciąż jeszcze niewiele też wiadomo jak stopień realizacji protokołu wpływa na odległe wyniki leczenia onkologicznego [21].

METODOLOGIA

Badaniem objęci są kolejni pacjenci operowani z powodu raka jelita grubego w Klinice Chirurgii Endoskopowej, Metabolicznej oraz Nowotworów Tkanek Miękkich Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie,

u których operacja wykonana została w trybie planowym techniką laparoskopową. Z badania wyłączeni zostali pacjenci, u których wykonano resekcję wielonarządową oraz pacjenci, u których współistniała choroba zapalna przewodu pokarmowego. Brak możliwości realizacji protokołu ERAS po zabiegu, np. ze względu na pobyt pacjenta na oddziale intensywnej terapii bezpośrednio po zabiegu, również był kryterium wykluczającym. U każdego z pacjentów opieka okołoperacyjna prowadzona była w oparciu o 16-elementowy protokół ERAS.

PODSUMOWANIE

Wyniki przedstawione zostały w 3 niezależnych badaniach prospektywnych, które wykazały, że stosowanie protokołu ERAS poprawia krótkoterminowe wyniki leczenia pacjentów operowanych laparoskopowo z powodu gruczolakoraka jelita grubego. Jego stosowanie nie tylko przyspiesza rekonwalescencję chorych (tolerancję doustnej diety czy uruchomienie po zabiegu operacyjnym) i zmniejsza zapotrzebowanie na leki opioidowe, ale – co najważniejsze – redukuje odsetek powikłań pooperacyjnych, skracając przez to czas trwania hospitalizacji. Dodatkowo nie wiąże się to z większym ryzykiem ponownych przyjęć do szpitala. Wyniki te korelują ze stopniem realizacji protokołu – im wyższa jego realizacja, tym lepsze wyniki krótkoterminowe. W naszym materiale wykazano, że z czasem dochodzi do niewielkiego spadku realizacji protokołu, co nie wpływa jednak niekorzystnie na wyniki krótkoterminowe. Parametry rekonwalescencji, odsetek powikłań, czas pobytu w szpitalu i odsetek ponownych przyjęć na oddział jest porównywalny w ciągu całego analizowanego okresu kilku lat od jego wprowadzenia. Najważniejszym wynikiem jest jednak wpływ stopnia realizacji protokołu ERAS na wyniki długoterminowe. W naszym badaniu okazało się, że niski stopień realizacji protokołu ERAS, obok wysokiego stopnia zaawansowania nowotworu oraz obecności powikłań pooperacyjnych, jest niezależnym czynnikiem pogarszającym przeżycia odległe.

WYKAZ PUBLIKACJI

Poniżej zamieszczony zostaje wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską Magdaleny Pisarskiej-Adamczyk pt. „Stopień realizacji protokołu opieki okołoperacyjnej ERAS a wyniki leczenia pacjentów operowanych z powodu raka jelita grubego” (promotor: dr hab. n. med. Michał Pędziwiatr):

- Pisarska M., Pędziwiatr M., Małczak P., Major P., Ochendusko S., Zub-Pokrowiecka A., Kulawik J.,

Budzyński A.: Do we really need the full compliance with ERAS protocol in laparoscopic colorectal surgery? A prospective cohort study. *International Journal of Surgery* 2016; 36: 377–382.

- Pisarska M., Gajewska N., Małczak P., Wysocki M., Major P., Milian-Ciesielska K., Budzyński A., Pędziwiatr M.: Is it possible to maintain high compliance with the enhanced recovery after surgery (ERAS) protocol? – A cohort study of 400

consecutive colorectal cancer patients. *J Clin Med*. 2018; 7(11): 412.

- Pisarska M., Torbicz G., Gajewska N., Rubiniewicz M., Wierdak M., Major P., Budzyński A., Ljungqvist O., Pędziwiatr M.: Compliance with the ERAS protocol and 3-year survival after laparoscopic surgery for non-metastatic colorectal cancer. *World J Surg*. 2019; 43: 2552–2560.

PIŚMIENNICTWO

1. Ljungqvist O.: Insulin resistance and outcomes in surgery. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010; 95(9): 4217–9.
2. Ljungqvist O., Jonathan E.: Rhoads lecture 2011: Insulin resistance and enhanced recovery after surgery. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2012; 36(4): 389–98.
3. Merkow R.P., Bentrem D.J., Mulcahy M.F. i wsp.: Effect of postoperative complications on adjuvant chemotherapy use for stage III colon cancer. *Ann Surg* 2013; 258(6): 847–53.
4. Tevis S.E., Kohlnhofer B.M., Stringfield S. i wsp.: Postoperative complications in patients with rectal cancer are associated with delays in chemotherapy that lead to worse disease-free and overall survival. *Dis Colon Rectum* 2013; 56(12): 1339–48.
5. Artinyan A., Orcutt S.T., Anaya D.A., Richardson P., Chen G.J., Berger D.H.: Infectious postoperative complications decrease long-term survival in patients undergoing curative surgery for colorectal cancer: a study of 12,075 patients. *Ann Surg* 2015; 261(3): 497–505.
6. Veenhof A.A., Vlug M.S., van der Pas M.H.G.M. i wsp.: Surgical stress response and postoperative immune function after laparoscopy or open surgery with fast track or standard perioperative care: a randomized trial. *Ann Surg* 2012; 255(2): 216–21.
7. Ljungqvist O.: Randomized clinical trial to compare the effects of preoperative oral carbohydrate versus placebo on insulin resistance after colorectal surgery. *Br J Surg* 2010; 97(3): 327.
8. Hill A.G., Srinivasa S., Kehlet H.: The LAFA study. *Ann Surg* 2015; 261(1): e31.
9. Greco M., Capretti G., Beretta L., Gemma M., Pecorelli N., Braga M.: Enhanced recovery program in colorectal surgery: a meta-analysis of randomized controlled trials. *World J Surg* 2014; 38(6): 1531–41.
10. Nygren J., Thacker J., Carli F. i wsp.: Guidelines for perioperative care in elective rectal/pelvic surgery: Enhanced Recovery After Surgery (ERAS[®]) Society recommendations. *Clin Nutr* 2012; 31(6): 801–16.
11. Nelson G., Bakkum-Gamez J., Kalogera E. i wsp.: Guidelines for perioperative care in gynecologic/oncology: Enhanced Recovery After Surgery (ERAS) Society recommendations-2019 update. *Int J Gynecol Cancer* 2019; 29(4): 651–668.
12. Low D.E., Allum W., De Manzoni G. i wsp.: Guidelines for Perioperative Care in Esophagectomy: Enhanced Recovery After Surgery (ERAS[®]) Society Recommendations. *World J Surg* 2019; 43(2): 299–330.
13. Cerantola Y., Valerio M., Persson B. i wsp.: Guidelines for perioperative care after radical cystectomy for bladder cancer: Enhanced Recovery After Surgery (ERAS[®]) society recommendations. *Clin Nutr* 2013; 32(6): 879–87.
14. Brandstrup B., Tønnesen H., Beier-Holgersen R. i wsp.: Effects of intravenous fluid restriction on postoperative complications: comparison of two perioperative fluid regimens: a randomized assessor-blinded multicenter trial. *Ann Surg* 2003; 238(5): 641–8.
15. Spanjersberg W.R., Reurings J., Keus F., van Laarhoven C.J.: Fast track surgery versus conventional recovery strategies for colorectal surgery. *Cochrane Database Syst Rev* 2011(2): Cd007635.
16. Spanjersberg W.R., van Sambeek J.D.P., Bremers A., Rosman C., van Laarhoven C.J.H.M.: Systematic review and meta-analysis for laparoscopic versus open colon surgery with or without an ERAS programme. *Surg Endosc* 2015; 29(12): 3443–53.
17. Vlug M.S., Wind J., Hollmann M.W. i wsp.: Laparoscopy in combination with fast track multimodal management is the best perioperative strategy in patients undergoing colonic surgery: a randomized clinical trial (LAFA-study). *Ann Surg* 2011; 254(6): 868–75.
18. Group E.C.: Group, E.C., The Impact of Enhanced Recovery Protocol Compliance on Elective Colorectal Cancer Resection: Results From an International Registry. *Ann Surg* 2015; 261(6): 1153–9.
19. Kehlet H., Büchler M.W., Beart Jr R.W., Billingham R.P., Williamson R.: Care after colonic operation – is it evidence-based? Results from a multinational survey in Europe and the United States. *J Am Coll Surg* 2006; 202(1): 45–54.
20. Ni X., Jia D., Guo Y., Sun X., Suo J.: The efficacy and safety of enhanced recovery after surgery (ERAS) program in laparoscopic digestive system surgery: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Surg* 2019; 69: 108–115.
21. Gustafsson U.O., Oppelstrup H., Thorell A., Nygren J., Ljungqvist O.: Adherence to the ERAS protocol is Associated with 5-Year Survival After Colorectal Cancer Surgery: A Retrospective Cohort Study. *World J Surg* 2016; 40(7): 1741–7.

Multifunkcjonalny preparat sztucznej śliny – wyzwania i potrzeby

Multifunctional artificial saliva preparation – challenges and needs

Katarzyna Niemirowicz-
-Laskowska^{1,2},
Joanna Mystkowska³,
Dawid Łysik³, Sylwia
Chmielewska¹, Łukasz
Suprewicz¹, Karol
Skłodowski¹, Piotr
Deptuła¹, Jan Ryszard
Dąbrowski¹, Robert Bucki¹

¹Zakład Mikrobiologii Lekarskiej i Inżynierii Nanobiomedycznej,
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

²Zakład Farmakologii Doświadczalnej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

³Instytut Inżynierii Biomedycznej, Politechnika Białostocka

Naukowa Fundacja Polpharmy przyznała w 2016 roku zespołowi pracującemu pod kierunkiem pani dr n. med. Katarzyny Niemirowicz-Laskowskiej grant na realizację projektu badawczego pt.: „Opracowanie multifunkcjonalnego preparatu sztucznej śliny zawierającego antybakteryjne nanosystemy”, ogłoszonego w ramach konkursu na najlepsze projekty badawcze w dziedzinie nauk farmaceutycznych i medycznych.

Streszczenie

Ślina odgrywa kluczową rolę w zachowaniu homeostazy nie tylko w obrębie jamy ustnej, lecz także w dalszych odcinkach przewodu pokarmowego. Posiada ona właściwości pleiotropowe, które obejmują: udział w trawieniu węglowodanów, oczyszczaniu i nawilżaniu jamy ustnej oraz utrzymaniu właściwego składu mikrobiomu jamy ustnej. Skutkiem upośledzonej czynności gruczołu ślinowego jest zmniejszone wydzielanie śliny, tj. hiposaliwacja, prowadząca w konsekwencji do stanu suchości jamy ustnej – kserostomii. Wykazano, iż liczne czynniki fizjologiczne (wiek, płeć, zmiana masy ciała) i patologiczne (politerapia, nowotwory głowy i szyi, choroby współistniejące, takie jak: cukrzyca, depresja, choroby sercowo-naczyniowe) prowadzą do redukcji sekrecji śliny, powodując tym samym stan suchości jamy ustnej. Leczenie zaburzeń wydzielania śliny opiera się na terapii farmakologicznej (w tym hormonalnej) lub terapii zastępczej polegającej na stosowaniu substytutów śliny. Stosowanie sztucznej śliny w przypadku zaburzeń sekrecji śliny naturalnej ma za zadanie wspomagać procesy żucia, nawilżać jamę ustną oraz pełnić funkcje biologiczne śliny. Na chwilę obecną na rynku farmaceutycznym brakuje jednak substytutów śliny, spełniających wymogi biologiczne przy jednoczesnym zachowaniu korzystnych cech fizykochemicznych i parametrów reologicznych preparatu. Biorąc pod uwagę problemy, z jakimi borykają się pacjenci z zaburzoną sekrecją śliny, celem naszych badań było podjęcie próby opracowania preparatu sztucznej śliny odzwierciedlającego w jak największym stopniu właściwości śliny naturalnej, zarówno w aspekcie właściwości mechanicznych, jak i biologicznych. W ramach przeprowadzonych badań opracowano skład chemiczny oraz przeprowadzono szczegółowe badania parametrów fizykochemicznych i reologicznych preparatów sztucznej śliny, zawierających mucyny oraz oceniono ich właściwości mikrobiologiczne i biokompatybilności *in vitro* na liniach wybranych komórek fizjologicznych.

Słowa kluczowe: artificial śliny, hiposaliwacja, kserostomia, ślina

Wpłynęło: 23-02-2021

Zaakceptowano: 06-06-2011

Opublikowano: 11-06-2021

DOI: 10.5604/01.3001.0014.9199

Adres do korespondencji

dr hab. Katarzyna Niemirowicz-
-Laskowska, Zakład Mikrobiologii
Lekarskiej i Inżynierii
Nanobiomedycznej,
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku,
ul. Szpitalna 37, 15-251 Białystok,
tel: +48 85 7485554, e-mail: katarzyna.
niemirowicz@umb.edu.pl;

Abstract

Saliva plays a crucial role in maintaining homeostasis not only within the oral cavity but also in further sections of the gastrointestinal tract. Pleiotropic properties of saliva include participation in the digestion of carbohydrates, cleansing and moisturizing the oral cavity, and maintaining the composition of the oral microbiome. The result of impaired function of the salivary gland is reduced salivation – hyposalivation, leading to dry mouth – xerostomia. It is established that numerous physiological factors (age, sex, weight change) and pathological factors (polytherapy, head and neck cancer, coexisting diseases such as diabetes, depression, cardiovascular diseases) lead to the reduction in saliva secretion, and in effect, causing a dry mouth. Treatment of salivary secretion disorders involves pharmacological therapy (including hormone therapy) or replacement therapy which based on the use of saliva substitutes. In the case of disturbances in the secretion of natural saliva, the application of the artificial saliva preparations should support the chewing processes, moisturize the oral cavity, and fulfill the biological functions of saliva. However, to date, on the pharmaceutical market, there are no saliva substitutes that meet the biological criteria and maintaining favorable physicochemical properties and rheological parameters. Taking into account the problems of the patients which are burden by impaired salivary secretion, the aim of our research was to attempt to develop an artificial saliva preparation that reflecting as much as possible the properties of natural saliva, both in terms of mechanical and biological properties. As part of the research, the chemical composition was developed and a detailed study of the physicochemical and rheological parameters of artificial saliva preparations containing mucins as well as their microbiological and biocompatibility assessment, at in vitro level were carried out.

Keywords: artificial saliva, hyposalivation, saliva, xerostomy

WSTĘP

Ślina stanowi płynny składnik środowiska jamy ustnej. W jej wydzielaniu i produkcji uczestniczą trzy pary gruczołów ślinowych: ślinianki przyuszne, podżuchwowe i podjęzykowe. U osób zdrowych dzienna sekrecja śliny wynosi około 1,0–1,5 litra, co w przeliczeniu na 1 minutę daje wynik 0,25–0,35 mL śliny. Wydzielanie śliny jest regulowane poprzez autonomiczny układ nerwowy. Najważniejszym składnikiem śliny jest woda, stanowi ona od 94–99,5% masy śliny. Pozostała część to składniki organiczne i nieorganiczne. Głównym składnikiem organicznym są białka z grupy glikoprotein, głównie mucyny, które współtworzą strukturę powlekającą powierzchnie błony śluzowej i uzębienia. Do składników nieorganicznych śliny należą kationy, m.in.: wapnia, sodu, magnezu, potasu, miedzi, żelaza oraz aniony, m.in.: fosforanów, węglanów, fluoru, jodu i chloru [1].

Ślina pełni wiele funkcji istotnych dla zachowania prawidłowej homeostazy nie tylko w obrębie jamy ustnej, lecz także w dalszych odcinkach przewodu pokarmowego. Wydzielanie śliny zapewnia przede

wszystkim prawidłową przemianę i wchłanianie produktów pokarmowych, głównie ze względu na zawarte w ślinie amylazy, uczestniczące w procesie trawienia węglowodanów. Jej rola obejmuje również kontrolę procesu samooczyszczania jamy ustnej poprzez wypłukiwanie resztek pokarmowych i regenerację komórek nabłonka błony śluzowej jamy ustnej, przełyku i żołądka. Ślina odgrywa też ważną rolę w artykulacji. Obecność śliny zapobiega przed wysychaniem i zapewnia stałe nawilżenie śluzówki, umożliwia płynne ruchy języka, warg i innych części jamy ustnej, biorących udział w czynności mowy. Ponadto stanowi ona również pierwszą linię obrony przed adhezją i inwazją drobnoustrojów chorobotwórczych, co uwarunkowane jest występowaniem substancji posiadających aktywność przeciwdrobnoustrojową (lizozymu, peroksydazy, laktoferyny, interferonu, kalprotektyny czy pochodzącego z katelicydyny peptydu LL-37) [2]. Ślina bierze również udział w procesie buforowania substancji, a tym samym tworzeniu zrównoważonego biocenotycznie środowiska mikroorganizmów oraz utrzymywaniu odpowiedniego dla saprofitującej mikroflory pH. Brak zdolności

buforowej śliny może przyczynić się do zwiększenia podatności na próchnicę i zaburzenia w składzie mikrobiomu jamy ustnej [3, 4].

Skutkiem upośledzonej czynności gruczołu ślinowego jest zmniejszone wydzielanie śliny, tj. hiposaliwacja, prowadząca w konsekwencji do stanu suchości jamy ustnej – kserostomii [5]. Redukcja sekrecji tego płynu może być spowodowana zarówno przez czynniki fizjologiczne (podeszły wiek, płeć, zmniejszona liczba zębów, zmiana masy ciała), jak i patologiczne (chemioterapia, radioterapia, długotrwałe leczenie farmakologiczne, politerapia oraz nowotwory głowy i szyi, choroby współistniejące, takie jak: cukrzyca, depresja, choroby sercowo-naczyniowe) [6–9]. Powyższe czynniki skłaniają do stwierdzenia, iż problem suchości jamy ustnej dotyczy dużej grupy osób i stale rośnie.

Brak śliny powoduje uszkodzenie zarówno tkanek twardych, co objawia się próchnicą, jak i miękkich, co z kolei skutkuje zakażeniem błony śluzowej i występowaniem owrzodzeń błony śluzowej jamy ustnej. U pacjentów z kserostomią błona śluzowa jamy ustnej jest cienka, biała, pobrużdżona, bez połysku oraz staje się sucha. Ślina z kolei staje się gęsta i spieniona. Język staje się wygładzony, niekiedy pomarszczony, zanikają brodawki. Ponadto jego błona śluzowa ma pobrużdżoną powierzchnię, staje się sucha i napięta. Zaburzone zostaje wówczas działanie przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze i przeciwwirusowe śliny, oczyszczanie i spłukiwanie jamy ustnej oraz poślizg pokarmów na błonie śluzowej, buforowanie silniejszych kwasów i procesy remineralizacji twardych tkanek zęba.

Leczenie zaburzeń sekrecji śliny opiera się na terapii farmakologicznej (w tym hormonalnej) lub terapii zastępczej polegającej na stosowaniu substytutów śliny [10, 11]. Dostępne środki charakteryzują się znacznymi różnicami pod względem składu i właściwości. W większości z nich odnotowano brak zawartości mikroelementów oraz odczyn poniżej pH krytycznego, co sprzyja procesom demineralizacji zębów. Ponadto preparaty te cechują się krótkotrwałym czasem działania, co wymusza ich częste stosowanie, uciążliwe dla wielu pacjentów. Posiadają one także nieodpowiednie właściwości organoleptyczne. Z kolei z ekonomicznego punktu widzenia produkcja preparatów poza granicami naszego kraju sprawia, iż są to preparaty dość kosztowne i dlatego pacjenci zamiast ich używania częściej preferują zwilżanie jamy ustnej wodą, co niestety jest mało skuteczne.

Stosowanie sztucznej śliny w przypadku zaburzeń wydzielania śliny naturalnej ma za zadanie wspomagać

procesy żucia, nawilżać jamę ustną oraz pełnić funkcje biologiczne śliny. Brakuje jednak substytutów śliny spełniających wymogi biologiczne przy jednoczesnym zachowaniu korzystnych cech fizykochemicznych i parametrów reologicznych preparatu [12].

CEL PRACY

W ramach projektu pt.: „Opracowanie multifunkcjonalnego preparatu sztucznej śliny zawierającego antybakteryjne nanosystemy”, finansowanego przez Naukową Fundację Polpharmy, mieliśmy możliwość opracowania składu chemicznego oraz przeprowadzenia szczegółowych badań fizykochemicznych, reologicznych, mikrobiologicznych oraz oceny biokompatybilności *in vitro* na liniach wybranych komórek preparatów sztucznej śliny, zawierających mucyny. Biorąc pod uwagę problemy, z jakimi borykają się pacjenci z zaburzoną sekrecją śliny, celem naszych badań było podjęcie próby opracowania preparatu sztucznej śliny odzwierciedlającego w jak największym stopniu właściwości śliny naturalnej, zarówno w aspekcie właściwości mechanicznych, jak i biologicznych.

MATERIAŁ I METODY

Skład preparatów

W pracy przeprowadzono ocenę właściwości: fizykochemicznych, reologicznych, mikrobiologicznych oraz cytotoksycznych dwóch preparatów śliny, przygotowanych na bazie: mucyny pochodzenia zwierzęcego, gumy ksantanowej, ksylitolu, laktoferyny, lizozymu, fluorku sodu, cząstek magnetycznych z powłoką aminosilanową MNP@NH₂ oraz peptydu IG19. Kompozycje roztworów zostały wybrane na podstawie analizy literatury i wcześniejszych badań własnych.

W pracy przetestowano dwa preparaty śliny:

1. Preparat 1: PBS + 1% mucyna + 0,4% gumaksantanowa + 2% ksylitol + 30 µg/mL lizozym + 30 µg/mL laktoferyna + 20 µg/mL MNP@NH₂ + 1 µg/mL NaF + 50 µg/mL IG19.
2. Preparat 2: PBS + 1% mucyna + 0,4% gumaksantanowa + 2% ksylitol + 60 µg/mL lizozym + 60 µg/mL laktoferyna + 20 µg/mL MNP@NH₂ + 1 µg/mL NaF + 50 µg/mL IG19.

Kompozycje własnych preparatów sztucznej śliny opracowano na bazie biokompatybilnych składników o właściwościach zbliżonych do naturalnych

składników śliny. Preparaty przygotowano na bazie buforowanego roztworu soli fizjologicznej (*phosphate-buffered saline*, PBS) z dodatkiem składników modyfikujących właściwości fizykochemiczne i mikrobiologiczne. Obecność mucyny i gumy ksantanowej ma na celu kształtowanie przede wszystkim właściwości reologicznych i tribologicznych przygotowanych preparatów sztucznej śliny. Wszystkie składniki mieszano w czasie 30 minut w temperaturze pokojowej w celu otrzymania jednorodnej konsystencji roztworu. Przygotowane preparaty śliny przechowywano w temperaturze 4°C pomiędzy poszczególnymi badaniami, nie dłużej niż 3 dni.

Właściwości fizykochemiczne

Badania pH, przewodności elektrolitycznej i potencjału *redox* przeprowadzono za pomocą odpowiednich elektrod pomiarowych współpracujących z multifunkcyjnym jonokonduktometrem Seven-Multi (Mettler Toledo, Szwajcaria). Ocenę pH dokonano przy wykorzystaniu elektrody Clarytrode 120. Pomiaru konduktywności dokonano za pomocą celki konduktometrycznej InLab740 firmy Mettler Toledo z wbudowaną sondą do pomiaru temperatury testowanego roztworu. Badania napięcia powierzchniowego przeprowadzono za pomocą tensjometru STA1 (Sinterface, Niemcy) z wykorzystaniem pierścienia platynowego. Zmiany masy rejestrowano za pomocą wagi, której dokładność pomiaru wynosiła 0,001 g. Wszystkie pomiary właściwości fizykochemicznych substytutów śliny wykonano z powtórzeniami w temperaturze 21°C ± 0,1. Przebadano po 6 próbek w poszczególnych cyklach badawczych. Przedstawione wyniki analizy są wartością średnią (n = 6).

Właściwości reologiczne

Badania reologiczne przeprowadzono z wykorzystaniem reometru RheoStress 6000 (Haake). Pomiar lepkości dynamicznej (η) w funkcji prędkości ścinania ($\dot{\gamma}$) wykonano z zastosowaniem układu pomiarowego typu stożek – płytka, w układzie automatycznej kontroli temperatury (system Peltiera). Górny rotor pomiarowy (stożek) obracał się w sposób rotacyjny. Testy prowadzono w zakresie prędkości ścinania $\dot{\gamma} = 5\text{--}200\text{ s}^{-1}$, co odpowiada warunkom ścinania śliny podczas mówienia ($\dot{\gamma} \sim 60\text{ s}^{-1}$) i żucia pokarmów ($\dot{\gamma} \sim 160\text{ s}^{-1}$). Do badań wykorzystano każdorazowo po 1 ml testowanej cieczy. Przeprowadzono po sześć pomiarów dla każdego rodzaju roztworu. Badania lepkości sprężystości (pomiar modułów: sprężystości – G' i lepkości – G'') wykonano z zastosowaniem układu pomiarowego typu płytka-płytka, w którym zastosowano oscylacyjny ruch górnej płytki pomiarowej.

Badania reologiczne przeprowadzono w temperaturze 21°C ± 0,1. Wyniki zarejestrowano za pomocą sprzężonego z reometrem oprogramowania komputerowego RheoWin.

Ocena właściwości mikrobiologicznych

Szczepy

Badania przeprowadzono na szczepach wzorcowych *Candida albicans* (Nr 1408; Polska Kolekcja Mikroorganizmów) oraz *Streptococcus mutans* (ATCC 35668). Grzyby hodowano na agarze Saboraud z 4% dekstrozą w 37°C przez 48 godzin. *Streptococcus mutans* hodowano na agarze Columbia z 5% krwią baranią w 37°C przez 24 godziny.

Ocena hamowania wzrostu biofilmu

Badania aktywności preparatów wobec biofilmu przeprowadzono na 96-dółkowych płytkach polistyrenowych o płaskim dnie z użyciem resazury jako znacznika żywotności komórek.

W tym celu przygotowano zawiesiny komórek bakterii (OD 600 = 0,1) i grzybów (OD 600 = 0,5) w bulionie LB, które następnie rozpipetowano w objętości 100 μL do poszczególnych dołków. Do tak przygotowanych płytek dodano preparaty sztucznej śliny w stosunku 1:10, 1:4 i 1:2 do medium hodowlanego, które następnie inkubowano przez 24 i 48 godzin w temperaturze 37°C. Po tym czasie płytki przepłukano trzykrotnie przy użyciu PBS-u celem usunięcia wolnopływających, niezwiązanych z biofilmem komórek. Następnie dodano 20 μL roztworu resazury o stężeniu 4 mg/mL i inkubowano przez godzinę w 37°C. Po tym czasie dokonano odczytu fluorescencji przy długości fali 520/590 nm (Varioskan Lux, Thermo Scientific, USA). Próbkę kontrolną, bez dodatku preparatów sztucznej śliny, przyjęto jako 100%.

Ocena biokompatybilności

Linie komórkowe

Komórki fibroblastów NIH/3T3 (ATCC CRL-1658) hodowano w pożywce DMEM uzupełnionej o 10% surowicę CBS z dodatkiem 100 KU/L penicyliny i 100 mg/L streptomycyny w 37°C w atmosferze 5% CO₂ [13].

Monocyty/Makrofagi THP-1 (ATCC TIB-202) hodowano w pożywce RPMI 1640 uzupełnionej o 10% inaktywowaną termicznie surowicę FBS z dodatkiem 1% penicyliny/streptomycyny i 2-merkaptotoetanol w 37°C w atmosferze 5% CO₂ [14].

Cytotoksyczność

Aktywność metaboliczną komórek fibroblastów w obecności badanych substytutów sztucznej śliny oceniono za pomocą testu MTT [15]. Po 24-godzinnej inkubacji komórek z badanymi preparatami komórki przemyto i inkubowano z 0,5 mg/mL soli MTT przez 3–4 godziny w 37°C w 5% CO₂. W celu rozpuszczenia wytrąconego formazanu zastosowano DMSO. Różnice w aktywności metabolicznej, odzwierciedlającej żywotność komórek, mierzono przez pomiar absorbancji przy długości fali 540 nm.

Komórki THP-1 o konfluencji 2 x 10⁵ komórek/mL wysiano na płytkach 96-dołkowych. Po 24 godzinach inkubacji komórki traktowano badanymi preparatami sztucznej śliny w stosunku 1:10, 1:4 i 1:2 do medium hodowlanego, które następnie inkubowano przez następne 24 godziny. Aby ocenić żywotność i funkcję metaboliczną traktowanych komórek, do każdego dołka dodano 10 µL roztworu resazury. Po 2 godzinach inkubacji supernatant z każdego dołka analizowano spektrofotometrycznie przy długości fali 570 nm.

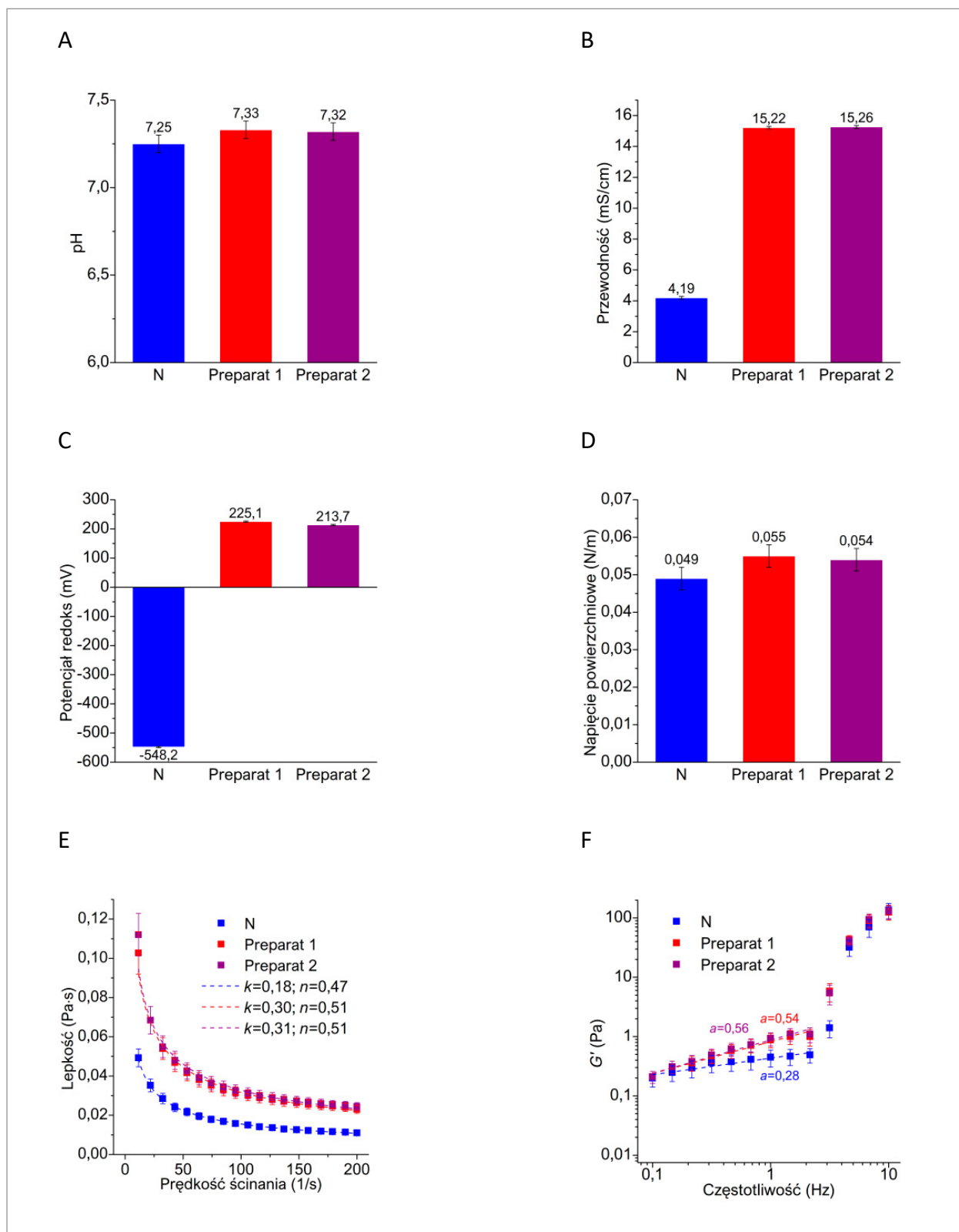
WYNIKI I OMÓWIENIE

Ze względu na ważną rolę śliny w utrzymaniu stanu homeostazy w organizmie, łagodzenie objawów hiposaliwacji jest ważnym, ale trudnym problemem medycznym. W sytuacjach, w których produkcja śliny jest zakłócona i nie można jej stymulować, stosuje się jej sztuczne substytuty. Preparaty te powinny w jak najwyższym stopniu odwzorowywać właściwości śliny naturalnej [5]. W związku z powyższym, idealny preparat winien być: biokompatybilny z komórkami gospodarza, zapewniać ochronę przed kolonizacją oraz inwazją drobnoustrojów chorobotwórczych, nawilżać powierzchnię jamy ustnej i pełnić funkcje smarne [6]. Na podstawie analizy stanu wiedzy w dziedzinie handlowych substytutów śliny [5, 7] można stwierdzić, że nie ma preparatów spełniających wymagania biologiczne, a jednocześnie posiadających odpowiednie właściwości fizykochemiczne, reologiczne i smarne. W niniejszym badaniu przetestowano własne preparaty śliny na bazie mucyny pochodzenia zwierzęcego. Skład chemiczny wybrano na podstawie danych literaturowych i wyników wcześniejszych badań własnych. Wykorzystano do badań mucynę pochodzenia zwierzęcego jest glikoproteiną o dużej masie cząsteczkowej (0,5–20 MDa). Składa się z ugrupowań węglowodanowych i łańcuchów oligosacharydowych. Pozostałe 20% cząsteczki mucyny stanowi białkowy rdzeń o masie cząsteczkowej ok. 200–500 kDa. W cząsteczce mucyny

występują ugrupowania hydrofilowe i hydrofobowe, a jej struktura jest stabilizowana wiązaniami wodorowymi, mostkami disulfidowymi (dzięki obecności cząsteczek cysteiny) oraz oddziaływaniami elektrostatycznymi. Daje to możliwość występowania wysokiego powinowactwa do tworzenia agregatów z innymi związkami. Rozbudowana struktura mucyny nadaje jej także właściwości ochronne, co w połączeniu z właściwościami reologicznymi predestynuje ją do stosowania w preparatach farmakologicznych. Roztwory na jej bazie wykazują właściwości pseudoplastycznych cieczy nieniu-tonowskich. Z kolei guma ksantanowa jest naturalnym polisacharydem o właściwościach anionu, otrzymywanym w procesie bakteryjnej fermentacji węglowodanów. Jej cząsteczki składają się z: glukozy, mannozy, kwasu glukuronowego i częściowo zestryfikowanych kwasów octowego i pirogronowego. Roztwory ksantanu pozostają stabilne w szerokim zakresie pH (2–12), a jego cząsteczki są odporne na degradację pod działaniem enzymów, temperatury czy obecności soli. Guma ksantanowa, dzięki swoim specyficznym właściwościom reologicznym, stosowana jest jako zagęstnik, stabilizator lub substancja żelująca już przy niewielkich jej stężeniach. Jej roztwory w aspekcie reologicznym wykazują właściwości płynu nieniu-tonowskiego o wysokiej pseudoplastyczności. Jako naturalny składnik jest stosowana w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym [16]. Do związków posiadających aktywność przeciwdrobnoustrojową należą: lizozym, laktoferyna, peptyd IG-19 oraz nanocząstki magnetyczne, spełniające jednocześnie funkcję nośnika. Należy tu podkreślić, że wymienione czynniki przeciwdrobnoustrojowe mogą oddziaływać ze sobą synergistycznie [17, 18].

Biorąc pod uwagę praktyczne aspekty stosowania preparatów na bazie mucyny, prace skoncentrowano na szczegółowej ocenie właściwości fizykochemicznych (pH, przewodność elektrolityczna, napięcie powierzchniowe, kąt zwilżania, potencjał *redox*, stężenie jonów fluorkowych) i reologicznych (lepkość, lepkość sprężystość) opracowanych preparatów śliny.

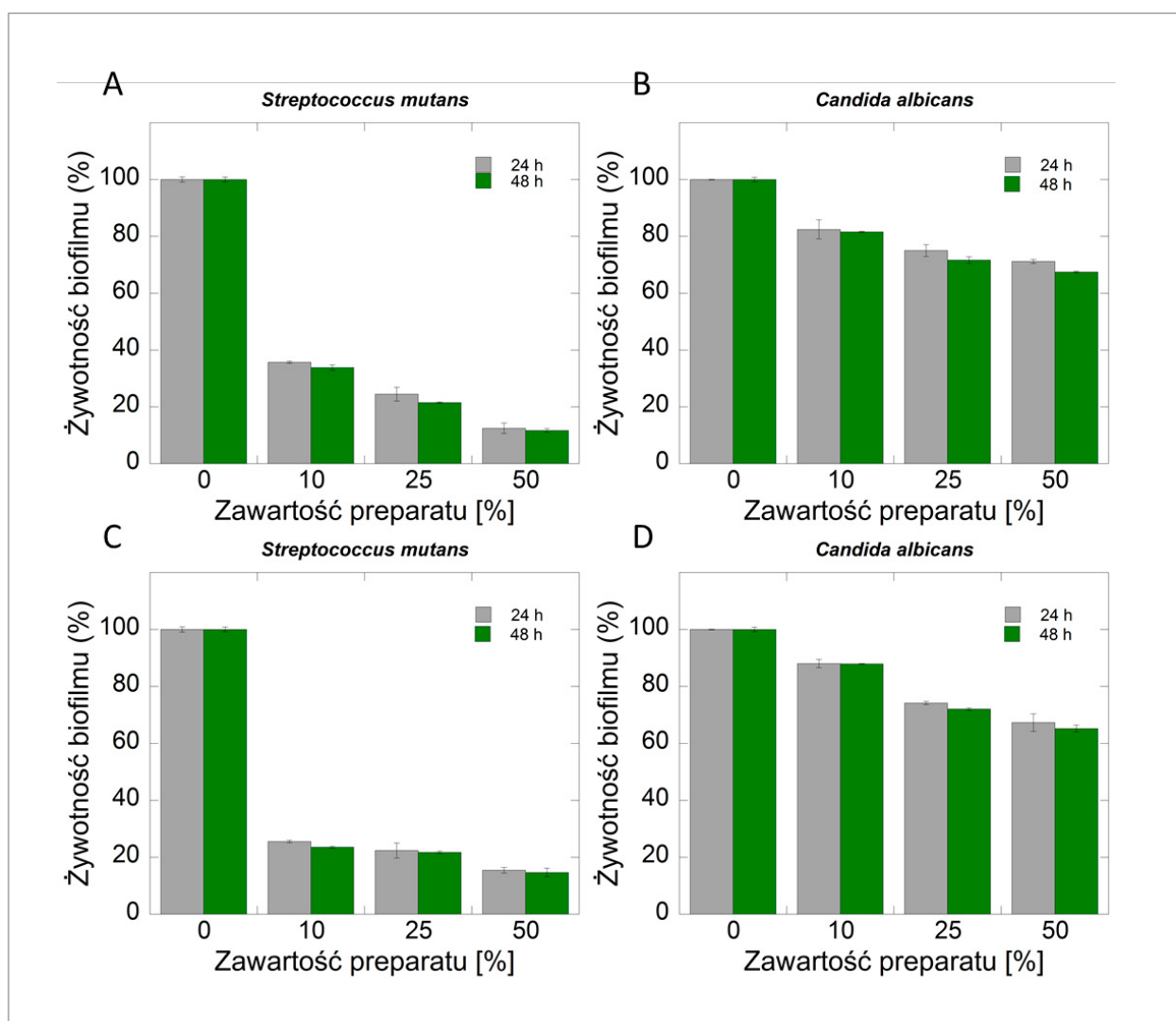
Wyniki pomiarów pH opracowanych preparatów (odpowiednio dla 1 i 2 preparatu: pH = 7,33 i pH = 7,32) pokazały, że są one zbliżone do wartości pH dla śliny naturalnej (pH = 7,25) (ryc. 1 A). Jest to niezwykle istotne, gdyż właściwy poziom pH zapobiega procesom demineralizacji zębów oraz korozji elementów metalowych używanych w zastosowaniach dentystycznych. Pomiar przewodnictwa elektrolitycznego wykazały, że przewodność wynosiła odpowiednio 15,22 mS/cm dla 1 preparatu i 15,26 mS/cm dla drugiego preparatu (ryc. 1 B). Odnotowane wartości przewodnictwa preparatów



Ryc. 1. Właściwości fizykochemiczne oraz reologiczne preparatów śliny w odniesieniu do śliny naturalnej: (A) pH, (B) przewodność elektrolityczna, (C) potencjał redox, (D) napięcie powierzchniowe, (E) lepkość, (F) sprężystość.

determinują ich zwiększoną aktywność jonową, wpływając tym samym pozytywnie na przenikanie jonów fluorkowych ze śliny do zębów. W rezultacie u pacjentów ze zdiagnozowaną próchnicą będzie można zaobserwować tak zwany efekt remineralizujący.

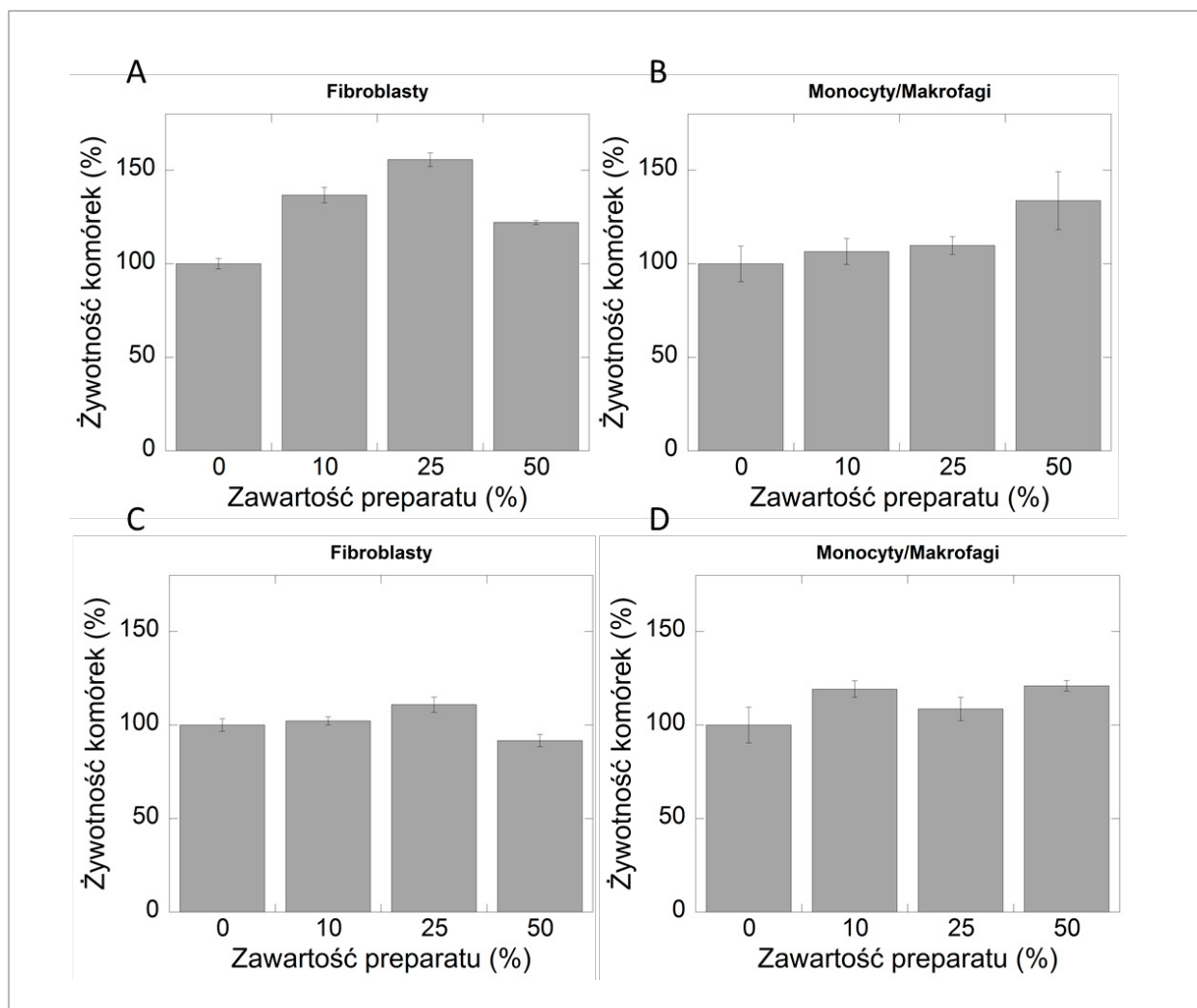
Wartości napięcia powierzchniowego przygotowanych substytutów śliny klasyfikowały się na poziomie 55 mN/m i 54 mN/m w przypadku pierwszego i drugiego preparatu (ryc. 1 D). Odpowiednia wartość napięcia wpływa na zwilżalność preparatów,



Ryc. 2. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa preparatów sztucznej śliny. Hamowanie aktywności metabolicznej i żywotności komórek *S. mutans* (A, C) oraz komórek *C. albicans* w dojrzałym biofilmie po 24 i 48 godzinach inkubacji w obecności preparatu 1 (A, B) i preparatu 2 (C, D).

a w przypadku śliny naturalnej na proces interakcji z błonami śluzowymi. Powyższe może mieć pozytywny wpływ na procesy tarcia, szczególnie w przypadku szkliva zębów, wypełnień dentystycznych i połączeń kinematycznych protez i aparatów ortodontycznych, które to z kolei są często używane przez pacjentów z zdiagnozowaną kserostomią. Potencjał *redox* oznacza miarę zdolności roztworu do przyjmowania i oddawania elektronów. Przeprowadzona ocena potencjału *redox* (ryc. 1 C) wykazała, że wartości były zbliżone dla obu testowanych preparatów i wynosiły odpowiednio 225,1 mV (1 preparat) i 213,7 mV (2 preparat). Niezwykle istotnym parametrem są właściwości reologiczne otrzymanych preparatów, które to zdeterminowane są obecnością mucyn (ryc. 1 E, F). Związki te zawierają w swojej strukturze mostki disiarczkowe między poszczególnymi oligomerami oraz wiązania wewnątrzcząsteczkowe między łańcuchami węglowodanów. Ze względu na wyżej wymienione właściwości reologiczne i rozległą strukturę, cząsteczki mucyny są odpowiedzialne za

utworzenie struktury lepkosprężystego żelu, zapewniając tym samym odpowiednią konsystencję płynom biologicznym, w których występują, w tym proponowanych preparatów sztucznej śliny. Analiza właściwości reologicznych poszczególnych preparatów, przeprowadzona w układzie stożek-płytką w zakresie prędkości ścinania 0,1–200 1/s, pokazuje, że lepkość wszystkich roztworów mucyny mieści się w zakresie 25–115 mPas. Istotnym jest fakt, iż preparaty na bazie mucyny, gumy ksantanowej i ksylitolu z dodatkiem składników determinujących właściwości przeciwbakteryjne, immunomodulujące oraz protekcyjne, tj.: lizozymu (w stężeniu 30 i 60 µg/ml), laktoferyny (w stężeniu 30 i 60 µg/ml), peptydu IG-19 (w stężeniu 50 µg/ml) oraz fluorku sodu NaF (w stężeniu 1 µg/ml) wykazują wyższe wartości lepkości od śliny naturalnej (dla której zaobserwowano lepkość w zakresie 5–50 mPas w zależności od prędkości ścinania). W badaniach wykazano, iż oba preparaty to ciecze pseudoplastyczne, które przy prędkości ścinania ~60 1/s wykazują lepkość około 40–45



Ryc. 3. Biokompatybilność preparatów sztucznej śliny. Aktywność metaboliczna i żywotności fibroblastów (A, C) oraz monocytów/makrofagów po 24 godzinach inkubacji w obecności preparatu 1 (A, B) i preparatu 2 (C, D).

mPas, a przy ~ 160 1/s ok. 20–25 mPas. Obserwowane zmiany lepkości dla wszystkich badanych preparatów wynikają z tworzenia wiązań między łańcuchami mucyny, np. słabe wiązania wodorowe lub częściowe splątanie łańcuchów. Podobne zależności zaobserwowano dla wyników pomiaru modułu sprężystego. W zakresie częstotliwości 0,1–10 Hz, moduł G' wynosił odpowiednio na poziomie 0,2–1 Pa dla opracowanych preparatów śliny oraz 0,2–0,4 Pa dla śliny naturalnej.

W przeprowadzonych badaniach mikrobiologicznych preparatów sztucznej śliny oceniono wpływ analizowanych substytutów na bazie mucyny na formowanie i żywotność biofilmu drobnoustrojów chorobotwórczych (*S. mutans* i *Candida sp.*) odpowiedzialnych za procesy próchniczne, formowanie płytki nazębnej oraz stany zapalne jamy ustnej [4, 19–23]. Przeprowadzone analizy potwierdziły, iż preparaty na bazie mucyny wzbogacone o dodatkowe substancje o właściwościach

przeciwdrobnoustrojowych i immunomodulujących posiadają silne właściwości hamujące rozwój i żywotność biofilmu bakteryjnego oraz grzybiczego po 24 i 48 h (ryc. 2 A–D). W przypadku biofilmu bakteryjnego zahamowanie aktywności metabolicznej komórek odnotowano na poziomie 65–85%. Z kolei w wyniku inkubacji komórek *Candida sp.* w obecności badanych preparatów wykazano, iż żywotność komórek została obniżona o 20–45% w stosunku do komórek nietraktowanych. Istotny jest fakt, że przy najmniejszym analizowanym stężeniu substytutu znacznie większą aktywność stwierdzono w przypadku preparatu 2 zawierającego wyższe stężenia lizozymu oraz laktoferyny. Wykazanie wyżej wymienionych właściwości protekcyjnych jest niezwykle istotne z klinicznego punktu widzenia, gdyż pacjenci z kserostomią bardzo często cierpią z powodu zaburzeń w składzie mikrobioty jamy ustnej [4]. Drobnoustroje występujące pierwotnie w niewielkiej liczbie, poprzez zwiększenie swojego udziału, stają się chorobotwórcze,

powodując w ten sposób zachwianie równowagi w składzie mikrobiomu. Prowadzi to do rozregulowania mikrośrodowiska i powstania tak zwanego stanu dysbiozy, który to z kolei może odgrywać znaczącą rolę w indukcji zmian patologicznych w obrębie jamy ustnej jak i chorobach ogólnoustrojowych oraz autoimmunologicznych [24].

W kolejnym kroku oceniono wpływ preparatów na żywotność komórek fizjologicznych fibroblastów. Fibroblasty to komórki mezenchymalne, które pełnią wiele ważnych funkcji przez cały okres egzystencji. Odpowiadają one za procesy syntezy macierzy zewnątrzkomórkowej w tkance łącznej i odgrywają kluczową rolę w regeneracji oraz gojeniu się ran [25]. Ich rola w jamie ustnej obejmuje zdolność do szybkiej naprawy mikrourazów powstałych w jej obrębie [26]. Badania wykazały, iż otrzymane substytuty są kompatybilne z przedstawicielami komórek macierzy zewnątrzkomórkowej (ryc. 3 A, C).

Biozgodność preparatów potwierdzono także w stosunku do reprezentantów komórek układu immunologicznego – monocytów/makrofagów. Wykazano, iż badane substytuty nie zaburzają procesów ich proliferacji i nie wpływają na aktywność metaboliczną. Biozgodność preparatów potwierdzono także w stosunku do reprezentantów komórek układu immunologicznego – monocytów/makrofagów. Wykazano, że badane substytuty nie zaburzają procesów ich proliferacji i nie wpływają na aktywność metaboliczną (ryc. 3 B, D).

PODSUMOWANIE

Podsumowując, opracowane w ramach projektu preparaty posiadają właściwości pleiotropowe. Powyższe elementy mogą mieć istotne znaczenie w odwzorowaniu właściwości śliny naturalnej oraz wpłynąć na:

1. Poprawę jakości leczenia i komfortu życia pacjentów – główna korzyść;
2. Zmniejszenie częstotliwości występowania zakażeń, przewlekłych stanów zapalnych jamy ustnej oraz przewlekłych kandydoz, dzięki zastosowaniu innowacyjnych składników preparatu;
3. Zapobieganie mikrourazom, mikrootarciom i przenikaniu drobnoustrojów w głąb śluzówki dzięki właściwościom przeciwadhezyjnym, regenerującym i immunomodulującym preparatu;
4. Zapobieganie problemom z mową i przełykaniem poprzez dobre nawilżenie śluzówki.

Połączenie wyżej wymienionych funkcji jest unikalne dla skomponowanego preparatu, przybliżając tym samym możliwość jego przyszłej komercjalizacji.

PODZIĘKOWANIA

Prof. Halinie Car i dr hab. Przemysławowi Wielgato-
wi za udostępnienie linii komórek THP-1.

PIŚMIENNICTWO

1. Lima D.P., Diniz D.G., Moimaz S.A.S., Sumida D.H., Okamoto A.C.: Saliva: reflection of the body. *Int J Infect Dis* 2010; 14(3): e184–8.
2. Schipper R.G., Silletti E., Vingerhoeds M.H.: Saliva as research material: biochemical, physicochemical and practical aspects. *Arch Oral Biol*. 2007; 52(12): 1114–35.
3. Amerongen A.V., Veerman E.C.: Saliva – the defender of the oral cavity. *Oral Dis*. 2002; 8(1): 12–22.
4. Guobis Ž., Kareivienė V., Basevičienė N.: Microflora of the oral cavity in patients with xerostomia. *Medicina (Kaunas)* 2011; 47(12): 646–51.
5. Tanasiewicz M., Hildebrandt T., Obersztyn I.: Xerostomia of Various Etiologies: A Review of the Literature. *Adv Clin Exp Med*. 2016; 25(1): 199–206.
6. Saleh J., Zancanaro Figueiredo M.A., Cherubini K., Gonçalves Salum F.: Salivary hypofunction: an update on aetiology, diagnosis and therapeutics. *Arch Oral Biol*. 2015; 60(2): 242–55.
7. Kałużny J., Wierzbicka M., Nogala H., Milecki P., Kopec T.: Radiotherapy induced xerostomia: Mechanisms, diagnostics, prevention and treatment – Evidence based up to 2013. *Otolaryngol Pol*. 2014; 68(1): 1–14.
8. Shetty, S.R., Bhowmick S., Castolino R., Babu S.: Drug induced xerostomia in elderly individuals: An institutional study. *Contemp Clin Dent* 2012; 3(2): 173–5.
9. Khovidhunkit S.O., Suwantuntula T., Thaweboon S. i wsp.: Xerostomia, hyposalivation, and oral microbiota in type 2 diabetic patients: a preliminary study. *J Med Assoc Thai*. 2009; 92(9): 1220–8.
10. Gómez-Moreno, G., Guardia J., Aguilar-Salvatierra A. i wsp.: Effectiveness of malic acid 1% in patients with xerostomia induced by antihypertensive drugs. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2013; 18(1): e49–e55.
11. Hahnel, S., Behr M., Handel G., Bürgers R.: Saliva substitutes for the treatment of radiation-induced xerostomia – a review. *Support Care Cancer* 2009; 17(11): 1331–43.
12. Łysik, D., Niemirowicz-Laskowska K., Bucki R., Tokajuk G., Mystkowska J.: Artificial Saliva: Challenges and Future Perspectives for the Treatment of Xerostomia. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(13): 3199.

13. Liu C.H., Hu Y.-Y., Wang X.-L., Liu P., Xu L.-M.: Effects of salvianolic acid-A on NIH/3T3 fibroblast proliferation, collagen synthesis and gene expression. *World J Gastroenterol.* 2000; 6(3): 361–364.
14. Sonmez M., Georgescu M., Alexandrescu L., Gurau D., Fica A., Fica D., Andronescu E.: Synthesis and applications of Fe₃O₄/SiO₂ core-shell materials. *Curr Pharm Des* 2015; 21(37): 5324–35.
15. Piktel E., Prokop I., Wnorowska U. i wsp.: Ceragenin CSA-13 as free molecules and attached to magnetic nanoparticle surfaces induce caspase-dependent apoptosis in human breast cancer cells via disruption of cell oxidative balance. *Oncotarget* 2018; 9(31): 21904–21920.
16. Mystkowska J.: Procesy korozji i zużycia tribologicznego wybranych biomateriałów metalowych w środowisku śliny i jej substytutów. Oficyna Wydawnicza Politechniki Białostockiej 2018.
17. Jammal J., Zaknoon F., Kaneti G., Hershkovits A.S., Mor A.: Sensitization of Gram-Negative Bacilli to Host Antibacterial Proteins. *J Infect Dis.* 2017; 215(10): 1599–1607.
18. van der Linden D.S., Short D., Dittmann A., Yu P.-L.: Synergistic effects of ovine-derived cathelicidins and other antimicrobials against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* 1056 MRSA. *Biotechnol Lett.* 2009; 31(8): 1265–7.
19. Marsh P.D.: Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. *Dent Clin North Am* 2010; 54(3): 441–54.
20. Nomura R., Hamada M., Nakano K., Nemoto H., Fujimoto K., Ooshima T.: Repeated bacteraemia caused by *Streptococcus mutans* in a patient with Sjogren's syndrome. *J Med Microbiol.* 2007; 56(Pt 7): 988–92.
21. Baker J.L., Bor B., Agnello M., Shi W., He X.: Ecology of the Oral Microbiome: Beyond Bacteria. *Trends Microbiol.* 2017; 25(5): 362–374.
22. Millsop J.W., Fazel N.: Oral candidiasis. *Clin Dermatol* 2016; 34(4): 487–94.
23. O'Donnell L.E., Millhouse E., Sherry L., Kean R., Malcolm J., Nile C.J., Ramage G.: Polymicrobial *Candida* biofilms: friends and foe in the oral cavity. *FEMS Yeast Res* 2015; 15(7): fov077.
24. Rusthen S., Kristoffersen A.K., Young A. i wsp.: Dysbiotic salivary microbiota in dry mouth and primary Sjögren's syndrome patients. *PLoS One* 2019; 14(6): e0218319.
25. Lynch M.D., Watt F.M.: Fibroblast heterogeneity: implications for human disease. *J Clin Invest.* 2018; 128(1): 26–35.
26. Chiquet M., Katsaros C., Kletsas D.: Multiple functions of gingival and mucoperiosteal fibroblasts in oral wound healing and repair. *Periodontol 2000.* 2015; 68(1): 21–40.

Strategie poprawiające profil bezpieczeństwa terapii CAR-T

Strategies to improve the safety profile of CAR-T therapy

Agnieszka
Graczyk-Jarzynka

Zakład Immunologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Finansowanie

Praca powstała dzięki grantowi Naukowej Fundacji Polpharmy 5FPOL8 pt. „Opracowanie platformy chimericznych receptorów antygenowych pod kontrolą indukowalnych systemów ekspresyjnych, aktywowanych w środowisku nowotworu” przyznanemu zespołowi pod kierunkiem dr Agnieszki Graczyk-Jarzynki.

Streszczenie

Jednym z największych przełomów ostatnich lat w dziedzinie immunoterapii jest zastosowanie technologii chimericznych receptorów antygenowych (CAR). Receptory CAR umożliwiają ukierunkowanie ataku komórek efektorowych układu odpornościowego, takich jak limfocyty T lub komórki NK na praktycznie dowolną cząsteczkę występującą na powierzchni komórki nowotworowej. Wyjątkowa skuteczność receptorów CAR została udowodniona w przypadku cząsteczki CD19 znajdującej się na nowotworach, wywodzących się z limfocytów B. Jednak jak dotąd skuteczność terapii CAR-T, nakierunkowanej na inne antygeny, jest mniej zadowalająca, a dodatkowo często związana jest z szeregiem działań niepożądanych. Wynikają one głównie z uproszczenia sposobu aktywacji komórek efektorowych, a najpoważniejszym z nich jest rozpoznanie antygeny na komórkach prawidłowych (efekt *on-target*, *off-tumor*). Wiele prowadzonych obecnie badań ma na celu zwiększenie profilu bezpieczeństwa terapii wykorzystujących komórki efektorowe, zmodyfikowane receptorem CAR. Częściowo można ten profil poprawić poprzez optymalizację budowy samego receptora CAR albo wykorzystanie przejściowej transfekcji do modyfikacji komórek efektorowych. Bardziej złożonym rozwiązaniem jest uzyskanie zdalnej kontroli nad limfocytami CAR-T w organizmie chorego. W tym podejściu stosuje się różnego rodzaju systemy ograniczające funkcjonalność komórek CAR-T u chorego, takie jak geny samobójcze, regulację na poziomie transkrypcyjnym i białkowym oraz zastosowanie różnego typu adapterów do aktywacji komórek CAR-T. Najbardziej zaawansowanym systemem jest zastosowanie bramek logicznych, które umożliwiają komórkom CAR-T rozpoznanie i „zrozumienie” sygnałów płynących ze środowiska oraz nadają pewien stopień autonomii w aktywacji ich potencjału cytotoksycznego. W niniejszym opracowaniu przedstawiono najważniejsze strategie, mające na celu poprawienie profilu bezpieczeństwa stosowania terapii CAR-T.

Słowa kluczowe: bezpieczeństwo terapii, CAR-T, chimericzny receptor antygenowy, kontrola aktywacji

Wpłynęło: 25-02-2021

Zaakceptowano: 06-06-2021

Opublikowano: 11-06-2021

DOI: 10.5604/01.3001.0014.9200

Adres do korespondencji

Agnieszka Graczyk-Jarzynka, Zakład Immunologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Nielubowicza 5, 02-097 Warszawa, e-mail: agnieszka.graczyk-jarzynka@wum.edu.pl

Abstract

The chimeric antigen receptor (CAR) technology has become one of the greatest breakthroughs in immunotherapy in recent years. CARs facilitate the attack of immune effector cells such as T cells or NK cells being directed at virtually any molecule presented on the surface of a cancer cell. The exceptional efficacy of CAR receptors has been demonstrated for the CD19 molecule found on B cell-derived tumors. However, the efficacy of CAR-T therapy targeting other antigens is less satisfactory while being quite frequently associated with a number of adverse effects. The adverse effects are mainly due to the effector cells being activated in a simplified manner; the most serious effect consists in the antigen being detected on healthy cells ("the on-target, off-tumor" effect). A number of ongoing studies aim at enhancing the safety profile of therapies making use of CAR-modified effector cells. In part, this can be achieved by optimizing the structure of the CAR receptor itself or by using transient transfection to modify the effector cells. A more complex solution consists in obtaining remote control over CAR-T lymphocytes within the patient's body. This approach makes use of different types of systems that limit the functionality of CAR-T cells in the patient, such as suicide genes, regulation at the transcriptional and protein levels, different types of adapters being used to activate the CAR-T cells. The most advanced system consists in the use of logic gates which make it possible for CAR-T cells to recognize and "understand" incoming signals from the environment, allowing for a certain degree of autonomy in the activation of the cells' cytotoxic potential. This study presents key strategies to improve the safety profiles of CAR-T therapies.

Keywords: activation control, CAR-T, chimeric antigen receptor, treatment safety

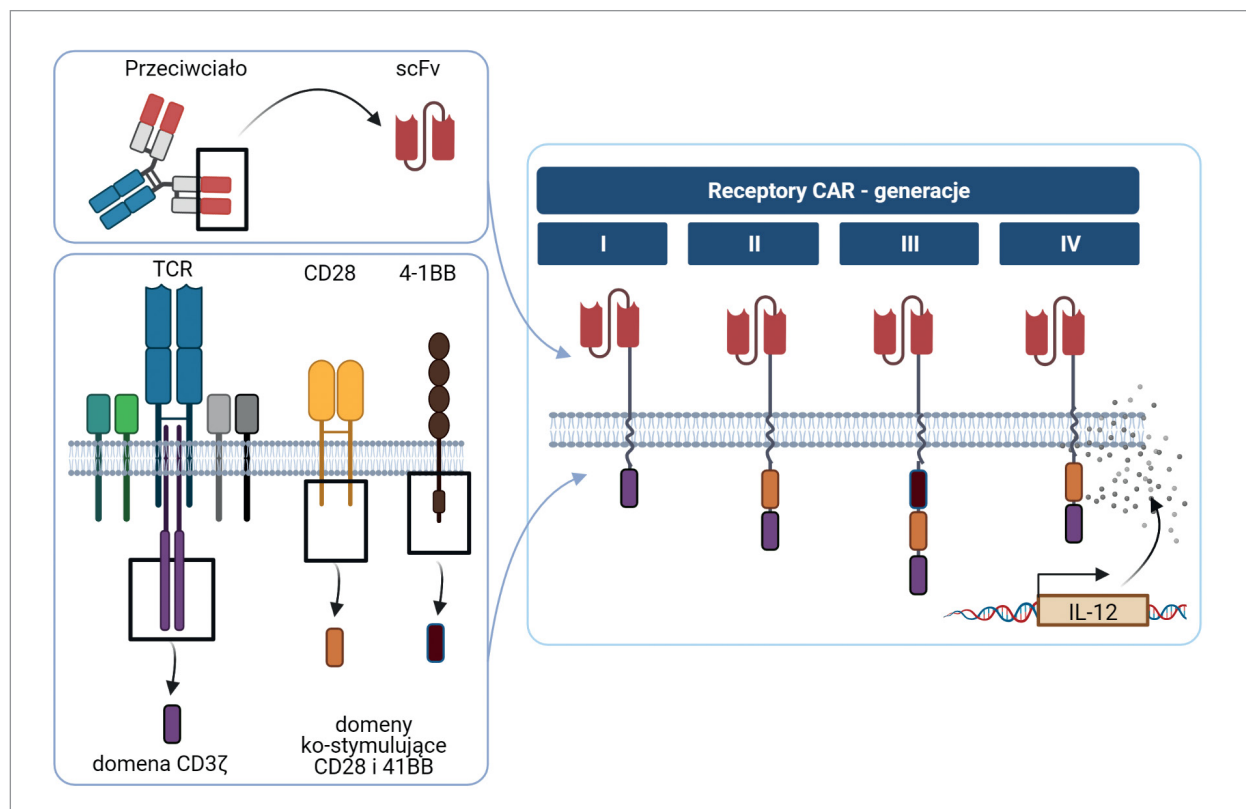
WSTĘP

Immunoterapia adoptywna nowotworów cieszy się w ostatnich latach rosnącym zainteresowaniem. Polega ona na pobraniu od chorych komórek cytotoksycznych (limfocytów T lub komórek NK), które następnie w warunkach laboratoryjnych są poddawane aktywacji i modyfikacjom, mającym na celu wzmocnienie ich działania cytotoksycznego względem komórek nowotworowych. W końcowym etapie zmodyfikowane komórki układu odpornościowego są z powrotem podawane chorym, od których zostały wyizolowane.

Prawdziwym przełomem w dziedzinie terapii adoptywnych stało się opracowanie technologii chimericznych receptorów antygenowych – w skrócie CAR (*chimeric antigen receptor*) oraz wykorzystanie ich do modyfikacji genetycznej limfocytów T lub komórek NK. Receptor CAR jest cząsteczką o budowie modułowej, zbudowaną z zewnątrzkomórkowej domeny wiążącej antygen pochodzącej z części zmiennych przeciwciała, części zawiasowej (*hinge*) oraz z wewnątrzkomórkowej domeny aktywującej, pochodzącej z kompleksu receptora limfocyty

T (*T cell receptor*, TCR) [1]. Domeną rozpoznającą antygen nowotworowy jest zazwyczaj jednołańcuchowy fragment zmienny przeciwciała (*single-chain variable fragment*, scFv). Wewnątrzkomórkowe domeny przekazujące sygnał pochodzą od cząsteczek sygnałowych obecnych na limfocytach T i w zależności od ich liczby i typu wyróżnia się kolejne generacje CAR. W cząsteczkach CAR I generacji przekazywanie sygnału odbywa się jedynie poprzez fragment łańcucha CD3ζ. W II generacji, oprócz łańcucha CD3ζ, znajduje się dodatkowa domena ko-stymulująca, taka jak: CD28, OX40, 4-1BB, CD27 lub DAP10. III generacja receptorów CAR zbudowana jest natomiast, oprócz łańcucha CD3ζ, z dwóch w/w domen w różnych kombinacjach. Konstrukty kodujące receptory CAR IV generacji wyposażają modyfikowane komórki w możliwość produkcji różnego rodzaju cytokin, zwiększając tym samym ich potencjał cytotoksyczny [2]. Schemat budowy różnych generacji receptorów CAR przedstawiono na ryc. 1.

Największą zaletą receptorów CAR jest unikatowy mechanizm rozpoznawania antygenów na komórkach nowotworowych. W przeciwieństwie do fizjologicznego receptora limfocytów T, który rozpoznaje



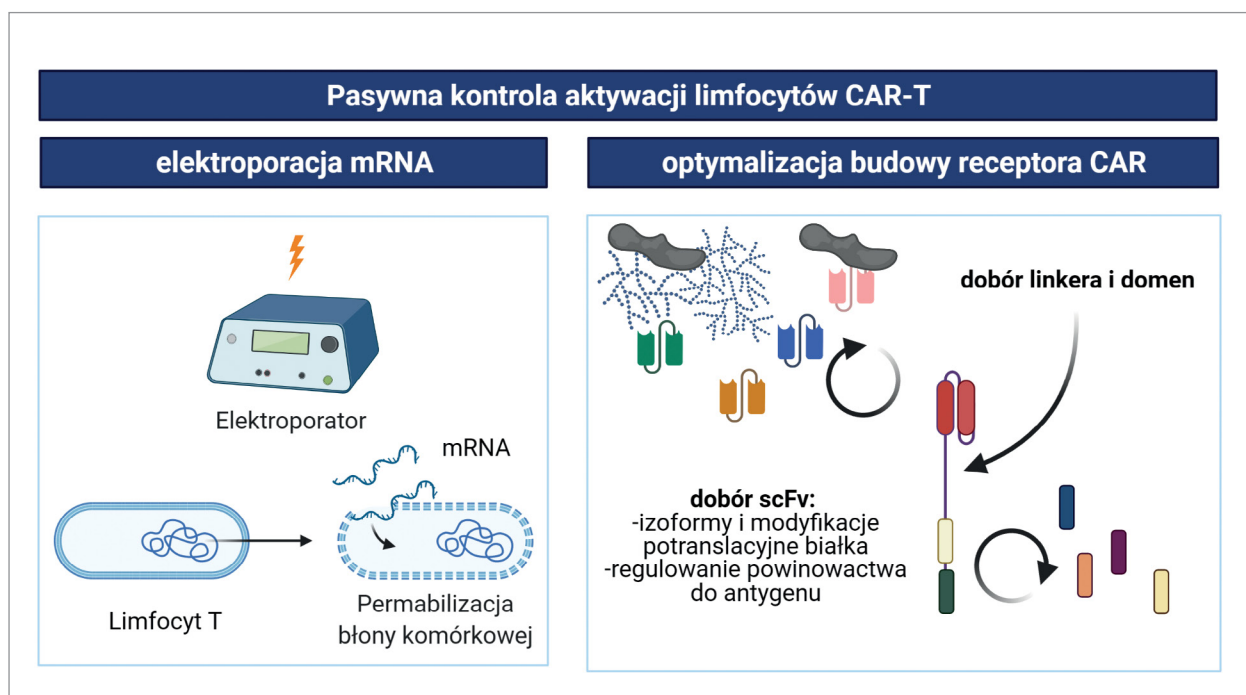
Ryc. 1. Schemat budowy receptorów CAR różnych generacji.

antygen peptydowy w kompleksie z białkiem MHC, receptor CAR wiąże się bezpośrednio z antygenami na powierzchni komórek nowotworowych. Efektem tej reakcji jest indukcja cytotoksyczności limfocytów, prowadząca do zabicia komórki nowotworowej bez konieczności prezentowania peptydów pochodzących z antygenów nowotworowych w kontekście cząsteczek MHC.

Jak dotąd najbardziej spektakularne sukcesy immunoterapii uzyskano z zastosowaniem limfocytów CAR rozpoznających cząsteczkę CD19. W badaniach klinicznych testujących skuteczność CAR anty-CD19 u pacjentów z zaawansowaną ostrą białaczką limfoblastyczną, wywodzącą się z komórek B (*B-cell acute lymphoblastic leukemia*, B-ALL), uzyskano współczynnik całkowitej remisji choroby pomiędzy 70 a 90% [3, 4]. Dotychczas amerykańska Agencja Żywności i Leków (*Food and Drug Administration*, FDA) zarejestrowała kilka terapii komórkowych, wykorzystujących limfocyty T zmodyfikowane cząsteczkami CAR, skierowanymi przeciwko antygenowi CD19. Trzeba mieć jednak na uwadze, że ogromny sukces tej immunoterapii związany jest z faktem, że obecność cząsteczki CD19 ograniczona jest do limfocytów B i nowotworów wywodzących się z tych komórek (chłoniaki i białaczki), a nie znajduje się na powierzchni innych komórek ani tkanek. Niedawno rejestrację uzyskała również terapia

przeznaczona dla chorych z nawrotowym lub opornym na leczenie szpiczakiem mnogim, skierowana przeciwko antygenowi BCMA, charakterystycznym dla dojrzałych limfocytów B. Wobec powyższego, wybranie odpowiedniego antygeny do terapii CAR-T jest kluczowym krokiem do wyselekcjonowania efektywnej, a jednocześnie bezpiecznej terapii nowotworów. W przypadku guzów litych takich antygenów jest stosunkowo niewiele, dlatego ukierunkowanie rozpoznania komórek nowotworowych przez limfocyty CAR-T jest dużo trudniejsze. Istotną rolę w hamowaniu limfocytów CAR-T względem guzów litych pełni też mikrośrodowisko nowotworu, które w dużej mierze może hamować aktywność cytotoksyczną tych komórek.

Należy podkreślić, że terapia z wykorzystaniem komórek efektorowych, zmodyfikowanych receptorami CAR, nie jest wolna od działań niepożądanych, często wymuszających zaprzestanie stosowania tej terapii. Wyjątkowa skuteczność immunoterapii za pomocą CAR sprawia, że terapia ta działa niczym miecz obosieczny. Najczęściej spotykanymi powikłaniami są: potencjalnie śmiertelny, prowadzący do niewydolności wielonarządowej, ciężki zespół uwalniania cytokin (związany z nadmierną aktywacją komórek efektorowych), powikłania ze strony układu nerwowego (prawdopodobnie również związane z nadmiernym wydzielaniem cytokin), a także



Ryc. 2. Pasywna kontrola aktywacji limfocytów CAR-T może być uzyskana przez przejściową transfekcję przy użyciu elektroporacji mRNA receptora CAR lub dzięki optymalizacji budowy receptora CAR.

niespecyficzność działania receptorów CAR, związana z rozpoznawaniem antygenu znajdującego się nie tylko na powierzchni komórek nowotworowych, lecz także w obrębie tkanek prawidłowych [5].

Obecnie największym wyzwaniem jest nie tylko odpowiednie ukierunkowanie limfocytów CAR-T, ale również kontrola ich aktywacji. W niniejszym opracowaniu omówione zostaną najważniejsze strategie rozwijane w celu uzyskania większej precyzji i bezpieczeństwa w stosowaniu terapii CAR-T nie tylko w leczeniu nowotworów hematologicznych, lecz także w terapii guzów litych.

PASYWNA KONTROLA AKTYWACJI LIMFOCYTÓW CAR-T

Metody pasywnej kontroli mają za zadanie ograniczyć niespecyficzną aktywację limfocytów CAR-T, ale nie umożliwiają żadnej kontroli nad tymi komórkami po podaniu ich do organizmu chorego. Najczęściej stosowanymi rozwiązaniami jest przejściowa modyfikacja limfocytów przy użyciu elektroporacji mRNA oraz optymalizacja budowy samego receptora CAR w celu bardziej precyzyjnego nakierowania go na wykrywany antygen, co przedstawia ryc. 2.

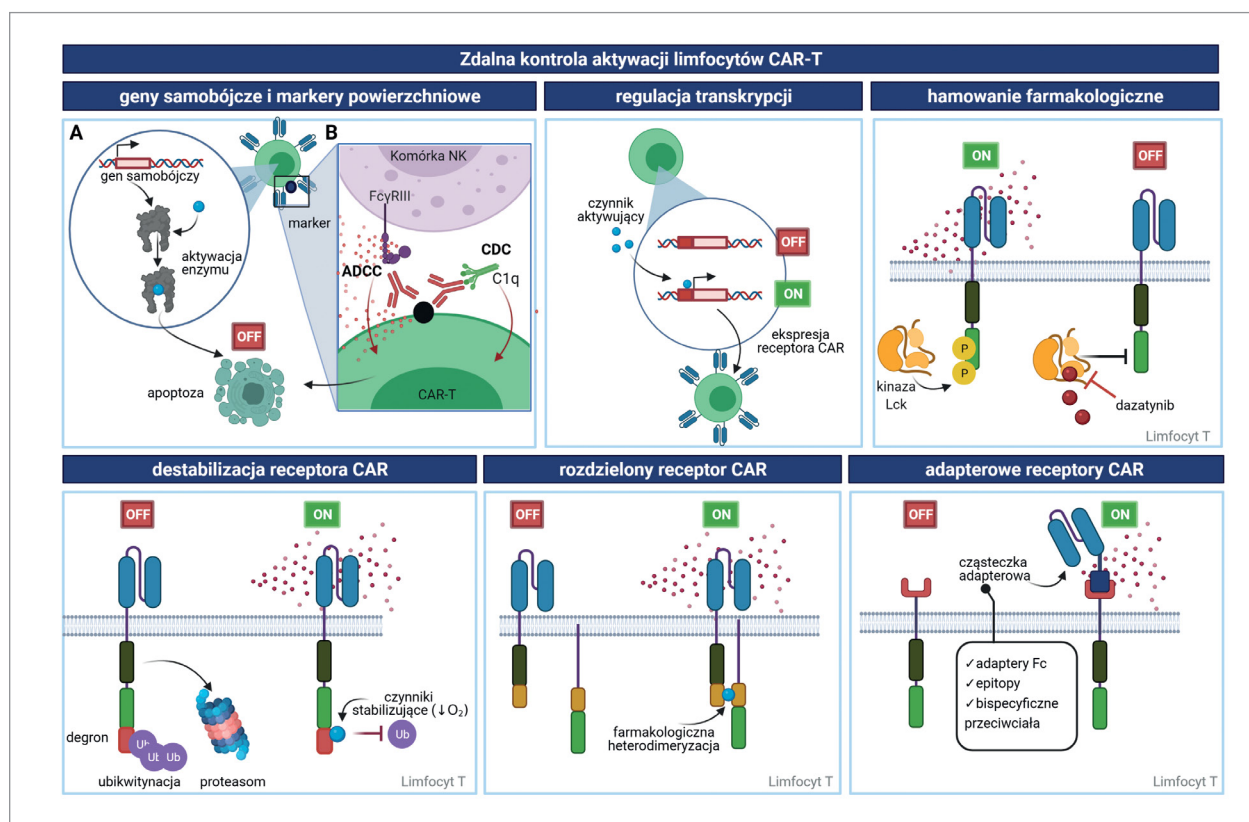
Przejściowa transfekcja

W przeciwieństwie do stabilnej modyfikacji limfocytów T przy użyciu transdukcji lenti- lub retrowirusowej, wykorzystanie elektroporacji mRNA do modyfikacji

limfocytów T umożliwia przejściową ekspresję receptora CAR w tych komórkach. Wprowadzone mRNA zostaje przepisane na funkcjonalne białko, a ekspresja receptora CAR jest ograniczona postępującą degradacją wprowadzonego mRNA oraz zmniejszaniem się jego zawartości w limfocytach T wraz z każdym podziałem komórkowym. Główną wadą takiego układu jest konieczność wielokrotnego podawania zmodyfikowanych w ten sposób limfocytów. Zastosowanie mRNA kodującego receptory CAR zostało z powodzeniem przetestowane w badaniach przedklinicznych *in vitro* i *in vivo* dotyczących nowotworów hematologicznych, celujących w cząsteczki: CD19 [6], CD37 [7], CD33 [8] i CD123 [9] oraz w wybrane antygeny obecne na guzach litych, takie jak: mezotelina [10], c-Met [11] czy HER2 [12]. W powyższych badaniach wykazano znaczną skuteczność przeciwnowotworową, o ile zmodyfikowane genetycznie komórki CAR-T podawano w kilkukrotnych dawkach. Nieliczne badania kliniczne (NCT02623582, NCT02277522, NCT01355965, NCT01897415, NCT01837602), przeprowadzone z wykorzystaniem przejściowo zmodyfikowanych komórek CAR-T, jasno wskazywały, że takie podejście wywołuje mniej działań niepożądanych u pacjentów, w porównaniu z podawaniem stabilnie zmodyfikowanych limfocytów T, niemniej efekty terapeutyczne nie zawsze były zadowalające.

Optymalizacja budowy i selektywności receptora CAR

Optymalne powinowactwo receptora CAR do antygenu zależy od wielu czynników. W dużej mierze zależne



Ryc. 3. Zdalna kontrola aktywacji limfocytów CAR-T może polegać na eliminacji komórek CAR-T za pomocą A) genów samobójczych B) markerów powierzchniowych, odbywa się na poziomie regulacji transkrypcji lub na poziomie białka. Na poziomie białka testowane są metody farmakologicznego, czasowego wyłączenia limfocytów CAR-T lub destabilizacji receptora CAR poprzez skrócenie jego czasu półtrwania. Stosuje się też metody rozłączenia domen ko-stymulujących, a także różnego rodzaju adaptery, mające na celu stworzenie uniwersalnych receptorów CAR.

jest od przeciwciała, z którego zbudowana jest zewnętrzkomórkowa domena rozpoznająca antygen, ale równie ważna jest długość i elastyczność rejonu zawiasowego, a także rodzaj domen ko-stymulujących [13]. Warto zaznaczyć, że – optymalizując budowę receptora CAR – można znacząco wpłynąć na ograniczenie niepożądanych efektów terapii CAR-T, takich jak zespół uwalniania cytokin czy powikłania ze strony układu nerwowego przy zachowaniu pełnego potencjału cytotoksycznego tych komórek [14]. Obniżenie powinowactwa domeny wiążącej antygen w receptorach CAR może wiązać się z ograniczeniem niepożądanych efektów rozpoznania antygeny na komórkach prawidłowych. O ile tak zmodyfikowane limfocyty CAR-T zachowują zdolność rozpoznania antygeny na komórkach nowotworowych o wysokiej ekspresji danego antygeny, o tyle komórki prawidłowe o mniejszej gęstości tego antygeny pozostają nierozpoznane. Wykorzystanie receptorów CAR o niskim powinowactwie do antygeny jest szczególnie interesujące w przypadku antygenów o których wiadomo, że znajdują się na tkankach prawidłowych w małych ilościach (np. HER2, EGFR). W modelach *in vitro* i *in vivo* pokazano, że obniżenie powinowactwa może skutecznie regulować aktywację limfocytów CAR-T nakierunkowanych na HER2 i EGFR oraz

oszczędzić komórki prawidłowe [15, 16]. Podobnie pokazano, że w przypadku szpiczaka mnogiego obniżenie powinowactwa receptorów CAR wobec cząsteczki CD38 skutecznie eliminuje komórki szpiczaka mnogiego i jednocześnie oszczędza prawidłowe limfocyty B, które mają mniej tego antygeny na swojej powierzchni [17]. Wadą tej strategii jest możliwość ucieczki spod nadzoru limfocytów CAR-T komórek nowotworowych, które charakteryzują się niską ekspresją danego antygeny lub klonów, które pod presją terapii CAR-T utraciły zdolność do jego ekspresji. W tym przypadku warto też zaznaczyć, że na powinowactwo receptora CAR do antygeny wpływ będzie miał zarówno zastosowany promotor, jak i wydajność transdukcji limfocytów T. Pewnego rodzaju rozwiązaniem jest integracja receptora CAR w *locus* receptora limfocytów T z wykorzystaniem systemu CRISPR/Cas9, która umożliwi uzyskanie ekspresji receptora CAR porównywalnej z fizjologiczną ekspresją TCR [18].

W niektórych przypadkach nowotworów można zaobserwować zmiany konformacyjne białek albo ich modyfikacje potranslacyjne, które nie występują w komórkach prawidłowych. Przykładowo pokazano, że integryna $\beta 7$ w szpiczaku mnogim ulega

zmianom konformacyjnym, które mogą być wykryte przez odpowiednie przeciwciała. Wykorzystanie następnie takiego przeciwciała do konstrukcji receptora CAR gwarantuje pewien rodzaj selektywności względem komórek nowotworowych [19]. Zmianom niekiedy ulega też białko po modyfikacjach translacyjnych. Pokazano, że w komórkach nowotworowych zmienia się poziom ekspresji niektórych enzymów odpowiedzialnych za glikozylację białek. Prowadzi to do zmiany wzorca glikozylacji – zmniejszenia lub zwiększenia liczby i rodzaju przyłączonych grup cukrowych. W przypadku zmniejszenia stopnia glikozylacji pokazano, że możliwe jest ukierunkowanie terapii CAR-T na fragmenty białka, epitopy krytyczne, które na komórkach prawidłowych są niedostępne dla przeciwciała. Ta strategia została wykorzystana do lepszego dopasowania powinowactwa receptora CAR do zmienionego białka MUC1 [20]. W komórkach prawidłowych, w przeciwieństwie do komórek nowotworowych, białko MUC1 jest związane z długimi i rozgałęzionymi resztami cukrowymi. Zastosowanie dłuższego i bardziej elastycznego rejonu zawiasowego pochodzącego z immunoglobuliny D umożliwiło receptorom CAR anty-MUC1 wykrywanie epitopów, znajdujących się blisko błony komórkowej [21]. W dalszych badaniach pokazano też, że zaburzony wzorec O-glikozylacji białka MUC1 stanowi idealną podstawę do wyselekcjonowania przeciwciała specyficznego dla zmian charakterystycznych dla komórek nowotworowych i wykorzystania go do skonstruowania funkcjonalnego receptora CAR [22]. Dokładne scharakteryzowanie modyfikacji potranslacyjnych białek powierzchniowych w komórkach nowotworowych może w efekcie poszerzyć wachlarz antygenów, które mogłyby stanowić potencjalne cele dla terapii CAR-T.

ZDALNA KONTROLA AKTYWACJI LIMFOCYTÓW CAR-T

Klasyczne limfocyty CAR-T to żywy lek, który po wprowadzeniu do organizmu biorcy zasadniczo pozostaje poza jakąkolwiek kontrolą. Proponowane są zatem różne strategie, mające na celu zapewnienie zdalnej kontroli nad modyfikowanymi komórkami oraz zmniejszenie ryzyka efektów ubocznych i niepożądanych tej terapii. Można wyznaczyć dwa główne podejścia, mające na celu zwiększenie poziomu bezpieczeństwa terapii CAR-T. Pierwszym z nich jest eliminacja komórek CAR-T z organizmu biorcy poprzez zastosowanie genów samobójczych lub markerów powierzchniowych. W drugim podejściu stosuje się różnego rodzaju systemy ograniczające funkcjonalność komórek CAR-T u chorego. Mogą one polegać na regulacji transkrypcji receptora CAR,

farmakologicznym hamowaniu aktywacji komórek CAR-T, mogą bazować na odpowiedniej białkowej budowie receptora CAR, a niekiedy wymagają zastosowania specyficznych adapterów do aktywacji limfocytów CAR-T. Strategie zdalnej aktywacji limfocytów CAR-T obrazuje ryc. 3.

Geny samobójcze i markery powierzchniowe

Zwiększenie bezpieczeństwa stosowania terapii CAR-T w pewnym stopniu może być uzyskane poprzez wbudowanie genów samobójczych do konstruktu kodującego receptor CAR. Geny samobójcze najczęściej kodują enzymy, które po podaniu nietoksycznego pro-leku mają za zadanie przekształcenie go na poziomie komórkowym do toksycznego końcowego produktu i do specyficznej eliminacji komórek, w których enzym ten ulega ekspresji. Przykładem takich genów jest gen kodujący indukowalną kaspazę 9 (*iCasp9*) [23], kinazę tymidynową wirusa herpes simplex (*hsv-tk*) [24] czy ludzką kinazę tymidynową (*TMPK*) [25]. Gen *iCasp9* ulega stałej ekspresji w komórkach, do których został wprowadzony. Funkcjonalna aktywacja tego białka jest możliwa dzięki zastosowaniu małowartościowych związków (*AP1903* lub *AP20187*), powodujących jego dimeryzację i inicjację kaskady, której efektem końcowym jest apoptoza transdukowanych komórek [23]. Gen kinazy tymidynowej *hsv-tk* jest genem zależnym od cyklu komórkowego. Kodowany przez niego enzym fosforyluje przeciwwirusowy lek gancyklowir (*GCV*), przekształcając go do monofosforanów. Te z kolei z udziałem kinaz komórkowych fosforylowane są do trójfosforanów – związków toksycznych dla dzielących się komórek [26]. Innym sposobem, który umożliwia eliminację komórek CAR-T, jest zastosowanie różnego rodzaju markerów powierzchniowych, które w fizjologicznych warunkach są nieobecne na limfocytach T. Markery te to najczęściej skrócone formy białka lub syntetyczne epitopy umiejscowione w błonie komórkowej limfocytów CAR-T. Dwa najczęściej stosowane markery to skrócona forma białka CD20, rozpoznawana przez rytuksymab (przeciwciała anty-CD20) [27] oraz skrócona forma białka EGFR, rozpoznawana przez cetuksymab (przeciwciała anty-EGFR) [28, 29]. Podanie przeciwciał powoduje eliminację limfocytów CAR-T w mechanizmie cytotoksyczności zależnej od przeciwciał (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) lub dopełniacza (*complement-dependent cytotoxicity*, CDC). Opracowano również epitop RQR8, który rozpoznawany jest zarówno przez przeciwciała anty-CD34, jak i rytuksymab. O ile przeciwciała anty-CD34 stosowane jest w tym przypadku jako marker selekcyjny do monitorowania procesu produkcyjnego limfocytów CAR-T, a także

ich poziomu *in vivo*, o tyle rytuksymab wykorzystywany jest do usunięcia zmodyfikowanych limfocytów T w organizmie chorego [30]. Warto zaznaczyć, że u pacjentów leczonych uprzednio chemioterapią można zaobserwować upośledzenie cytotoksyczności przeciwciał zależnej od dopełniacza i stąd też istnieje ryzyko, że podanie przeciwciał monoklonalnych nie usunie w razie potrzeby zmodyfikowanych komórek. Należy również podkreślić, że aktywacja genów samobójczych lub podanie przeciwciał monoklonalnych wiąże się z trwałym usunięciem z organizmu zmodyfikowanych limfocytów T, co nie jest optymalnym rozwiązaniem, biorąc pod uwagę czas i koszt wyprodukowania i podania preparatu CAR-T do organizmu biorcy.

Regulacja ekspresji receptorów CAR na poziomie transkrypcyjnym

Jednym ze sposobów regulacji ekspresji receptorów CAR w komórkach jest zastosowanie indukowalnego systemu opartego na kasecie sekwencji promotorowej, która ulega aktywacji po podaniu antybiotyku z grupy tetracyklin. mRNA kodujące receptor CAR jest produkowane jedynie w obecności doksycykliny, a w przypadku jej braku obserwuje się jedynie minimalny bazowy poziom ekspresji. W badaniach przedklinicznych wykazano skuteczność takiego systemu w kontroli ekspresji konstruktów kodujących receptory CAR skierowany wobec białka CD147 w raku wątrobowokomórkowym [31] i potwierdzono jego skuteczność, wykorzystując również receptory CAR anty-CD19 [32] oraz anty-CD38 [33] w nowotworach hematologicznych. Najwyższy poziom ekspresji receptora CAR anty-CD147 następował po 24 godzinach od podania doksycykliny, a po zakończeniu podawania antybiotyku powracał do poziomu bazowego dopiero po 48 godzinach [31]. Niewątpliwą wadą tego systemu jest konieczność podawania antybiotyku jako induktora ekspresji receptora CAR oraz długi czas „wygaszania” jego produkcji, co nie adresuje w pełni potrzeby szybkiego, funkcjonalnego wyłączenia limfocytów CAR-T. Innym zaproponowanym rozwiązaniem, badanym przez naszą grupę i zaproponowanym również przez innych badaczy, jest uzależnienie ekspresji receptora CAR od czynników środowiskowych, takich jak hipoksja. Jest to możliwe dzięki stosowaniu syntetycznych sekwencji promotorowych wzbogaconych w miejsca wiązania dla czynnika HIF-1 α [34]. Warto zaznaczyć, że bazowy poziom ekspresji receptora CAR w tym systemie bywa wystarczający do wyposażenia limfocytów w zdolność do pełnienia funkcji cytotoksycznych nawet w stanie normoksji. Podobnie też, jak w przypadku kasety tetracyklinowej, problemem jest długi czas półtrwania receptora CAR na powierzchni limfocytów.

Regulacja działania receptora CAR na poziomie białka

W przeciwieństwie do regulacji transkrypcyjnej, regulacja receptorów CAR na poziomie białka może mieć efekt natychmiastowy, stąd wiele grup opracowuje różne strategie wpływające na funkcjonalność wprowadzonego konstruktu. Jak do tej pory zaaprobowanymi metodami zwalczania nadmiernej cytotoksyczności limfocytów CAR-T, związanej z ich masową aktywacją, jest zastosowanie antagonistów dla receptora IL-6 (*tocilizumab*) oraz wywołanie ogólnego stanu immunosupresji przy użyciu sterydów (głównie deksametazonu). Nadal jednak brakuje bezpośredniego wyłącznika działania limfocytów CAR-T. Poszukiwanie związków, które z jednej strony dopuszczane są do stosowania w klinice i które bezpośrednio mogłyby blokować przekazywanie sygnału w zaktywowanych limfocytach CAR-T, umożliwiło wyselekcjonowanie grupy inhibitorów kinaz tyrozynowych, a w szczególności dazatynibu [30, 35]. Dazatynib został zaprojektowany jako inhibitor białka fuzyjnego BCR-ABL i stosowany jest w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej oraz Ph-dodatniej ostrej białaczki limfoblastycznej. Pokazano natomiast, że dazatynib blokuje również przekazywanie sygnału zależne od receptora limfocytów T, hamując kinazy Src, Fyn i Lck [36]. Warto zaznaczyć, że aktywacja limfocytów CAR-T jest także uzależniona od tych kinaz i faktycznie pokazano, że zastosowanie dazatynibu w odwracalny sposób blokuje cytotoksyczność, wydzielanie cytokin oraz proliferację limfocytów T zmodyfikowanych receptorem CAR anty-CD19. Efekt „re-startu” i przywrócenia pełni potencjału cytotoksycznego limfocytów CAR-T obserwowany był dopiero po siedmiu dniach od podania inhibitora. Co ciekawe, w mysim modelu ciężkiego przebiegu burzy cytokinowej po podaniu limfocytów CAR-T, zastosowanie dazatynibu znacząco łagodziło przebieg choroby i zmniejszało śmiertelność badanych zwierząt [30]. Jest to jednak, jak dotąd, jedyny sposób umożliwiający w przejściowy sposób farmakologicznie „wyłączenie” limfocytów CAR-T, który wciąż wymaga odpowiedniej walidacji w badaniach klinicznych.

Ciekawą koncepcję zdalnej regulacji aktywności receptora CAR zaproponował Park i wsp., którzy zaprojektowali rusztowanie jednołańcuchowego fragmentu rozpoznającego antygen CD33 lub EGFR w oparciu o strukturę nanoprzeciwciała specyficznego dla metotreksatu. W obecności metotreksatu struktura przeciwciała ulegała zmianom konformacyjnym, uniemożliwiającym rozpoznanie antygen CD33 lub EGFR, natomiast przy braku tego leku, przeciwciała skutecznie wiązało się do badanych

białek. Zarówno badania *in vitro*, jak i *in vivo* pokazały, że komórki CAR-T wyposażone w receptor na bazie tego przeciwciała skutecznie eliminują komórki nowotworowe, na które zostały nakierowane, ale metrotekstat wydajnie blokuje ich aktywność [37].

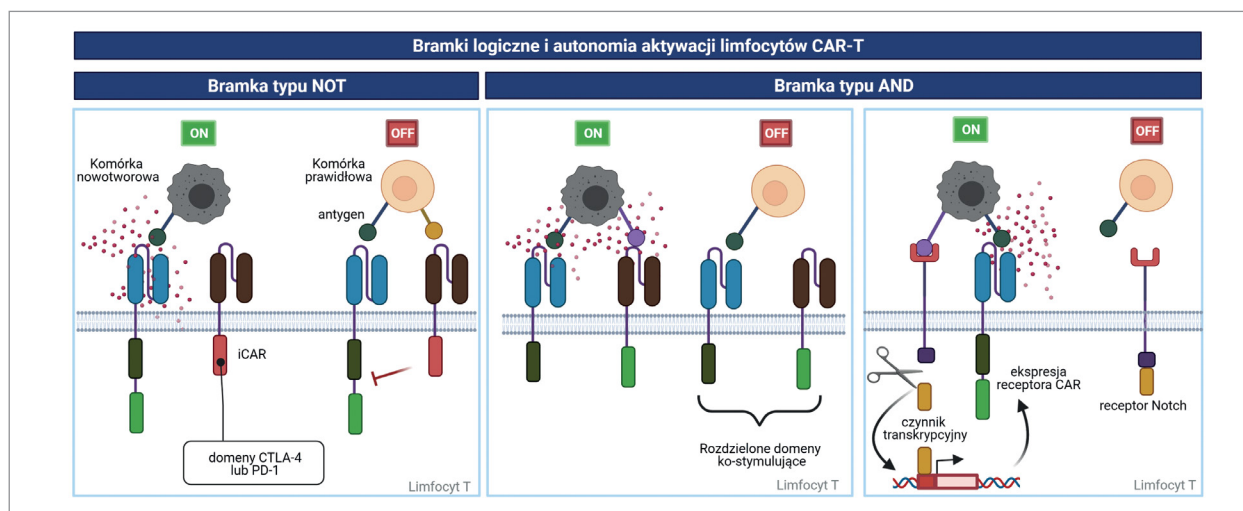
Wiele grup badawczych opracowuje regulację działania receptora CAR poprzez bezpośrednią optymalizację jego budowy. Jedną z proponowanych strategii jest skrócenie czasu półtrwania receptora CAR i uzależnienie jego stabilizacji od 1) czynników środowiskowych, 2) czynników farmakologicznych. W pierwszym przypadku warunkiem determinującym stabilność receptora CAR może być m.in. hipoksja. Kilka grup badawczych, w tym nasza, wykorzystuje w tym celu domenę ODD (*oxygen dependent degradation domain*) znajdującą się w czynniku HIF-1 α . Sekwencja ODD jest naturalnie występującą w białku HIF-1 α domeną kierującą białko do degradacji (tzw. *degron*). Zawiera ona dwie proliny, które w warunkach normoksji podlegają hydroksylacji i w tej formie są rozpoznawane przez multikompleks białkowy ligazy ubikwityny E3 i czynnika von Hippel-Lindau kierujący białko HIF-1 α do degradacji w proteasomie. W warunkach hipoksji czynnik HIF-1 α , lub jakiegokolwiek inne białko zawierające domenę ODD, ulega stabilizacji. Domena ODD wbudowana w sekwencję receptora CAR może skutecznie ograniczać działanie komórek zmodyfikowanych takich konstruktem jedynie do rejonów, w których występuje hipoksja [38]. Rozwiązanie to również nie jest pozbawione wad, ponieważ stan częściowego obniżenia stężenia tlenu może występować w różnych miejscach w organizmie. Z tego powodu zastosowany receptor CAR na pewno wymaga precyzyjnego doboru celu terapeutycznego, żeby zapobiec potencjalnej niespecyficznemu cytotoksyczności. Odmienne zastosowanie „degronów” zostało pokazane przez Juillerat i wsp. Wykorzystali oni sekwencję samotnej proteazy NS3, którą umieścili tuż za karboksylowym końcem receptora CAR, a zaraz za nią domenę degradującą. Proteaza ta miała za zadanie odcinać domenę degradującą i stabilizować receptor CAR. Podanie inhibitora dla proteazy NS3, a konkretnie azunaprewiru, blokowało jej funkcje i tym samym kierowało cały receptor CAR do degradacji. Autorzy pokazali, że aktywność limfocytów T zmodyfikowanych takim receptorem CAR zależy od stężenia inhibitora proteazy NS3 [39]. Wadą tego systemu, z dużą pewnością, jest wirusowe pochodzenie proteazy NS3, która może być wysoce immunogenna i przez to może ograniczać skuteczność działania komórek CAR-T.

Inną strategią jest zastosowanie systemu tzw. rozdzielonego receptora CAR (*split CAR*). W tym przypadku

komórki są modyfikowane dwoma oddzielnymi konstrukciami, których oba białkowe produkty lokalizują się w błonie komórkowej. Jedno z białek zbudowane jest jak klasyczny receptor CAR, ale jedynie z jedną domeną ko-stymulującą, której sygnał jest nie wystarczający do uruchomienia aktywności cytotoksycznej modyfikowanych limfocytów. Posiada on z kolei domenę umożliwiającą dimeryzację z drugim konstruktem, który również zawiera podobną domenę i niezbędną dla aktywacji domenę CD3 ζ . Kluczowym rozwiązaniem w tym systemie jest uzależnienie heterodimeryzacji obu konstrukciami od obecności w środowisku analogu rapamycyny. System ten zapewnia aktywację cytotoksyczności zależnej od receptorów CAR jedynie, gdy w środowisku obecne są 2 sygnały – rozpoznanie antygeny oraz chemiczny „pomost” umożliwiający połączenie obu białek w funkcjonalną całość [40]. Tego typu rozwiązanie można zaklasyfikować również do bramki logicznej typu AND, które zostaną omówione w dalszej części tego opracowania. Warto podkreślić, że receptory split-CAR oferują czasową i odwracalną kontrolę nad ilością funkcjonalnych komórek CAR-T, natomiast nie chronią przed ich niespecyficzną aktywacją na komórkach prawidłowych, ponieważ brakuje całkowitej kontroli nad biodystrybucją analogu rapamycyny w organizmie.

Receptory CAR działające w oparciu o adaptory

Wiele badań skupia się na potencjale stworzenia uniwersalnych receptorów CAR. Głównym założeniem tego podejścia jest ukierunkowanie cytotoksyczności zmodyfikowanych komórek na cząsteczkę adapterową, a nie bezpośrednio na dany antygen obecny na komórkach nowotworowych. Modyfikowane komórki zawierają wewnątrzkomórkowe domeny aktywujące identyczne jak w klasycznych receptorach CAR drugiej czy trzeciej generacji. Zewnątrzkomórkowa część receptora CAR nie zawiera części rozpoznającej antygen obecny na komórkach nowotworowych, ale skonstruowana jest w taki sposób, żeby rozpoznawać fragment odpowiedniej cząsteczki adapterowej. Cząsteczka adapterowa zatem stanowi linker, który odpowiada za specyficzne rozpoznanie antygeny na komórkach nowotworowych. Kompleks cząsteczki adapterowej i odpowiedniego receptora CAR zapewnia podobny poziom skuteczności w eliminacji komórek nowotworowych, jak klasyczne receptory CAR. Ogromną przewagą tego typu systemów jest możliwość modulowania aktywności komórek modyfikowanych adapterowym systemem CAR. Odpowiedź cytotoksyczna zanika wraz z usuwaniem cząsteczek adapterowych z organizmu i odwrotnie, kilkukrotne podanie tych cząsteczek pobudza aktywność modyfikowanych limfocytów.



Ryc. 4. Autonomia aktywacji limfocytów CAR-T dzięki zastosowaniu bramek logicznych. W bramce typu NOT receptor iCAR (inhibitory CAR) po rozpoznaniu antygenu hamuje aktywację klasycznego receptora CAR. W bramce typu AND rozpoznanie dwóch różnych antygenów rozpoznawanych przez osobne konstrukty aktywuje limfocyty CAR-T. W strategii synNotch rozpoznanie pierwszego antygenu (aktywacja receptora Notch) uruchamia ekspresję receptora CAR i umożliwia rozpoznanie drugiego antygenu.

Istnieje kilka równolegle rozwijanych platform, które można podzielić na 3 klasy adapterowych receptorów CAR opartych o: wiązanie fragmentu Fc przeciwciała, wiązanie specyficznych znaczników oraz wykorzystujące bispecyficzne przeciwciała. Podwaliny pod strategię wykorzystania adapterowych CAR-ów zostały zdefiniowane w 2006 roku przez Clémenceau i wsp., którzy wykorzystali oddziaływanie cząsteczki CD16 z fragmentami Fc immunoglobulin do stworzenia receptora CAR zbudowanego z zewnątrzkomórkowej domeny białka CD16 i wewnątrzkomórkowej domeny FcεRIγ [41]. W kolejnych etapach powstawały receptory CAR zawierające domeny przekazujące sygnał z receptorów CAR pierwszej i drugiej generacji, a limfocyty T modyfikowane takimi konstruktami wykazywały dużą skuteczność cytotoksyczną *in vitro* i *in vivo* [42]. Równolegle rozwijano kolejne strategie, w których zewnątrzkomórkowa domena adapterowego receptora CAR zbudowana była z awidyny [43], fragmentu scFv przeciwciała rozpoznającego białko FITC [44], syntetycznych epitopów [45] czy w oparciu o domenę suwaka leucynowego [46]. Wadą tego typu systemów jest wysoka immunogenność niektórych ze stosowanych znaczników, jak np. w przypadku systemu opartego o awidynę i biotynę czy białko FITC. Innym sposobem aktywacji receptorów CAR jest wykorzystanie bispecyficznych przeciwciał, które stanowią pomost umożliwiający z jednej strony związanie antygenu na komórkach nowotworowych, a z drugiej strony oddziałują z zewnątrzkomórkową domeną receptora CAR, która często jest zbudowana na bazie fragmentu receptora folianowego lub wariantu białka EGFRvIII, a nie klasycznie na bazie przeciwciała [47, 48]. Interesującą koncepcję stanowi wykorzystanie potencjału limfocytów zmodyfikowanych

receptorem CAR anti-CD19 w sytuacji, gdy dochodzi do wznowy połączonej z utratą antygenu CD19 z powierzchni komórek nowotworowych. W tym przypadku bispecyficzne przeciwciało opracowane jest w taki sposób, że zawiera w swojej strukturze fragment białka CD19 rozpoznawany przez receptor CAR oraz fragment przeciwciała rozpoznający nowy cel terapeutyczny, którym mogłaby być np. cząsteczka CD20, co umożliwiłoby dalszą walkę z nowotworem [49].

BRAMKI LOGICZNE I AUTONOMIA AKTYWACJI LIMFOCYTÓW CAR-T

Zastosowanie rozwiązań typu logicznego jest szczególnie istotne w terapii guzów litych, gdzie coraz większy nacisk kładzie się na rozróżnienie pomiędzy komórkami nowotworowymi a komórkami prawidłowymi. Bramki logiczne w układzie biologicznym tworzone są poprzez wzmocnienie sygnału aktywacji limfocytów CAR-T w bramce typu AND lub poprzez wyhamowanie tego sygnału w bramce typu NOT. W wyniku zastosowania takich rozwiązań modyfikowane limfocyty CAR-T nabierają autonomii w skutecznym i specyficznym rozpoznaniu komórek nowotworowych, co zilustrowane zostało na ryc. 4.

Bramka typu „NOT”

Selektywność rozpoznania komórek nowotworowych może być uzyskana poprzez hamowanie aktywności cytotoksycznej wobec komórek prawidłowych. W tym celu najczęściej wykorzystuje się hamujące receptory CAR (*inhibitory CAR*, iCAR).

Receptory te w przeciwieństwie do klasycznych receptorów CAR zamiast domen stymulujących wyposażone są w wewnątrzkomórkowe domeny hamujące pochodzące z białek CTLA-4 lub PD-1. Rozpoznanie antygeny na powierzchni prawidłowych komórek prowadzi do defosforylacji kompleksu receptora i tym samym zahamowania aktywności zmodyfikowanych limfocytów. Receptory iCAR mają za zadanie ograniczyć działanie komórek CAR-T jedynie do komórek, które nie mają na swojej powierzchni danego antygeny. Dużą uwagę zwraca się na fakt, aby antygen rozpoznawany przez receptor iCAR znajdował się w dużej ilości na komórkach prawidłowych, a prawie nie występował na komórkach nowotworowych. Pokazano na przykład, że wprowadzenie do komórek dwóch typów receptorów – jednego klasycznego receptora CAR anty-CD19 z domenami ko-stymulującymi CD28 i CD3 ζ oraz hamującego receptora rozpoznającego antygen PSMA – skutecznie ogranicza cytotoksyczność tak modyfikowanych limfocytów wobec komórek nowotworowych, posiadających na swojej powierzchni oba antygeny. Limfocyty te natomiast skutecznie niszczyły komórki CD19-dodatnie, a PSMA-ujemne [50]. Należy zaznaczyć, że użyty układ doświadczalny był „sztuczny”, gdyż fizjologicznie komórki, mające jednocześnie antygen CD19 i PSMA, nie występują w ludzkim organizmie. Tym samym największym problemem dalszego rozwijania tego typu terapii jest brak odpowiedniego antygeny, będącego celem dla klasycznego receptora CAR i nieobecnego na tkankach prawidłowych.

Bramka typu „AND”

W tym podejściu aktywacja limfocytów CAR-T możliwa jest jedynie po rozpoznaniu kombinacji antygenów. Najczęściej stosowanym rozwiązaniem jest wykorzystanie dwóch konstruktów, z których każdy zawiera domenę zewnątrzkomórkową ukierunkowaną na rozpoznanie innego antygeny. Dodatkowo jeden z konstruktów zawiera wewnątrzkomórkową domenę CD3 ζ , a drugi ko-stymulującą domenę CD28 lub 4-1BB. Taka strategia została z sukcesem zaimplementowana w badaniach przedklinicznych na modelach raka piersi oraz prostaty. Przykładowo, jeden receptor rozpoznawał antygen PSCA, natomiast drugi receptor CAR rozpoznawał antygen PMSA. Oba antygeny są obiecującym celem terapeutycznym w oparciu o komórki CAR-T, ale każdy z nich występuje również w stanie fizjologicznym na komórkach prawidłowych. W badaniach *in vivo* nowotwory PSCA- i PMSA-dodatnie były skutecznie niszczone przez limfocyty CAR-T, podczas gdy nowotwory mające ekspresję jedynie jednego

antygeny nie były niszczone [51, 52]. Głównym mankamentem tego systemu jest fakt, że nawet częściowa aktywacja limfocytów T może być wystarczającym sygnałem do włączenia aktywności cytotoksycznej limfocytów CAR-T.

Bardziej zaawansowanym zastosowaniem bramki logicznej typu AND jest wykorzystanie dwóch różnych typów receptorów, z których aktywacja pierwszego bezpośrednio, na poziomie transkrypcji steruje ekspresją receptora CAR w limfocytach T. W tym systemie rozpoznanie pierwszego antygeny aktywuje zmodyfikowany, „syntetyczny” receptor Notch – synNotch (*synthetic Notch*), co skutkuje cięciem proteolitycznym i uwolnieniem białka – czynnika transkrypcyjnego, który z kolei uruchamia ekspresję receptora CAR ukierunkowanego na rozpoznanie innego antygeny obecnego na komórkach nowotworowych. Należy podkreślić sekwencyjny charakter tych zdarzeń, który umożliwia rozróżnienie tkanek, które mają oba antygeny na swojej powierzchni od tych, które mają tylko jeden [53, 54]. Przykładowo, komórki neuroblastomy charakteryzują się wysokim poziomem białka GD2 oraz B7H3. Wykorzystanie klasycznych receptorów CAR, zwłaszcza wobec antygeny GD2, wiązało się ze śmiertelną neurotoksycznością w badaniach *in vivo*. Natomiast wykorzystanie białka GD2 jako sygnału do aktywacji receptora Notch i uruchomienia ekspresji receptora CAR anty-B7H3 znacząco poprawiło bezpieczeństwo stosowania modyfikowanych komórek przy ograniczeniu ich nadmiernej aktywacji [55]. System synNotch umożliwia ponadto wprowadzenie do jednej komórki kilku różnych syntetycznych receptorów Notch, z których aktywacja każdego może powodować uwolnienie różnych czynników transkrypcyjnych i tym samym uruchomienie różnych, a czasami komplementarnych programów sterujących dalszym losem modyfikowanych komórek [54].

WNIOSKI

Terapia CAR-T jest niezwykle skuteczną terapią w przypadku nowotworów hematologicznych, w których standardowe schematy leczenia nie przynoszą oczekiwanych wyników. Warto podkreślić, że sukces tej terapii w dużej mierze zależy od selektywności eliminacji komórek CD19-dodatnich, czyli komórek wywodzących się z limfocytów B. Ukierunkowanie terapii CAR-T na inne antygeny jest w dużej mierze utrudnione przez brak specyficznych celów terapeutycznych obecnych jedynie na komórkach nowotworowych, a nieobecnych na komórkach zdrowych. Zarejestrowanie pod koniec marca 2021 pierwszej terapii CAR, ukierunkowanej

na antygen inny niż CD19, a konkretnie na BCMA, z jednej strony budzi ekscytację rozwojem immunoterapii opartych na komórkach CAR-T, a z drugiej budzi obawy o bezpieczeństwo ich stosowania. Rejestracja kolejnych komórkowych terapii rozpoznających mniej unikalne antygeny będzie w dużej mierze zależała od tego, czy uda się skutecznie wyeliminować niebezpieczeństwo rozpoznania danego antygeny na komórkach prawidłowych. W październiku 2020 rozpoczęło się pierwsze badanie kliniczne oceniające zdolność dazatynibu do zdalnej kontroli limfocytów CAR-T podawanych pacjentom (NCT04603872), jak dotychczas, jedyne farmakologiczne środka o potencjale do czasowego wyłączenia działania limfocytów CAR-T, ale na jego wynik trzeba jeszcze poczekać.

Uzbrojenie komórek CAR-T w zdolność do reagowania na zmienione środowisko nowotworu, precyzyjny dobór antygeny bądź jego modyfikacji specyficznych dla nowotworu, które mają być celem terapeutycznym, a także różnego rodzaju logiczne bramki sterujące ekspresją receptora CAR mają dużą szansę zagwarantowania skuteczności działania, jak i ograniczenia działań niepożądanych.

PODZIĘKOWANIA

Dziękuję dr hab. Magdalenie Winiarskiej i dr Małgorzacie Bajor za krytyczne uwagi dotyczące niniejszego opracowania. Ryciny do niniejszej pracy zostały wykonane w programie Biorender.

PIŚMIENNICTWO

1. June C.H., O'Connor R.S., Kawalekar O.U., Ghassemi S., Milone M.C.: CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science* 2018; 359(6382): 1361–1365. doi: 10.1126/science.aar6711.
2. Chmielewski M., Hombach A.A., Abken H.: Of CARs and TRUCKs: chimeric antigen receptor (CAR) T cells engineered with an inducible cytokine to modulate the tumor stroma. *Immunol Rev.* 2014; 257(1): 83–90. doi: 10.1111/imr.12125.
3. Maude S.L., Frey N., Shaw P.A. i wsp.: Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. *New England Journal of Medicine* 2014; 371(16): 1507–1517. doi: 10.1056/NEJMoa1407222.
4. Lee D.W., Kochenderfer J.N., Stetler-Stevenson M. i wsp.: T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *The Lancet* 2015; 385(9967): 517–528. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61403-3.
5. Bonifant C.L., Jackson H.J., Brentjens R.J., Curran K.J.: Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Molecular Therapy – Oncolytics*. 2016; 3: 16011. doi: 10.1038/mto.2016.11.
6. Almåsbak H., Rian E., Hoel H.J. i wsp.: Transiently redirected T cells for adoptive transfer. *Cytotherapy* 2011; 13(5): 629–640. doi: 10.3109/14653249.2010.542461.
7. Köksal H., Dillard P., Josefsson S.E. i wsp.: Preclinical development of CD37CAR T-cell therapy for treatment of B-cell lymphoma. *Blood Adv.* 2019; 3(8): 1230–1243. doi: 10.1182/bloodadvances.2018029678.
8. Kenderian S.S., Ruella M., Shestova O. i wsp.: CD33-specific chimeric antigen receptor T cells exhibit potent preclinical activity against human acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2015; 29(8): 1637–1647. doi: 10.1038/leu.2015.52.
9. Tasian S.K., Kenderian S.S., Shen F. i wsp.: Optimized depletion of chimeric antigen receptor T cells in murine xenograft models of human acute myeloid leukemia. *Blood* 2017; 129(17): 2395–2407. doi: 10.1182/blood-2016-08-736041.
10. Beatty G.L., Haas A.R., Maus M.V. i wsp.: Mesothelin-specific Chimeric Antigen Receptor mRNA-Engineered T cells Induce Anti-Tumor Activity in Solid Malignancies. *Cancer Immunol Res.* 2014; 2(2): 112–120. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0170.
11. Tchou J., Zhao Y., Levine B.L. i wsp.: Safety and Efficacy of Intratumoral Injections of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells in Metastatic Breast Cancer. *Cancer Immunol Res.* 2017; 5(12): 1152–1161. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0189.
12. Yoon S.H., Lee J.M., Cho H.I. i wsp.: Adoptive immunotherapy using human peripheral blood lymphocytes transferred with RNA encoding Her-2/neu-specific chimeric immune receptor in ovarian cancer xenograft model. *Cancer Gene Therapy* 2009; 16(6): 489–497. doi: 10.1038/cgt.2008.98.
13. Zhylko A., Winiarska M., Graczyk-Jarzynka A.: The Great War of Today: Modifications of CAR-T Cells to Effectively Combat Malignancies. *Cancers (Basel)* 2020; 12(8): 2030. doi: 10.3390/cancers12082030.
14. Ying Z., Huang X.F., Xiang X. i wsp.: A safe and potent anti-CD19 CAR T cell therapy. *Nat Med.* 2019; 25(6): 947–953. doi: 10.1038/s41591-019-0421-7.
15. Liu X., Jiang S., Fang C. i wsp.: Affinity-Tuned ErbB2 or EGFR Chimeric Antigen Receptor T Cells Exhibit an Increased Therapeutic Index against Tumors in Mice. *Cancer Res.* 2015; 75(17): 3596–3607. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0159.
16. Caruso H.G., Hurton L.V., Najjar A. i wsp.: Tuning Sensitivity of CAR to EGFR Density Limits Recognition of Normal Tissue While Maintaining Potent Antitumor Activity. *Cancer Res.* 2015; 75(17): 3505–3518. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0139.
17. Drent E., Themeli M., Poels R. i wsp.: A Rational Strategy for Reducing On-Target Off-Tumor Effects of CD38-Chimeric Antigen Receptors by Affinity Optimization. *Mol Ther.* 2017; 25(8): 1946–1958. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.04.024.
18. Eyquem J., Mansilla-Soto J., Giavridis T. i wsp.: Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature* 2017; 543(7643): 113–117. doi: 10.1038/nature21405.

19. Hosen N., Matsunaga Y., Hasegawa K. i wsp.: The activated conformation of integrin $\beta 7$ is a novel multiple myeloma-specific target for CAR T cell therapy. *Nat Med.* 2017; 23(12): 1436–1443. doi: 10.1038/nm.4431.
20. Brockhausen I., Yang J.-M., Burchell J., Whitehouse C., Taylor-Papadimitriou J.: Mechanisms Underlying Aberrant Glycosylation of MUC1 Mucin in Breast Cancer Cells. *European Journal of Biochemistry.* 1995; 233(2): 607–617. doi: https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.607_2.x.
21. Wilkie S., Picco G., Foster J. i wsp.: Retargeting of Human T Cells to Tumor-Associated MUC1: The Evolution of a Chimeric Antigen Receptor. *J Immunol.* 2008; 180(7): 4901. doi: 10.4049/jimmunol.180.7.4901
22. Posey A.D., Schwab R.D., Boesteanu A.C. i wsp.: Engineered CAR T Cells Targeting the Cancer-Associated Tn-Glycoform of the Membrane Mucin MUC1 Control Adenocarcinoma. *Immunity.* 2016; 44(6): 1444–1454. doi: 10.1016/j.immuni.2016.05.014.
23. Gargett T., Brown M.P.: The inducible caspase-9 suicide gene system as a “safety switch” to limit on-target, off-tumor toxicities of chimeric antigen receptor T cells. *Front Pharmacol.* 2014; 5: 235. doi: 10.3389/fphar.2014.00235.
24. Bonini C., Ferrari G., Verzeletti S. i wsp.: HSV-TK Gene Transfer into Donor Lymphocytes for Control of Allogeneic Graft-Versus-Leukemia. *Science* 1997; 276(5319): 1719–1724. doi: 10.1126/science.276.5319.1719.
25. Sato T., Neschadim A., Konrad M., Fowler D.H., Lavie A., Medin J.A.: Engineered Human tmpr/AZT As a Novel Enzyme/Prodrug Axis for Suicide Gene Therapy. *Molecular Therapy* 2007; 15(5): 962–970. doi: 10.1038/mt.sj.6300122.
26. Greco R., Oliveira G., Stanghellini M.T.L. i wsp.: Improving the safety of cell therapy with the TK-suicide gene. *Front Pharmacol.* 2015; 6: 95. doi: 10.3389/fphar.2015.00095.
27. Griffioen M., Egmond E.H.M. van, Kester M.G.D., Willemze R., Falkenburg J.H.F., Heemskerk M.H.M.: Retroviral transfer of human CD20 as a suicide gene for adoptive T-cell therapy. *Haematologica* 2009; 94(9): 1316–1320. doi: 10.3324/haematol.2008.001677.
28. Paszkiewicz P.J., Fräßle S.P., Srivastava S. i wsp.: Targeted antibody-mediated depletion of murine CD19 CAR T cells permanently reverses B cell aplasia. *J Clin Invest.* 2016; 126(11): 4262–4272. doi: 10.1172/JCI84813.
29. Wang X., Chang W.-C., Wong C.W. i wsp.: A transgene-encoded cell surface polypeptide for selection, in vivo tracking, and ablation of engineered cells. *Blood* 2011; 118(5): 1255–1263. doi: 10.1182/blood-2011-02-337360.
30. Mestermann K., Giavridis T., Weber J. i wsp.: The tyrosine kinase inhibitor dasatinib acts as a pharmacologic on/off switch for CAR-T cells. *Sci Transl Med.* 2019; 11(499): eaau5907. doi: 10.1126/scitranslmed.aau5907.
31. Zhang R.-Y., Wei D., Liu Z.-K. i wsp.: Doxycycline Inducible Chimeric Antigen Receptor T Cells Targeting CD147 for Hepatocellular Carcinoma Therapy. *Front Cell Dev Biol.* 2019; 7: 233. doi: 10.3389/fcell.2019.00233.
32. Sakemura R., Terakura S., Watanabe K. i wsp.: A Tet-On Inducible System for Controlling CD19-Chimeric Antigen Receptor Expression upon Drug Administration. *Cancer Immunol Res.* 2016; 4(8): 658–668. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0043.
33. Drent E., Poels R., Mulders M.J. i wsp.: Feasibility of controlling CD38-CAR T cell activity with a Tet-on inducible CAR design. *PLOS ONE.* 2018; 13(5): e0197349. doi: 10.1371/journal.pone.0197349.
34. Ede C., Chen X., Lin M.-Y., Chen Y.Y.: Quantitative Analyses of Core Promoters Enable Precise Engineering of Regulated Gene Expression in Mammalian Cells. *ACS Synth Biol.* 2016; 5(5): 395–404. doi: 10.1021/acssynbio.5b00266.
35. Weber E.W., Lynn R.C., Sotillo E., Lattin J., Xu P., Mackall C.L.: Pharmacologic control of CAR-T cell function using dasatinib. *Blood Adv.* 2019; 3(5): 711–717. doi: 10.1182/bloodadvances.2018028720.
36. Lee K.C., Ouwehand I., Giannini A.L., Thomas N.S., Dibb N.J., Bijlmakers M.J.: Lck is a key target of imatinib and dasatinib in T-cell activation. *Leukemia* 2010; 24(4): 896–900. doi: 10.1038/leu.2010.11.
37. Park S., Pascua E., Lindquist K.C. i wsp.: Direct control of CAR T cells through small molecule-regulated antibodies. *Nature Communications* 2021; 12(1): 710. doi: 10.1038/s41467-020-20671-6.
38. Kosti P., Opzoomer J.W., Larios-Martinez K.I. i wsp.: Hypoxia-Sensing CAR T-Cells Provide Safety and Efficacy in Treating Solid Tumors. *Synthetic Biology* 2020; 2(4): 100227. doi: 10.1101/2020.05.13.091546.
39. Juillerat A., Tkach D., Busser B.W. i wsp.: Modulation of chimeric antigen receptor surface expression by a small molecule switch. *BMC Biotechnology* 2019; 19(1): 44. doi: 10.1186/s12896-019-0537-3.
40. Wu C.-Y., Roybal K.T., Puchner E.M., Onuffer J., Lim W.A.: Remote control of therapeutic T cells through a small molecule-gated chimeric receptor. *Science* 2015; 350(6258): aab4077. doi: 10.1126/science.aab4077.
41. Clémenceau B., Congy-Jolivet N., Gallot G. i wsp.: Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) is mediated by genetically modified antigen-specific human T lymphocytes. *Blood* 2006; 107(12): 4669–4677. doi: 10.1182/blood-2005-09-3775.
42. Ochi F., Fujiwara H., Tanimoto K. i wsp.: Gene-modified human α/β -T cells expressing a chimeric CD16-CD3 ζ receptor as adoptively transferable effector cells for anticancer monoclonal antibody therapy. *Cancer Immunol Res.* 2014; 2(3): 249–262. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0099-T.
43. Urbanska K., Lanitis E., Poussin M. i wsp.: A universal strategy for adoptive immunotherapy of cancer through use of a novel T-cell antigen receptor. *Cancer Res.* 2012; 72(7): 1844–1852. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3890.
44. Tamada K., Geng D., Sakoda Y. i wsp.: Redirecting gene-modified T cells toward various cancer types using tagged antibodies. *Clin Cancer Res.* 2012; 18(23): 6436–6445. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1449.
45. Cartellieri M., Loff S., von Bonin M. i wsp.: Unicar: A Novel Modular Retargeting Platform Technology for CAR T Cells. *Blood* 2015; 126(23): 5549–5549. doi: 10.1182/blood.V126.23.5549.5549.
46. Cho J.H., Collins J.J., Wong W.W.: Universal Chimeric Antigen Receptors for Multiplexed and Logical Control of T Cell Responses. *Cell* 2018; 173(6): 1426–1438.e11. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.038.
47. Urbanska K., Lynn R.C., Stashwick C., Thakur A., Lum L.G., Powell D.J.: Targeted cancer immunotherapy via combination of designer bispecific antibody and novel gene-engineered T cells. *Journal of Translational Medicine* 2014; 12(1): 347. doi: 10.1186/s12967-014-0347-2.
48. Karches C.H., Benmehbarek M.-R., Schmidbauer M.L. i wsp.: Bispecific Antibodies Enable Synthetic Agonistic Receptor-Transduced T Cells for Tumor Immunotherapy. *Clin Cancer Res.* 2019; 25(19): 5890–5900. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-3927.

49. Klesmith J.R., Su L., Wu L. i wsp.: Retargeting CD19 Chimeric Antigen Receptor T Cells via Engineered CD19-Fusion Proteins. *Mol Pharmaceutics* 2019; 16(8): 3544–3558. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b00418.
50. Fedorov V.D., Themeli M., Sadelain M.: PD-1- and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses. *Sci Transl Med.* 2013; 5(215): 215ra172. doi: 10.1126/scitranslmed.3006597.
51. Kloss C.C., Condomines M., Cartellieri M., Bachmann M., Sadelain M.: Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells. *Nat Biotechnol.* 2013; 31(1): 71–75. doi: 10.1038/nbt.2459.
52. Wilkie S., van Schalkwyk M.C.I., Hobbs S. i wsp.: Dual targeting of ErbB2 and MUC1 in breast cancer using chimeric antigen receptors engineered to provide complementary signaling. *J Clin Immunol.* 2012; 32(5): 1059–1070. doi: 10.1007/s10875-012-9689-9.
53. Roybal K.T., Rupp L.J., Morsut L. i wsp.: Precision Tumor Recognition by T Cells With Combinatorial Antigen-Sensing Circuits. *Cell.* 2016; 164(4): 770–779. doi: 10.1016/j.cell.2016.01.011.
54. Morsut L., Roybal K.T., Xiong X. i wsp.: Engineering Customized Cell Sensing and Response Behaviors Using Synthetic Notch Receptors. *Cell.* 2016; 164(4): 780–791. doi: 10.1016/j.cell.2016.01.012.
55. Moghimi B., Muthugounder S., Jambon S. i wsp.: Preclinical assessment of the efficacy and specificity of GD2-B7H3 SynNotch CAR-T in metastatic neuroblastoma. *Nature Communications* 2021; 12(1): 511. doi: 10.1038/s41467-020-20785-x.

INSTRUKCJE DLA AUTORÓW

Postępy Polskiej Medycyny i Farmacji. Zeszyty Naukowe Fundacji Polpharmy to czasopismo naukowe publikujące przeglądowe i poglądowe prace naukowe powstałe na podstawie projektów badawczych finansowanych ze środków Naukowej Fundacji Polpharmy. Tematyka prac publikowanych w czasopiśmie obejmuje wiele 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 ukazują 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 mają pożądaną wartość dydaktyczną (szkoleniową). 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 roku 1964, w Tokio w roku 1975 i w zaleceniach Światowej Organizacji Zdrowia w 1982 roku.

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 oraz wydawcy pierwotnej publikacji, w której materiał ten został opublikowany i w której 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 powinno do niej dochodzić. Niemniej jednak autorzy prac naukowych mają obowiązek ochraniać dane osobowe pacjenta. Publikować należy wyłącznie informacje o znaczeniu naukowym lub 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 *Postępowach 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 *Postępowach 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 czasopiśmie 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 między wierszami.

Tabele

Tabele można nadsyłać w dowolnej wersji edytora tekstowego Microsoft Word lub 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 lub diagram powinien być zawarty w oddzielnym pliku. W przypadku użycia jakiegokolwiek innego oprogramowania (np. statystycznego) prosimy o kontakt z redakcją w celu uzgodnienia szczegółów dotyczących wybranego formatu wykresu.

Ryciny

Ryciny powinny być przygotowane w rozdzielczości 300 dpi lub większej w formacie *.pdf, *.eps lub *.jpeg.

Strona tytułowa

Praca powinna mieć 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 **podziękowania**. Podkreśla się w nich wkład wszystkich osób, które pomagały w prowadzeniu badań i które nie spełniają kryteriów włączenia do zespołu autorów, np. asystentów, techników, kierowników jednostek dających 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 o zwrócenie uwagi na stosowane znaki interpunkcyjne oddzielające poszczególne pola bibliograficzne cytowanej pozycji. Źródła internetowe z racji łatwości zmian lub korekt powinny zawierać datę pobrania bądź przejrzenia pliku. Podając listę autorów, należy użyć zwrotu „i wsp.”, jeśli liczba autorów cytowanej pozycji jest wyższa niż 3.

Typowy artykuł w czasopiśmie

Lichtenstein G.R., Hanauer S.B., Sandborn W.J.: 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 M.M.: 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 D.E., 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/określonymi autorem/autorami

Ringsven M.K., Bond D.: Gerontology and leadership skills for nurses. II wyd. Albany, Nowy Jork, Delmar Publishers, 1996.

Książka redagowana

Norman U., Redfern S.J. 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 S.J., Whisnant J.R.: Hypertension and stroke, w: Laragh J.H., Brenner B.M. editors: Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management, II wyd., Nowy Jork, Raven Press, 1995, 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, Kioto, Japonia, Amsterdam, Elsevier, 1996.

Referat

Bengtsson S., Solheim B.G.: Enforcement of data protection, privacy and security in medical information, w: Lun K.G., Oegoulet P., Piemme T.E., Rienhoff O. redd.: MEDINFO 92, materiały z VII Światowego Kongresu nt. Informatyki Medycznej, 1992.09.6-10, Genewa, Szwajcaria.

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

TABELE I ILUSTRACJE

Tabele mają swoją numerację 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 odmiennie, 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 (rozdzielczość 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 ich tożsamość, albo uzyskać pisemną zgodę na opublikowanie zdjęcia. Redakcja przyjmuje zdjęcia w formie elektronicznej w możliwie najwyższej jakości (rozdzielczość min. 300 dpi).

Legendy pod rycinami należy numerować cyframi arabskimi odpowiadającymi kolejnym rycinom.

Jednostki miary. Pomiary 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, niepocho- dzące z tego systemu, powinny być dodane w nawiasach.

Skróty i symbole. Redakcja wymaga stosowania jedynie standardowych skrótów. Nie należy używać skrótów w tytule ani 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: office@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 że 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 ww. warunki za spełnione, jeżeli złożony zostanie podpis pierwszego autora.

KOMPLET MATERIAŁÓW NALEŻY PRZESŁAĆ DO REDAKCJI NA ADRES:

Index Copernicus sp. z o.o.
Postępy Polskiej Medycyny i Farmacji
ul. Kasprzaka 31A/184, 01-234 Warszawa
tel.: +48 22 487 53 93
e-mail: office@indexcopernicus.com

Jesteśmy jednym z narodowych czempionów gospodarczych i największym polskim producentem leków. Wpływamy na rozwój polskiej gospodarki w oparciu o wiedzę i innowacyjne technologie. Naszym mottem jest hasło „Ludzie pomagają Ludziom”. Od ponad 85 lat cieszymy się zaufaniem lekarzy, farmaceutów i pacjentów, wytwarzając leki wysokiej jakości, bezpieczne i skuteczne.

A close-up photograph of a woman with blonde hair, wearing a white lab coat, looking intently at a test tube she is holding. The image is partially enclosed by a large, light blue circle with an orange border.

Jesteśmy dumni z naszego rozwoju

- Jesteśmy liderem polskiego rynku farmaceutycznego.
- Dynamicznie rozwijamy się w regionie Europy Środkowo-Wschodniej i Azji Centralnej.
- Zatrudniamy ok. 7500 pracowników w Polsce i za granicą.
- Od 2000 r. zainwestowaliśmy około 2,5 mld zł w badania i rozwój – najwięcej w polskiej farmacji.
- Przeznaczyliśmy ponad 25 mln zł na rozwój polskiej nauki i działalność Naukowej Fundacji Polpharmy.
- Wdrażamy najlepsze praktyki społecznej odpowiedzialności biznesu.



**ul. Bobrowiecka 6
00-728 WARSZAWA**

www.polpharma.pl/fundacja