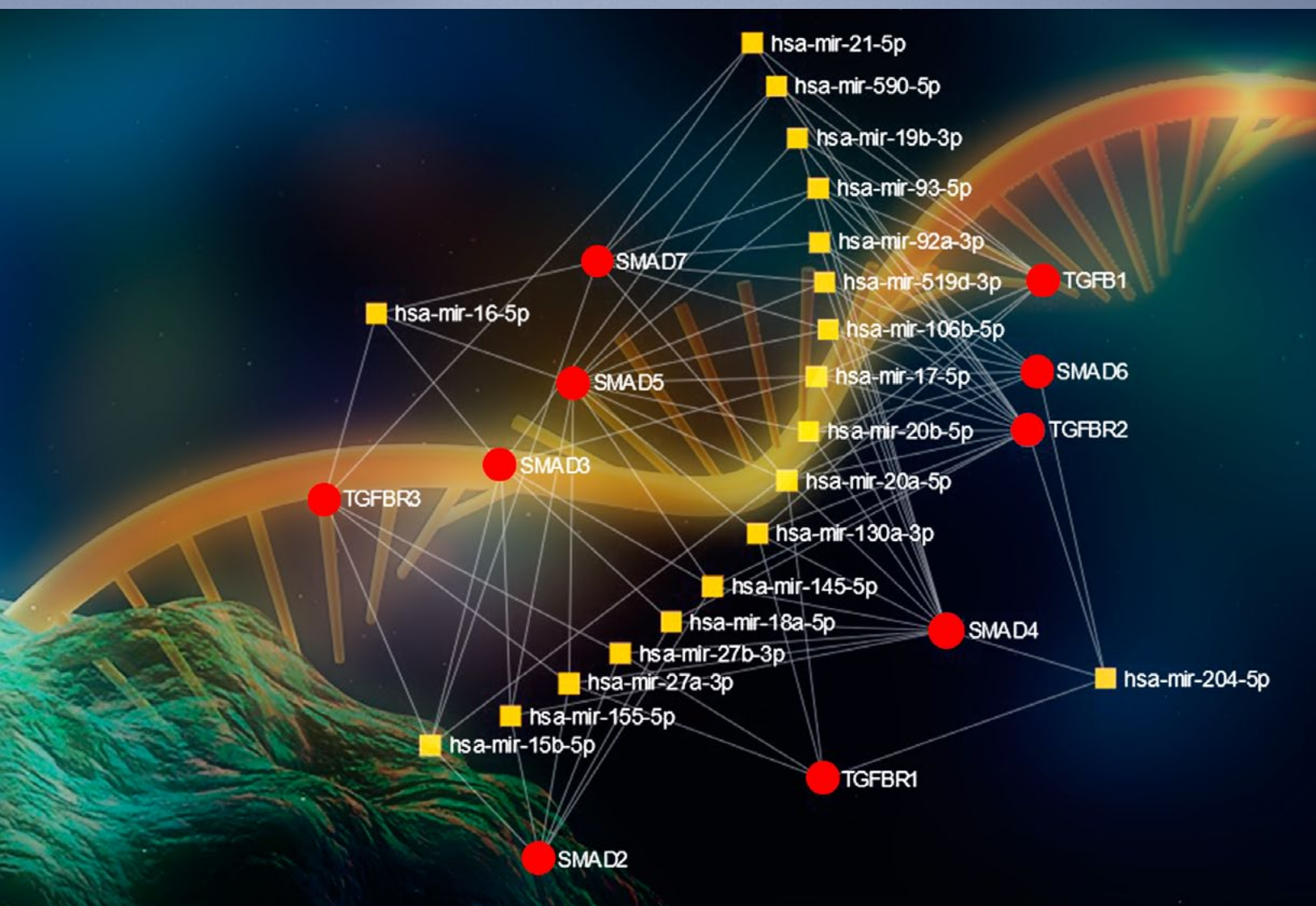


POSTĘPY POLSKIEJ MEDYCYNY I FARMACJI

Zeszyty Naukowej Fundacji Polpharmy



NAUKOWA
FUNDACJA
POLPHARMY



NAUKOWA
FUNDACJA
POLPHARMY

Naukowa Fundacja Polpharmy jest jedną z największych w kraju organizacji finansujących projekty badawcze realizowane przez polskich naukowców.

Została założona w 2001 r. przez Zakłady Farmaceutyczne Polpharma SA.

Misją Fundacji jest wspieranie rozwoju nauk farmaceutycznych i medycznych poprzez finansowanie badań naukowych w tych dziedzinach.

Pomagamy ludziom nauki

667 projektów prac badawczych
zostało zgłoszonych do oceny
w 18 edycjach konkursu Fundacji

57 stypendiów naukowych przyznała Fundacja
doktorantom uczelni medycznych o łącznej
wartości 570 000 zł

75 zespołów badawczych
otrzymało granty
o łącznej wartości 22 896 982 zł

7 tomów zeszytów
„Postępy Polskiej Medycyny i Farmacji”
wydała już Naukowa Fundacja Polpharmy

61 prac
zostało
zrealizowanych

70 nagród ufundowała Fundacja
dla zwycięzców ogólnopolskich konkursów
prac magisterskich z dziedziny farmacji



POSTĘPY POLSKIEJ MEDYCYNY I FARMACJI

ADVANCES IN POLISH MEDICINE
AND PHARMACOLOGICAL SCIENCES

Tom 7, 2020



NAUKOWA
FUNDACJA
POLPHARMY

WARSZAWA 2020

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

Editor-in-Chief, Chairman of the Editorial Board • Redaktor Naczelny, Przewodniczący Rady Naukowej PPMiF
prof. dr hab. n. med. Zbigniew Gaciong, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Associate Editor • Kolegium redakcyjne
Bożenna Płatos, Naukowa Fundacja Polpharmy, Warszawa

Chairman of the Scientific Council • Przewodniczący Rady Naukowej Naukowej Fundacji Polpharmy
prof. dr hab. Kazimierz Roszkowski-Śliż, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa

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 Płażnik
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. Jacek Rożniecki
prof. dr hab. Jacek Spławski
prof. dr hab. Cezary Szczylik
prof. dr hab. Marian Zembala

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

Associate Editor • Kolegium Redakcyjne
Bożenna Płatos
bozena.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

Board Member • Członek Zarządu
dr Beata Kamosińska

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

ISSN 1234-5678

rocznik

Indeksowane w: Index Copernicus Journals Master List

500 egz.

Grafika na okładce pochodzi z pracy dr hab. Joanny Bogusławskiej pt.: „Interakcje między szlakiem sygnałowym TGF-β1 a cząsteczkami mikroRNA w raku nerki”.

© 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

- 8 Słowo wstępne**
Editorial
Zbigniew Gaciong
- 11 Wybrane intrygujące formy leczenia przewlekłej niewydolności serca**
– dane z międzynarodowych rejestrów obserwacyjnych
Selected intriguing forms of treatment for chronic heart failure
– data from international observational registries
Krzysztof Ozierański
- 17 TLR-y i IFN-y w patogenezie i obrazie klinicznym układowych chorób tkanki łącznej**
The TLRs and IFNs in patients with connective tissue diseases
Agnieszka Paradowska-Gorycka, Anna Wajda, Barbara Stypińska, Ewa Walczuk, Marcela Walczyk, Anna Felis-Giemza, Jolanta Nałęcz-Janik, Aleksandra Poluch, Marzena Olesińska
- 27 Rola śródbłónka w wybranych chorobach układu sercowo-naczyniowego**
The role of the endothelium in selected diseases of the cardiovascular system
Michał Peller, Paweł Balsam, Marcin Grabowski, Grzegorz Opolski
- 32 Interakcje między szlakiem sygnałowym TGF- β 1 a cząsteczkami mikroRNA w raku nerki**
Crosstalk between TGF- β 1 signalling pathway and microRNAs in renal cancer
Joanna Bogusławska
- 46 Profilowanie metabolomiczne ostrych powikłań cukrzycy typu 1 u dzieci**
Metabolomic profiling of acute diabetes complications in children with type 1 diabetes mellitus
Beata Małachowska, Wojciech Fendler



Słowo wstępne

Prof. dr hab. n. med. Zbigniew Gaciong

Przewodniczący Rady Naukowej

Postępów Polskiej Medycyny i Farmacji,

Redaktor Naczelny

Szanowani Państwo,

trafia do Was kolejny – tym razem już siódmy – tom POSTĘPÓW POLSKIEJ MEDYCYNY I FARMACJI, który zawiera publikacje powstałe w wyniku realizacji projektów naukowych finansowanych przez Naukową Fundację Polpharmy.

Od 14 lat Fundacja wspiera najzdolniejszych młodych badaczy stypendiami dla doktorantów. W numerze znalazły się trzy publikacje, które powstały w trakcie realizacji programu dla doktorantów. W VI edycji konkursu laureatką została dr Beata Małachowska z Zakładu Biostatystyki i Medycyny Translantacyjnej, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Doktorantka zastosowała analizę metaboliczną próbek krwi pobranych od dzieci z cukrzycą typu 1, które przebyły powikłania metaboliczne, takie jak kwasica cukrzycowa czy ciężka hipoglikemia. Wyniki wskazują, że pomimo ustąpienia objawów klinicznych i odwrócenia zaburzeń równowagi kwasowo-zasadowej i hipoglikemii, pozostaje trwałe piętno metaboliczne.

Również w tej edycji stypendium otrzymał dr Michał Peller z Katedry i Kliniki Kardiologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Jego badania dotyczyły dysfunkcji śródbłónka w wybranych zespołach chorobowych. Wartość uzyskanych wyników podnosi fakt, że Autor posługiwał się zarówno nową metodą oceny czynnościowej, jak i pomiarem stężenia wybranych biomarkerów śródbłonkowych. Wyniki posiadają duże znacze-

nie praktyczne, pozwalając identyfikować grupy chorych o szczególnie wysokim ryzyku sercowo-naczyniowym.

Z tej samej jednostki pochodzi kolejny laureat konkursu dla doktorantów – dr Krzysztof Ozierański – który analizował dostępne międzynarodowe rejestry pacjentów z niewydolnością serca, starając się ocenić intrygujące – jak je określił – formy terapii. Według słownika języka polskiego oznacza to metody wzbudzające zainteresowanie i rzeczywistość analiza dr Ozierańskiego odnosi się do bardzo dyskutowanej obecnie kwestii różnic pomiędzy lekami moczopędnymi. Tych, których intryguje różnica pomiędzy furosemidem i torasemidem – odsyłam do artykułu w numerze. Warto podkreślić, że dr Krzysztof Ozierański otrzymał stypendium w roku 2019, a zdążył już obronić pracę doktorską, której wyniki ukazały się w 3 publikacjach zamieszczonych w pismach o zasięgu międzynarodowym.

Od roku 2002 Fundacja ogłasza corocznie konkurs na najlepsze projekty badawcze w dziedzinie nauk farmaceutycznych i medycznych. W roku 2015 jednym z laureatów została dr n. med. Agnieszka Paradowska-Gorycka, której projekt dotyczył znaczenia ścieżki sygnałowej związanej z receptorami Toll-podobnymi oraz interferonami (TLR-IFN) w patogenezie i obrazie klinicznym mieszanej choroby tkanki łącznej. Wyniki zbliżają do poznania

istoty choroby i różnorodności jej obrazu klinicznego oraz dają podstawy do poszukiwania nowych form terapii.

Laureatką XV edycji w roku 2016 została dr n. med. Joanna Bogusławska z Zakładu Biochemii i Biologii Molekularnej CMKP w Warszawie. Dr Bogusławska badała niekodujące, krążące cząsteczki mikroRNA (miRNA), które regulują czynność około 60% genów u człowieka, a ich zaburzenia wykryto w szeregu nowotworów. Autorka wykazała, że w raku nerki dochodzi do zaburzeń oddziaływania pomiędzy

miRNA a genami szlaku sygnałowego związanego z transformującym czynnikiem wzrostu (TGF- β). Jej wyniki mogą tłumaczyć „paradoks TGF- β ”, która to cząsteczka hamuje rozwój nowotworu na wczesnym etapie, nasilając jego progresję w postaci zaawansowanej. Ta przemiana może wiązać się z odmienną regulacją przez miRNA, co stwarza szansę na opracowanie nowych metod leczenia raka nerki.

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



Wybrane intrygujące formy leczenia przewlekłej niewydolności serca – dane z międzynarodowych rejestrów obserwacyjnych

Selected intriguing forms of treatment for chronic heart failure – data from international observational registries

Krzysztof Ozierański

I Katedra i Klinika Kardiologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa, Polska

Streszczenie

W prezentowanej pracy zebrano wyniki trzech publikacji, powstałych na podstawie prospektywnych, międzynarodowych rejestrów obserwacyjnych pacjentów z niewydolnością serca (HF) – *Heart Failure Pilot*, *Heart Failure Long-Term* oraz *QUALIFY – The quality of adherence to guideline recommendations for life-saving treatment in heart failure*. Celem analiz była ocena wpływu beta-adrenolityków na rokowanie w grupie pacjentów z HF i towarzyszącym migotaniem przedsionków, porównanie efektywności furosemidu i torasemidu w grupie pacjentów z HF oraz próba oceny adherencji lekarzy w Polsce do europejskich rekomendacji.

Do analizy oceniającej wpływ beta-adrenolityków włączono 797 pacjentów. Pacjenci przyjmujący beta-adrenolityk w porównaniu do osób bez beta-adrenolityku rzadziej osiągnęli pierwszorzędowy (zgon z jakiegokolwiek przyczyny; 10,9% vs 25,6%, $p = 0,001$) i drugorzędowy (zgon z jakiegokolwiek przyczyny lub hospitalizacja z powodu HF; 30,6% vs 44,2%, $p = 0,02$) punkt końcowy. Brak przyjmowania beta-adrenolityku był niezależnym predyktorem jedynie pierwszorzędowego punktu końcowego (HR 0,52; 95%CI, 0,31–0,89; $p = 0,02$). Oba punkty końcowe najrzadziej obserwowano w grupie z częstotliwością rytmu serca 80–109/min.

W grupie 1440 pacjentów z HF wykazano, że pacjenci w leczeniu torasemidem, w porównaniu do furosemidu, rzadziej doświadczali drugorzędowego (zgon z jakiegokolwiek przyczyny lub hospitalizacja z powodu HF; 26,4% vs 34,7%; $p = 0,04$), ale nie pierwszorzędowego (zgon z jakiegokolwiek przyczyny; 9,8% vs 14,1%; $p = 0,13$) punktu końcowego. U pacjentów leczonych furosemidem odnotowano nasilone objawy HF w klasie NYHA po roku ($p = 0,04$). Przeanalizowano również adherencję lekarzy w Polsce do wytycznych leczenia HF. W analizie 209 ambulatoryjnych pacjentów z HF z obniżoną frakcją wyrzutową lewej komory wykazano satysfakcjonujący wynik adherencji do rekomendowanej terapii HF w 72% przypadków.

Słowa kluczowe: niewydolność serca, beta-adrenolityki, diuretyki pętlowe, adherencja, rejestr, furosemid, torasemid

Wpłynęło: 6-11-2019

Zaakceptowano: 6-12-2019

Opublikowano: 29-05-2020

DOI: 10.5604/01.3001.0014.1582

Adres do korespondencji

dr n. med. Krzysztof Ozierański
I Katedra i Klinika Kardiologii,
Uniwersyteckie Centrum Kliniczne,
Warszawski Uniwersytet Medyczny,
ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa,
Polska,
e-mail: krzysztof.ozieranski@gmail.com

Abstract

The presented paper gathers the results of three publications based on prospective, international, observation registries of patients with heart failure (HF) – *HF Pilot*, *HF Long-Term* and *QUALIFY – The quality of adherence to guideline recommendations for life-saving treatment in heart failure*. The aim of the analysis was to assess the effect of beta-bloc-

kers on prognosis in HF with associated atrial fibrillation; to compare the effectiveness of furosemide and torasemide in HF; and to assess the adherence of physicians in Poland to European recommendations.

797 patients were included in the analysis assessing the effects of beta-blockers. Patients with a beta blocker compared to those without were less likely to achieve primary (all-cause death; 10.9% vs 25.6%, $p = 0.001$) and secondary (all-cause death or HF hospitalization; 30.6% vs 44.2%, $p = 0.02$) endpoints. Beta-blocker was an independent predictor of only the primary endpoint (HR 0.52; 95% CI, 0.31–0.89; $p = 0.02$). Both endpoints were least frequently observed in the group with a heart rate of 80–109/min.

In the group of 1440 patients with HF, it was shown that patients treated with torasemide compared to furosemide were less likely to experience secondary (death from any cause or HF hospitalization; 26.4% vs 34.7%; $p = 0.04$), but not primary (death from any cause; 9.8% vs 14.1%; $p = 0.13$) endpoint. Patients treated with furosemide also had a greater severity of HF symptoms in NYHA class ($p = 0.04$).

Adherence of physicians in Poland to HF treatment guidelines was also analyzed. An analysis of 209 HF outpatients with reduced left ventricular ejection fraction showed a satisfactory adherence to the recommended HF therapy in 72% of cases.

Keywords: heart failure, beta-blockers, loop diuretics, adherence, registry, furosemide, torasemide

WPROWADZENIE

Niewydolność serca (HF) jest poważnym problemem ze względu na przewlekły przebieg, a wzrastająca liczba pacjentów z HF w Polsce sięga miliona osób w populacji ogólnej oraz ponad 10% wśród osób w wieku ≥ 70 lat [1, 2]. Zdekompensowana HF jest najczęstszą przyczyną hospitalizacji dorosłych w Polsce, przy czym nawet do 50% pacjentów z HF jest ponownie hospitalizowanych z powodu zaostrzenia HF w ciągu 6 miesięcy od wypisu ze szpitala [3, 4], a 5-letnia śmiertelność w HF wynosi 50% [5]. Stąd leczenie HF generuje ogromne koszty dla systemu ochrony zdrowia i pacjentów [1, 6]. Z danych Narodowego Funduszu Zdrowia wynika, że wydatki związane z hospitalizacjami z powodu HF pochłaniają ponad 700 mln zł rocznie i przekraczają 94% budżetu przeznaczonego na leczenie HF [1, 6].

Aktualne trendy dotyczące kompleksowej terapii HF koncentrują się wokół kilku intrygujących zagadnień, takich jak udoskonalenie leczenia HF poprzez optymalizację dostępnej farmakoterapii czy poprawę adherencji lekarzy do europejskich wytycznych terapii HF [2, 5, 7].

W prezentowanej pracy zebrano wyniki trzech publikacji powstałych na podstawie danych pochodzących

z prospektywnych, międzynarodowych rejestrów obserwacyjnych pacjentów z HF – *Heart Failure Pilot*, *Heart Failure Long-Term* oraz *QUALIFY – The quality of adherence to guideline recommendations for life-saving treatment in heart failure*. Analizy dotyczyły próby oceny adherencji lekarzy w Polsce do europejskich rekomendacji oraz oceny wybranych form terapii HF. Szczególny nacisk położono na porównanie skuteczności leczenia pacjentów z HF za pomocą furosemidu lub torasemidu oraz wpływu stosowania beta-adrenolityków na rokowanie w grupie pacjentów z HF i towarzyszącym migotaniem przedsionków.

Beta-adrenolityki w leczeniu pacjentów z HF i migotaniem przedsionków

Beta-adrenolityki obok inhibitorów konwertazy angiotensyny, ze względu na redukcję ryzyka hospitalizacji z powodu HF i zgonu, należą do tzw. leczenia pierwszego rzutu u pacjentów z przewlekłą niewydolnością serca z obniżoną frakcją wyrzutową lewej komory (HF-rEF) [2], jednak pomimo tak istotnych zalet wciąż pojawiają się kontrowersje dotyczące ich skuteczności w podgrupie pacjentów z HF z towarzyszącym migotaniem przedsionków. W badaniach klinicznych z beta-adrenolitykami większość uczestniczących pacjentów posiadało rytm zato-

kowy, a zaledwie 11–35% pacjentów uwzględnionych w tych badaniach miało rozpoznane migotanie przedsionków [8–11]. Co więcej, analizy publikowane w ostatnim czasie prezentują istotnie odmienne wnioski. Metaanaliza dziesięciu randomizowanych badań klinicznych nie wykazała korzyści w długoterminowym rokowaniu podczas terapii beta-adrenolitykami u pacjentów z HF-rEF i towarzyszącym migotaniem przedsionków [12]. W przeciwieństwie do wspomnianej metaanalizy, duży ogólnokrajowy rejestr szwedzki [13] i analiza *post-hoc* badania AF-CHF [14] dowiodły znaczącego spadku śmiertelności ze wszystkich przyczyn w grupie pacjentów z HF i migotaniem przedsionków leczonych beta-adrenolitykami (odpowiednio zmniejszenie ryzyka względnie o 25 i 28%).

Kolejnym ważnym zagadnieniem, które także aktualnie jest poddawane licznym dyskusjom, jest docelowa spoczynkowa częstotliwość rytmu serca u pacjentów z HF i towarzyszącym migotaniem przedsionków. Zaobserwowano, że częstotliwość rytmu komór serca poniżej 70. uderzeń na minutę może być związana z gorszym rokowaniem pacjentów z HF i migotaniem przedsionków [15]. Aktualne zalecenia ESC dotyczące terapii HF i migotania przedsionków są rozbieżne w kontekście optymalnej częstotliwości rytmu serca. Wytyczne HF, jako cel terapii kontrolującej częstotliwość rytmu komór u pacjentów z HF i migotaniem przedsionków, sugerują zakres 60–100 uderzeń na minutę, podczas gdy wytyczne ESC dotyczące migotania przedsionków proponują mniej rygorystyczny próg <110 uderzeń na minutę (oraz jednocześnie unikanie bradykardii) [2, 16].

W pracy Ozierańskiego K. i wsp. przeanalizowano dane 2019 pacjentów zrekrutowanych do dwóch rejestrów HF ESC (*Heart Failure Pilot* oraz *Heart Failure Long-Term*), z których 797 osób miało zdiagnozowane migotanie przedsionków [17]. Następnie tych pacjentów przydzielono do dwóch grup w zależności od tego, czy otrzymywali leczenie beta-adrenolitykiem (89,7%), czy nie (10,3%). Ci nieotrzymujący beta-adrenolityku, w porównaniu do osób stosujących beta-adrenolityk, byli starsi; rzadziej byli płci męskiej; mieli wyższą frakcję wyrzutową lewej komory; częściej etiologią HF była choroba wieńcowa; nierzadko w wywiadzie cierpieli na przewlekłą obturacyjną chorobę płuc; mieli niższe stężenie hemoglobiny; rzadziej otrzymywali antagonistów receptora mineralokortykoidowego, doustne leki przeciwkrzepliwe, statyny oraz mniej z nich miało w przeszłości implantowany kardiowerter defibrylator. Okazało się, że pacjenci otrzymujący beta-adrenolityk rzadziej osiągnęli pierwszorzędkowy (zgon z jakiegokolwiek przyczyny; 10,9% vs 25,6%, $P = 0,001$) i drugorzędo-

wy (zgon z jakiegokolwiek przyczyny lub hospitalizacja z powodu HF; 30,6% vs 44,2%, $P = 0,02$) punkt końcowy w porównaniu do osób bez beta-adrenolityku. Brak przyjmowania beta-adrenolityku był także predyktorem obu punktów końcowych w analizie jednoczynnikowej, natomiast w analizie wieloczynnikowej istotność została zachowana tylko dla pierwszorzędkowego punktu końcowego (*hazard ratio* dla stosowania beta-adrenolityku, 0,52; 95% przedział ufności, 0,31–0,89; $P = 0,02$). Dodatkowo w pracy porównano roczne rokowanie pacjentów w zależności od spoczynkowej częstotliwości rytmu serca (poniżej 80/min., 80–109/min. oraz 110 lub więcej uderzeń na minutę). Oba punkty końcowe występowały najczęściej w grupie z najwyższą częstotliwością rytmu serca, podczas gdy najmniej zdarzeń obserwowano w grupie ze spoczynkową częstotliwością rytmu serca w zakresie 80–109/min.

Wyniki tej analizy wpisują się w aktualne trendy publikacyjne i wydają się potwierdzać wcześniejsze obawy, że beta-adrenolityki nie zmniejszają istotnie ryzyka hospitalizacji z powodu zaostrzenia HF w grupie pacjentów z HF i towarzyszącym migotaniem przedsionków. Jednak ich zastosowanie w tej grupie pacjentów wciąż powinno być rekomendowane ze względu na redukcję ryzyka zgonu. Optymalną spoczynkową częstotliwością rytmu serca w grupie pacjentów z HF i migotaniem przedsionków wydaje się zakres 80–109 uderzeń na minutę, podczas gdy wyższa częstość wiąże się z gorszym rokowaniem.

Diuretyki pętlowe w leczeniu objawowej HF

Powszechną wiedzą jest, że odpowiednie zapobieganie retencji płynów za pomocą leczenia diuretycznego może zmniejszyć ryzyko wystąpienia zaostrzenia HF [18]. Mimo to nawet 50% pacjentów z HF wymaga ponownej hospitalizacji z powodu zaostrzenia objawów choroby w ciągu 6 miesięcy od wypisu ze szpitala, co świadczy o potrzebie poprawy opieki ambulatoryjnej, w tym leczenia objawowego [2]. Obecne zalecenia nie podkreślają jednak wyższości żadnego z dostępnych diuretyków [2], natomiast zdecydowanie najczęściej stosowanym diuretykiem pętlowym jest furosemid [19]. Wiadomo jednak, że furosemid jest lekiem szybko i krótko działającym, stąd może prowadzić do zaburzeń elektrolitowych i wiązać się z niekorzystnym rokowaniem [20]. Nowe badania dotyczące innego diuretyku pętlowego – torasemidu – są zachęcające i sugerują szereg korzystnych następstw jego działania, w tym redukcję objawów oraz potencjalny spadek ryzyka zgonu i hospitalizacji z powodu zaostrzenia HF [21, 22]. Torasemid wykazuje także korzystny wpływ na układ renina-angiotensyna-aldosteron oraz redukuje włók-

nienie i przebudowę lewej komory serca [23–25], w czym upatruje się jego potencjalnych zalet w stosunku do furosemidu.

W publikacji powstałej w oparciu o polskie dane z dwóch prospektywnych, międzynarodowych rejestrów ESC (*Heart Failure Pilot* oraz *Heart Failure Long-Term*) Ozierański K. i wsp. przeanalizowali 2019 polskich pacjentów [26]. W ostatecznej analizie uwzględniono 1440 pacjentów leczonych furosemidem lub torasemidem. Główna analiza została przeprowadzona na grupach pacjentów dobranych pod względem charakterystyki klinicznej za pomocą metody *propensity score matching*, aby wyeliminować potencjalny wpływ innych zmiennych na końcowy wynik. Pacjenci leczeni torasemidem rzadziej osiągnęli drugorzędowy punkt końcowy (zgon z jakiegokolwiek przyczyny lub byli hospitalizowani z powodu HF; 26,4%) niż pacjenci w grupie otrzymującej furosemid (34,7%; $p = 0,04$). Nie zaobserwowano różnic pomiędzy obiema grupami pod względem częstotliwości występowania pierwszorzędnego punktu końcowego (zgon z jakiegokolwiek przyczyny; 9,8% vs 14,1%; $p = 0,13$, odpowiednio w grupie torasemidu i furosemidu). Pierwszorzędnym i drugorzędnym punktem końcowym najczęściej (odpowiednio 23,9% oraz 59,2%) obserwowano w grupie pacjentów przyjmujących jednocześnie furosemid i torasemid. Po roku obserwacji w grupie leczonej furosemidem obserwowano także większe nasilenie objawów HF w klasie NYHA w porównaniu do osób leczonych furosemidem ($p = 0,04$). Szczególne korzyści ze stosowania torasemidu obserwowano w subpopulacjach pacjentów z HF o etiologii kardiomiopatii rozstrzeniowej oraz u pacjentów w młodszym wieku (poniżej 65. roku życia). Wyniki tej pracy wpisują się w aktualne trendy badań naukowych nad optymalnym wyborem diuretyków. Obecne wytyczne leczenia HF, pomimo kilku dekad doświadczeń ze stosowania diuretyków, nie podkreślają wyższości żadnego z leków moczopędnych. Dostępne raporty są zachęcające i sugerują korzystniejsze działanie torasemidu w stosunku do furosemidu. Wyniki prezentowanej pracy sugerują także, że torasemid może mieć korzystny wpływ na objawy HF i rokowanie pacjentów z HF, szczególnie młodszych pacjentów, lub z kardiomiopatią rozstrzeniową, ale wymaga to dalszych analiz w prospektywnych randomizowanych badaniach klinicznych.

Przestrzeganie wytycznych leczenia HF

Opublikowane niedawno światowe wyniki międzynarodowego, prospektywnego, obserwacyjnego rejestru QUALIFY, obejmującego ambulatoryjnych pa-

cientów z HF, pokazują względnie satysfakcjonujące przestrzeganie rekomendacji ESC dotyczących farmakoterapii HF [7]. Na podstawie danych z rejestru QUALIFY można wnioskować, że głównym wyzwaniem pozostaje nadal osiągnięcie docelowej dawki danego leku [7]. W badanej populacji odsetek pacjentów przyjmujących odpowiednią dawkę leków był w większości bardzo niski (14,8% dla leków beta-adrenolitycznych, 6,9% dla antagonistów receptora angiotensyny, 26,6% dla iwabradyny, 27,9% dla inhibitorów konwertazy angiotensyny oraz 70,7% dla antagonistów receptora mineralokortykoidowego) [7]. Wciąż nie są jednak znane dane dotyczące przestrzegania zaleceń terapii HF w Polsce, stąd próbę ich oceny przedstawiono w niniejszej pracy. Tego rodzaju dane są bardzo pożądane ze względu na ewentualną potrzebę poprawy świadomości lekarzy o potrzebie intensyfikacji terapii HF oraz wdrożenia działań poprawiających odpowiednie prowadzenie terapii HF w warunkach ambulatoryjnych, co może w znaczący sposób przełożyć się na przebieg choroby oraz ilość jej zaostrzeń prowadzących do licznych hospitalizacji. Na podstawie analiz przeprowadzonych na badanej populacji oszacowano poziom adherencji do wytycznych leczenia HF w polskiej grupie.

Do badania QUALIFY w Polsce włączono 209 ambulatoryjnych pacjentów z HF-rEF, którzy byli hospitalizowani z powodu zaostrzenia HF w ciągu ostatnich 1–15 miesięcy. Analiza przeprowadzona przez Opolskiego G. i wsp. wykazała satysfakcjonujące zastosowanie leków zalecanych przez wytyczne, jednak w zbyt niskich dawkach [27]. Średni wiek badanej grupy wynosił 67,4 ($\pm 10,9$) lat, a 77% stanowili mężczyźni. Prawie 92% pacjentów otrzymywało inhibitor konwertazy angiotensyny lub bloker receptora angiotensyny, jednak odpowiednio zaledwie 27,4% i 4,0% z nich otrzymywało lek w dawce docelowej. Około 97% pacjentów miało przepisany beta-adrenolityk, a zaledwie 17,7% osiągnęło właściwą dawkę leku. Antagonistę receptora mineralokortykoidowego otrzymywało 73,2% osób, z których większość (66%) otrzymywało dawkę docelową. Iwabradynę przyjmowało 14% pacjentów, przy czym zaledwie 13,8% z nich w dawce docelowej. Przedstawiony w badaniu tzw. *adherence score* (obliczany na podstawie stosowania podstawowych leków w terapii HF, jak: inhibitory konwertazy angiotensyny, blokery receptora angiotensyny, beta-adrenolityki, antagoniści receptora mineralokortykoidowego oraz iwabradyna) był dobry u 72% pacjentów, umiarkowany u 24% i słaby u 4%. Otrzymane wyniki sugerują, że w Polsce istnieje potrzeba poprawy adherencji do wytycznych leczenia HF, szczególnie w warunkach ambulatoryjnych, co może przełożyć się na poprawę rokowania pacjen-

tów. Takie postępowanie jest kolejnym krokiem w optymalizacji procesu leczenia HF.

PODSUMOWANIE

Podsumowując, przedstawione wyniki opierają się na danych z 3 dużych, międzynarodowych, prospektywnych rejestrów obserwacyjnych o uznanej metodologii, co pozwoliło na ocenę wybranych form terapii pacjentów z HF oraz próbę analizy adherencji do leczenia HF w polskiej grupie. Dzięki obserwacyjnemu i prospektywnemu charakterowi powyższych rejestrów, w odróżnieniu od randomizowanych badań klinicznych, możliwa była analiza niewyselekcjonowanej grupy pacjentów spotykanej w ambulatoryjnej i szpitalnej praktyce klinicznej. Zaobserwowano pozytywny wpływ beta-adrenolityków na roczne przeżycie, przy braku wpływu na drugorzędowy punkt końcowy (zgon z jakiegokolwiek przyczyny lub hospitalizacja z powodu zaostrzenia HF) pacjentów z HF i towarzyszącym migotaniem przedsionków. Podjęto również próbę określenia optymalnej spoczynkowej częstotliwości rytmu serca w tej grupie pacjentów, która wynosiła 80–109 uderzeń na minutę. Przeprowadzona analiza wykazała również korzystne działanie torasemidu w porównaniu z furosemidem na roczne rokowanie i nasilenie objawów w grupie pacjentów z HF. Ponadto wyniki analiz wykazały satysfakcjonujący poziom adherencji do wytycznych leczenia HF w Polsce, a jednocześnie dowiodły potrzebę dalszych starań w kierunku optymalizacji terapii HF poprzez osiąganie docelowych dawek leków poprawiających rokowanie pacjentów z HF.

FINANSOWANIE

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

PIŚMIENNICTWO

- Gierczyński J., Gryglewicz J., Karczewicz E., Zalewska H. redd. Niewydolność serca – analiza kosztów ekonomicznych i społecznych. Warszawa: Uczelnia Łazarskiego; 2013.
- McMurray J.J., Adamopoulos S., Anker S.D. et al.: ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J*, 2012; 33: 1787–847.
- Czech M., Opolski G., Zdrojewski T. et al.: The costs of heart failure in Poland from the public payer's perspective. Polish programme assessing diagnostic procedures, treatment and costs in patients with heart failure in randomly selected outpatient clinics and hospitals at different levels of care: POLKARD. *Kardiologia Pol.*, 2013; 71: 224–232.
- Desai A.S., Stevenson L.W.: Rehospitalization for heart failure: predict or prevent? *Circulation*, 2012; 126: 501–506.

PODZIĘKOWANIA

Serdecznie dziękuję mojemu promotorowi Panu Profesorowi Grzegorzowi Opolskiemu za życzliwość, codzienne wsparcie, za to, że drzwi do gabinetu Pana Profesora zawsze były dla mnie otwarte pomimo ogromu obowiązków, a także za przekazanie wzoru pracy naukowca, w szczególności klinicysty.

Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską lek. Krzysztofa Ozierańskiego pt. „Terapia niewydolności serca w Polsce na podstawie międzynarodowych rejestrów obserwacyjnych” (promotor: Prof. dr hab. n. med. Grzegorz Opolski) oraz podstawę opracowania niniejszego artykułu:

- Ozierański K., Kapłon-Cieślicka A., Balsam P., Tymińska A., Wancerz A., Peller M., Marchel M., Crespo-Leiro M.G., Maggioni A.P., Drożdż J., Filipiak K.J., Opolski G.: Effect of β -blockers on 1-year survival and hospitalizations in patients with heart failure and atrial fibrillation: results from ESC-HF Pilot and ESC-HF Long-Term Registry, *Pol Arch Intern Med.*, 2018; 128: 649–657.
- Ozierański K., Balsam P., Kapłon-Cieślicka A., Tymińska A., Kowalik R., Grabowski M., Peller M., Wancerz A., Marchel M., Crespo-Leiro M.G., Maggioni A.P., Drożdż J., Filipiak K.J., Opolski G.: Comparative Analysis of Long-Term Outcomes of Torasemide and Furosemide in Heart Failure Patients in Heart Failure Registries of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Drugs Ther.*, 2019; 33(1): 77–86.
- Opolski G., Ozierański K., Lelonek M., Balsam P., Wilkins A., Ponikowski P., On Behalf Of The Polish Qualify Investigators: Adherence to the guidelines on the management of systolic heart failure in ambulatory care in Poland. Data from the international QUALIFY survey. *Pol Arch Intern Med.*, 2017; 127: 657–665.

5. Yancy C.W., Jessup M., Bozkurt B. et al.: 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *Circulation*, 2013; 128: 240–327.
6. Narodowy Program Zdrowia na lata 2016–2020. Załącznik do uchwały Prezesa Rady Ministrów, (cytowany 01.01.2019), dostępny pod adresem URL: <http://www.legislacja.gov.pl/do cs//2/12270850/12281779/12281780/dokument164277.pdf>
7. Komajda M., Anker S.D., Cowie M.R. et al.: Physicians' adherence to guideline – recommended medications in heart failure with reduced ejection fraction: data from the QUALIFY global survey. *Eur J Heart Fail.*, 2016; 18: 514–22.
8. Metra M., Mentz R.J., Chiswell K. et al.: Acute heart failure in elderly patients: worse outcomes and differential utility of standard prognostic variables. Insights from the PROTECT trial. *Eur J Heart Fail.*, 2015; 17: 109–118.
9. Flather M.D., Shibata M.C., Coats A.J. et al.: Randomized trial to determine the effect of nebivolol on mortality and cardiovascular hospital admission in elderly patients with heart failure (SENIORS). *Eur Heart J.*, 2005; 26: 215–225.
10. Paulus W.J., Tschöpe C.: A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J Am Coll Cardiol.*, 2013; 62: 263–271.
11. Tsutsui H., Tsuchihashi-Makaya M., Kinugawa S.: Clinical characteristics and outcomes of heart failure with preserved ejection fraction: lessons from epidemiological studies. *J Cardiol.*, 2010; 55: 13–22.
12. Kotecha D., Holmes J., Krum H., Altman D.G., Manzano L., Cleland J.G. et al.: Efficacy of beta blockers in patients with heart failure plus atrial fibrillation: an individual-patient data meta-analysis. *Lancet*, 2014; 384(9961): 2235–43.
13. Nielsen P.B., Larsen T.B., Gorst-Rasmussen A., Skjoth F., Lip G.Y.: Beta-Blockers in Atrial Fibrillation Patients With or Without Heart Failure: Association With Mortality in a Nationwide Cohort Study. *Circ Heart Fail.*, 2016; 9(2): e002597.
14. Cadrin-Tourigny J., Shohoudi A., Roy D., Talajic M., Tadros R., Mondesert B. et al.: Decreased Mortality With Beta-Blockers in Patients With Heart Failure and Coexisting Atrial Fibrillation: An AF-CHF Substudy. *JACC Heart Fail.*, 2017; 5(2): 99–106.
15. Mareev Y., Cleland J.G.: Should beta-blockers be used in patients with heart failure and atrial fibrillation? *Clin Ther.*, 2015; 37(10): 2215–24.
16. Kirchhof P., Benussi S., Kotecha D., Ahlsson A., Atar D., Casadei B. et al.: 2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS. *Europace*, 2016; 18(11): 1609–78.
17. Ozieranski K., Kaplon-Cieslicka A., Balsam P., Tyminska A., Wancierz A., Peller M. et al.: Effect of beta-blockers on 1-year survival and hospitalizations in patients with heart failure and atrial fibrillation: results from ESC-HF Pilot and ESC-HF Long-Term Registry. *Pol Arch Intern Med.*, 2018; 128(11): 649–57.
18. Mueller T.M., Vuckovic K.M., Knox D.A., Williams R.E.: Telemanagement of heart failure: a diuretic treatment algorithm for advanced practice nurses. *Heart Lung.*, 2002; 31: 340–7.
19. Maggioni A.P., Anker S.D., Dahlstrom U., Filippatos G., Ponikowski P., Zannad F., Amir O., Chioncel O., Leiro M.C., Drozd J., Erglis A., Fazlibegovic E., Fonseca C., Fruhwald E., Gatzov P., Goncalvesova E., Hassanein M., Hradec J., Kavoluniene A., Lainscak M., Logeart D., Merkely B., Metra M., Persson H., Seferovic P., Temizhan A., Tousoulis D., Tavazzi L., Heart Failure Association of the ESC.: Are hospitalized or ambulatory patients with heart failure treated in accordance with European Society of Cardiology guidelines? Evidence from 12,440 patients of the ESC Heart Failure Long-Term Registry. *Eur J Heart Fail.*, 2013; 15: 1173–84.
20. Domanski M., Norman J., Pitt B., Haigney M., Hanlon S., Peyster E., Studies of Left Ventricular D.: Diuretic use, progressive heart failure, and death in patients in the Studies Of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol.*, 2003; 42: 705–8.
21. Cosin J., Diez J., TORIC investigators: Torasemide in chronic heart failure: results of the TORIC study. *Eur J Heart Fail.*, 2002; 4: 507–13.
22. Murray M.D., Deer M.M., Ferguson J.A., Dexter P.R., Bennett S.J., Perkins S.M., Smith F.E., Lane K.A., Adams L.D., Tierney W.M., Brater D.C.: Open-label randomized trial of torsemide compared with furosemide therapy for patients with heart failure. *Am J Med.*, 2001; 111: 513–20.
23. Fortuno A., Muniz P., Ravassa S., Rodriguez J.A., Fortuno M.A., Zalba G., Diez J.: Torasemide inhibits angiotensin II-induced vasoconstriction and intracellular calcium increase in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 1999; 34: 138–43.
24. Harada K., Izawa H., Nishizawa T., Hirashiki A., Murase Y., Kobayashi M., Isobe S., Cheng X.W., Noda A., Nagata K., Yokota M., Murohara T.: Beneficial effects of torasemide on systolic wall stress and sympathetic nervous activity in asymptomatic or mildly symptomatic patients with heart failure: comparison with azosemide. *J Cardiovasc Pharmacol.*, 2009; 53: 468–73.
25. Lopez B., Querejeta R., Gonzalez A., Sanchez E., Larman M., Diez J.: Effects of loop diuretics on myocardial fibrosis and collagen type I turnover in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 43: 2028–35.
26. Ozieranski K., Balsam P., Kaplon-Cieslicka A., Tyminska A., Kowalik R., Grabowski M. et al.: Comparative Analysis of Long-Term Outcomes of Torasemide and Furosemide in Heart Failure Patients in Heart Failure Registries of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Drugs Ther.*, 2019; 33(1): 77–86.
27. Opolski G., Ozieranski K., Lelonek M., Balsam P., Wilkins A., Ponikowski P., On Behalf Of The Polish Qualify Investigators: Adherence to the guidelines on the management of systolic heart failure in ambulatory care in Poland. Data from the international QUALIFY survey. *Pol Arch Intern Med.*, 2017; 127(10): 657–65.

TLR-y i IFN-y w patogenezie i obrazie klinicznym układowych chorób tkanki łącznej

The TLRs and IFNs in patients with connective tissue diseases

Agnieszka Paradowska-Gorycka¹, Anna Wajda¹,
Barbara Stypińska¹,
Ewa Walczuk¹, Marcela
Walczyk², Anna
Felis-Giemza², Jolanta
Nałęcz-Janik², Aleksandra
Poluch², Marzena
Olesińska²

¹ Zakład Biologii Molekularnej, Narodowy Instytut Geriatrii, Reumatologii i Rehabilitacji w Warszawie, Warszawa, Polska

² Klinika i Poliklinika Układowych Chorób Tkanki Łącznej, Narodowy Instytut Geriatrii, Reumatologii i Rehabilitacji w Warszawie, Warszawa, Polska

Projekt zrealizowany w ramach grantu Naukowej Fundacji Polpharmy pt. „Genetyczne i epigenetyczne różnice w szlaku sygnalizacyjnym U1-RNP/TLRs/IFN w patogenezie i obrazie klinicznym mieszanej choroby tkanki łącznej (MCTD)”.

Streszczenie

Autoimmunizacyjne choroby tkanki łącznej (ACTD) charakteryzują się spontaniczną stymulacją układu odpornościowego i wytwarzaniem autoprzeciwciał. Niektóre autoprzeciwciała tworzą kompleksy immunologiczne z DNA i/lub RNA, obecne w surowicy chorych na ACTD, promujące zapalenie tkanek, a tym samym rozwój różnych objawów klinicznych choroby. Kompleksy immunologiczne, w których zawarte są kwasy nukleinowe, mogą działać jako ligandy dla endosomalnych receptoriów Toll-podobnych (TLR), których aktywacja indukuje wydzielanie interferonów typu I (IFN-I) oraz typu III. Celem niniejszego projektu było między innymi określenie, czy geny szlaku TLR-IFN mogą być uważane jako potencjalne biomarkery ACTD. Polimorfizmy genu *IFN-A* i *IFN-G* wykazały związek z predyspozycją do rozwoju SLE i MCTD, a polimorfizmy genu *IFN-B* z predyspozycją do rozwoju SLE. Allel TLR7 rs5743305 T oraz allel rs5743316 A mogą pełnić rolę ochronną przed rozwojem MCTD, zaś allel TLR7 rs1731479 T oraz allel TLR8 rs17256081 C mogą być predyktorami rozwoju MCTD w populacji polskiej. Ekspresja mRNA IFN- α , IFN- β , IFN- γ oraz TLR3, TLR8 i TLR7 była znacznie wyższa u pacjentów z SLE w stosunku do pacjentów z MCTD i SSz. U pacjentów MCTD anty-U1-70k (+) stwierdzono wyższy poziom IFN- γ i niższy poziom IFN- β w surowicy niż u pacjentów, u których nie stwierdzono obecności tego przeciwciała. U chorych na SLE IFN- α i IFN- γ korelują ze stężeniem składowych dopełniacza a IFN- α z aktywnością choroby. Chociaż szczegółowa etiopatogeneza ACTD nie jest ustalona, to badania potwierdzają, iż nadmierna aktywacja immunologiczna z udziałem endosomalnych receptorów TLR i IFN- α - β - γ uznawane są za ważny mechanizm patogeny tych schorzeń.

Wpłynęło: 6-11-2019

Zaakceptowano: 6-12-2019

Opublikowano: 29-05-2020

DOI: 10.5604/01.3001.0014.1583

Adres do korespondencji

Agnieszka Paradowska-Gorycka
Zakład Biologii Molekularnej,
Narodowy Instytut Geriatrii,
Reumatologii i Rehabilitacji
w Warszawie, ul. Spartańska 1,
02-637 Warszawa,
e-mail: agnieszka.paradowska-
gorycka@spartanska.pl

Słowa kluczowe: receptory toll-like, interferon, patogeneza, choroby tkanki łącznej

Abstract

Autoimmune connective tissue diseases (ACTD) are characterized by spontaneous stimulation of the immune system and the production

of autoantibodies. Some autoantibodies may create an immune complex with DNA and/or RNA and promote tissue inflammation. Immune complexes that contain nucleic acids can act as ligands for endosomal Toll-like receptors (TLR), which activation induces secretion of the type I and type III interferons. The present study aimed to determine whether TLRs and IFNs genes could be considered as potential ACTD biomarkers. IFN-A and IFN-G showed a relationship with a predisposition to the development of SLE and MCTD, and IFN-B with a predisposition to the development of SLE. The TLR7 rs5743305 T allele and rs5743316 A allele may play a protective role against the development of MCTD, and the TLR7 rs1731479 T allele and TLR8 rs17256081 C allele may be predictors of MCTD development. mRNA expression of the IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TLR3, TLR8 and TLR7 was significantly higher in patients with SLE compared to patients with MCTD and SSc. MCTD patients with anti-U1-70k (+) had higher IFN- γ and lower IFN- β serum levels than patients without this antibody. In patients with SLE, serum levels of IFN- α and IFN- γ correlate with the concentration of complement components, and serum levels of IFN- α with disease activity. The study confirmed that the TLR-IFN pathway may be considered as an important pathogenic mechanism for ACTD.

Keywords: toll-like receptors, interferons, pathogenesis, connective tissue diseases

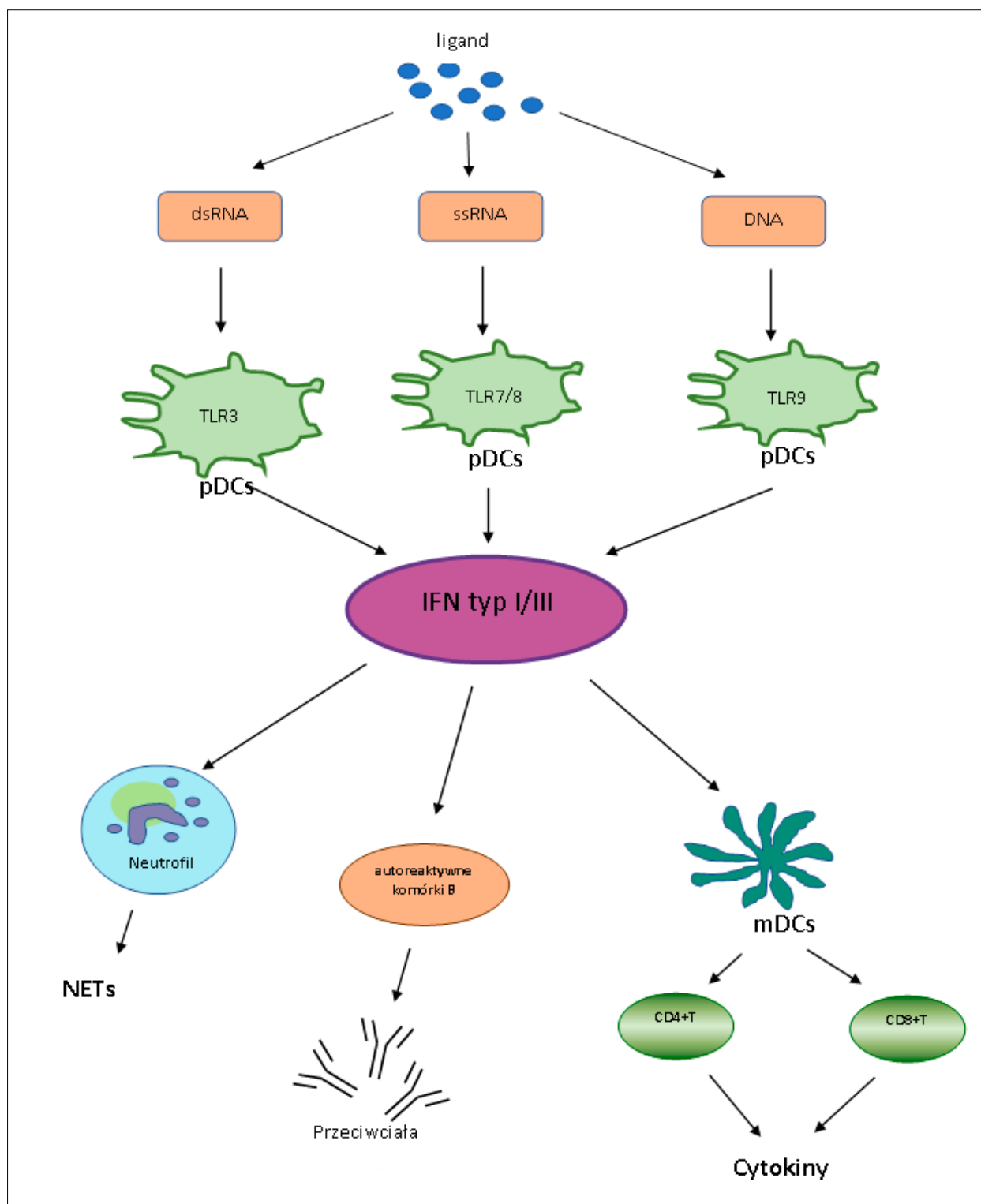
WSTĘP

Autoimmunizacyjne choroby tkanki łącznej (*auto-immune connective tissue diseases*, ACTD) określane są jako układowe choroby tkanki łącznej. Mimo że dotyczą one niewielkiego odsetka populacji ogólnej, to – jako choroby przewlekłe, rozpoczynające się w relatywnie młodym wieku i prowadzące do postępującej niepełnosprawności ruchowej – stanowią ważny problem społeczny i medyczny. Choroby układowe tkanki łącznej obejmują procesem chorobowym liczne narządy i układy w organizmie, co wiąże się z koniecznością wielospecjalistycznego leczenia. Charakter tego typu schorzeń łączy się z wieloma niezwykle uciążliwymi objawami, miewając ciężki przebieg, niekiedy zagrażający życiu. Ponadto osoby cierpiące na ACTD są często wykluczone społecznie, a wynika to z rosnącego stopnia niepełnosprawności. W związku z powyższym, rzetelne badania naukowe są ważne nie tylko dla osób dotkniętych chorobą osób czy ich rodzin, ale również dla całego społeczeństwa.

ACTD charakteryzują się spontaniczną stymulacją układu odpornościowego i wytwarzaniem przeciwciał przeciwko własnym składnikom komórkowym (białka lub kwasy nukleinowe). Klasyczny podział ACTD obejmuje toczeń rumieniowaty układowy (SLE), reumatoidalne zapalenie stawów (RA), twar-

dzinę układową (SSc), zespół Sjögrena (SS) oraz mieszaną chorobę tkanki łącznej (MCTD). ACTD są trudne w diagnozie, która opiera się w dużej mierze na analizie przeciwciał występujących we krwi, uwzględnionych w kryteriach klasyfikacji tych chorób. Najczęstszym schorzeniem tego typu jest RA (występuje u ok. 2% ludzi), a jednym z najrzadszych MCTD (10 przypadków/100 000 ludności) [1–3].

Układowe choroby tkanki łącznej charakteryzują się stymulacją układu odpornościowego poprzez wytwarzanie autoprzeciwciał przeciwko komponentom jądrowym i cytoplazmatycznym [4–6]. Przeciwciała te wytwarzane są przez autoreaktywne komórki B przy współpracy z autoreaktywnymi komórkami T [6]. Ponadto u pacjentów z toczniem rumieniowatym układowym scharakteryzowano populację dojrzałych komórek B, które są naturalnie autoreaktywne, ale utrzymują się w stanie anergicznym. Stan anergiczny jest przejściowy i odwracalny, jeśli komórki otrzymają odpowiednie sygnały komórek pro-T i/lub pro-B lub gdy komórki zostaną usunięte ze środowiska autoreaktywnego [6]. Wśród pacjentów z ACTD bardzo charakterystyczne jest występowanie przeciwciał reaktywnych wobec nukleosomów, dwuniciowego DNA, Ro/SSA, małych jądrowych rybonukleoprotein czy La/SSB. U około 90% pacjentów stwierdza się reaktywność na nukleosomy. Uważa się, że w układowych chorobach tkanki łącznej do-



Ryc. 1. Potencjalna rola endosomalnych TLRów i IFN typu I i typu III w patogenezie ACTD. pDCs – plazmatyczne komórki dendrytyczne, mDCs – dojrzała komórki dendrytyczne, NETs – neutrophil extracellular traps.

chodzi do przerwania tolerancji immunologicznej na białka własne, w tym DNA i inne białka jądrowe. Ponadto liczne badania wskazują, że w podatności do rozwoju i przebiegu ACTD współuczestniczą liczne czynniki genetyczne i środowiskowe [7]. Niektóre autoprzeciwciała tworzą kompleksy immunologiczne z DNA i/lub RNA, obecne w surowicy chorych

na ACTD, promujące zapalenie tkanek, a tym samym rozwój różnych objawów klinicznych choroby. Kompleksy immunologiczne, w których zawarte są kwasy nukleinowe, mogą działać jako ligandy dla endosomalnych receptoriów Toll-podobnych (*Toll-like receptors*, TLRs) [8, 9]. Endosomalne TLR występują głównie na komórkach dendrytycznych, gdzie ich

aktywacja indukuje wydzielanie interferonów typu I (IFN-I) oraz interferonów typu III [10]. Pomimo iż szlaki sygnalizacyjne endosomalnych TLR-ów wykazują niezwykle podobieństwa, to jednak wyniki po aktywacji każdego z nich prowadzą do klinicznie odmiennych fenotypów chorób autoimmunizacyjnych.

Ścieżka TLR-IFN w patogenezie układowych chorób tkanki łącznej

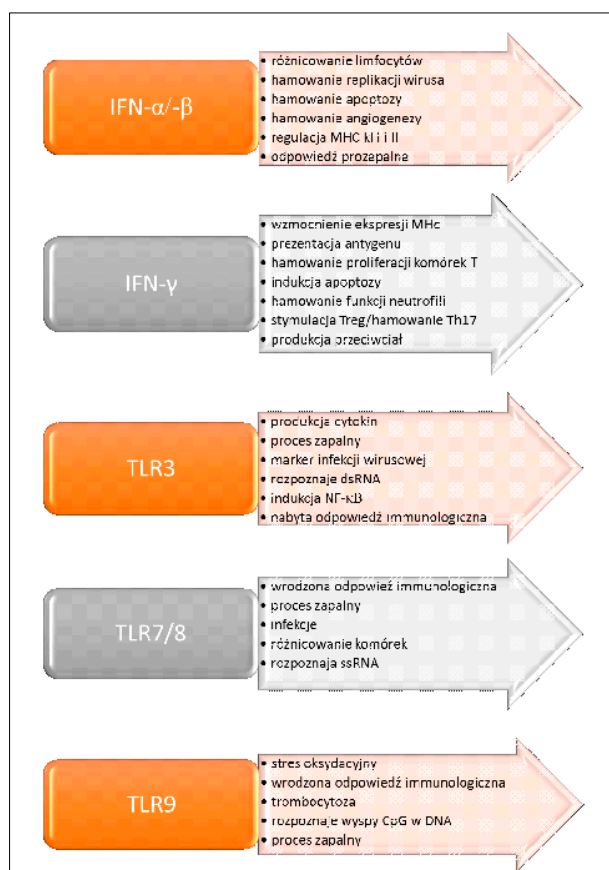
Chociaż patofizjologia ACTD pozostaje nie do końca poznana, wiele badań wskazuje na istotną rolę odporności wrodzonej, a główne geny ryzyka choroby działają w obrębie szlaku interferonu typu I. Badania pokazują, że heterogeniczność w aktywacji szlaku interferonu typu I, interferonu typu II oraz podłoża genetyczne przyczyniają się do niejednorodności klinicznej obserwowanej w poszczególnych jednostkach układowych chorób tkanki łącznej. Biorąc pod uwagę, że szlak interferonu typu I jest głęboko powiązany z patogenezą wielu chorób autoimmunizacyjnych, włączając ACTD. Od wielu lat trwają intensywne badania w celu ustalenia, czy aktywność interferonu typu I i/lub typu II może być predyktorem odpowiedzi na leczenie, czy szlak interferonów może być ukierunkowany na leczenie [11].

Interferony są krytycznymi cytokinami zaangażowanymi w odpowiedź przeciwwirusową. Interferony typu I u ludzi obejmują dwanaście podtypów interferonu- α (IFN α), IFN β , IFN ω , IFN κ i IFN ϵ . Każdy podtyp jest wytwarzany przez poszczególne komórki w odpowiedzi na określone bodźce [11]. Plazmacytoidalne komórki dendrytyczne (pDC) są głównymi producentami IFN- α , podczas gdy komórki takie jak: fibroblasty, komórki nabłonkowe, komórki dendrytyczne, fagocyty i synowocyty wytwarzają IFN- β . Interferony typu I uczestniczą nie tylko w odpowiedzi immunologicznej przeciwko wirusom, ale również mogą przyczyniać się do stanów zapalnych i utraty tolerancji przy rozregulowanej produkcji IFN (Ryc. 1).

IFN- α charakteryzuje się bardzo szerokim zakresem wpływu na układ odpornościowy, włączając regulację ekspresji cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej (MHC) czy aktywację komórek prezentujących antygen. Funkcje te stawiają IFN- α w roli łącznika odporności wrodzonej z nabytą i sugerują, że IFN- α może być krytycznym punktem przy ustalaniu „progów autoimmunizacji” [12]. IFN- β , zwykle wytwarzany przez fibroblasty, ma działanie przeciwwirusowe i antyproliferacyjne. W komórkach odpornościowych (najbardziej prawdopodobny cel działania terapeutycznego IFN- β w stwardnieniu rozsianym) IFN- β hamuje presenta-

cję antygeny oraz proliferację limfocytów T, wpływa na ekspresję cytokin i metaloproteiny (MMP) [13]. Natomiast w obrębie rodziny IFN typu II wyróżnia się tylko IFN- γ , który, w przeciwieństwie do IFN typu I i typu III, pośredniczy w funkcjach prozapalnych i immunomodulujących [14]. IFN- γ został pierwotnie zidentyfikowany jako „czynnik aktywujący makrofagi”, będący głównym fizjologicznym celem działania IFN- γ . Dziś już wiadomo, że IFN- γ ma również istotny wpływ na komórki pomocnicze T (Th), komórki pomocnicze T pęcherzykowe (Tfh), komórki regulatorowe T (Treg) oraz komórki B. IFN- γ jest ważny również dla lokalnego różnicowania monocytów w komórki dendrytyczne i makrofagi, które służą jako główne źródła IL-12 w miejscach infekcji. IFN- γ wykazuje selektywne działanie na komórki B w kontekście autoimmunizacji i wytwarzania autoprzeciwciał; taka selektywność wspiera celowanie terapeutyczne IFN- γ [15].

Wrodzona odpowiedź immunologiczna może być aktywowana przez tak zwane receptory rozpoznawania wzorców (PRR), które wiążą się z cząsteczkami związanymi z czynnikami zakaźnymi (wzorce molekularne związane z patogenem, PAMP) lub składnikami komórkowymi uszkodzonych lub martwych komórek (wzorce molekularne związane z uszkodzeniem, DAMPY) [16]. Wrodzone receptory immunologiczne, w tym receptory TLR, receptory RIG-podobne (RLR), receptory podobne do Nod, są zazwyczaj aktywowane na: makrofagach, komórkach dendrytycznych, komórkach nabłonkowych i komórkach śródbłonna, gdzie zapewniają szybką odpowiedź organizmu, z jednoczesną produkcją cytokin prozapalnych, które z kolei rekrutują i aktywują dodatkowe mediatory odpowiedzi immunologicznej. TLR-y ze względu na lokalizację dzieli się na dwie podrodziny: TLR występujące na powierzchni komórki (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 i TLR10) i TLR wewnątrzkomórkowe zlokalizowane w endosomach (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12 i TLR13) [16]. TLR-y zlokalizowane na powierzchni komórek rozpoznają głównie składniki błon drobnoustrojów, takie jak: lipidy, lipoproteiny czy białka. Natomiast TLR-y endosomalne rozpoznają kwasy nukleinowe pochodzące od bakterii i wirusów, a także „własne” kwasy nukleinowe (*self-nucleic acids*, pochodzące od człowieka) w stanach chorobowych, takich jak autoimmunizacja [10, 11]. Endosomalne TLR-y ulegają ekspresji w komórkach dendrytycznych: TLR3 jest wyrażany na szpikowych komórkach dendrytycznych (MDC) podczas gdy TLR7, -8 i -9 ulegają ekspresji na PDC. Aktywacja tych receptorów prowadzi do aktywacji komórek odpornościowych, w szczególności komórek DC oraz komórek B i T, a także do niewłaściwego wytwarzania



Ryc. 2. Funkcje endosomalnych TLR i IFN-α/-β/-γ w procesie zapalnym.

INF-γ, -α, -β i wielu innych cytokin zapalnych, takich jak: IL-1, IL-6, IL-12 i TNF-α, które mogą być zaangażowane w patogenezę ACTD (Ryc. 2) [4, 17, 18].

Wszystkie te mediatory zapalne przyczyniają się do rozwoju i utrzymania procesu zapalnego poprzez przewlekłą aktywację autoreaktywnych komórek T. Udział IFN-γ w patogenezie ACTD wynika z jego zdolności do częściowego indukowania aktywacji immunologicznej, prowadzącej do indukcji dojrzewania komórek osocza i zwiększaniego wytwarzania autooprzeciwciał. Natomiast IFN-α i IFN-β wydzielane przez wiele typów komórek, w tym: limfocyty, makrofagi fibroblasty, komórki śródbłonna i osteoblasty są bardzo istotnymi cytokinami w ścieżce sygnałowej TLR3 i TLR7. Dlatego też określenie pozytywnych oraz negatywnych regulatorów funkcjonowania interferonów może przyczynić się do lepszego zrozumienia, w jaki sposób organizm wytwarza mechanizmy ochronne przed różnymi infekcjami, wywołanymi patogenami wewnątrzkomórkowymi, jednocześnie ograniczając uszkodzenie tkanek spowodowane przez niepożądane reakcje zapalne [19–21]. Co więcej, stymulacja TLR przez endogenne ligandy ma coraz większy wpływ na początek i rozwój choroby autoimmunologicznej. Ponadto patologia ACTD

zależy również od wytwarzania autooprzeciwciał przez autoreaktywne komórki B, a także prawdopodobnie od wzmożonej produkcji IFN-γ. Oba te procesy są regulowane przez endosomalne TLR, takie jak: TLR3, 7, 8 i 9 [22].

Rola badań genetycznych w patogenezie chorób autoimmunizacyjnych – na tropie biomarkerów

W ciągu ostatnich lat coraz więcej uwagi poświęca się polimorfizmom genetycznym mediatorów zapalenia, które mogą być pomocne w wyjaśnieniu różnic w przebiegu reakcji immunologicznych i zapalnych, a także mogą służyć jako geny podatności dla stanów patologicznych. Co więcej, polimorfizmy stały się standardowymi markerami genetycznymi wykorzystywanymi do poszukiwania alleli sprzężonych z daną jednostką chorobową. Identyfikacja polimorfizmów funkcjonalnych jest ważna nie tylko dla określenia efektu genetycznej zmienności ekspresji i funkcji mediatorów zapalenia, ale również umożliwia ocenę wpływu podłoża genetycznego na choroby autoimmunologiczne. Ponadto odkrywanie i terapeutyczne wykorzystanie genetycznych różnic między jednostkami przybliża nas do medycyny spersonalizowanej i prowadzi do uzyskiwania lepszych wyników w monitorowaniu i leczeniu chorób autoimmunologicznych. Warto zauważyć, że choroby autoimmunologiczne nie mają tej samej patologii lub objawów, ale mają wspólne mechanizmy immunogenetyczne.

Badania asocjacyjne całego genomu (*genome wide-association studies*, GWAS) w SLE czy RA zidentyfikowały szereg genów podatności i loci [23]. Co ciekawe, większość z tych genów wydaje się zaangażowana w podobne i/lub pokrewne szlaki biologiczne, w tym produkcję IFN typu I czy transdukcję sygnału immunologicznego [24, 25]. Do tej pory nie opublikowano GWAS dla MCTD. Fakt, że MCTD jest rzadką, złożoną chorobą, rekrutacja odpowiednio dużej liczby pacjentów jest trudna. Dlatego uważamy, że nasza grupa 145 pacjentów z MCTD o bardzo szczegółowej charakterystyce stanowi wartość dodaną tej pracy, a wyniki naszych badań mogą być znaczące również dla praktyki klinicznej. Ponadto lepsze zrozumienie mechanizmów działania receptorów TLR 3/7/8 i interferonów w układzie autoimmunologicznym oraz zidentyfikowanie ligandów (aktywatorów i inhibitorów), pozwalających na „regulowanie” ich poziomu w komórce, jest istotnym kierunkiem prowadzonych obecnie badań nad strategią terapeutyczną bólu, najczęściej zgłaszaną przez pacjentów reumatologicznych, istotnie wpływającą na ich jakość życia.

CEL PROJEKTU

Biorąc pod uwagę istotność drogi sygnałowej TLR/IFN w odpowiedzi immunologicznej oraz różnicowaniu się komórek, celem niniejszego projektu było między innymi określenie, czy geny powyższego szlaku mogą być uważane jako potencjalne biomarkery ACTD. W tym celu przeprowadziliśmy następujące badania:

Oznaczenie polimorfizmów genów TLR3, TLR7, TLR8, INF- γ , IFN- α , IFN- β z badaniem asocjacyjnym;

Oznaczenie stężenia białek INF- γ , IFN- α , IFN- β w surowicy z badaniem asocjacyjnym;

Oznaczenie poziomu ekspresji mRNA genów TLR3, TLR7, TLR8, INF- γ , IFN- α , IFN- β w krwi obwodowej z badaniem asocjacyjnym.

WYNIKI

Do badania włączono następujące grupy:

- Grupę niespokrewnionych chorych cierpiących na mieszaną chorobę tkanki łącznej (MCTD, grupa badana), pochodzenia polskiego, znajdujących się pod opieką Kliniki i Polikliniki Układowych Chorób Tkanki Łącznej oraz Przychodni Przyklinicznej Narodowego Instytutu Geriatrii, Reumatologii i Rehabilitacji w Warszawie. Wszyscy chorzy zakwalifikowani do badania spełniali kryteria klasyfikacyjne Alarcon-Segovii/Villareala. U wszystkich przeprowadzono badania podmiotowe, przedmiotowe, laboratoryjne oraz radiologiczne.
- Grupę niespokrewnionych chorych z toczeniem rumieniowatym układowym (SLE), znajdujących się pod opieką Kliniki i Polikliniki Układowych Chorób Tkanki Łącznej oraz Przychodni Przyklinicznej Narodowego Instytutu Geriatrii, Reumatologii i Rehabilitacji w Warszawie. Chorzy zakwalifikowani do badania spełniali kryteria klasyfikacyjne American College of Rheumatology/Systemic Lupus International Collaborating Clinics (ACR/SLICC) z 2012 roku. U wszystkich pacjentów przeprowadzono badania podmiotowe, przedmiotowe, laboratoryjne oraz radiologiczne.
- Grupę niespokrewnionych chorych z twardziną układową (SSc), znajdujących się pod opieką Kliniki i Polikliniki Układowych Chorób Tkanki Łącznej oraz Przychodni Przyklinicznej Narodowego Instytutu Geriatrii, Reumatologii i Rehabilitacji w War-

szawie. Chorzy zakwalifikowani do badania spełniali kryteria klasyfikacyjne ACR/*European League Against Rheumatism* (EULAR) z 2013 roku. U wszystkich przeprowadzono badania podmiotowe, przedmiotowe, laboratoryjne oraz radiologiczne.

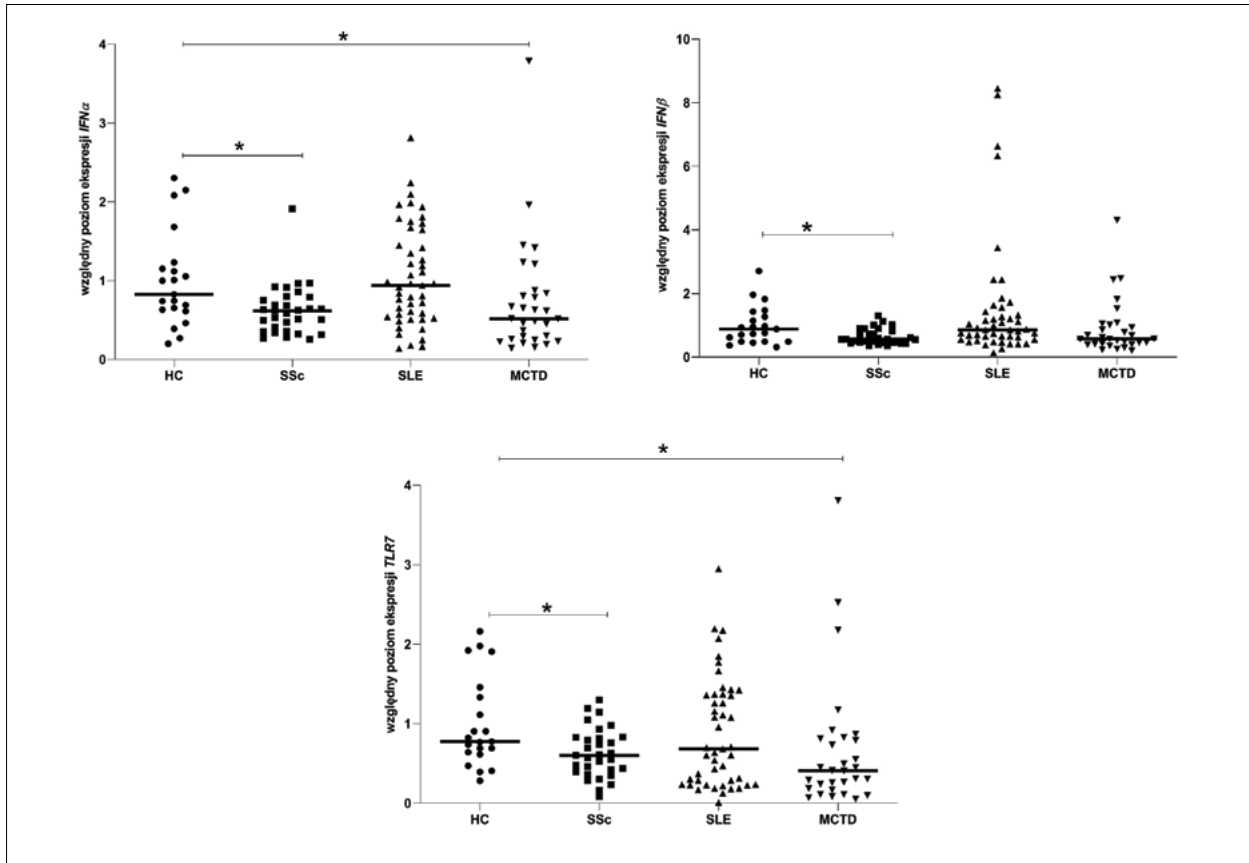
- Grupę niespokrewnionych zdrowych dawców krwi, pozyskanych z regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Warszawie, u których na podstawie wywiadu wykluczono: choroby autoimmunologiczne, nowotwory, ostry lub przewlekły stan zapalny, zakażenie, niewydolność układu krążenia, niewydolność układu oddechowego, nerek czy wątroby (wszystkie osoby podpisały zgodę na udział w badaniu).

Skalę aktywności MCTD (MCTD-AI) opracowano na podstawie skali aktywności SLE-SLEDAI. Wskaźnik uszkodzeń MCTD (MCTD-DI) jest odpowiednikiem skali SLICC/ACR DI wykorzystywanej do oceny stopnia uszkodzeń w SLE. Mediana wartości MCTD-AI wyniosła 9,4 punktu (najniższy – 0, najwyższy – 32 punkty). Mediana MCTD-DI wyniosła 5 (najniższa wartość – 0, najwyższa – 68). Przeciwciała przeciwjądrowe (ANA) w mianie >1: 320 wykryto u 88% pacjentów z MCTD. 99% pacjentów z MCTD miało przeciwciała anty-U1-RNP: anty-70K wykryto u 72% pacjentów, anty-A u 82% badanych i anty-C u 77% pacjentów.

Przeciętna aktywność choroby tocznia rumieniowatego układowego, oceniana przy pomocy wskaźnika SELENA-SLEDAI, wyniosła 4 punkty (najniższy – 0, najwyższy – 12), podczas gdy przeciętny wskaźnik uszkodzeń SLE oceniany przez indeks SLICC wynosił 4 punkty (najniższy – 0, najwyższy – 17). ANA w mianie >1: 320 wykryto u 48% pacjentów z SLE, a przeciwciała anty-U1-RNP zaobserwowano u 14% pacjentów z SLE.

Przeciętna aktywność choroby u pacjentów z twardziną układową oceniana przy pomocy wskaźnika EScSG-AI (*European Scleroderma Research Group Activity Index*) wyniosła 0,5 punktu (najniższy – 0, najwyższy – 9). Przeciętny wskaźnik uszkodzeń oszacowany za pomocą wskaźnika *Damage Index* wyniósł 2 punkty (najniższy – 0, najwyższy – 15). ANA w mianie >1: 320 wykryto u 75% pacjentów z SSc. U pacjentów z SSc nie wykryto przeciwciał anty-U1-RNP.

Prezentowane badanie zostało zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną Narodowego Instytutu Geriatrii, Reumatologii i Rehabilitacji w Warszawie. Wszyscy pacjenci i zdrowi dawcy wyrazili świadomą pisemną zgodę na badanie, które przeprowadzono zgodnie z Deklaracją Helsińską.



Ryc. 3. Względny poziom ekspresji IFN- α , IFN- β , TLR7.

Polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNP), zlokalizowane w genach związanych z interferonem typu I oraz typu III, są czynnikami ryzyka dla niektórych chorób reumatycznych i mogą wyjaśniać pewną niejednorodność w odpowiedzi na interferon typu I/III, obserwowaną między pacjentami z układowymi chorobami tkanki łącznej. Niewłaściwa aktywacja odpowiedzi immunologicznej przez TLR-y przyczynia się również do rozregulowania szlaku interferonu typu I. Na podstawie badań GWAS zidentyfikowano geny dla interferonów oraz geny indukowane interferonami jako loci, które przyczyniają się do podatności i/lub ciężkości ACTD [12, 23, 26–28]. W przeprowadzonych w ramach projektu badaniach wykazaliśmy, że polimorfizmy genu *IFN-A* *rs10757212* i *rs37582236* były istotnie powiązane z predyspozycją do rozwoju SLE i MCTD, polimorfizmy genu *IFN-B* *rs7873167* i *rs10964831* oraz *IFN-G* *rs1861493* z predyspozycją do rozwoju SLE. Natomiast polimorfizm genu *IFN-G* *rs2069718* z predyspozycją do rozwoju MCTD w naszej populacji. Analiza polimorfizmów zlokalizowanych w genach dla TLR-ów wykazała, że allel TLR7 *rs5743305* T oraz allel *rs5743316* A mogą pełnić rolę ochronną przed rozwojem MCTD, a allel TLR7 *rs1731479* T oraz allel TLR8 *rs17256081* C mogą być predyktorami rozwoju MCTD w populacji polskiej. Nasze

badania po raz pierwszy wykazały, że polimorfizmy w genach dla IFN-ów oraz w genie dla TLR7 mogą odgrywać rolę w predyspozycji do rozwoju MCTD. Warianty genetyczne związane ze szlakami sygnałowymi IFN typu I zostały powiązane z rozwojem i postępem RA, sugerując rolę IFN typu I jako czynnika wyzwalającego rozwój tej choroby [29]. Ponadto, badania GWAS dotyczące pacjentów z SLE wykazały, że kluczowe warianty genetyczne zaangażowane w nadmierną aktywację procesów zapalnych lub regulację wrodzonej odpowiedzi immunologicznej są ściśle skorelowane z IFN typu I [30, 31]. Dodatkowo allele ryzyka, które działają w genach szlaku IFN, są również zaangażowane w patogenezę toczenia [32]. Dlatego też rozregulowana sygnalizacja interferonu typu I związana ze SLE jest obecnie rozpoznawana jako nowa rodzina chorób zwanych „interferonopatiami”. Badania funkcjonalne przyczynowych wariantów allelicznych powinny zwiększyć naszą umiejętność do wprowadzenia analiz genetycznych do codziennej praktyki klinicznej. Zrozumienie regulacji szlaku interferonów u ludzi będzie miało ważne implikacje terapeutyczne związane z bezpieczeństwem zastosowanego leczenia. Rozumiejąc regulację genetyczną i podstawy molekularne interferonu typu I oraz typu III w ACTD, możemy terapeutycznie interweniować w bardziej spersonalizowany sposób – na podstawie

rozregulowania molekularnego występującego u danego osobnika.

Nasze badania miały również na celu określenie ekspresji mRNA *TLR3/7/8* oraz *INF- α - β - γ* we wszystkich badanych grupach. Porównanie ekspresji mRNA *TLR3/7/8* oraz *INF- α - β - γ* między grupami pacjentów z MCTD, SLE i SSC wykazało, że ekspresja badanych IFN-ów jest najsilniejsza u pacjentów z SLE, średnia u pacjentów z MCTD i najniższa w SSC (Ryc. 3).

Zwiększone wytwarzanie *IFN- γ* zostało potwierdzone u pacjentów SLE również w innych badaniach [33]. Wykazano także, że blokowanie *IFN- γ* normalizuje ekspresję genów regulowanych przez IFN i poziomy chemokiny CXCL10 w surowicy u pacjentów z SLE [34].

Analiza poziomu IFN w surowicy pacjentów wykazała różnice poziomu cytokin w stosunku do analizy ekspresji mRNA. Badania pokazały, że poziom *IFN- α* był najwyższy u chorych na MCTD, a najniższy u chorych na SLE. W przypadku *IFN- β* poziom białka w surowicy był najwyższy u pacjentów z SSC, a najniższy w MCTD. Uważa się, że podwyższony poziom *IFN- α* znacząco przyczynia się do rozwoju i utrzymania autoimmunizacji poprzez przewlekłą aktywację autoreaktywnych komórek T i B [35].

Zgodnie z definicją MCTD, u wszystkich chorych występują przeciwciała anty-U1-RNP w mianie zdecydowanie wyższym niż w innych chorobach tkanki łącznej. Badania Greidingera [36] wykazały sekwencję w powstawaniu przeciwciał przeciwko poszczególnym składnikom kompleksu U1-RNP. Zwykle jako pierwsze pojawiają się przeciwciała anty-U1-70K, następnie anty-Sm-B, anty-U1-A, a jako ostatnie anty-U1-C. U pacjentów MCTD z dodatnim wynikiem anty-U1-70k stwierdzono wysokie poziomy *IFN- γ* i bardzo niskie poziomy *IFN- β* w porównaniu do pacjentów bez tego przeciwciała. W przypadku chorych na toczeń rumieniowaty układowy zaobserwowaliśmy, że zarówno *IFN- α* , jak i *IFN- γ* korelują ze stężeniem składowych dopełniacza, a *IFN- α* z aktywnością choroby. Nasze badania pokazują, iż ścieżka TLR/IFN ma największe znaczenie w patogenezie tocznia rumieniowatego układowego. Być może wykazane przez nas różnice w ekspresji genów na poziomie mRNA czy białka wynikają też z rodzaju zastosowanego leczenia u poszczególnych pacjentów. Badania *in vitro* pokazały, że leczenie hydroksychlorochiną upośledza zdolność pDC do wytwarzania *IFN α* i TNF w odpowiedzi na stymulację agonistami TLR9 i TLR7 [11]. Wśród naszych pacjentów tylko chorzy na SLE przyjmowali hydroksychlorochinę, co może korelować z niskim poziomem *IFN- α* w su-

rowicy tych pacjentów. Ponadto niektóre czynniki genetyczne i/lub szlaki sygnałowe mogą wyjaśniać określone fenotypy choroby. A co ważniejsze, czynniki leżące u podstaw tych mechanizmów nie będą wspólne dla wszystkich pacjentów. Podejrzewamy, że zmienność szlaku interferonu typu I oraz typu III może być jednym z kluczowych czynników w niewyjaśnionej dziedziczności choroby reumatycznej.

Wyniki uzyskane z powyższych badań interferonu typu I i III oraz endosomalnych TLR-ów, w tym tych identyfikujących loci ryzyka choroby, mogą pomóc wyjaśnić heterogeniczność w patogenezie molekularnej układowych chorób tkanki łącznej. Chociaż szczegółowa etiopatogeneza układowych chorób tkanki łącznej nie jest ustalona, to jednak badania potwierdzają, iż nadmierna aktywacja immunologiczna z udziałem receptorów TLR, szczególnie TLR3/7/8 i interferonu (*IFN- α - β - γ*), uznawane są za bardzo ważny mechanizm patogenny tych schorzeń. Posiadają one potencjał dla rozwoju terapii w zakresie zakażeń wirusowych i chorób autoimmunizacyjnych. Dotychczas zbadano i wyjaśniono wiele mechanizmów oraz wykazano rolę wielu cząsteczek sygnałowych w kontekście aktywacji szlaków sygnałowych zależnych od receptorów TLR. Mimo to w dalszym ciągu brakuje nowych, potencjalnych strategii umożliwiających kontrolowaną ingerencję w szlaki TLR, choć zapotrzebowanie na nowe środki przeciwwirusowe i leki immunosupresyjne stale rośnie.

WNIOSKI I DALSZE KIERUNKI BADAŃ

IFN typu I i III pierwotnie badano pod kątem ich działania przeciwwirusowego, jednak ostatnie dowody wykazały, że mają one również funkcję immunomodulującą w autoimmunizacji i są głównymi mediatorami w patogenezie SLE. Dlatego opracowywane są nowe strategie terapeutyczne ukierunkowane na IFN i szlaki sygnałowe IFN, które wydają się obiecujące dla modulowania aktywności choroby w SLE. Uzyskane przez nas wyniki mogą wskazywać, że ścieżka sygnałowa TLR-IFN również w patogenezie MCTD może mieć dość istotne znaczenie. Należy zwrócić jednak uwagę, że analiza ekspresji genów na poziomie mRNA została przeprowadzona z pełnej krwi, gdyż celem projektu było poszukiwanie biomarkerów MCTD. Uzyskane przez nas wyniki wymagają dalszego potwierdzenia i kontynuacji badań w tym zakresie, z uwzględnieniem analizy ekspresji TLR-ów w PMBC oraz badań funkcjonalnych (np. stymulacji PMBC przeciwciałem U1-RNP). Aby umożliwić regulację aktywności TLR, potrzeba więcej badań nad inhibitorami ścieżki TLR-IFN, co może przyczynić się do stworzenia nowych alter-

natywnych opcji terapeutycznych, zapewniających długoterminowe terapie z ograniczonymi efektami ubocznymi.

techniczną. Jesteśmy również wdzięczni wszystkim pacjentom i zdrowym osobom, których współpraca umożliwiła przeprowadzenie tego badania.

PODZIĘKOWANIA

Autorzy pragną podziękować pani Wiesławie Frankowskiej oraz pani Teresie Gołaszewskiej za pomoc

FINASOWANIE

Przedstawione wyniki uzyskano dzięki funduszom ze środków Naukowej Fundacji Polpharmy.

PIŚMIENNICTWO

1. Venables P.J.: Mixed connective tissue disease, *Lupus*, 2006; 15: 132–137.
2. Winfield J.B., Koffler D., Kunkel H.G.: Development of antibodies to ribonucleoprotein following short-term therapy with procainamide, *Arthritis Rheum*, 1975; 18: 531–534.
3. Szodoray P., Szollosi Z., Gyimesi E. et al.: Sarcoidosis in patients with mixed connective tissue disease: clinical, genetic, serological and histological observations, *Rheumatol Int*, 2008; 28: 743–747.
4. Li J., Wang X., Zhang F. et al.: Toll-like receptors as therapeutic targets for autoimmune connective tissue diseases, *Pharmacol Ther.*, 2013; 138: 441–451.
5. Chauhan S.K., Singh V.V., Rai R. et al.: Distinct autoantibody profiles in systemic lupus erythematosus patients are selectively associated with TLR7 and TLR9 upregulation, *J Clin Immunol.*, 2013; 33: 954–964.
6. Celhar T., Magalhaes R., Fairhurst A.M.: TLR7 and TLR9 in SLE: when sensing self goes wrong, *Immunol Res.*, 2012; 53: 58–77.
7. Jensen M.A., Niewold T.B.: Interferon regulatory factors: critical mediators of human lupus, *Transl Res.*, 2015; 165: 283–95.
8. Osnes L.T., Nakken B., Bodolay E. et al.: Assessment of intracellular cytokines and regulatory cells in patients with autoimmune diseases and primary immunodeficiencies – novel tool for diagnostics and patient follow-up, *Autoimmun Rev.*, 2013; 12: 967–971.
9. O'Reilly S.: Innate immunity is systemic sclerosis pathogenesis, *Clin Science*, 2014; 126: 329–337.
10. Trivedi S., Greidinger E.L.: Endosomal Toll-like receptors in autoimmunity: mechanisms for clinical diversity, *Therapy*, 2009; 6: 433–442.
11. Muskardin T.L.W., Niewold T.B.: Type I interferon in rheumatic diseases, *Nat Rev Rheumatol.*, 2018; 14: 214–228.
12. Niewold T.B.: Interferon Alpha as a Primary Pathogenic Factor in Human Lupus, *J Interferon Cytokine Res.*, 2011; 31: 887–892.
13. Markowitz C.E.: Interferon-beta. Mechanism of action and dosing issues, *Neurology*, 2007; 68(24 Suppl. 4): S8–S11.
14. Chyuan I.T., Tzeng H.T., Chen J.Y.: Signaling Pathways of Type I and Type III Interferons and Targeted Therapies in Systemic Lupus Erythematosus, *Cells*, 2019; 8: E963.
15. Ivashkiv L.B.: IFN γ : signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy, *Nat Rev Immunol.*, 2018; 18(9): 545–558.
16. Kawasaki T., Kawai T.: Toll-like receptor signaling pathways, *Front Immunol.*, 2014; 5: 461.
17. Hassan A.B., Ronnelid J., Gunnarsson I. et al.: Increased serum levels of immunoglobulins, C-reactive protein, type 1 and type 2 cytokines in patients with mixed connective tissue disease, *J Autoimmunity*, 1998; 11: 503–508.
18. Bodolay E., Aleksza M., Antal-Szalmas A. et al.: Serum cytokine levels and type 1 and type 2 intracellular T cell cytokine profiles in mixed connective tissue disease, *J Rheumatol.*, 2002; 29: 2136–2142.
19. Devarapu S.K., Anders H.J.: Toll-like receptors in lupus nephritis, *J Biomed Sci.*, 2018; 25: 35.
20. Bengtsson A.A., Rönnblom L.: Role of interferons in SLE, *Best Pract Res Clin Rheumatol.*, 2017; 31: 415–428.
21. Psarras A., Emery P., Vital E.M.: Type I interferon-mediated autoimmune diseases: pathogenesis, diagnosis and targeted therapy. *Rheumatology (Oxford)*, 2017; 56: 1662–1675.
22. Hoffmad R.W., Maldonado M.E.: Immune pathogenesis of mixed connective tissue disease: a short analytical review, *Clin Immunol.*, 2008; 128: 8–17.
23. Ghodke-Puranik Y., Imgruet M., Dorschner J.M. et al.: Novel genetic associations with interferon in systemic lupus erythematosus identified by replication and fine-mapping of trait-stratified genome-wide screen, *Cytokine*, 2019; 2019: S1043–4666(19)30002-X.
24. Järvinen T.M., Hellquist A., Zucchelli M. et al.: Replication of GWAS-identified systemic lupus erythematosus susceptibility genes affirms B-cell receptor pathway signaling and strengthens the role of IRF5 in disease susceptibility in a Northern European population, *Rheumatology (Oxford)*, 2012; 51(1): 87–92.

25. Berggren O., Alexsson A., Morris D.L. et al.: IFN- α production by plasmacytoid dendritic cell associations with polymorphisms in gene loci related to autoimmune and inflammatory diseases, *Hum Mol Genet.*, 2015; 24: 3571–3581.
26. Morris D.L., Sheng Y., Zhang Y. et al.: Genome-wide association meta-analysis in Chinese and European individuals identifies ten new loci associated with systemic lupus erythematosus, *Nat Genet.* 2016; 48: 940–946.
27. Teruel M., Alarcon-Riquelme M.E.: The genetic basis of systemic lupus erythematosus: what are the risk factors and what have we learned, *J Autoimmun.*, 2016; 74: 161–75.
28. Järvinen T.M., Hellquist A., Zucchelli M. et al.: Replication of GWAS-identified systemic lupus erythematosus susceptibility genes affirms B-cell receptor pathway signaling and strengthens the role of IRF5 in disease susceptibility in a Northern European population, *Rheumatology (Oxford)*, 2012; 51: 87–92.
29. Rodriguez-Carrio J., Lopez P., Suarez A.: Type I IFNs as biomarkers in rheumatoid arthritis: Towards disease profiling and personalized medicine, *Clin. Sci. (Lond.)*, 2015; 128: 449–464.
30. Sigurdsson S., Nordmark G., Garnier S. et al.: A risk haplotype of STAT4 for systemic lupus erythematosus is over-expressed, correlates with anti-dsDNA and shows additive effects with two risk alleles of IRF5, *Hum Mol Genet.*, 2008; 17: 2868–2876.
31. Abelson A.K., Delgado-Vega A.M., Kozyrev S.V. et al.: STAT4 associates with systemic lupus erythematosus through two independent effects that correlate with gene expression and act additively with IRF5 to increase risk, *Ann Rheum Dis.*, 2009; 68: 1746–53.
32. Harley I.T., Kaufman K.M., Langefeld C.D. et al.: Genetic susceptibility to SLE: new insights from fine mapping and genome-wide association studies, *Nat Rev Genet.*, 2009; 10: 285–290.
33. Csiszár A., Nagy G.Y., Gergely P. et al.: Increased interferon-gamma (IFN- γ), IL-10 and decreased IL-4 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with systemic lupus erythematosus (SLE), *Clin Exp Immunol.*, 2000; 122: 464–470.
34. Welcher A.A., Boedigheimer M., Kivitz A.J. et al.: Blockade of interferon- γ normalizes interferon-regulated gene expression and serum CXCL10 levels in patients with systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheumatol.* 2015; 67: 2713–2722.
35. Laska M.J., Trolborg A., Hansen B. et al.: Polymorphisms within Toll-like receptors are associated with systemic lupus erythematosus in a cohort of Danish females, *Rheumatology*, 2014; 53: 48–55.
36. Greidinger E.L., Zang Y., Jaimes K. et al.: A murine model of mixed connective tissue disease induced with U1 small nuclear RNP autoantigen, *Arthritis Rheum.*, 2006; 54: 661–669.

Rola śródbłonka w wybranych chorobach układu sercowo-naczyniowego

The role of the endothelium in selected diseases of the cardiovascular system

*Michał Peller, Paweł
Balsam, Marcin
Grabowski, Grzegorz
Opolski*

I Katedra i Klinika Kardiologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
„Publikacja powstała dzięki grantowi naukowemu Naukowej Fundacji
Polpharmy”

Streszczenie

W ostatnich latach wzrosła rola oceny funkcji śródbłonka w zakresie rozpoznawania przedklinicznych form chorób układu sercowo-naczyniowego. Jednocześnie pojawiają się narzędzia do oceny funkcji śródbłonka, będące w pełni obiektywne i zautomatyzowane, co istotnie wpływa na łatwość wykonywania oznaczeń. Wydaje się, że mogą one wyprzeć najczęściej stosowaną metodę pomiaru funkcji śródbłonka, którą jest dylatacja tętnicy w odpowiedzi na niedokrwienie. Oprócz wartości diagnostycznej, poprawa funkcji śródbłonka może stanowić cel leczenia pacjentów z rozpoznanymi chorobami układu sercowo-naczyniowego. Wykazano korzystny wpływ aktywności fizycznej u pacjentów po zawale serca z uniesieniem odcinka ST na funkcję śródbłonka. Największe korzyści odnieśli pacjenci z bardziej nasiloną, wyjściową dysfunkcją śródbłonka. Udowodniono również pozytywny efekt stosowania beta-adrenolityków na funkcję śródbłonka. Działanie takie wykazują również inne leki hipotensyjne. Ponadto zaburzenia funkcji śródbłonka wpływają również na występowanie zaburzeń rytmu serca, w tym migotania przedsionków. Udowodniono jednak, że dłuższy czas trwania epizodu arytmii zmniejsza stopień zaburzeń funkcji śródbłonka, ocenianych za pomocą pomiaru stężenia biomarkerów w surowicy. Sytuacja ta może być związana z adaptacją organizmu do występowania arytmii.

Słowa kluczowe: śródbłonek, zawał serca, migotanie przedsionków, beta-adrenolityki

Abstract

In recent years, the role of endothelial function assessment in the recognition of preclinical forms of cardiovascular disease has increased. At the same time, there are tools to assess endothelial function that are fully objective and automated, which significantly affects the ease of assessment. It seems that they can displace the most commonly used method of measuring endothelial function, which is dilatation of the artery in response to ischemia. In addition to the diagnostic value, the improvement of endothelial function may be the goal of treatment of patients with known cardiovascular diseases. The beneficial effect of physical activity in patients after ST segment elevation myocardial infarction on endothelial function has been demonstrated. Patients with more severe, baseline endothelial diffusion experienced the greatest benefits. Similarly, a positive effect of beta-blockers on endothelial function has been demonstrated. Other antihypertensive drugs also have this effect. Endothelial dysfunction

Wpłynęło: 6-11-2019

Zaakceptowano: 6-12-2019

Opublikowano: 29-05-2020

DOI: 10.5604/01.3001.0014.1584

Adres do korespondencji

Michał Peller

I Katedra i Klinika Kardiologii

Warszawskiego Uniwersytetu

Medycznego,

ul. Banacha 1A, 02-097 Warszawa,

e-mail: michalPELLER@gmail.com

tion also affects the occurrence of arrhythmias, including atrial fibrillation. However, it has been shown that the longer duration of the arrhythmia episode decreases the degree of endothelial dysfunction as assessed by measuring serum biomarkers' levels. The situation may be related to the adaptation of the body to the occurrence of arrhythmias.

Keywords: endothelium, myocardial infarction, atrial fibrillation, beta-blockers

WSTĘP

Spojrzenie na rolę śródbłónka w utrzymaniu homeostazy zmieniło się na przestrzeni ostatnich lat. Wcześniej uważano, że śródbłonek bierze udział głównie w lokalnej regulacji procesów krzepnięcia, produkuje i uwalnia substancje wazoaktywne, wpływa na remodeling naczyń oraz moduluje wzrost naczyń. Obecnie przeważa pogląd, że śródbłonek powinien być traktowany jak narząd wpływający na funkcjonowanie całego organizmu. Spojrzenie takie powoduje, że pod względem masy całkowitej śródbłonek jest drugim po wątrobie największym narządem ludzkiego ciała [1].

Badania oceniające funkcję śródbłónka są multidyscyplinarne i dotyczą m.in. takich dziedzin jak: onkologia, hematologia czy kardiologia. W prezentowanym artykule przedstawiona zostanie rola śródbłónka w diagnostyce oraz monitorowania wybranych chorób układu sercowo-naczyniowego. Wcześniejsze prace pokazują, że dysfunkcję śródbłónka można traktować jako przedkliniczną manifestację chorób układu sercowo-naczyniowego, m.in.: nadciśnienia tętniczego, choroby niedokrwiennej serca czy zaburzeń rytmu serca.

Istotną kwestią jest również wybór metody oceny funkcji śródbłónka. W chwili obecnej brakuje jednoznacznych wytycznych dotyczących wyboru optymalnego narzędzia do pomiaru funkcji śródbłónka. Jedną z najczęściej stosowanych metod jest ocena dylatacji tętnicy w odpowiedzi na niedokrwienie (FMD). W ostatnim czasie wzrasta jednak popularność zautomatyzowanych metod oceny funkcji śródbłónka.

METODY OCENY FUNKCJI ŚRÓDBŁÓNKA

Ocena biochemiczna

Oznaczenia biochemiczne markerów wydzielanych przez komórki śródbłónka mogą być jedną z metod

oceny jego funkcji. Obecnie najczęściej wykorzystywanymi biomarkerami oceny są: tlenek azotu, endotelina-1, czynnik von Willebranda, trombomodulina, endotelialny czynnik wzrostu, wybrane cytokiny oraz prostaglandyny [2–4]. Warto zaznaczyć, że istnieją odmienne mechanizmy działania poszczególnych biomarkerów, a także zmienny okres ich półtrwania. Pomiar stężenia jedynie wybranych biomarkerów może w niepełny sposób oceniać funkcję śródbłónka, nie odzwierciedlając złożoności zachodzących procesów.

Dylatacja tętnicy w odpowiedzi na niedokrwienie

Dylatacja tętnicy w odpowiedzi na niedokrwienie (*flow-mediated dilation*, FMD) jest najczęściej stosowaną metodą czynnościowej oceny funkcji śródbłónka. Metoda ta polega na ocenie średnicy tętnicy ramiennej oraz prędkości przepływu krwi przed i po 5-minutowym niedokrwieniu. Pomiaru prędkości przepływu krwi dokonuje się najczęściej w 15. sekundzie po zwolnieniu ucisku. Średnica naczynia jest z reguły oceniana w 60. sekundzie powrotu przepływu krwi przez naczynie [5]. Przy prawidłowej funkcji śródbłónka średnica tętnicy ramiennej powinna wzrosnąć o minimum 7–10% [6]. Warto zaznaczyć, że jest to metoda subiektywna, uzależniona od umiejętności osoby wykonującej badanie. Różnice te mogą wynosić nawet kilkadziesiąt procent [7]. Kolejne ograniczenie stanowi konieczność stosowania aparatów ultrasonograficznych o bardzo dobrej jakości zapisu. Różnice pomiaru na poziomie 0,1 mm mogą powodować kilkudziesięcioprocentowe zmiany wartości FMD.

Pomiar zmian w napięciu naczyń w przebiegu reaktywnego przekrwienia

Pomiar zmian w napięciu ścian naczyń w przebiegu reaktywnego przekrwienia (*Reactive Hyperemia Peripheral Arterial Tonometry*, RH-PAT) to jedna z nowszych metod nieinwazyjnej oceny funkcji śródbłónka. Pozwala ona na ocenę czynności obwodowych naczyń mikrokrążenia w sposób obiektyw-

ny, niezależny od badacza [8–10]. W licznych pracach wykazano, że pacjenci z dysfunkcją śródbłónka mikrokrażenia wieńcowego cechują się niską obwodową odpowiedzią w postaci przekrwienia (hiperemii) w porównaniu do osób z prawidłową czynnością śródbłónka naczyń wieńcowych. Sugeruje to duże znaczenie techniki RH-PAT jako nieinwazyjnej metody monitorowania funkcji śródbłónka naczyń wieńcowych [11]. Działanie jego jest oparte o reakcje tętnicze wywołane za pośrednictwem śródbłónka na dystalnym paliczku w odpowiedzi na pięciominutowe zamknięcie tętnicy ramiennej. Nieinwazyjny system zawiera przyrząd pomiarowy złożony z pary czujników opartych o technologię pletyzmograficzną, które przekazują ujednolicone pole ciśnienia na dystalne dwie trzecie palców włącznie z ich kończynkami. Po założeniu czujników na palce wskazujące obu rąk wykonywany jest pomiar kontrolny. Następnie poprzez napełnienie rękawa stosowanego do pomiaru ciśnienia tętniczego następuje zamknięcie tętnicy ramiennej na 5 minut. Po tym czasie ucisk rękawa jest szybko zwalniany i dokonywany jest kolejny pomiar. U pacjentów z prawidłową funkcją śródbłónka obserwuje się istotny wzrost ciśnienia w obrębie palców, co wskazuje na prawidłowe rozszerzenie naczyń tętniczych.

ROLA ŚRÓDBŁÓNKA W ROZWOJU I LECZENIU CHOROBY NIEDOKRWIENNEJ SERCA – WPŁYW AKTYWNOŚCI FIZYCZNEJ

Zaburzenia czynności śródbłónka są ściśle związane z występowaniem choroby wieńcowej. Wykazano również istotnie częstszą obecność zaburzeń funkcji śródbłónka u pacjentów po zawale serca [12]. Zaburzenia funkcji śródbłónka mają charakter odwracalny, dlatego szczególnie ważne jest wczesne wdrażanie leczenia, którego jedną z form może być zwiększenie poziomu aktywności fizycznej chorego [13]. Wcześniejsze badania udowodniły związek pomiędzy stopniem zaawansowania ED a ryzykiem wystąpienia incydentów wieńcowych [14]. W związku z tym należy oczekiwać, że chorzy, u których wystąpił zawał serca, będą odznaczać się większymi zaburzeniami w zakresie funkcji śródbłónka. Liczne publikacje opisują korzystny wpływ odpowiednio zaplanowanej rehabilitacji kardiologicznej na długoterminowe rokowanie chorych po zawale serca [15, 16]. U tych osób, które przeżyły zawał serca, rehabilitacja kardiologiczna powinna trwać przez całe życie. W sposób szczególny należy skupić się na jednym z jej etapów, realizowanym w ambulatoryjnych ośrodkach rehabilitacji, kiedy to chorzy pod okiem specjalistów rozpoczynają ten proces. Pomimo wiedzy, że rehabilitacja kardiologiczna ogranicza śmier-

telność oraz poprawia jakość życia chorych po OZW, wciąż jednak brakuje precyzyjnych danych określających w sposób obiektywny wpływ tego typu działania na funkcję śródbłónka.

W grupie 29 analizowanych pacjentów, u 16 (55,2%) wyjściowo występowała dysfunkcja śródbłónka. Nie wykazano istotnych różnic pomiędzy pacjentami z dysfunkcją i bez dysfunkcji śródbłónka w zakresie: wieku, płci, chorób współistniejących, stosowanej farmakoterapii oraz frakcji wyrzutowej lewej komory. Pojawił się jednak trend wskazujący na gorszą wydolność fizyczną wśród pacjentów z dysfunkcją śródbłónka w porównaniu z pacjentami z prawidłową funkcją śródbłónka. Przeprowadzono również analizę oceniającą zmianę stopnia dysfunkcji śródbłónka w podgrupie pacjentów bez wyjściowej dysfunkcji śródbłónka i w podgrupie z dysfunkcją śródbłónka. Analiza ta wykazała istotną poprawę funkcji śródbłónka po cyklu rehabilitacji kardiologicznej u pacjentów z wyjściową dysfunkcją śródbłónka. Istotnej różnicy nie wykazano dla pacjentów bez wyjściowej dysfunkcji śródbłónka [17].

OCENA FUNKCJI ŚRÓDBŁÓNKA U PACJENTÓW Z MIGOTANIEM PRZEDSIONKÓW

U pacjentów z rozpoznaniem migotaniem przedsionków istotnie częściej obserwuje się zaburzenie funkcji śródbłónka w porównaniu z populacją ogólną. Nieprawidłowa funkcja sprzyja włóknieniu tkanki przedsionków oraz może zwiększać ryzyko występowania powikłań zakrzepowo-zatorowych. Oznacza to, że zaburzenia funkcji śródbłónka będą sprzyjać zmianie charakteru arytmii z napadowej na przetrwałą lub utrwaloną poprzez niekorzystny remodeling substratu arytmii. Ponadto arytmia, poprzez niemierną pracę serca, sprzyja nasileniu dysfunkcji śródbłónka [18].

Wzajemne oddziaływanie pomiędzy obecnością arytmii a funkcją śródbłónka przedstawia praca dotycząca oceny wpływu czasu trwania epizodu migotania przedsionków na funkcję śródbłónka, ocenianą przy pomocy pomiaru stężenia biomarkerów w surowicy krwi żyłnej [19]. Pacjentów z przetrwałym migotaniem przedsionków podzielono na trzy podgrupy wraz z rosnącym czasem trwania epizodu migotania przedsionków. Badanie to wykazało, że wraz ze wzrostem czasu trwania epizodu migotania przedsionków maleje stężenie endoteliny-1 – jednego z najczęściej ocenianego biomarkera oceny zaburzeń funkcji śródbłónka. Wynik taki może wskazywać na tworzenie się pewnego stanu równowagi wraz z czasem trwania epizodu migotania przed-

sionków. Wyższe stężenia endoteliny-1 u pacjentów z krótszym czasem trwania epizodu arytmii mogą wskazywać na wysokie ryzyko zakrzepowo-zatorowe w tej grupie, co oznacza, że czas trwania arytmii oraz jej charakter (napadowe vs przetrwałe/utrwalone migotanie przedsionków) nie powinny wpływać na wskazania do leczenia przeciwzakrzepowego.

WPLYW FARMAKOTERAPII NA FUNKCJĘ ŚRÓDBŁÓNKA

Wpływ leków hipotensyjnych na funkcję śródbłónka wydaje się ściśle związany z obniżeniem ciśnienia krwi. Ponadto właściwości antyoksydacyjne inhibitorów konwertazy angiotensyny, antagonistów receptora angiotensyny i antagonistów wapnia są dobrze udowodnione [20–22]. Dotychczasowe badania sugerują, że redukcja stresu oksydacyjnego jest jednym z mechanizmów poprawy funkcji śródbłónka. Kolejną grupę leków hipotensyjnych stanowią beta-adrenolityki, które zostały wprowadzone do terapii w latach 60. Obecnie dostępne są trzy generacje beta-adrenolityków: nieselektywne, selektywne i beta-adrenolityki o dodatkowych właściwościach rozszerzających naczynia. Wydaje się, że dodatko-

wa właściwość beta-adrenolityków trzeciej generacji, związana z zależnym od tlenu azotu rozszerzaniem naczynia krwionośne, ma kluczowy wpływ na poprawę funkcji śródbłónka [23]. Obserwacje te potwierdzono metaanalizą oceniającą wpływ beta-adrenolityków na funkcję śródbłónka ocenianą za pomocą badania FMD [24]. Wykazała ona korzystniejszy wpływ beta-adrenolityków trzeciej generacji na poprawę funkcji śródbłónka w porównaniu z beta-adrenolitykami drugiej generacji. Ponadto obserwowano poprawę funkcji śródbłónka, stosując beta-adrenolityki drugiej i trzeciej generacji w porównaniu z placebo.

WNIOSKI

Rola śródbłónka w patomechanizmie rozwoju chorób sercowo-naczyniowych jest dobrze udokumentowana. Pomimo licznych metod pomiaru funkcji śródbłónka, wciąż brak jest metody uznanej za referencyjną. Wczesne zidentyfikowanie zaburzeń funkcji śródbłónka może pomóc wyselekcjonować osoby o zwiększonym ryzyku występowania chorób układu sercowo-naczyniowego oraz umożliwić działania prewencyjne.

PIŚMIENNICTWO

1. Vlachopoulos C., Aznaouridis K., Stefanadis C.: Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with arterial stiffness: a systematic review and meta-analysis, *J Am Coll Cardiol.*, 2010; 55: 1318–27.
2. Houde M., Desbiens L., D'Orléans-Juste P.: Endothelin-1: Biosynthesis, Signaling and Vasoreactivity, *Adv Pharmacol.*, 2016; 77: 143–175.
3. Ito T., Kakihana Y., Maruyama I.: Thrombomodulin as an intravascular safeguard against inflammatory and thrombotic diseases, *Expert Opin Ther Targets.*, 2016; 20: 151–158.
4. He H., Venema V.J., Gu X., Venema R.C., Marrero M.B., Caldwell R.B.: Vascular endothelial growth factor signals endothelial cell production of nitric oxide and prostacyclin through flk-1/KDR activation of c-Src, *J Biol Chem.*, 1999; 274: 25130–25135.
5. Bots M.L., Westerink J., Rabelink T.J. et al.: Assessment of flow-mediated vasodilatation (FMD) of the brachial artery: effects of technical aspects of the FMD measurement on the FMD response, *Eur Heart J.*, 2005; 26: 363–8.
6. Thijssen D.H., Black M.A., Pyke K.E. et al.: Assessment of flow-mediated dilation in humans: a methodological and physiological guideline, *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 2011; 300: H2–H12.
7. Malik J., Wichterle D., Haas T. et al.: Repeatability of non-invasive surrogates of endothelial function, *Am J Cardiol.*, 2004; 94: 693–6.
8. Bonetti P.O., Barsness G.W., Keelan P.C. et al.: Enhanced external counterpulsation improves endothelial function in patients with symptomatic coronary artery disease, *J Am Coll Cardiol.*, 2003; 41: 1761–8.
9. Gerhard-Herman M., Creager M.A., Hurley S. et al.: Assessment of endothelial function (nitric oxide) at the tip of a finger, *Circulation*, 2002; 102(Suppl II): 851.
10. Al Suwaidi J., Hamasaki S., Higano S.T., Nishimura R.A., Holmes D.R. Jr., Lerman A.: Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction, *Circulation*, 2000; 101: 948–54.
11. Bonetti P.O., Pumper G.M., Higano S.T., Holmes D.R. Jr., Kuvin J.T., Lerman A.: Noninvasive Identification of Patients with Early Coronary Atherosclerosis by Assessment of Digital Reactive Hyperemia, *JACC*, 2004; 44(11): 2137–41.
12. Fichtlscherer S., Breuer S., Zeiher A.: Prognostic Value of Systemic Endothelial Dysfunction in Patients With Acute Coronary Syndromes, *Circulation*, 2004; 110: 1926–1932.
13. Luk T., Dai Y., Siu C.: Effect of exercise training on vascular endothelial function in patients with stable

- coronary artery disease: a randomized controlled trial, *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.*, 2012; 19(4): 830–9.
14. Targonski P.V., Bonetti P.O., Pumper G.M., Higano S.T., Holmes D.R. Jr., Lerman A.: Coronary endothelial dysfunction is associated with an increased risk of cerebrovascular events, *Circulation*, 2003; 107(22): 2805–2809
15. Hammill B.G., Curtis L.H., Schulman K.A. et al.: Relationship Between Cardiac Rehabilitation and Long-Term Risks of Death and Myocardial Infarction Among Elderly Medicare Beneficiaries, *Circulation*, 2010; 121: 63–70.
16. Jolliffe J.A., Rees K., Taylor R.S. et al.: Exercise-based rehabilitation for coronary heart disease, *Cochrane Database Syst Rev.*, 2001; 1: CD001800.
17. Peller M., Balsam P., Głowczyńska R. et al.: Impact of physical training on endothelial function in myocardial infarction survivors-pilot study, *Kardiol Pol.*, 2016; 74(5): 439–46.
18. Kirchhof P., Benussi S., Kotecha D. et al.: 2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS, *Europace*, 2016; 18(11): 1609–1678.
19. Peller M., Łodziński P., Ozierański K. et al.: The influence of the atrial fibrillation episode duration on the endothelial function in patients treated with pulmonary veins isolation, *Adv Clin Exp Med.*, 2017; 26(1): 109–113.
20. Chin B.S., Langford N.J., Nuttall S.L., Gibbs C.R., Blann A.D., Lip G.Y.: Anti-oxidative properties of beta-blockers and angiotensin-converting enzyme inhibitors in congestive heart failure, *Eur J Heart Fail*, 2003; 5: 171–174.
21. Yu Y., Fukuda N., Yao E.H. et al.: Effects of an ARB on endothelial progenitor cell function and cardiovascular oxidation in hypertension, *Am J Hypertens*, 2008; 21: 72–77.
22. Godfraind T.: Antioxidant effects and the therapeutic mode of action of calcium channel blockers in hypertension and atherosclerosis, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2005; 360: 2259–2272.
23. Ritter J.M.: Nebivolol: endothelium-mediated vasodilating effect, *J Cardiovasc Pharmacol*, 2011; 38(Suppl 3): S13–16.
24. Peller M., Ozierański K., Balsam P. et al.: Influence of beta-blockers on endothelial function: A meta-analysis of randomized controlled trials, *Cardiol J.*, 2015; 22(6): 708–16

Interakcje między szlakiem sygnałowym TGF- β 1 a cząsteczkami mikroRNA w raku nerki

Crosstalk between TGF- β 1 signalling pathway and microRNAs in renal cancer

Joanna Bogusławska

Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

Praca powstała w ramach grantu Naukowej Fundacji Polpharmy przyznane-go dr hab. Joannie Bogusławskiej pt.: „Cząsteczki mikroRNA pośredniczące w działaniu TGF- β 1 w raku nerki: poszukiwanie nowych potencjalnych markerów nowotworzenia i celów terapeutycznych” w 2017 roku.

Streszczenie

W raku nerki obserwuje się zaburzenia szlaku sygnałowego TGF- β 1 oraz ekspresji cząsteczek mikroRNA (miRNA). TGF- β 1 jest ważnym regulatorem wielu procesów komórkowych i może przyczyniać się do rozwoju wielu chorób, w tym nowotworów. Pełni w nich dwojaką funkcję zwaną „paradoksem TGF- β 1”: hamuje rozwój nowotworu na wczesnych jego etapach, promując natomiast progresję nowotworów zaawansowanych. Do przełączania się TGF- β 1 z funkcji supresorowej w onkogeną mogą przyczyniać się miRNA, małe niekodujące cząsteczki RNA, które regulują ekspresję genów. W artykule przedstawiono najnowsze informacje dotyczące wzajemnej regulacji między miRNA a szlakiem sygnałowym TGF- β 1 oraz jej potencjalnego znaczenia w terapii raka nerki.

Słowa kluczowe: TGF- β 1, rak nerki, mikroRNA

Abstract

Alterations in TGF- β 1 signalling in renal cancer are accompanied by disturbed expression of microRNAs (miRNAs). TGF- β 1 is an important regulator of key cellular processes and contributes to the development of many diseases, including cancer. At early cancer stages, TGF- β 1 inhibits proliferation and tumour growth, while as the disease progresses, TGF- β 1 stimulates metastasis. This dual TGF- β 1 effect in cancers is called the “TGF- β 1 paradox”. miRNAs – small, noncoding RNAs which regulate genes expression may contribute to the switching of TGF- β 1 from suppressor to oncogenic function. The article presents the latest information regarding mutual regulation between miRNAs and the TGF- β 1 signalling pathway as well as its potential role in the treatment of kidney cancer.

Wpłynęło: 6-11-2019

Zaakceptowano: 6-12-2019

Opublikowano: 29-05-2020

DOI: 10.5604/01.3001.0014.1585

Adres do korespondencji

dr hab. Joanna Bogusławska, Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 99/103, 01-813 Warszawa, e-mail: joanna.boguslawska@cmkp.edu.pl

Keywords: TGF- β 1, renal cancer, microRNA

WSTĘP

Rak nerki stanowi około 3% wszystkich nowotworów człowieka, a najczęściej występującym jego typem jest rak nerkowokomórkowy (*renal cell cancer*, RCC), wywodzący się z nabłonka kanalików proksymalnych. Wyróżnia się 3 podtypy RCC: jasnokomórkowy (*clear cell renal cell carcinoma*, ccRCC), brodawkowaty (*papillary renal cell carcinoma*, pRCC) i chromofobny (*chromophobe renal cell carcinoma*, chRCC), przy czym najczęściej (75–80% przypadków) diagnozowany jest ccRCC, który jest również najbardziej agresywnym podtypem, charakteryzującym się dużą zdolnością do tworzenia przerzutów i opornością na chemioterapię [1, 2]. Głównym zaburzeniem genetycznym występującym w ccRCC jest utrata integralności fragmentu chromosomu 3p, prowadząca do mutacji w genach: *VHL*, *PBRM1*, *BAP1* i *SETD2*. W 80% przypadków ccRCC obserwuje się mutacje, hipermetylację promotora lub utratę heterozygotyczności genu *VHL* (*von Hippel Lindau*), które prowadzą do powstania nieaktywnej formy tego białka. Aktywny *VHL* oddziałuje z HIF1 α i HIF2 α (czynniki transkrypcyjne aktywowane hipoksją), kierując je do proteosomalnej degradacji. W warunkach hipoksji (niskiego stężenia tlenu) lub inaktywacji *VHL* następuje stabilizacja i nagromadzenie czynników HIF, a w konsekwencji aktywacja między innymi angiogenezy poprzez indukcję ekspresji VEGF lub proliferacji na skutek aktywacji PDGF, EGFR, TGF α [3].

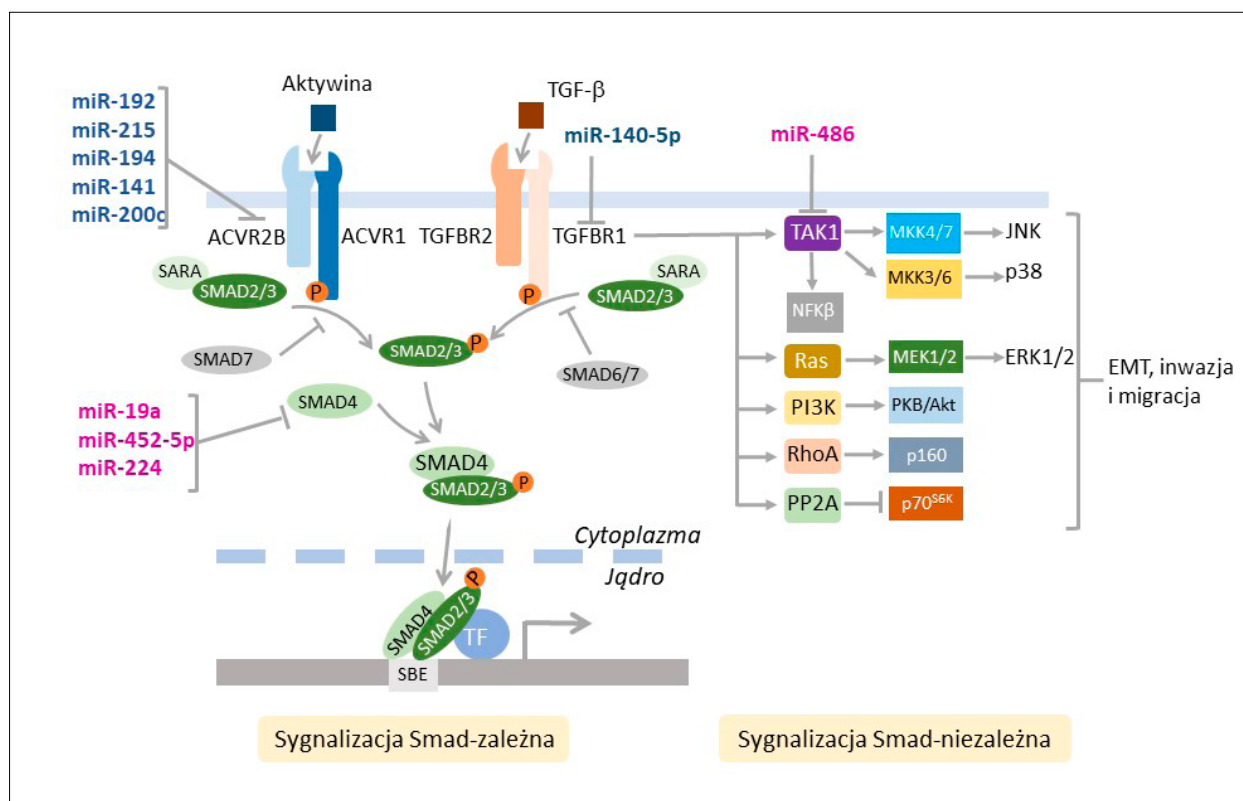
Wśród potencjalnych molekularnych biomarkerów RCC wymienia się cząsteczki mikroRNA (miRNA). Są to krótkie (18–25 pz), niekodujące cząsteczki RNA, które wiążąc się do sekwencji MRE (*miRNA response elements*) w 3'UTR transkryptów, powodują degradację mRNA lub zahamowanie translacji. Szacuje się, że miRNA regulują ekspresję ponad 60% genów człowieka, a co za tym idzie, wpływają na wiele kluczowych procesów komórkowych, takich jak: wzrost komórek, proliferacja, różnicowanie, apoptoza czy migracja. Zaburzenia ekspresji i funkcjonowania tych cząsteczek mogą przyczyniać się do rozwoju nowotworów. Szeroko opisano rolę miRNA w RCC: wykazano ich rolę w diagnostyce i prognozowaniu tego nowotworu [4–6], opisano udział miRNA w regulacji wzrostu, cyklu komórkowego, apoptozy, angiogenezy, migracji i inwazji komórek RCC [7]. Ponadto wykazano, że analiza ekspresji tych cząsteczek może być pomocna w wyborze odpowiedniej metody leczenia pacjentów z rakiem nerki. Stwierdzono między innymi korelację pomiędzy podwyższonym poziomem cząsteczki miR-183 w surowicy pacjentów RCC, a lepszą ich odpowiedzią na cytotoksyczny efekt terapii komórkami NK (*natural killer*) [8].

Podwyższony poziom ekspresji miR-381 uwrażliwia komórki linii 786-O wyprowadzone z RCC na 5-fluorouracyl [9], a ekspresja miR-942 wpływa na odpowiedź pacjentów z rakiem nerkowokomórkowym na leczenie sunitinibem [10].

W wielu tkankach wykazano wzajemną regulację pomiędzy cząsteczkami miRNA a szlakiem sygnałowym TGF- β 1 [11–17]. Cytokina TGF- β 1 jest wielofunkcyjnym białkiem regulującym wzrost komórek, ich różnicowanie, adhezję, migrację i apoptozę. Jednocześnie odgrywa ważną rolę w rozwoju i progresji nowotworów. We wczesnej fazie ich pełni funkcję supresora poprzez hamowanie proliferacji komórek nowotworowych, natomiast wraz z progresją choroby nowotworowej stymuluje migrację, inwazję i tworzenie przerzutów, czyli wykazuje właściwości onkogenne. Ten dwójaki efekt działania TGF- β 1 nazywany jest „paradoksem TGF- β 1”. Dokładne poznanie mechanizmów działania TGF- β 1 oraz znalezienie cząsteczek, które odpowiadają za tę zmienną rolę TGF- β 1, może mieć duże znaczenie w terapii nowotworów, w tym RCC. W prezentowanej pracy omówiono mechanizmy wzajemnego oddziaływania między cząsteczkami miRNA a szlakiem sygnałowym TGF- β w raku nerki, polegające na: 1) regulacji ekspresji genów szlaku sygnałowego TGF- β 1 przez cząsteczki miRNA; 2) regulacji ekspresji tych cząsteczek przez TGF- β 1, oraz 3) wpływie cząsteczek miRNA na procesy regulowane przez TGF- β 1.

SZLAK SYGNAŁOWY TGF-B

Rodzina czynników wzrostu TGF- β to duża grupa około 33 cytokin odgrywających ważną rolę w regulacji wielu kluczowych procesów komórkowych. W jej skład wchodzi między innymi: trzy izoformy TGF- β : TGF- β 1, TGF- β 2 i TGF- β 3, aktywiny A i B, inhibiny A i B, białka morfogenetyczne kości (*Browth Morphogenetic Proteins*, BMP) oraz czynniki wzrostu i różnicowania (*Growth Differentiation Factors*, GDF). Najlepiej poznanym białkiem tej rodziny jest TGF- β 1, który jest syntetyzowany w formie prekursorowej, zawierającej na końcu C peptyd sygnałowy, składający się z 112 reszt aminokwasowych, który zostaje usunięty w aparacie Golgiego przez proteazy podczas procesu dojrzewania tego białka. Dojrzała cząsteczka TGF- β 1 pozostaje jednak związana niekowalencyjnie z N-końcowym fragmentem białka LAP (*Latency Associated Protein*), tworząc w ten sposób tzw. mały kompleks latentny (*Small Latency Complex*, SLC), który może łączyć się z białkiem LTBP (*Latent TGF- β Binding Protein*) i formować duży kompleks latentny. Tworzenie tych kompleksów jest niezbędne do prawidłowego dojrzewania



Ryc. 1. Mechanizm działania szlaku sygnałowego TGF- β 1 (zależny i niezależny od białek SMAD). Na granatowo zaznaczono miRNA, które regulują ekspresję genów szlaku sygnałowego TGF- β 1 w guzach Wilmsa, a na różowo cząsteczki regulujące ekspresję tych genów w raku nerkowokomórkowym.

i sekrecji TGF- β 1, wpływa na jego stabilność oraz chroni przed jego przedwczesną aktywacją. TGF- β 1 jest aktywowany (uwalniany z tych kompleksów) pod wpływem różnych czynników, między innymi: wahań temperatury i pH, oksydacji przez reaktywne formy tlenu (*Reactive Oxygen Species*, ROS) czy proteolityczne cięcie przez proteazy, takie jak: białka MMP (*Matrix Metalloproteinases*) i plazminy. Ważną rolę w aktywacji TGF- β odgrywają również trombospondyna TSP-1 i integryny szczególnie $\alpha\beta$ 6, która wiąże się z domeną RGD obecną w kompleksie LAP/TGF- β i uwalnia dojrzałą cząsteczkę TGF- β 1 [18, 19].

Aktywny TGF- β 1 jest dimerem o masie cząsteczkowej 25 kDa i uczestniczy w przekazywaniu sygnałów komórkowych poprzez oddziaływanie ze specyficznymi receptorami błonowymi, wykazującymi aktywność kinaz serynowo-treoninowych. TGF- β 1 wiąże się do receptora typu II (TGFBR2), który tworzy heterodimer z receptorem typu I (TGFBR1). Po związaniu TGF- β 1 następuje fosforylacja cytoplazmatycznej domeny Gs TGFBR1 i aktywacja szlaków sygnałowych. W kanonicznym mechanizmie działania TGF- β 1, fosforylacja TGFBR1 prowadzi do aktywacji białek SMAD2 i SMAD3, które oddziałują z białkami SMAD4, transportowanymi następnie do

jądra komórkowego, gdzie następuje regulacja ekspresji genów zależnych od TGF- β 1. Białka SMAD6 i SMAD7 negatywnie regulują ścieżkę sygnałową TGF- β 1, głównie na skutek współzawodnictwa z białkami SMAD2 i 3 o wiązanie się z receptorem oraz tworzenie kompleksu z białkiem SMAD4. Hamują one również transkrypcję genów zależnych od TGF- β 1 poprzez wiązanie się z DNA w rejonie promotorowym tych genów [20] (Ryc. 1).

Cytokina TGF- β 1 może również działać niezależnie od białek SMAD w tzw. mechanizmie niekanonicznym. Aktywuje wówczas między innymi białka: MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*), TAK1 (*TGF- β – activated kinase*), Ras, RHOA (*Ras Homology Family Member A*), PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*) czy PP2A (*protein phosphatase 2A*), co z kolei prowadzi do aktywacji wielu innych białek i całych szlaków sygnałowych. Na przykład aktywacja TAK1 przez TGF- β 1 prowadzi do indukcji ekspresji COL1A1 i fibronektyny poprzez aktywację MKK3/6 (*MAPK kinase*) i p38 oraz MKK4/7 i JNK (*C-Jun N-terminal kinase*). Szlak kinaz RAS-RAF-MEK-ERK1 może być aktywowany przez TGF- β 1 w wyniku fosforylacji białka SHCA. Cytokina TGF- β 1 reguluje aktywność wielu GTP-az z rodziny RHO – w tym RHOA – poprzez stymulację ubiquitytacji i degra-

dację tego białka przez PAR6 (*Partioning defective 6 homolog alpha*) [21, 22]. Davis i wsp. opisali niekanoniczny mechanizm działania TGF- β 1, w którym cytokina ta reguluje biosyntezę niektórych cząsteczek mikroRNA (w tym miR-21) poprzez oddziaływanie białek SMAD (SMAD1, 2, 3, 5 i 8) z sekwencją SBE (*SMAD binding elements*) w pri-miRNA (sekwencje prekursorowe mikroRNA), co wpływa na wydajność przycinania tych prekursorów przez rybonukleazę DROSHA [23–25] (Ryc. 1).

Cytokina TGF- β 1, poprzez aktywację tak wielu różnych szlaków sygnałowych, uczestniczy w regulacji kluczowych procesów komórkowych, takich jak: embriogeneza, proliferacja, wzrost i różnicowanie komórek, apoptoza, produkcja macierzy zewnątrzkomórkowej czy regulacja działania układu immunologicznego w tym proces gojenia się ran. Szlak sygnałowy TGF- β podlega precyzyjnej regulacji, zależnej od typu tkanek i komórek, ich stopnia zróżnicowania oraz oddziaływania z innymi szlakami sygnałowymi. Zaburzenia funkcjonowania tego szlaku mogą prowadzić do rozwoju chorób, w tym nowotworowych. Wspomniany wcześniej „paradoks TGF- β 1” wynika z zaburzeń epigenetycznych oraz mutacji w genach szlaku TGF- β 1, dzięki którym na wczesnych etapach kancerogenezy możliwe jest hamowanie proliferacji i angiogenezy oraz indukcja apoptozy, natomiast w zaawansowanych stadiach choroby stymulacja powstawania przerzutów poprzez aktywację EMT (przejście nabłonkowo-mezenchymalne, *Epithelial-Mesenchymal transition*), modulowanie mikrośrodowiska guza, indukcję syntezy chemokin oraz wyciszenie odpowiedzi immunologicznej [21, 22, 26–31]. W licznych nowotworach, w tym w raku piersi [32], wątroby [33], jelita grubego [34], trzustki [35] czy płuc [36] stwierdzono zaburzenia ekspresji między innymi: TGFB1, TGFB1R1, TGFB1R2, SMAD2 czy SMAD4. Zaburzenia szlaku sygnałowego TGF- β w nowotworach zostały również potwierdzone przez konsorcjum TCGA (*The Cancer Genome Atlas*). W badaniach przeprowadzonych na próbkach z 33 typów nowotworów od ponad 9000 pacjentów stwierdzono zaburzenia tej ścieżki w ponad 40% przypadków nowotworów. Ponadto wykazano korelację ekspresji genów szlaku sygnałowego TGF- β oraz mikroRNA (wytypowanych jako potencjalnie regulujące ich ekspresję), co może świadczyć o regulacji szlaku TGF- β przez te cząsteczki [37].

ZABURZENIA SZLAKU SYGNAŁOWEGO TGF- β W RAKU NERKI

Białka szlaku sygnałowego TGF- β pełnią ważną rolę w rozwoju i prawidłowym funkcjonowaniu nerek.

Wykazano między innymi udział TGF- β 1 w rozwoju kanalików nerkowych [38] oraz Aktywiny A i TGF- β 2 podczas tworzenia się pączka moczowodowego [39]. Wyciszenie ekspresji TGFB2 u myszy prowadziło do agenezji nerek [49].

Szeroko opisano rolę TGF- β w rozwoju włóknienia nerek na skutek stymulacji produkcji białek macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM). Zwłóknienie nerek może prowadzić do rozwoju przewlekłej choroby nerek (*chronic kidney diseases*, CKD), a nawet schyłkowej niewydolności tego narządu (*End-stage renal diseases*, ESRD) [41–44]. Wykazano podwyższony poziom TGF- β 1 we krwi i moczu pacjentów z postępującym włóknieniem nerek. Wyciszenie tej cytokiny za pomocą przeciwciał, antysensownych oligonukleotydów lub innych inhibitorów hamowało włóknienie nerek w eksperymentach przeprowadzonych zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* [41].

Rola TGF- β w rozwoju raka nerki jest niejasna, a opisane wyniki badań są często sprzeczne. W wielu pracach opisano podwyższony poziom TGF- β 1 w próbkach tkanek RCC oraz liniach komórkowych wyprowadzonych z tego nowotworu [45–50]. U pacjentów z nowotworem nerek stwierdzono również wyższy poziom TGF- β 1 w osoczu i surowicy krwi [51–53], krwi obwodowej oraz w limfocytach naciekających guz (*tumor infiltrating lymphocytes*, TILs) [54]. Wykazano, że poziom ten koreluje ze stopniem zaawansowania i agresywności nowotworu i jest wyższy u pacjentów z przerzutującym rakiem nerki [53], co wskazuje na rolę TGF- β 1 w progresji tego nowotworu [55]. Odmienne wyniki przedstawił zespół Zheng’a. Wykazali oni obniżenie poziomu TGF- β 1 w próbkach z przerzutów RCC w porównaniu z wycinkami pierwotnych guzów, spowodowane hipermetylacją promotora TGFB1. Co istotne, wyniki te zostały potwierdzone w badaniach *in vivo* na mysich ksenograftach guzów pierwotnych i przerzutów. Inkubacja komórek nowotworowych z inhibitorem metylacji (5-aza-2'-deoksycytydyny) przed wprowadzeniem ich do organizmu zwierząt prowadziła do spadku ekspresji TGF- β 1 i zmniejszenia wielkości guza oraz wydłużała czas przeżycia myszy [56]. Niejednoznaczne są również wyniki dotyczące funkcjonalności szlaku TGF- β 1 w liniach komórkowych wyprowadzonych z ccRCC. Ananth i wsp. wykazali, że szlak ten jest nieaktywny w komórkach linii 786-O na skutek braku ekspresji receptora TGFB1R2, podczas gdy Sjolund i wsp. potwierdzili jego funkcjonalność w tych komórkach [57–58]. Funkcjonalność ta została również potwierdzona w naszych badaniach, prowadzonych w ramach grantu przyznanego przez Fundację Naukową Polpharmy (praca w przygotowaniu).

Jedną z przyczyn obserwowanych w ccRCC zaburzeń poziomu TGF- β 1 może być inaktywacja genu *VHL*. Wykazano, że VHL obniża stabilność TGF- β 1, prowadząc do zahamowania jego ekspresji w komórkach ccRCC 786-O. Wyciszenie tej cytokiny przy pomocy przeciwciał prowadziło do zahamowania wzrostu guzów i angiogenezy w mysich ksenograftach [57]. Komórki z inaktywowanym VHL wydzielały więcej TGF- β 1 i były bardziej wrażliwe na jego działanie niż te z aktywnym VHL [59]. Z kolei przywrócenie ekspresji VHL w komórkach ccRCC zmniejszało sekrecję TGF- β 1 przez te komórki, hamowało również poziom fosorylacji białka SMAD2, a co za tym idzie, obniżało odpowiedź komórek ccRCC na stymulację przez TGF- β 1, co potwierdza wzajemną regulację pomiędzy tymi szlakami [60]. Mechanizm tej regulacji został wyjaśniony między innymi przez Mallikarjuna i wsp., którzy wykazali, że aktywny VHL w odpowiedzi na TGF- β 1 prowadzi do ubikwitynacji receptora TGFBR1 w komórkach ccRCC, co prowadzi do zahamowania ekspresji zależnych od TGF- β 1 genów [61].

Badano również poziom receptorów TGF- β w RCC. Analiza ekspresji TGFBR1 u pacjentów z ccRCC wykazała, że wyższy jego poziom koreluje z gorszym rokowaniem pacjentów [58]. Bostrom i wsp. stwierdzili, że zahamowanie receptora TGFBR1 przy użyciu inhibitora SB431542 stymuluje inwazyjność komórek ccRCC [60]. Ponadto analiza przeprowadzona na 151 przypadkach nowotworów dróg moczowych wykazała wyższe ryzyko wystąpienia raka nerki u pacjentów z wyższym poziomem ekspresji wariantu TGFBR1 – Int7624A [62]. W niektórych pracach wykazano również spadek poziomu TGFBR2 wraz z progresją raka nerki, co może być przyczyną obserwowanej w zaawansowanym RCC oporności komórek nowotworowych na hamowanie ich wzrostu przez TGF- β 1 [63, 64]. Odmienne wyniki otrzymali Parker i wsp., którzy wykazali, że spadek ekspresji TGFBR2 koreluje z lepszym rokowaniem pacjentów z ccRCC [65]. Podobnie zespół Kominsky'ego zaobserwował, że wyciszenie ekspresji TGFBR2 u myszy hamuje tworzenie przerzutów ccRCC do kości [66]. Analiza poziomu receptora TGFBR3 wykazała spadek jego poziomu w ccRCC. Sjolund i wsp. zaobserwowali związek między obniżonym poziomem TGFBR3 a krótszym czasem przeżycia pacjentów z ccRCC [58]. Podobnie Nishida i wsp. stwierdzili niski poziom ekspresji tego receptora w próbkach tkanek od pacjentów z zaawansowaną postacią ccRCC. Jednocześnie wykazali, że wyciszenie ekspresji tego receptora hamuje migrację komórek i powstawanie przerzutów ccRCC do płuc [67].

Analizowano także ekspresję i rolę innych białek szlaku sygnałowego TGF- β 1 w RCC. Immunohistochemiczna analiza poziomu białek SMAD2, SMAD3 i SMAD4 w 637 próbkach od pacjentów z ccRCC wykazała negatywną korelację poziomu białek SMAD3 i SMAD4 z wiekiem pacjentów oraz stopniem zaawansowania i złośliwości nowotworu, a także długością czasu przeżycia pacjentów wolnego od progresji [68]. Również Sitaram i wsp. badali immunohistochemicznie poziom ekspresji białek SMAD2 i SMAD3 (ufosforylowanych pSMAD2/3) oraz białka PAI-1 (zależnego od TGF- β 1). Wykazali oni nadekspresję tych białek w próbkach tkanek od pacjentów z ccRCC o wyższym stopniu zaawansowania, a poziom tych białek korelował z wielkością guza i niższą przeżywalnością pacjentów. Ponadto hodowała komórki linii ccRCC: 786-O i A498 w obecności TGF- β 1 aktywowała poziom TGFBR1 i szlak TGF- β /Smad/PAI-1, a w konsekwencji inwazyjne właściwości komórek nowotworowych [69].

Intensywne badania nad rolą cytokiny TGF- β 1 w regulacji kluczowych procesów związanych z rozwojem i progresją RCC wykazały, że wpływa ona na proces angiogenezy, przejście nabłonkowo-mezenchymalne, adhezję oraz przerzutowanie. Udział TGF- β 1 w regulacji angiogenezy opisali Yagasaki i wsp., którzy oznaczali poziom TGF- β 1 oraz innych czynników angiogennych, takich jak: VEGF i MMP2 w preparatach tkanek ccRCC utrwalonych w parafinie (*formalin-fixed, paraffin-embedded ccRCC tissue samples*, FFPE) i stwierdzili korelację pomiędzy ekspresją VEGF oraz TGF- β 1 a stopniem zaawansowania i złośliwości nowotworu. Ponadto poziom białka TGF- β 1 negatywnie korelował z gęstością mikrounaczynienia (*microvessel density*, MVD), czyli czynnikiem służącym do oceny intensywności procesu neoangiogenezy (im jest wyższy, tym lepsze są rokowania pacjentów z ccRCC) [70]. Sprzeczne wyniki otrzymał zespół Taguchi i wsp., którzy wykazali, że TGF- β 1 w komórkach ccRCC nie wpływał na poziom głównych regulatorów angiogenezy: THBS1 i VEGFA [71].

TGF- β 1 uznawany jest za jeden z głównych regulatorów przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT). Rola TGF- β 1 w regulacji EMT oraz adhezji, migracji i inwazyjności komórek ccRCC została również dobrze udokumentowana w tym typie nowotworu. EMT jest złożonym, wieloetapowym procesem, który polega na przekształceniu komórek nabłonkowych w komórki o charakterze mezenchymalnym. Rozpoczyna się on od utraty połączeń między komórkami, następnie stopniowej degradacji ulega błona podstawna. Zmiany te są spowodowane spadkiem ekspresji białek powierzch-

niowych: E-kadheryny, kładyny czy okładyny, a wzrostem ekspresji białek charakterystycznych dla komórek mezenchymalnych: N-kadheryny czy integryny α V β 6. W konsekwencji komórki nabywają zdolność do migracji, co jest kluczowe dla progresji i przerzutowania komórek nowotworowych [72]. W naszych wcześniejszych badaniach wykazaliśmy, że nadekspresja TGF- β 1 prowadzi do wzrostu ekspresji genów związanych z adhezją i modelowaniem macierzy zewnątrzkomórkowej: TGFBI, COL1A1, COL5A1, COL8A1, FN1, ITGA5, ITGAM i TIMP1 w RCC [47]. W ccRCC, podobnie jak w innych nowotworach, wykazano, że TGF- β 1 wpływa na obniżenie ekspresji E-kadheryny, a wzrostu ekspresji wimentyny i N-kadheryny, co prowadzi do aktywacji EMT [73–76]. TGF- β 1 za pośrednictwem białek SMAD2/3 indukuje ekspresję białka PINCH-1, które oddziałuje z kinazą związaną z integrynami ILK (kinaza serynowo-treoninowa aktywująca małe GTP-azy, PI3K i kinazy MAP), co prowadzi do spadku ekspresji E-kadheryny i indukcji EMT [77]. TGF- β 1 stymuluje poziom integryn, w tym α V β 3 i α V β 6, które z kolei biorą udział w uwalnianiu TGF- β 1 z kompleksu latentnego. Ponadto integryna α V β 3 aktywuje kompleks FAK/Src (kinaza ognisk przylegania, *focal adhesion kinase*, FAK; Src – protoonkogenna kinaza), co prowadzi do aktywacji EMT poprzez hamowanie zależnych od E-kadheryny oddziaływań komórka-komórka. Feldkoren i wsp. potwierdzili ten mechanizm indukcji EMT przez TGF- β 1 w komórkach RCC, wykazali oni, że transfekcja tych komórek syntetycznym ligandem domeny RGD integryny α V β 3 zwiększała spadek poziomu E-kadheryny, co potwierdza synergistyczne oddziaływanie między TGF- β 1 a integrynami w hamowaniu jej ekspresji. Autorzy wykazali również, że w tej wzajemnej regulacji uczestniczy czynnik transkrypcyjny Snail1. Wyciszenie ekspresji FAK i PINCH-1 przy pomocy siRNA hamowało oddziaływanie TGF- β 1/RGD [78]. Spadek poziomu E-kadheryny wskutek indukcji ekspresji czynników transkrypcyjnych Snail1, Slug i ZEB1 w ccRCC pod wpływem działania TGF- β 1 potwierdzili również Tretbar i wsp. [76]. Huang i wsp. wykazali z kolei, że TGF- β 1 wpływa na migrację i inwazyjność komórek linii 786-O poprzez działanie na poziom mRNA i białka Fascin1 wiążącego aktyne i odgrywającego kluczową rolę w migracji komórek nowotworowych [79].

TGF- β 1 wpływa również na tworzenie przerzutów RCC do kości, które występują u około 40% pacjentów z ccRCC [80]. Kominsky i wsp. wykazali ekspresję TGF- β 1 i jego receptorów w próbkach pobranych z przerzutów raka nerek do kości (*RCC bone metastases*, RBM) oraz linii komórkowej wypro-

wadzonej z tych przerzutów RBM1-IT4. Jednocześnie potwierdzili, że komórki te wydzielają TGF- β 1 i TGF- β 2, a ich hodowla w obecności TGF- β 1 prowadzi do wzrostu fosforylacji białek SMAD2 i SMAD3, co wskazuje na funkcjonalność klasycznego mechanizmu działania tej cytokiny w tych komórkach. W doświadczeniach na liniach komórkowych z wyciszonym receptorem TGFBR2 wykazano też bezpośredni wpływ TGF- β 1 na tworzenie przerzutów RCC do kości. Komórki te były niewrażliwe na stymulację TGF- β 1, a wprowadzenie ich do kości udowej bezgranicznych myszy typu „nude” hamowało wzrost guza RCC i osteolizę kości. Co ciekawe, hodowla komórek RBM-IT4 w obecności TGF- β 1 nie wpływała na ich proliferację [66], co może sugerować, że stymulacja tworzenia przerzutów RCC do kości przez TGF- β 1 nie jest bezpośrednia. TGF- β 1 może stymulować powstawanie RBM poprzez indukcję parakrynnych oddziaływań między komórkami nowotworowymi a mikrośrodowiskiem kości. Kominsky i wsp. w innej swojej pracy potwierdzili tę hipotezę, wykazując, że TGF- β 1 indukuje w przerzutach ccRCC do kości ekspresję MMP-13 (*matrix metalloproteinase 13*) – białka zaangażowanego w degradację macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) [81].

MIKRORNA I SZLAK SYGNAŁOWY TGF- β W RAKU NERKI

Mimo dobrze poznanej roli cząsteczek mikroRNA w raku nerki, niewiele jest prac opisujących ich związek ze szlakiem sygnałowym TGF- β 1 i głównie dotyczą one roli miRNA w regulacji ekspresji białek tego szlaku. Wykazano między innymi udział miRNA w regulacji ekspresji białka SMAD4. I tak na przykład stwierdzono, że jego ekspresja jest regulowana przez miR-19a, którego nadekspresję obserwuje się w RCC i koreluje ona ze słabą przeżywalnością pacjentów. Transfekcja komórek RCC miR-19a prowadziła do indukcji proliferacji tych komórek oraz spadku ekspresji SMAD4 i PTEN [82]. Zhai i wsp. wykazali natomiast stymulację migracji i inwazyjności komórek RCC po nadekspresji miR-452-5p, spowodowaną zahamowaniem szlaku sygnałowego SMAD4/SMAD7, wynikającym z obniżenia ekspresji SMAD4 przez tę cząsteczkę miRNA. Co ciekawe, mechanizm ten jest hamowany przez sunitinib należący do grupy inhibitorów kinaz tyrozynowych (*tyrosine kinase inhibitor*, TKI), stosowany jako chemioterapeutyk pierwszego wyboru w leczeniu RCC, który hamuje migrację i inwazyjność komórek RCC poprzez obniżenie ekspresji miR-452-5p. Nadekspresja tej cząsteczki koreluje z krótszą przeżywalnością pacjentów z nerkowoko-

mórkowym rakiem nerki [83]. Opisano również regulację ekspresji SMAD4 i SMAD5 przez miR-224 [84]. Ekspresja SMAD4 może być również regulowana pośrednio przez cząsteczkę miR-629. Wykazano, że reguluje ona ekspresję białka TRIM33, będącego inhibitorem szlaku sygnałowego TGF- β 1/SMAD. Białko to wpływa na poziom SMAD4, jego lokalizację komórkową oraz konkuruje ze SMAD4 o wiązanie ze SMAD2/3. Nadekspresja miR-629 w komórkach RCC indukuje zależną od TGF- β 1 aktywację SMAD2/3 oraz SMAD4 poprzez zahamowanie ekspresji TRIM33 [85].

Opisano także regulację ekspresji receptora TGFBR1 przez cząsteczkę miR-140-5p w komórkach wyprowadzonych z guza Wilmsa (nefroblastoma), będącego najczęstszym nowotworem nerek występującym u dzieci [86]. Pochodzenie tych nowotworów jest nie do końca poznane, jednak uważa się, że wywodzą się one z nieprawidłowo przetrwałych embrionalnych komórek macierzystych nerki, które uległy transformacji nowotworowej [87]. W nowotworze tym wykazano również, że miR-192, miR-194, miR-141 i miR-200c regulują ekspresję białka ACVR2B (receptor aktywiny typu 2B), należącego do szlaku sygnałowego TGF- β 1. Stwierdzono obniżoną ekspresję tych cząsteczek miRNA w próbkach pobranych od dzieci z tym nowotworem w porównaniu z próbkami kontrolnymi (pobranymi z nerek osób dorosłych) [88].

Wykazano też regulację ekspresji innego białka szlaku sygnałowego TGF- β 1: TAK1 (*TGF- β -activated kinase 1*) w raku nerkowokomórkowym przez miR-486-6p. W komórkach wyprowadzonych z tego nowotworu obserwuje się podwyższony poziom TAK1, prowadzący do stymulacji wzrostu guza. Proces ten może być odwrócony przez zwiększenie ekspresji miR-486-6p [89].

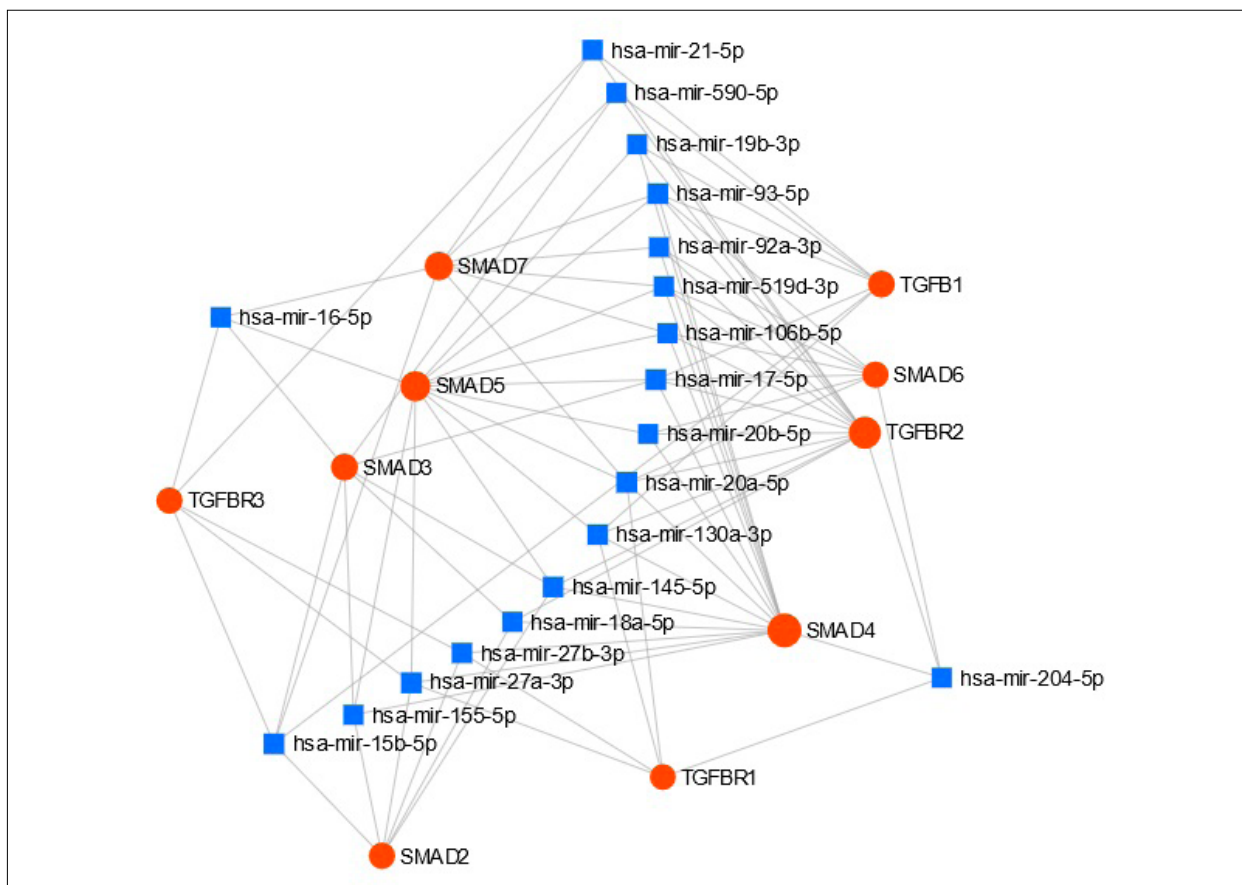
Cząsteczki mikroRNA mogą również uczestniczyć w regulacji procesów indukowanych przez TGF- β 1. Shi i wsp. wykazali, że TGF- β 1 indukuje ekspresję RBL2 (*retinoblastoma-like protein*), co prowadzi do zahamowania proliferacji i cyklu komórkowego. Jednocześnie wykazano, że ekspresja RBL2 jest z kolei hamowana przez miR-93 poprzez jego wiązanie się w rejonie 3'UTR tego transkryptu. Zatem miR-93 hamuje zależną od TGF- β 1 indukcję ekspresji RBL2, a tym samym inaktywuje supresorowe właściwości TGF- β 1. Co ciekawe, wykazano, że cytokina TGF- β 1 hamuje poziom miR-93, co w konsekwencji prowadzi do nadekspresji RBL2 i świadczy o istnieniu mechanizmu zwrotnej regulacji pomiędzy TGF- β 1, miR-93 a RBL2 [90]. W innej pracy udowodniono, że miR-429 hamuje indukowany przez TGF- β 1 pro-

ces EMT. Transfekcja komórek RCC tą cząsteczką miRNA prowadziła do zahamowania zależnego od TGF- β 1 spadku poziomu E-kadheryny, który, jak opisano powyżej, jest kluczowy dla rozpoczęcia procesu EMT [91].

Cytokina TGF- β 1 może również wpływać na ekspresję cząsteczek mikroRNA. W naszych badaniach wykazaliśmy wpływ tej cytokiny na ekspresję cząsteczek miRNA regulujących poziom genów związanych z adhezją i macierzą zewnątrzkomórkową. Hodowla komórek ccRCC w obecności TGF- β 1 prowadziła do zahamowania ekspresji miR-30a-5p i miR-328 oraz indukcji ekspresji miR-25-3p. Zaobserwowaliśmy również silną korelację pomiędzy tymi miRNA, a TGF- β 1 w próbkach będących wycinkami ccRCC. TGF- β 1 indukował ekspresję genów COL5A1 i ITGA5, stymulacja ta była silniejsza po wyciszeniu miR-25-3p, co sugeruje, że ta cząsteczka hamuje zależną od TGF- β 1 regulację ekspresji badanych genów adhezyjnych [92].

W ramach finansowanego przez Naukową Fundację Polpharmy grantu pt.: *Cząsteczki mikroRNA pośredniczące w działaniu TGF- β 1 w raku nerki: poszukiwanie nowych potencjalnych markerów nowotworzenia i celów terapeutycznych* badaliśmy oddziaływanie między cząsteczkami miRNA a cytokiną TGF- β 1. Przeprowadzona przez nas globalna analiza wpływu TGF- β 1 na poziom cząsteczek miRNA (przy użyciu mikromacierzy) wykazała wpływ tej cytokiny na poziom ekspresji miR-181a-5p, miR-181b-5p, miR-125b-5p, miR-155-5p oraz miR-30c-5p, stwierdziliśmy również, że cząsteczki te regulują ekspresję genów związanych z proliferacją (praca w przygotowaniu).

Jak opisano powyżej, cząsteczki mikroRNA mogą uczestniczyć w regulacji ekspresji genów szlaku sygnałowego TGF- β 1 poprzez wiązanie się do 3'UTR ich transkryptów. W celu wytypowania takich cząsteczek przeprowadziliśmy analizę bioinformatyczną przy użyciu programu miRSystem <http://mirsystem.cgm.ntu.edu.tw/> [93], który integruje wyniki 7 programów służących do szukania miejsc wiązania cząsteczek miRNA, przy czym do dalszych analiz wybieraliśmy tylko cząsteczki, których potencjalne oddziaływanie z 3'UTR transkryptów *TGFB1*, *TGFB1*, *TGFB2*, *TGFB3*, *SMAD2*, *SMAD3*, *SMAD4*, *SMAD5*, *SMAD6* oraz *SMAD7* zostało wytypowane przez przynajmniej 4 programy. W ten sposób wytypowano 197 miRNA. Na rycinie 2 przedstawiono cząsteczki miRNA, które potencjalnie oddziałują z 3'UTR przynajmniej 4 z 10 analizowanych transkryptów i są to między innymi: miR-15b-5p, miR-16-5p, miR-21-5p, miR-



Ryc 2. Cząsteczki mikroRNA potencjalnie wiążą się z 3'UTR transkryptów szlaku sygnałowego TGF- β 1. Na schemacie zaznaczono cząsteczki mikroRNA, które potencjalnie oddziałują z co najmniej 4 z 10 analizowanych genów. Analiza została wykonana przy pomocy programu bioinformatycznego miRNet: <https://www.mirnet.ca/miRNet/home.xhtml> [106]. Lista cząsteczek miRNA, poddanych analizie w programie miRNet została utworzona przy użyciu programu miRSystem: <http://mirsystem.cgm.ntu.edu.tw/> [93], który integruje wyniki 7 programów bioinformatycznych służących do typowania miejsc wiązania cząsteczek miRNA, przy czym do analizy w miRNet wybrano tylko te cząsteczki miRNA, które zostały wytypowane przez przynajmniej 4 z 7 programów.

-27b-3p, miR-155-5p czy miR-204-5p. Większość tych oddziaływań została potwierdzona eksperymentalnie w różnych tkankach i nowotworach, np.: wiązanie się miR-16-5p z 3'UTR *SMAD3* [94, 95] i *SMAD7* [96]; miR-21-5p z 3'UTR *TGFB3* [97] i *SMAD7* [98], oraz miR-155-5p z 3'UTR *SMAD4* [99] i *SMAD5* [100, 101]. Do tej pory nie potwierdzono tych oddziaływań w raku nerki.

Przeprowadziliśmy również analizę bioinformatyczną przy użyciu programu: Encori (<http://starbase.sysu.edu.cn/index.php>) [102], który wykorzystuje dane dotyczące ekspresji genów, miRNA oraz innych niekodujących cząsteczek RNA z konsorcjum TCGA (*The Cancer Genome Atlas Program*, <https://www.cancer.gov/tcga>) w celu wytypowania cząsteczek miRNA, których ekspresja w ccRCC koreluje z ekspresją genów szlaku sygnałowego TGF- β 1: *TGFB1*, *TGFB1*, *TGFB2*, *TGFB3*, *SMAD2*, *SMAD3*, *SMAD4*, *SMAD6* i *SMAD7*. Wyniki tej analizy zostały przedstawione w tabeli 1. Ekspresja cząsteczek miR-10b-5p i miR-139-5p koreluje dodatnio z eks-

presją największej liczby genów szlaku sygnałowego TGF- β 1 (miR-10b-5p vs *SMAD4*, *SMAD6*, *SMAD7*, *TGFB2*, *TGFB3* oraz miR-139-5p vs *SMAD2*, *SMAD4*, *SMAD6*, *TGFB2* i *TGFB3*). Co ciekawe, wykazaliśmy również korelację między ekspresją wytypowanych powyżej cząsteczek miRNA potencjalnie regulujących ekspresję genów szlaku sygnałowego TGF- β 1 a ekspresją tych genów, np.: miR-21-5p vs *TGFB1* i *SMAD4*, miR-130e-3p vs *TGFB1*, miR-145-5p vs *SMAD6*, *SMAD7*, *TGFB2* i *TGFB3* czy miR-155-5p a *TGFB1*. Może to potwierdzać wzajemną regulację między tymi cząsteczkami miRNA a szlakiem sygnałowym TGF- β 1 w ccRCC.

DALSZE KIERUNKI BADAŃ

Ze względu na zaburzenia ścieżki sygnałowej TGF- β 1 w nowotworach, intensywnie poszukuje się cząsteczek oddziałujących bezpośrednio z białkami tego szlaku i modulującymi ich poziom. Do tej pory stosowano między innymi: przeciwciała

Tabela I. Częsteczki mikroRNA, których poziom w ccRCC koreluje z poziomem genów szlaku sygnałowego TGF- β 1. Wyniki uzyskano przy użyciu programu Encori (<http://starbase.sysu.edu.cn/index.php>), korelację wyliczono na danych dla 517 próbek ccRCC z bazy TCGA. W tabeli przedstawiono częsteczki miRNA, dla których współczynnik r wynosi przynajmniej $\pm 0,3$.

	Gen, którego ekspresja koreluje z ekspresją miRNA	Współczynnik korelacji r Spermana	Wartość p		Gen, którego ekspresja koreluje z ekspresją miRNA	Współczynnik korelacji r Spermana	Wartość p
	<i>TGFBR3</i>	0,3	3,4E-12	hsa-miR-182-5p	<i>SMAD6</i>	-0,318	1,39E-13
hsa-miR-10a-5p	<i>SMAD4</i>	0,322	5,85E-14	hsa-miR-182-5p	<i>SMAD7</i>	-0,328	2,16E-14
hsa-miR-10b-5p	<i>SMAD4</i>	0,386	8,55E-20	hsa-miR-182-5p	<i>TGFBR2</i>	-0,369	3,95E-18
hsa-miR-10b-5p	<i>SMAD6</i>	0,326	2,99E-14	hsa-miR-182-5p	<i>TGFBR3</i>	-0,47	8,52E-30
hsa-miR-10b-5p	<i>SMAD7</i>	0,405	7,38E-22	hsa-miR-183-5p	<i>SMAD6</i>	-0,328	1,98E-14
hsa-miR-10b-5p	<i>TGFBR2</i>	0,441	5,1E-26	hsa-miR-183-5p	<i>SMAD7</i>	-0,361	2,3E-17
hsa-miR-10b-5p	<i>TGFBR3</i>	0,436	1,92E-25	hsa-miR-183-5p	<i>TGFBR2</i>	-0,389	4,36E-20
hsa-miR-125a-5p	<i>SMAD4</i>	0,372	2,15E-18	hsa-miR-183-5p	<i>TGFBR3</i>	-0,478	7,12E-31
hsa-miR-125a-5p	<i>TGFBR3</i>	0,331	1,12E-14	hsa-miR-193a-3p	<i>TGFB1</i>	0,317	1,44E-13
hsa-miR-126-3p	<i>SMAD6</i>	0,352	1,52E-16	hsa-miR-193a-5p	<i>TGFB1</i>	0,371	2,8E-18
hsa-miR-126-3p	<i>SMAD7</i>	0,35	2,27E-16	hsa-miR-193b-3p	<i>SMAD4</i>	-0,303	1,78E-12
hsa-miR-126-3p	<i>TGFBR2</i>	0,451	2,53E-27	hsa-miR-193b-3p	<i>SMAD7</i>	-0,317	1,46E-13
hsa-miR-126-3p	<i>TGFBR3</i>	0,473	3,81E-30	hsa-miR-193b-3p	<i>TGFBR2</i>	-0,353	1,29E-16
hsa-miR-126-5p	<i>TGFBR2</i>	0,437	1,45E-25	hsa-miR-199a-3p	<i>TGFB1</i>	0,305	1,45E-12
hsa-miR-126-5p	<i>TGFBR3</i>	0,417	3,33E-23	hsa-miR-199a-5p	<i>TGFB1</i>	0,338	2,74E-15
hsa-miR-130a-3p	<i>TGFB1</i>	0,322	5,79E-14	hsa-miR-199b-3p	<i>TGFB1</i>	0,304	1,53E-12
hsa-miR-130b-3p	<i>SMAD4</i>	-0,3	3,48E-12	hsa-miR-200b-3p	<i>TGFB1</i>	-0,344	8,02E-16
hsa-miR-134-5p	<i>TGFB1</i>	0,308	8,44E-13	hsa-miR-204-5p	<i>TGFBR3</i>	0,464	5,31E-29
hsa-miR-139-5p	<i>SMAD2</i>	0,35	2,29E-16	hsa-miR-21-5p	<i>TGFB1</i>	0,383	1,76E-19
hsa-miR-139-5p	<i>SMAD4</i>	0,442	4,32E-26	hsa-miR-21-5p	<i>SMAD4</i>	-0,411	1,74E-22
hsa-miR-139-5p	<i>SMAD6</i>	0,495	2,69E-33	hsa-miR-221-3p	<i>TGFBR3</i>	-0,341	1,5E-15
hsa-miR-139-5p	<i>TGFBR2</i>	0,625	2,11E-57	hsa-miR-222-3p	<i>TGFBR3</i>	-0,327	2,4E-14
hsa-miR-139-5p	<i>TGFBR3</i>	0,608	1,32E-53	hsa-miR-22-3p	<i>SMAD4</i>	-0,347	4,6E-16
hsa-miR-142-5p	<i>SMAD4</i>	-0,31	5,33E-13	hsa-miR-22-3p	<i>SMAD7</i>	-0,378	5,39E-19
hsa-miR-143-3p	<i>TGFBR2</i>	0,359	3,67E-17	hsa-miR-22-3p	<i>TGFBR2</i>	-0,3	3,36E-12
hsa-miR-143-3p	<i>TGFBR3</i>	0,378	5,76E-19	hsa-miR-22-3p	<i>TGFBR3</i>	-0,348	3,34E-16
hsa-miR-145-5p	<i>SMAD6</i>	0,338	2,72E-15	hsa-miR-23b-3p	<i>SMAD4</i>	0,301	2,61E-12
hsa-miR-145-5p	<i>SMAD7</i>	0,329	1,75E-14	hsa-miR-27b-3p	<i>SMAD6</i>	0,305	1,46E-12
hsa-miR-145-5p	<i>TGFBR2</i>	0,348	3,42E-16	hsa-miR-29b-3p	<i>TGFBR2</i>	-0,333	7,4E-15
hsa-miR-145-5p	<i>TGFBR3</i>	0,358	4,14E-17	hsa-miR-29b-3p	<i>TGFBR3</i>	-0,391	2,61E-20
hsa-miR-146b-5p	<i>SMAD4</i>	-0,326	2,75E-14	hsa-miR-30a-5p	<i>TGFB1</i>	-0,386	8,58E-20
hsa-miR-155-5p	<i>TGFB1</i>	0,32	8,29E-14	hsa-miR-30d-5p	<i>TGFB1</i>	-0,365	9,07E-18
hsa-miR-181a-5p	<i>TGFBR2</i>	0,336	4,04E-15	hsa-miR-30e-5p	<i>TGFB1</i>	-0,347	4,87E-16
hsa-miR-181a-5p	<i>TGFBR3</i>	0,353	1,42E-16	hsa-miR-338-3p	<i>SMAD6</i>	0,347	4,55E-16
hsa-miR-181d-5p	<i>TGFB1</i>	0,341	1,57E-15	hsa-miR-338-3p	<i>SMAD7</i>	0,329	1,78E-14

Tabela I. c.d.

	Gen, którego ekspresja koreluje z ekspresją miRNA	Współczynnik korelacji r Spermana	Wartość p
hsa-miR-338-3p	TGFBR2	0,436	2,16E-25
hsa-miR-338-3p	TGFBR3	0,393	1,59E-20
hsa-miR-362-5p	TGFB1	-0,36	2,73E-17
hsa-miR-365a-3p	TGFBR2	-0,321	7,77E-14
hsa-miR-365b-3p	TGFBR2	-0,321	8,04E-14
hsa-miR-378a-3p	SMAD2	-0,306	1,06E-12
hsa-miR-378a-3p	SMAD7	-0,307	9,77E-13
hsa-miR-379-5p	TGFB1	0,312	3,99E-13
hsa-miR-455-5p	TGFBR3	0,308	8,44E-13
hsa-miR-4677-3p	SMAD4	-0,303	2,04E-12
hsa-miR-497-5p	TGFB1	0,331	1,04E-14
hsa-miR-500a-3p	TGFB1	-0,327	2,28E-14
hsa-miR-502-3p	TGFB1	-0,318	1,42E-13
hsa-miR-532-5p	TGFB1	-0,48	4E-31
hsa-miR-584-5p	TGFBR2	0,448	6,25E-27
hsa-miR-584-5p	TGFBR3	0,375	1,17E-18
hsa-miR-589-5p	SMAD7	-0,306	1,19E-12
hsa-miR-625-3p	SMAD4	-0,312	4,18E-13
hsa-miR-660-5p	TGFB1	-0,353	1,18E-16
hsa-miR-874-3p	SMAD2	0,308	7,72E-13
hsa-miR-892c-3p	TGFB1	-0,316	1,85E-13
hsa-miR-96-5p	TGFBR2	-0,338	2,9E-15
hsa-miR-96-5p	TGFBR3	-0,357	5,26E-17
hsa-miR-99b-5p	TGFBR3	0,356	6,68E-17

neutralizujące TGF-β1, antysensowne oligonukleotydy (ASO), inhibitory receptorów, czy receptory „pułapki” nie posiadające domen cytoplazmatycznej. Pierwszym opisanym przykładem tego typu terapii w nowotworach układu moczowego było zastosowanie oligonukleotydów antysensownych (ASO) w celu zablokowania sekrecji TGF-β1 przez komórki wyprowadzone z raka pęcherza moczowego, co prowadziło do zahamowania wzrostu tych komórek *in vitro* i *in vivo* [103]. Ostatnio przeprowadzono badania z wykorzystaniem M7824 – dwufunkcyjnego białka fuzyjnego, składającego się z monoklonalnego przeciwciała anty-PLD-L1 (inhibitor immunologicznych punktów kontrolnych) oraz zewnątrzkomórkowej domeny TGFBR2

(które wychwytuje wszystkie formy TGF-β, blokując w ten sposób immunosupresyjne właściwości tych białek). Traktowanie komórek wyprowadzonych z raka pęcherza moczowego M7824 hamowało ekspresję genów związanych z angiogenezą, przebudową macierzy zewnątrzkomórkowej, EMT oraz poziom białek zewnątrzkomórkowych związanych z modulacją układu immunologicznego [104]. Wykazano, że cząsteczki miRNA mogą wpływać na odpowiedź komórek nowotworowych na leczenie chemioterapeutykami. Między innymi zwiększona ekspresja miR-145 (który reguluje poziom TGFBR2 i SMAD3) prowadzi do rozwoju oporności komórek raka pęcherza moczowego na gemcyabinę. Ponadto stwierdzono, że transfekcja komórek raka prostaty miR-582-3p i miR-582-5p hamowała migrację i inwazję komórek nowotworowych *in vivo* oraz tworzenie przerzutów *in vitro*. Badane cząsteczki miRNA hamowały poziom SMAD2, SMAD4, TGFBR1 i TGFBR2, a w konsekwencji blokowały cały szlak sygnałowy TGF-β [105]. Do tej pory nie opisano przykładów hamowania ścieżki sygnałowej TGF-β w leczeniu raka nerki. Uzyskane w ramach projektu wyniki pozwalają lepiej poznać molekularne podłoże działania TGF-β1 w raku nerki, co może być przydatne w opracowaniu terapii tego nowotworu. Jeśli uda się potwierdzić bezpośrednie oddziaływanie analizowanych w ramach grantu przyznanego przez Naukową Fundację Polpharmy miRNA z transkryptami szlaku TGF-β1, być może zyskamy cząsteczki, które mogą być bezpośrednimi modulatorami tego szlaku o znaczeniu terapeutycznym.

WNIOSKI

W artykule szeroko zostały opisane wzajemne zależności między cząsteczkami mikroRNA a szlakiem sygnałowym TGF-β1. W raku nerki obserwuje się zaburzenia ekspresji cząsteczek miRNA oraz poziomu i funkcjonowania białek szlaku sygnałowego TGF-β1, a biorąc pod uwagę ich rolę w regulacji wielu procesów związanych z nowotworzeniem, poznanie mechanizmów wzajemnych oddziaływań między cytokiną TGF-β1 a miRNA może przyczynić się do opracowania nowych strategii leczenia raka nerki.

PODZIĘKOWANIA

Podziękowania dla Naukowej Fundacji Polpharmy za grant, z którego finansowana była prezentowana praca, oraz dla Jana Hanuska za analizę bioinformatyczną korelacji ekspresji TGF-β1 oraz genów szlaku sygnałowego TGF-β1.

PIŚMIENICTWO

- Capitanio U., Cloutier V., Zini, L. i wsp.: A critical assessment of the prognostic value of clear cell, papillary and chromophobe histological subtypes in renal cell carcinoma: A population-based study, *BJU Int*, 2009; 103: 1496–1500.
- Keegan K.A., Schupp C.W., Chamie K. i wsp.: Histopathology of surgically treated renal cell carcinoma: Survival differences by subtype and stage, *J Urol*, 2012; 188: 391–397.
- Brugarolas J.: Molecular genetics of clear-cell renal cell carcinoma, *J Clin Oncol*, 2014; 32: 1968–1976.
- Youssef Y.M., White N.M.A., Grigull J. i wsp.: Accurate Molecular Classification of Kidney Cancer Subtypes Using MicroRNA Signature, *European Urol*, 2011; 59: 721–730.
- Fridman E., Dotan Z., Barshack I. i wsp.: Accurate Molecular Classification of Renal Tumors Using MicroRNA Expression, *J Mol Diagn*, 2010; 12: 687–696.
- Silva-Santos R.M., Costa-Pinheiro P., Luis A., i wsp.: MicroRNA profile: A promising ancillary tool for accurate renal cell tumour diagnosis, *Brit J Cancer*, 2013; 109: 2646–2653.
- Mytsyk Y., Dosenko V., Skrzypczyk M.A. i wsp.: Potential clinical applications of microRNAs as biomarkers for renal cell carcinoma, *Cent European J Urol*, 2018; 71: 295–303.
- Zhang Q.M., Di W.Y., Dong Y.Q. i wsp.: High serum miR-183 level is associated with poor responsiveness of renal cancer to natural killer cells, *Tumor Biol*, 2015; 36: 9245–9249.
- Chen B.H., Duan L.J., Yin G.M. i wsp.: miR-381, a novel intrinsic WEE1 inhibitor, sensitizes renal cancer cells to 5-FU by up-regulation of Cdc2 activities in 786-O, *J Chemother*, 2013; 25: 229–238.
- Prior C., Perez-Gracia J.L., Garcia-Donas J. i wsp.: Identification of Tissue microRNAs Predictive of Sunitinib Activity in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma, *PLoS ONE*, 2014; 9: e86263.
- Butz H., Racz K., Hunyady L. i wsp.: Crosstalk between TGF- β signaling and the microRNAmachinery, *Trends Pharm Sci*, 2012; 33: 382–393.
- Bowen T., Jenkins R.H., Fraser D.J.: MicroRNAs, transforming growth factor beta-1, and tissue fibrosis, *J Pathol*, 2013; 229: 274–285.
- Guo L.L., Zhang Y.S., Zhang L.F. i wsp.: MicroRNAs, TGF- β signaling, and the inflammatory microenvironment in cancer, *Tumor Biol*, 2016; 37: 115–125.
- Chen W., Zhou S., Mao L., i wsp.: Crosstalk between TGF- β signaling and miRNAs in breast cancer metastasis, *Tumor Biol*, 2016; 37: 10011–10019.
- Kang H.: Role of microRNAs in TGF- β signaling pathway-mediated pulmonary fibrosis, *Int J Mol Sci*, 2017; 18(12): 2527.
- Janakiraman H., House R.P., Gangaraju V.K., i wsp.: The long (lncRNA) and short (miRNA) of It: TGF β -mediated control of RNA-binding proteins and noncoding RNAs, *Mol Cancer Res*, 2018; 16: 567–579.
- Suzuki H.I.: MicroRNA Control of TGF- β signalling, *Int J Mol Sci*, 2018; 19: 1901.
- Hayashi H., Sakai T.: Biological significance of local TGF- β activation in liver diseases, *Front Physiol*, 2012; 3: 12.
- Kubiczkova L., Sedlarikova L., Hajek R. i wsp.: TGF- β -an excellent servant but a bad master, *J Transl Med*, 2012; 10: 183.
- Rahimi R.A., Leof E.B.: TGF- β signaling: A tale of two responses, *J Cell Biochem*, 2007; 102: 593–608.
- Bierie B., Moses H.L.: TGF β : The molecular Jekyll and Hyde of cancer, *Nat Rev Cancer*, 2006; 6: 506–520.
- Meulmeester E., ten Dijke P.: The dynamic roles of TGF- β in cancer, *J Pathol*, 2011; 223: 205–218.
- Davis B.N., Hilyard A.C., Lagna G. i wsp.: SMAD proteins control DROSHA mediated, maturation, *Nature*, 2008; 454: 56–61.
- Davis B.N., Hilyard A.C., Nguyen P.H. i wsp.: Smad proteins bind a conserved RNA sequence to promote microRNA maturation by Drosha, *Mol Cell*, 2010; 39: 373–384.
- Davis-Dusenbery B.N., Hata A.: Smad-mediated miRNA processing: A critical role for a conserved RNA sequence, *RNA Biol*, 2011; 8: 71–76.
- Wakefield L.M., Hill C.S.: Beyond TGF β : Roles of other TGF β superfamily members in cancer, *Nat Rev Cancer*, 2013; 13: 328–341.
- Cantelli G., Crosas-Molist E., Georgouli M. i wsp.: TGFB-induced transcription in cancer, *Semin Cancer Biol*, 2017; 42: 60–69.
- Ikushima H., Miyazono K.: TGF β signalling: A complex web in cancer progression, *Nat Rev Cancer*, 2010; 10: 415–424.
- Drabsch Y., ten Dijke P.: TGF- β signalling and its role in cancer progression and metastasis, *Cancer Metast Rev*, 2012; 31: 553–568.
- Pickup M., Novitskiy S., Moses H.L.: The roles of TGF β in the tumour microenvironment, *Nat Rev Cancer*, 2013; 13: 788–799.
- Tian M.Z., Neil J.R., Schiemann W.P.: Transforming growth factor- β and the hallmarks of cancer, *Cell Signal*, 2011; 23: 951–962.
- Zarzynska J.M.: Two faces of TGF- β 1 in breast cancer. *Mediat Inflamm*, 2014; 2014: 141747.
- Katz L.H., Likhter M., Jogunoori W. i wsp.: TGF- β signaling in liver and gastrointestinal cancers, *Cancer Lett*, 2016; 379: 166–172.
- Xu Y., Pasche B.: TGF- β signaling alterations and susceptibility to colorectal cancer, *Hum Mol Genet*, 2007; 16: R14–R20.

35. Truty M.J., Urrutia R.: Basics of TGF-beta and pancreatic cancer, *Pancreatology*, 2007; 7: 423–435.
36. Jeon H.S., Jen J.: TGF-beta signaling and the role of inhibitory Smads in non-small cell lung cancer, *J Thorac Oncol*, 2010; 5: 417–419.
37. Korkut A., Zaidi S., Kanchi R.S. i wsp.: A Pan-Cancer Analysis Reveals High-Frequency Genetic Alterations in Mediators of Signaling by the TGF-beta Superfamily, *Cell Syst*, 2018, 7: 422–437.
38. Thompson N.L., Flanders K.C., Smith J.M. i wsp.: Expression of Transforming Growth Factor-Beta-1 in Specific Cells and Tissues of Adult and Neonatal Mice, *J Cell Biol*, 1989; 108: 661–669.
39. Shah M.M., Sampogna R.V., Sakurai H. i wsp.: Branching morphogenesis and kidney Disease, *Development*, 2004; 131: 1449–1462.
40. Sanford L.P., Ormsby I., Gittenbergerde-Groot A.C. i wsp.: TGF beta 2 knockout mice have multiple developmental defects that are nonoverlapping with other TGF beta knockout phenotypes, *Development*, 1997; 124: 2659–2670.
41. Meng X.M., Nikolic-Paterson D.J., Lan H.Y.: TGF-beta: The master regulator of fibrosis, *Nature Reviews Nephrology*, 2016; 12: 325–338.
42. Hu H.H., Chen D.Q., Wang Y.N. i wsp.: New insights into TGF-beta/Smad signaling in tissue fibrosis, *Chem-Biol Interact*, 2018; 292: 76–83.
43. Isaka Y.: Targeting TGF-beta Signaling in Kidney Fibrosis, *Int J Mol Sci*, 2018; 19(9): 2532.
44. Sutariya B., Jhonsa D., Saraf M.N.: TGF-beta: The connecting link between nephropathy and fibrosis, *Immunopharmacol. Immunotoxicol*, 2016; 38: 39–49.
45. Derynck R., Goeddel D.V., Ullrich A. i wsp.: Synthesis of Messenger-Rnas for Transforming Growth Factor-Alpha and Factor-Beta and the Epidermal Growth-Factor Receptor by Human-Tumors, *Cancer Res*, 1987; 47: 707–712.
46. Gomella L.G., Sargent E.R., Wade T.P. i wsp.: Expression of Transforming Growth Factor-Alpha in Normal Human Adult Kidney and Enhanced Expression of Transforming Growth Factor-Alpha and Factor-Beta-1 in Renal-Cell Carcinoma, *Cancer Res*, 1989; 49: 6972–6975.
47. Bogusławska J., Kedzierska H., Poplawski P. i wsp.: Expression of Genes Involved in Cellular Adhesion and Extracellular Matrix Remodeling Correlates with Poor Survival of Patients with Renal Cancer, *J Urol*, 2016; 195: 1892–1902.
48. Ramp U., Jaquet K., Reinecke P. i wsp.: Acquisition of TGF-beta(1) resistance: An important progression factor in human renal cell carcinoma, *Lab Investig*, 1997; 76: 739–749.
49. Ramp U., Jaquet K., Reinecke P., i wsp.: Functional intactness of stimulatory and inhibitory autocrine loops in human renal carcinoma cell lines of the clear cell type, *J Urol*, 1997; 157: 2345–2350.
50. Knoefel B., Nuske K., Steiner T., i wsp.: Renal cell carcinomas produce IL-6, IL-10, IL-11, and TGF-beta 1 in primary cultures and modulate T lymphocyte blast transformation, *J Interf Cytok Res*, 1997; 17: 95–102.
51. Wunderlich H., Steiner T., Junker U. i wsp.: Serum transforming growth factor-beta 1 in patients with renal cell carcinoma, *J Urol*, 1997; 157: 1602–1603.
52. Wunderlich H., Steiner T., Kosmehl, H. i wsp.: Increased transforming growth factor beta 1 plasma level in patients with renal cell carcinoma: A tumor-specific marker? *Urol Int*, 1998; 60: 205–207.
53. Hegele A., Varga Z., von Knobloch R. i wsp.: TGF-beta 1 in patients with renal cell carcinoma, *Urol Res*, 2002; 30: 126–129.
54. Kim C.S., Kim Y., Kwon T. i wsp.: Regulatory T cells and TGF-beta 1 in clinically localized renal cell carcinoma: Comparison with age-matched healthy controls, *Urol Oncol*. 2015; 33(3):113.e19–25.
55. Mitropoulos D., Kiroudi A., Christelli E. i wsp.: Expression of transforming growth factor beta in renal cell carcinoma and matched non-involved renal tissue, *Urol Res*, 2004; 32: 317–322.
56. Zheng J.B., Mei Y.H., Xiang P., i wsp.: DNA methylation affects metastasis of renal cancer and is associated with TGF-beta/RUNX3 inhibition, *Cancer Cell Int*, 2018; 18: 56.
57. Ananth S., Knebelmann B., Gruning W. i wsp.: Transforming growth factor beta 1 is a target for the von Hippel-Lindau tumor suppressor and a critical growth factor for clear cell renal carcinoma, *Cancer Res*, 1999; 59: 2210–2216.
58. Sjolund J., Bostrom A.K., Lindgren D. i wsp.: The Notch and TGF-beta Signaling Pathways Contribute to the Aggressiveness of Clear Cell Renal Cell Carcinoma, *PLoS ONE*, 2011; 6(8): e23057.
59. Shang D.H., Liu Y.T., Yang P.Q. i wsp.: TGFBI-promoted Adhesion, Migration and Invasion of Human Renal Cell Carcinoma Depends on Inactivation of von Hippel-Lindau Tumor Suppressor, *Urology*, 2012; 79(4): 966.e1–7
60. Bostrom A.K., Lindgren D., Johansson M.E. i wsp.: Effects of TGF-beta signaling in clear cell renal cell carcinoma cells, *Biochem Bioph Res*, 2013; 435: 126–133.
61. Mallikarjuna P., Sitaram R.T., Landström M. i wsp.: VHL status regulates transforming growth factor- β signaling pathways in renal cell carcinoma, *Oncotarget*, 2018; 9(23): 16297–16310.
62. Chen T., Jackson C., Costello B. i wsp.: An intronic variant of the TGFBR1 gene is associated with carcinomas of the kidney and bladder, *Int J Cancer*, 2004; 112: 420–425.
63. Miyajima A., Asano T., Seta K. i wsp.: Loss of expression of transforming growth factor-beta receptor as a prognostic factor in patients with renal cell carcinoma, *Urology*, 2003; 61: 1072–1077.
64. Copland J.A., Luxon B.A., Ajani L. i wsp.: Genomic profiling identifies alterations in TGF beta signaling through loss of TGF beta receptor expression in human renal cell carcinogenesis and progression, *Oncogene*, 2003; 22: 8053–8062.

65. Parker A.S., Lohse C.M., Wu K. i wsp.: Lower expression levels of the transforming growth factor beta receptor type II protein are associated with a less aggressive tumor phenotype and improved survival among patients with clear cell renal cell carcinoma, *Hum Pathol*, 2007; 38: 453–461.
66. Kominsky S.L., Doucet M., Brady K., i wsp.: TGF-beta promotes the establishment of renal cell carcinoma bone metastasis, *J Bone Miner Res*, 2007; 22: 37–44.
67. Nishida J., Miyazono K., Ehata S.: Decreased TGFBR3/betaglycan expression enhances the metastatic abilities of renal cell carcinoma cells through TGF-beta-dependent and-independent mechanisms, *Oncogene*, 2018; 37: 2197–2212.
68. Park J.H., Lee C., Suh J.H. i wsp.: Nuclear expression of Smad proteins and its prognostic significance in clear cell renal cell carcinoma, *Hum Pathol*, 2013; 44: 2047–2054.
69. Sitaram R.T., Mallikarjuna P., Landstrom M. i wsp.: Transforming growth factor-beta promotes aggressiveness and invasion of clear cell renal cell carcinoma, *Oncotarget*, 2016; 7: 35917–35931.
70. Yagasaki H., Kawata N., Takimoto Y. i wsp.: Histopathological analysis of angiogenic factors in renal cell carcinoma, *Int J Urol*, 2003; 10: 220–227.
71. Taguchi L., Miyakuni K., Morishita Y. i wsp.: c-Ski accelerates renal cancer progression by attenuating transforming growth factor β signaling, *Cancer Sci*, 2019; 110: 2063–2074.
72. Gavert N., Ben-Ze'ev A.: Epithelial-mesenchymal transition and the invasive potential of tumors, *Trends Mol Med*, 2008; 14: 199–209.
73. Kalluri R., Weinberg R.A.: The basics of epithelial-mesenchymal transition, *J Clin Invest*, 2009; 119: 1420–1428.
74. Hanahan D., Weinberg R.A.: Hallmarks of Cancer: The Next Generation, *Cell*, 2011; 144: 646–674.
75. Katsuno Y., Lamouille S., Derynck R.: TGF-beta signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression, *Curr Opin Oncol*, 2013; 25: 76–84.
76. Tretbar S., Krausbeck P., Müller A. i wsp.: TGF- β Inducible Epithelial-To-Mesenchymal Transition in Renal Cell Carcinoma, *Oncotarget*, 2019; 10: 1507–1524.
77. Li Y., Dai C., Wu C. i wsp.: PINCH-1 promotes tubular epithelial to-mesenchymal transition by interacting with integrin-linked kinase, *J Am Soc Nephrol*, 2007; 18: 2534–2543.
78. Feldkoren B., Hutchinson R., Rapaport Y. i wsp.: Integrin signaling potentiates transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) dependent down-regulation of E-Cadherin expression – Important implications for epithelial to mesenchymal transition (EMT) in renal cell carcinoma, *Exp Cell Res*, 2017; 355: 57–66.
79. Huang W., Cen S., Kang X.L. i wsp.: TGF-beta 1-induced Fascin1 promotes cell invasion and metastasis of human 786-0 renal carcinoma cells, *Acta Histochem*, 2016; 118: 144–151.
80. Zekri J., Ahmed N., Coleman R.E. i wsp.: The skeletal metastatic complications of renal cell carcinoma, *Int J Oncol*, 2001; 19: 379–382.
81. Kominsky S.L., Doucet M., Thorpe M. i wsp.: MMP-13 is over-expressed in renal cell carcinoma bone metastasis and is induced by TGF-beta 1, *Clin Exp Metastasis*, 2008; 25: 865–870.
82. Ma Q., Peng Z.Q., Wang, L. i wsp.: miR-19a correlates with poor prognosis of clear cell renal cell carcinoma patients via promoting cell proliferation and suppressing PTEN/SMAD4 expression, *Int J Oncol*, 2016; 49: 2589–2599.
83. Zhai W., Li S.Y., Zhang J., i wsp.: Sunitinib-suppressed miR-452-5p facilitates renal cancer cell invasion and metastasis through modulating SMAD4/SMAD7 signals, *Mol Cancer*, 2018; 17: 157.
84. Lichner Z., Mejia-Guerrero S., Ignacak M. i wsp.: Pleiotropic Action of Renal Cell Carcinoma-Dysregulated miRNAs on Hypoxia-Related Signaling Pathways, *Am J Pathol*, 2012; 180: 1675–1687.
85. Jingushi K., Ueda Y., Kitae K. i wsp.: miR-629 Targets TRIM33 to Promote TGF beta/Smad Signaling and Metastatic Phenotypes in ccRCC, *Mol Cancer Res*, 2015; 13: 565–574.
86. Liu Z., He F., Ou Yang S., i wsp.: miR-140-5p could suppress tumor proliferation and progression by targeting TGFBR1/SMAD2/3 and IGF-1R/AKT signaling pathways in Wilms' tumor, *BMC Cancer*, 2019; 19(1): 405.
87. Vujanic G.M., Sandstedt B.: The pathology of Wilms' tumour (nephroblastoma): The International Society of Paediatric Oncology approach, *J Clin Pathol*, 2010; 63(2): 102–109.
88. Senanayake U., Das S., Vesely P. i wsp.: miR-192, miR-194, miR-215, miR-200c and miR-141 are downregulated and their common target ACVR2B is strongly expressed in renal childhood neoplasms, *Carcinogenesis*, 2012; 33: 1014–1021.
89. He Y.F., Liu J.Z., Wang Y.J. i wsp.: Role of miR-486-5p in regulating renal cell carcinoma cell proliferation and apoptosis via TGF-beta-activated kinase 1, *J Cell Biochem*, 2019; 120: 2954–2963.
90. Shi J., Zhuang Y., Liu X.K. i wsp.: TGF-beta induced RBL2 expression in renal cancer cells by down-regulating miR-93, *Clin Transl Oncol*, 2014; 16: 986–992.
91. Machackova T., Mlcochova H., Stanik M. i wsp.: MiR-429 is linked to metastasis and poor prognosis in renal cell carcinoma by affecting epithelial-mesenchymal transition, *Tumor Biol*, 2016, 37: 14653–14658.
92. Boguslawska J., Rodzik K., Poplawski P. i wsp.: TGF-beta 1 targets a microRNA network that regulates cellular adhesion and migration in renal cancer, *Cancer Lett*, 2018; 412: 155–169.
93. Tzu-Pin L., Chien-Yueh L., Mong-Hsun T. i wsp.: miRSys-tem: An Integrated System for Characterizing Enriched Functions and Pathways of microRNA Targets, *PLoS One*, 2012; 7(8): e42390.
94. Zhang H., Yang K., Ren T. i wsp.: miR-16-5p Inhibits Chordoma Cell Proliferation, Invasion and Metastasis by Targeting Smad3, *Cell Death Dis*, 2018; 9(6): 680.

95. Zhu Ch., Huang Q., Zhu K.: Melatonin Inhibits the Proliferation of Gastric Cancer Cells Through Regulating the miR-16-5p-Smad3 Pathway, *DNA and Cell Biol*, 2018; 37(3): 244–252.
96. Xu J., Xu Y.: The lncRNA MEG3 downregulation leads to osteoarthritis progression via miR-16/SMAD7 axis, *Cell Biosci*, 2017; 7: 69.
97. Liang H., Zhang C., Ban T. i wsp.: A novel reciprocal loop between microRNA-21 and TGF β RIII is involved in cardiac fibrosis, *Int J Biochem Cell Biol*, 2012; 44: 2152–2160.
98. Liu Q., Liu S., Wang D.: Overexpression of microRNA-21 decreased the sensitivity of advanced cervical cancer to chemoradiotherapy through SMAD7, *Anticancer Drugs*, 2020; 31: 272–281.
99. Zhao H., Zhang J., Shao H. i wsp.: Transforming Growth Factor β 1/Smad4 Signaling Affects Osteoclast Differentiation via Regulation of miR-155 Expression [errata opublikowana w: *Mol Cells*, 2017; 31: 40(5): 378], *Mol Cells*, 2017; 40: 211–221.
100. He W., Li F., Zhang S. i wsp.: LncRNA AFAP1-AS1 promotes osteoblast differentiation of human aortic valve interstitial cells through regulating miR-155/SMAD5 axis, *Mol Cell Probes*, 2020; 50: 101509.
101. Gu Y., Ma L., Song L. i wsp.: miR-155 Inhibits Mouse Osteoblast Differentiation by Suppressing SMAD5 Expression, *Biomed Res Int*, 2017; 2017: 1893520.
102. Li J.H., Liu S., Zhou H. i wsp.: starBase v2.0: decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein-RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data. *Nucleic Acids Res*, 2014; 42(Database issue): D92–D97.
103. Tzai T.S., Lin C.I., Shiau A.L. i wsp.: Antisense oligonucleotide specific for transforming growth factor-beta 1 inhibit both in vitro and in vivo growth of MBT-2 murine bladder cancer, *Anticancer Res*, 1998; 18: 1585–1589.
104. Grenga I., Donahue R.N., Gargulak M.L. i wsp.: Anti-PD-L1/TGFI3R2 (M7824) fusion protein induces immunogenic modulation of human urothelial carcinoma cell lines, rendering them more susceptible to immune-mediated recognition and lysis, *Urol Oncol*, 2018; 36(3): 93.e1–93.e11.
105. Huang S., Zou C.Y., Tang Y.B. i wsp.: miR-582-3p and miR-582-5p Suppress Prostate Cancer Metastasis to Bone by Repressing TGF-beta Signaling, *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019; 16: 91–104.
106. Fan Y., Xia J.: miRNet: functional analysis and visual exploration of miRNA-target interactions in a network context, *Methods Mol Biol*, 2018; 1819: 215–233.

Profilowanie metabolomiczne ostrych powikłań cukrzycy typu 1 u dzieci

Metabolomic profiling of acute diabetes complications in children with type 1 diabetes mellitus

Beata Małachowska,
Wojciech Fendler

Zakład Biostatystyki i Medycyny Translacyjnej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Źródła finansowania: Badanie było finansowane ze środków Grantu Naukowego finansowanego ze środków Polskie Towarzystwa Diabetologicznego oraz środków młodych badaczy Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Naukowa Fundacja Polpharmy przyznała doktorantce w 2016 roku stypendium Naukowej Fundacji Polpharmy.

Streszczenie

Wstęp: Ostre powikłania cukrzycy – kwasica ketonowa (DKA) i hipoglikemia (HG) – stanowią niebezpieczeństwo nie tylko ze względu na niosące ze sobą zagrożenie życia, ale również ze względu na długotrwałe następstwa ich przebiegu.

Cel: Celem pracy była identyfikacja surowiczych zmian metabolicznych wywołanych przez epizod DKA i HG, które utrzymują się pomimo wyrównania typowych parametrów laboratoryjnych zaburzonych w trakcie epizodów oraz wytypowanie potencjalnych długotrwałych biomarkerów przebiegu epizodu DKA i HG.

Materiały i metody: Cztery grupy dzieci z rozpoznaniem cukrzycy typu 1 zostały zrekrutowane do badania: pacjenci po epizodzie DKA i HG, dzieci z dobrze wyrównaną cukrzycą (EDM) oraz świeżo rozpoznaną cukrzycą typu 1 bez DKA (NDM). Próbkę krwi została pobrana od pacjentów w trakcie hospitalizacji w trzech punktach czasowych (począwszy od przyjęcia do szpitala): 0h – 24h – 72h dla grupy DKA oraz NDM, a od pacjentów z grupy HG w schemacie 0h – 12h – 48h. Od pacjentów z grupy EDM pobrano jedną próbkę podczas rutynowo wykonywanych badań kontrolnych. Pacjentów dobrano do dwóch serii próbek: DKA-NDM-EDM (N = 20x3, N = 10x3, N = 10) oraz HG-EDM-NDM (N = 10x3, N = 25, N = 15x3). Metabolomiczny odcisk palca został wykonany za pomocą LC-QTOF-MS (Agilent 6550 iFunnel).

Wyniki: W serii DKA, po filtrowaniu technicznym, do analizy statystycznej wytypowano 248 cech metabolicznych spośród 712 (w jonizacji pozytywnej) oraz 295 z 652 (w jonizacji negatywnej). Analiza statystyczna wytypowała 22 cechy metaboliczne jako potencjalne biomarkery przebiegu epizodu DKA utrzymujące się do 72 godzin od epizodu. Drzewo decyzyjne oparte na dwóch najlepszych metabolitach osiągnęło czułość na poziomie 95% (PU (przedział ufności): 81,79–99,13%) oraz swoistość 80% (PU: 67,30–88,81%) w diagnostyce przeszłych epizodów DKA.

W serii HG, po filtrowaniu technicznym, do analizy statystycznej wytypowano 359 z 1006 cech z jonizacji pozytywnej oraz 374 z 763 cech z jonizacji negatywnej. Analiza statystyczna wytypowała 9 cech metabolicznych jako potencjalne biomarkery przebiegu epizodu HG w ciągu ostatnich 48h. Drzewo decyzyjne oparte na dwóch najlepszych metabolitach osiągnęło czułość na poziomie 90% (PU: 72,32–97,38%) oraz swoistość 80% (PU: 68,39–88,26%) w diagnostyce przeszłych epizodów HG.

Wpłynęło: 6-11-2019

Zaakceptowano: 6-12-2019

Opublikowano: 29-05-2020

DOI: 10.5604/01.3001.0014.1586

Adres do korespondencji

Dr n. med. Beata Małachowska
Zakład Biostatystyki i Medycyny
Translacyjnej
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
ul. Mazowiecka 15, 92-215 Łódź,
e-mail: b.e.malachowska@gmail.com

Wnioski: Zaburzenia metaboliczne wywołane kwasicą ketonową mogą utrzymywać się w surowicy pacjentów przez co najmniej 72 godzin od epizodu, a hipoglikemią przez co najmniej 48 godzin.

Słowa kluczowe: kwasica ketonowa, hipoglikemia, cukrzyca typu 1, biomarker, metabolomika

Abstract

Acute type 1 diabetes mellitus (T1DM) complications – diabetes ketoacidosis (DKA) and hypoglycemia (HG) – are dangerous not only as a threat to patients' life but also because of their long-term sequelae.

Aim: Evaluation of serum metabolic changes caused by episode of DKA and HG, that can be detected despite restoring parameters typically changed during the episodes. Selection of putative long-standing biomarkers of past episodes of DKA and HG.

Materials and methods: Four groups of children with T1DM were recruited: patients after episode of DKA and HG, children with established T1DM (EDM) and patients with newly diagnosed diabetes without diabetes ketoacidosis (NDM). Serum samples were collected in three group-specific time points (since the hospital admission): 0h – 24h – 72h for DKA and NDM group and 0h – 12h – 48h for HG group. From EDM patients only one sample was collected during running routine laboratory tests. Patients were assigned to two batches: DKA-NDM-EDM (N = 20x3, N = 10x3, N = 10) and HG-EDM-NDM (N = 10x3, N = 25, N = 15x3). All patients within the batches were matched based on age and sex. Metabolic fingerprinting was performed with LC-QTOF-MS (Agilent 6550 iFunnel).

Results: In DKA batch after technical filtering 248 metabolomic features out of 712 (in positive ionization) and 295 out of 652 (in negative ionization) were suitable for between-group comparisons. Statistical analysis selected 22 metabolic features as putative biomarkers of episodes of DKA occurrence in nearest 72h. Decision tree to diagnose past DKA episode, based on two best metabolites, achieved sensitivity of 95% (CI (confidence interval): 81.79–99.13%) and specificity of 80% (CI: 67.30–88.81%).

In HG batch after technical filtering 359 metabolomic features out of 1006 (in positive ionization) and 374 out of 763 (in negative ionization) were suitable for between-group comparisons. Statistical analysis selected 9 metabolic features as putative biomarkers of episodes of DKA occurrence in nearest 48h. Decision tree to diagnose past HG episode, based on two best metabolites, achieved sensitivity of 90% (CI: 72.32–97.38%) and specificity 80% (CI: 68.39–88.26%).

Conclusions: Metabolic disturbances caused by DKA may be traced in serum up to 72h after the episode and for hypoglycemia up to 48h.

Keywords: diabetes ketoacidosis, hypoglycemia, type 1 diabetes, biomarkers, metabolomics

WSTĘP

Kwasica ketonowa (DKA) oraz hipoglikemia (HG) są typowymi ostrymi powikłaniami cukrzycy typu 1 (T1DM). Monitorowanie ich objawów, a także przeciwdziałanie ich rozwojowi są jednymi z głównych wyzwań zarówno dla pediatrów, opiekunów dzieci

z T1DM, jak i samych pacjentów. Rozpoznanie ostrych powikłań T1DM jest relatywnie proste za pomocą powszechnie dostępnych testów laboratoryjnych, tj. pomiaru stężenia glukozy czy pomiaru występowania ciał ketonowych w moczu, które to są dostępne nie tylko w wyspecjalizowanych jednostkach laboratoryjnych, ale także w domu pacjenta. Normalizacja paramet-

trów oznaczanych dostępnymi metodami nie wyklucza jednak, iż wszystkie szlaki metaboliczne, których aktywność została zaburzona poprzez epizod kwasicy ketonowej (DKA) lub hipoglikemii (HG), wróciły do normalnego funkcjonowania.

Rozwój DKA wynika z niedoboru krążącej insuliny oraz z wyrzutu hormonów kontrregulacyjnych, tj. katecholaminy, glukagonu, kortyzolu oraz somatotropiny [1]. Niedobór insuliny może być bezwzględny – typowo w przypadku nowo rozpoznanej T1DM – lub względny, wynikający z większego zapotrzebowania na insulinę, spowodowanego działaniem hormonów kontrregulacyjnych wydzielonych w odpowiedzi na stres (uogólniona reakcja zapalna, obrażenia ciała czy też choroba przebiegająca z gorączką) [1]. Najpoważniejszym następstwem rozwoju kwasicy ketonowej jest obrzęk mózgu.

Istnieją jednak dowody, iż epizod DKA pozostawia metaboliczne i neurologiczne piętno w organizmie. W piśmiennictwie możemy odnaleźć dane sugerujące, że nawet po 6 miesiącach po epizodzie DKA, z towarzyszącym obrzękiem mózgu, 35% pacjentów prezentuje objawy utrwalonych zaburzeń neurologicznych, tj.: zaburzenie funkcji motorycznych, osłabienie wzroku, osłabienie pamięci krótkotrwałej, problemy z mową, zaburzenia emocjonalne lub problemy z uczeniem się [2]. Dodatkowo, towarzysząca nowemu rozpoznaniu T1DM DKA predysponuje pacjenta do następczego gorszego wyrównania cukrzycy niezależnie od czynników demograficznych czy socjoekonomicznych [3, 4]. W związku z powyższym, unikanie epizodów DKA i ścisłe monitorowanie jej występowania stanowi jeden z celów terapeutycznych leczenia T1DM.

Patofizjologicznym podłożem hipoglikemii jest nadmiar insuliny. Podobnie jak w przypadku DKA, może być on bezwzględny i względny. Epizod hipoglikemii może pozostawić trwałe następstwa fizjologiczne, w szczególności w zakresie funkcji neurologicznych. Są to między innymi: osłabienie orientacji przestrzennej [5], obniżenie zdolności poznawczych, takich jak: logiczne myślenie, zdolności werbalne, ograniczenie zdolności psychoruchowych [6], a także upośledzenie funkcjonowania narządu przedsionkowego [7]. Pomiędzy samo występowanie cukrzycy typu 1 wydaje się nie wpływać istotnie na wyniki w nauce [8], to wystąpienie epizodu hipoglikemii, a w szczególności epizodu z towarzyszącymi drgawkami, może wiązać się z deficytami percepcji, ruchu, pamięci, a także umiejętności wymagających skupienia nawet po 7 latach od wystąpienia epizodu [9].

Dodatkowo należy pamiętać, że mechanizmy kontrregulacyjne u pacjentów z cukrzycą typu 1 są zaburzone,

co skraca im czas między wystąpieniem objawów prodromalnych hipoglikemii a utratą świadomości. Zjawisko to nazywamy nieświadomością hipoglikemii. Szacuje się, że występuje ono u 25% pacjentów z T1DM w wieku rozwojowym [10] i prowadzi do 6-krotnego wzrostu ryzyka ciężkiej hipoglikemii [11]. Hipoglikemia pozostawia też następstwa metaboliczne. Po pierwsze, zaraz po epizodzie hipoglikemii mamy do czynienia z reaktywną hiperglikemią (zjawisko Somogyi) [12]. Ponadto aktywacja mechanizmów kontrregulacyjnych związana jest z pohipoglikemicznym wzrostem insulinooporności najprawdopodobniej mediuowanym przez aktywację lipolizy [13]. Dodatkowo epizody hipoglikemii u dobrze wyrównanych pacjentów prowadzą do podniesienia się markerów stanu zapalnego [14]. Dlatego też zmiany prozapalne wywołane hipoglikemią mogą sprzyjać utrzymywaniu się w organizmie stanu zapalnego wraz ze wszystkimi tego konsekwencjami [15].

W związku z powyższym, istnieje potrzeba opracowania biomarkerów pozwalających na monitorowanie występowania ostrych powikłań cukrzycy celem ich prewencji i zapobiegania występowaniu odległych następstw.

Jak wspomniano wyżej, ostre powikłania cukrzycy wiążą się z przewlekłymi konsekwencjami, a także następczym gorszym wyrównaniem metabolicznym. Wydaje się, że każdy epizod hipoglikemii czy kwasicy ketonowej pozostawia po sobie swoje piętno metaboliczne, które może przyczyniać się do uszkodzenia organizmu, pomimo wyrównania takich parametrów jak stężenie glukozy czy pH krwi. Nie są dobrze poznane szlaki metaboliczne, które mogłyby być odpowiedzialne za takie zjawisko. Dlatego też potrzebny jest szeroki wgląd w profil metaboliczny pacjentów po takich epizodach, aby lepiej zrozumieć patogenzę następstw metabolicznych pozostawionych przez ostre powikłanie cukrzycy. Metabolomika – jedna z technologii omicznych, tzn. wysokoprzepustowych technik, które mają za zadanie zbadanie, identyfikację jak i kwantyfikację całości metabolitów występujących w danej próbce biologicznej – wydaje się idealną techniką, aby osiągnąć ten cel.

W związku z powyższym postanowiono przeprowadzić badanie surowiczego profilu metabolomicznego przebiecia kwasicy ketonowej lub hipoglikemii w populacji pediatrycznej.

MATERIAŁY I METODY

Badanie uzyskało zgodę Komisji Etyki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (nr RNN/71/14/KE z dnia

13 maja 2014 r.), a pacjenci spełniający kryteria zostali włączeni do badania po wyjaśnieniu im i ich rodzicom założeń projektu oraz po podpisaniu formularza świadomej zgody przez rodziców lub, w przypadku dzieci powyżej 16. roku życia, przez samych pacjentów. Spośród dzieci hospitalizowanych w Klinice Pediatrii, Onkologii, Hematologii i Diabetologii (obecnie Klinika Pediatrii, Diabetologii, Endokrynologii i Nefrologii) Szpitala Uniwersyteckiego Nr 4 im. Marii Konopnickiej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi prospektywnie zrekrutowano pacjentów do badania.

Spośród pacjentów Kliniki zrekrutowano dzieci do jednej z 4 grup przewidzianych przez protokół badania, w tym dwóch grup porównawczych:

- **grupa DKA** (*diabetes ketoacidosis*) – pacjenci hospitalizowani z powodu kwasicy ketonowej ($\text{pH} < 7,30$ i/ lub $\text{HCO}_3^- < 15 \text{ mmol/L}$);
- **grupa HG** (*hypoglycemia*) – pacjenci hospitalizowani z powodu epizodu hipoglikemii (stężenie glukozy poniżej 70 mg/dL oraz wystąpienie utraty świadomości lub drgawek).

oraz dwóch grup porównawczych:

- **grupa NDM** (*newly diagnosed diabetes mellitus*) – pacjenci ze świeżo rozpoznaną T1DM bez kwasicy ketonowej ($\text{pH} > 7,35$, $\text{HCO}_3^- > 21 \text{ mmol/L}$);
- **grupa EDM** (*established diabetes mellitus*) – pacjenci z ustabilizowaną cukrzycą (czas trwania cukrzycy powyżej pół roku oraz brak epizodu kwasicy ketonowej lub hipoglikemii w przeciągu ostatnich 3 miesięcy).

Protokół badania zakładał pobranie 3 próbek krwi w różnych odstępach czasowych w zależności od grupy, do której należał pacjent. Dla grupy DKA i NDM próbki pobrano przy przyjęciu pacjenta do szpitala – 0h, a następnie po 48h i po 72h. Próbkę z kolejnych punktów czasowych dla grupy DKA oznaczono jako: DKA-1, DKA-2, DKA-3, a od pacjentów z grupy NDM oznaczono jako: NDM-4, NDM-5, NDM-6. Od pacjentów z grupy HG pobrano próbki przy przyjęciu – 0h, po 12h i po 48h. W przypadku grupy ze stabilną cukrzycą pobrana została tylko jedna próbka (oznaczono jako EDM), jako że nie przewidywano dynamicznych zmian w poziomie metabolitów tychże pacjentów w czasie trwania hospitalizacji.

Pomiary wykonano za pomocą chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrią mas z kwadrupolem i analizatorem czasu przelotu (LC-QTOF-MS model 6550 i Funnel Q-TOF-MS, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) za pomocą protokołu opisanego wcześniej [16]. Wszystkie analizy przeprowadzono

w zgodzie z obecnie obowiązującymi standardami dla badań metabolomicznych opartych o spektrometrię mas z użyciem metodologii kontroli jakości [17, 18].

ANALIZA STATYSTYCZNA

Na wstępie odfiltrowano cechy metaboliczne, które charakteryzowały się współczynnikiem RSD (*relative standard deviation*) dla próbek QC $\geq 20\%$ oraz te, które ulegały detekcji w więcej niż 1/3 próbek ślepych. Wyniki odczytów z poszczególnych próbek podzielono przez całkowitą liczbę odczytów i pomnożono razy 100 000 000. Do analizy statystycznej wybrano cechy metaboliczne ulegające detekcji w co najmniej 80% próbek z każdej z grup poddanych analizie. Następnie wykonano jednoczynnikową analizę danych za pomocą analizy wariancji (ANOVA) oraz przeprowadzono procedurę Benjaminiego-Hochberga, aby uwzględnić wielokrotne testowanie hipotez. Do analizy *post-hoc* wybrano cechy z FDR (*false discovery rate*) $< 0,15$. Jako test *post-hoc* wykorzystano test *t*-studenta z poprawką Bonferroniego. Dodatkowo, za pomocą narzędzia Metaboanalyst 4.0 [19], przeprowadzono wielowymiarowe analizy na danych poddanych identycznej obróbce danych jak te, które poddano analizie jednoczynnikowej, lecz dodatkowo uzupełniono braki danych za pomocą procedury *K*-najbliższych sąsiadów (*nearest neighbor*, *K-NN*) oraz poddano skalowaniu za pomocą algorytmu Pareto. Wykonane analizy wielowymiarowe obejmowały dyskryminacyjną metodę ortogonalnych częściowych najmniejszych kwadratów (*orthogonal partial least square discriminant analysis*, OPLS-DA). Cechy powtarzające się w obu analizach wytypowano do identyfikacji. Na podstawie analizy ROC (*Receiver Operating Characteristic*) wybrano metabolity najlepiej różnicujące pacjentów po przebiegu epizodu DKA/HG i na podstawie tak wybranych metabolitów opracowano drzewo decyzyjne, używając algorytmu CART. Te analizy przeprowadzono za pomocą programu STATISTICA 13.1 (TIBCO Software, Palo Alto, CA, USA).

WYNIKI

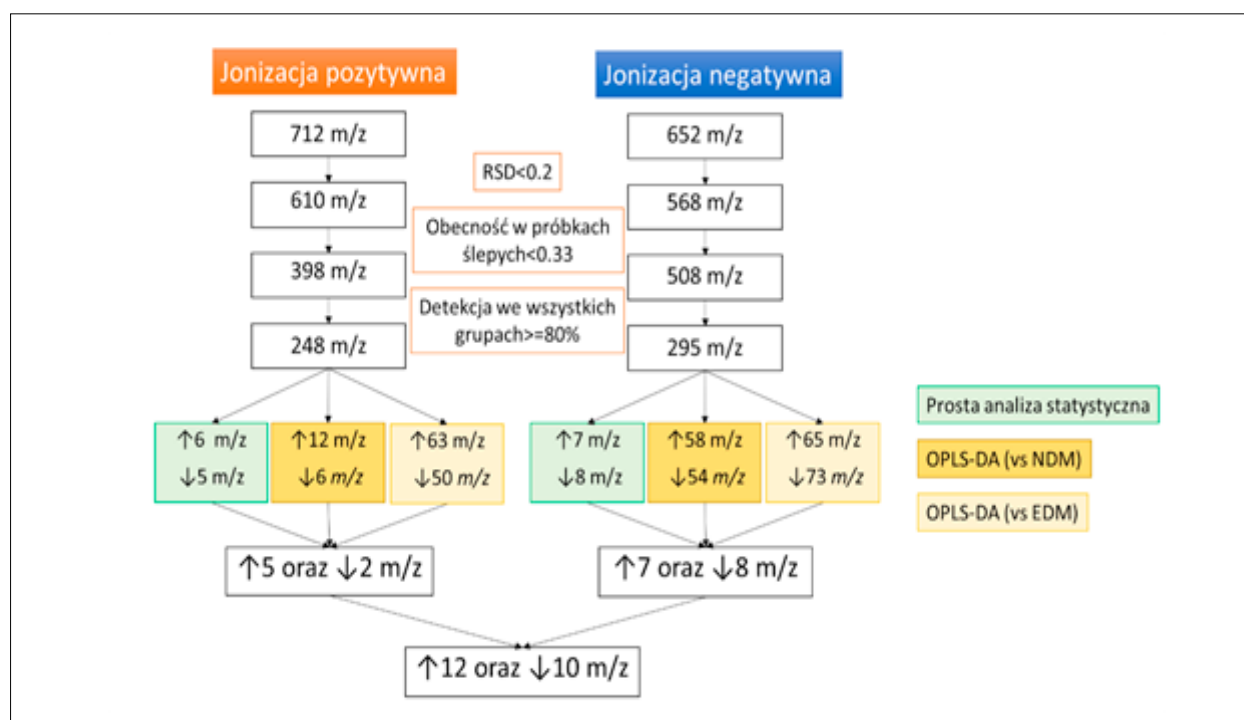
Kwasica ketonowa

Do profilowania metabolomicznego w tym etapie badania, spośród zrekrutowanych osób, wybrano pacjentów (według kryteriów opisanych poniżej) po epizodzie kwasicy ketonowej (DKA, $N = 20$, razy 3 punkty czasowe (0h – 24h – 72h), czyli łącznie 60 próbek) oraz dwie grupy porównawcze – dzieci z dobrze wyrównaną cukrzycą (EDM, $N = 10$) oraz świeżo rozpoznaną cukrzycą typu 1 bez kwasicy ketono-

Tabela I. Charakterystyka kliniczna pacjentów wybranych do profilowania metabolomicznego przebiecia epizodu kwasicy ketonowej.

	DKA (N = 20)	NDM (N = 10)	EDM (N = 10)	p
Płeć – chłopcy	10/20 (50%)	5/10 (50%)	50%	1,0
	Średnia +/-Odch. Std.	Średnia +/-Odch. Std.	Średnia +/-Odch. Std.	
Wiek [lata]	10,35+/-3,54	9,91+/-3,78	10,41+/-3,41	0,9383
Czas trwania cukrzycy [lata]	2,28 +/-4,34#	0,0+/-0,0*	5,00+/-3,30*#	0,0001
HbA1c [%]	11,79+/-2,59#	11,25+/-1,62*	7,45+/-1,33*#	<0,0001
Peptyd C [ng/mL]	0,30+/-0,24#	0,67+/-0,45*	0,02+/-0,02*#	<0,0001
BMI z-score	-0,62+/-1,08	-0,94+/-1,52*	-0,42+/-0,77*	0,0259
pH	7,18+/-0,09\$	7,38 +/-0,02\$	W normie (7,35–7,45)	<0,0001
HC03- [mmol/L]	10,59+/-3,26\$	21,56+/-1,21\$	W normie (21–27)	<0,0001

\$ – istotna różnica między grupą DKA i NDM, # – istotna różnica między grupą DKA i EDM, * – istotna różnica między grupą NDM i EDM

**Ryc. 1.** Algorytm filtracji danych z profilowania metabolomicznego odcisku palca kwasicy ketonowej.

wej (NDM, N = 10, razy 3 punkty czasowe (0h – 24h – 72h), czyli łącznie 30 próbek). Charakterystyka kliniczna pacjentów wybranych do profilowania przedstawiono w tabeli I.

Filtrację danych z profilowania metabolomicznego odcisku palca kwasicy ketonowej zaprezentowano na rycinie 1. Porównując dane z prostej i zaawansowanej analizy statystycznej, wytypowano 7 cech metabolicznych, których zmienione stężenie utrzymuje się po przebiegu epizodu kwasicy ketonowej z jonizacji pozytywnej i 15 cech z jonizacji negatywnej.

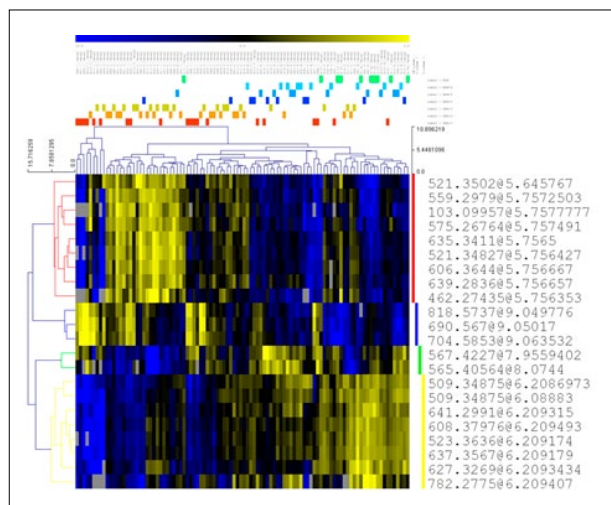
Na rycinie 2 można zaobserwować, że wyselekcjonowane cechy grupują się w 4 wyraźne klastry. Pierwszy z nich zawiera 9 cech metabolicznych, które charakteryzują się podniesionym poziomem w surowicy pacjentów po przebiegu epizodu DKA w stosunku do grup porównawczych. Drugi klaster zawiera 3 cechy o podniesionym poziomie u pacjentów w grupie badanej, ale co ciekawe, ich poziom podniesiony był u pacjentów, u których nie wykryto podniesienia poziomu metabolitów z pierwszego klastra. Trzeci klaster zawiera jedynie 2 cechy, które charakteryzował się obniżonym poziomem u pacjentów w grupie badanej.

Tabela II. Charakterystyka kliniczna pacjentów wybranych do profilowania metabolomicznego przebiegu epizodu hipoglikemii.

	HG (N = 10)	EDM (N = 25)	NDM (N = 15)	P
Płeć – chłopcy	5/10 (50%)	13/25 (52%)	8/15 (53%)	0,9867
	Średnia +/-Odch. Std.	Średnia +/-Odch. Std.	Średnia +/-Odch. Std.	
Wiek [lata]	15,05+/-2,74\$	15,00+/-2,58*\$	9,26+/-3,33*	<0,0001
Czas trwania cukrzycy [lata]	5,95+/-3,61\$	5,25+/-3,55*\$	0,00+/-0,00*	<0,0001
HbA1c [mg%]	8,17+/-2,07\$	7,31+/-1,02*\$	11,26+/-1,78*	<0,0001
DDI [U/kg]	0,82+/-0,16	0,77+/-0,27	0,57+/-0,21	0,0191
BMI z-score	0,38+/-1,00	0,37+/-0,85	-0,50+/-1,48	0,0436
Peptyd C [ng/mL]	0,13+/-0,19\$	0,26+/-0,36\$	0,54+/-0,42	0,0230

DDI – dobową dawkę insuliny, * – istotna różnica w porównaniu *post-hoc* między grupą NDM i EDM, # – istotna różnica w porównaniu *post-hoc* między grupą HG i EDM, \$ – istotna różnica w porównaniu *post-hoc* między grupą HG i NDM.

Czwarty klaster zawiera 8 cech o obniżonym poziomie w grupie badanej. Wszystkie wytypowane cechy metaboliczne zostały następnie poddane próbie identyfikacji za pomocą fragmentacji widma w komorze kolizyjnej (LC-MS/MS).



Ryc. 2. Mapa ciepła przedstawiająca wyniki klasterizacji hierarchicznej (odległość Euklidesowa) 22 cech metabolicznych wytypowanych do identyfikacji jako markery przebiegu epizodu kwasicy ketonowej.

W grupie DKA znalazły się dane z grupy DKA-1 (czerwone znaczniki na górze mapy) DKA-2 (pomarańczowe znaczniki) i DKA3 (złote znaczniki) w grupie NDM dane z grupy NDM-4 (granatowe znaczniki), NDM-5 (niebieskie znaczniki) i NDM-6 (jasnoniebieskie) i wszystkie profile od pacjentów z grupy EDM (zielone znaczniki). Na mapie wyróżnione 4 klastry danych: pierwszy – górny (czerwony), drugi – środkowy górny (granatowy), trzeci – środkowy dolny (zielony), czwarty – dolny (żółty).

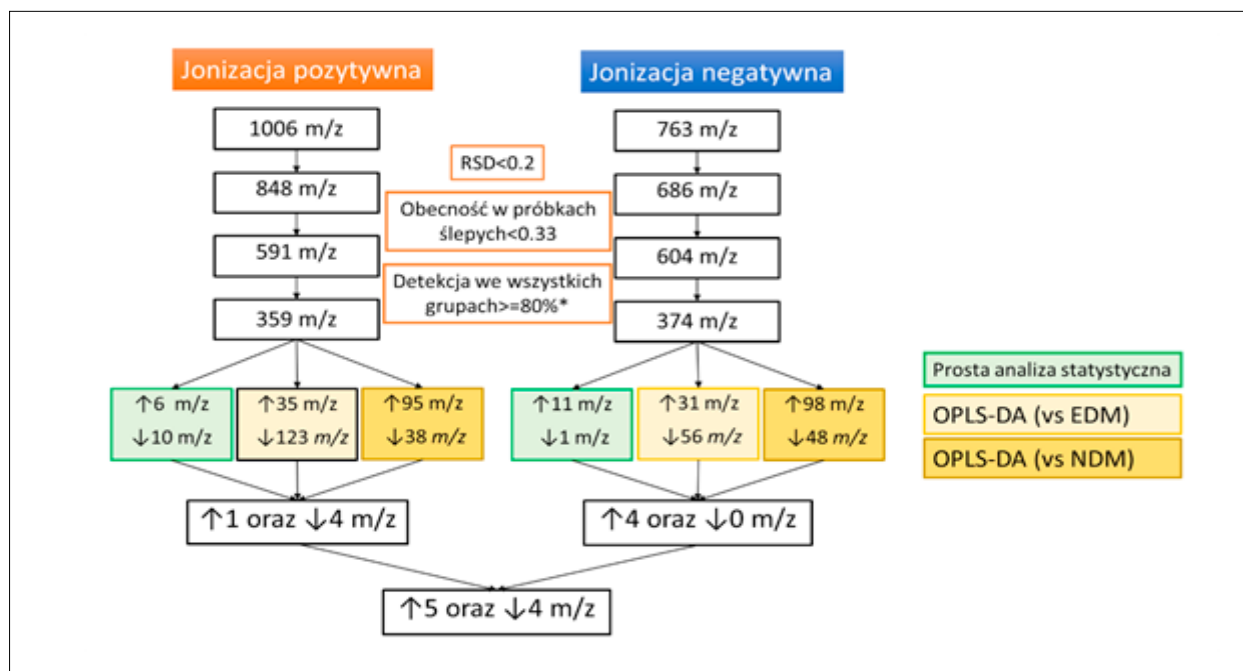
Za pomocą algorytmu CART opracowano drzewo decyzyjne służące do diagnostyki przeszłych epizodów DKA. Zostało ono oparte na dwóch najlepszych metabolitach i osiągnęło czułość na poziomie 95% (PU (przedział ufności): 81,79–99,13%) oraz swoistość 80% (PU: 67,30–88,81%).

Hipoglikemia

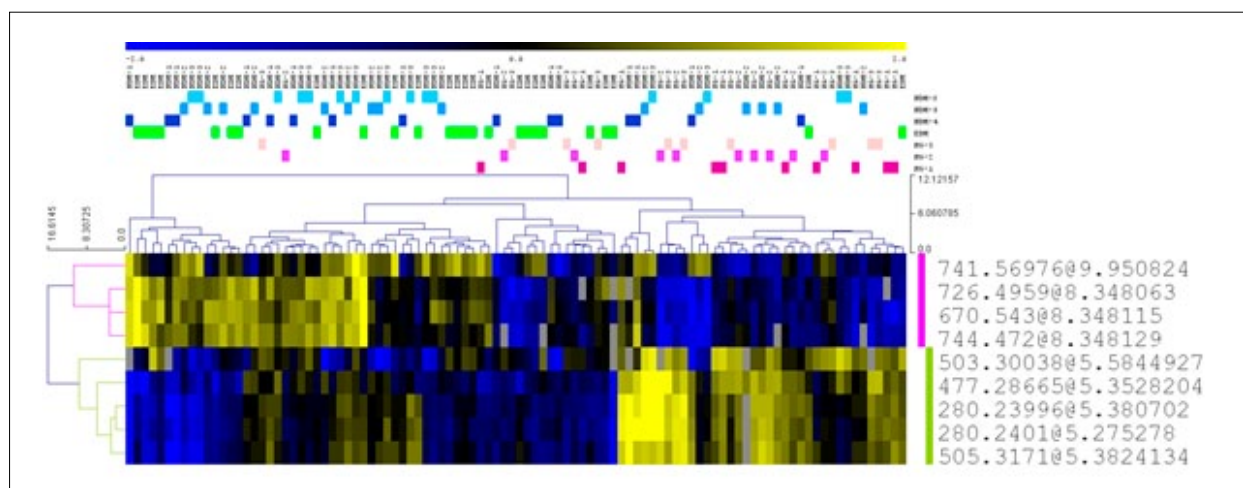
Do profilowania metabolomicznego w tym etapie badania, spośród zrekrutowanych dzieci, wybrano (według kryteriów opisanych poniżej) 10 pacjentów po epizodzie hipoglikemii – grupa badana (HG, N = 10, razy 3 punkty czasowe, czyli łącznie 30 próbek) oraz dwie grupy porównawcze – dzieci z dobrze wyrównaną cukrzycą (EDM, N = 25) oraz dzieci ze świeżo rozpoznaną cukrzycą (czysta hiperglikemia) (NDM = 15, razy 3 punkty czasowe, czyli łącznie 45 próbek). Charakterystykę pacjentów przedstawiono w tabeli II.

Filtrację danych z profilowania metabolomicznego odcisku palca hipoglikemii zaprezentowano na rycinie 3. Porównując dane z prostej i zaawansowanej analizy statystycznej, wytypowano 5 cech metabolicznych, których zmienione stężenie utrzymuje się po przebiegu epizodu kwasicy ketonowej z jonizacji pozytywnej i 4 cechy z jonizacji negatywnej.

Podsumowując wyniki z obu jonizacji, łącznie wytypowano 9 cech metabolicznych mogących stanowić potencjalne markery przebiegu epizodu hipoglikemii. Na rycinie 4 można zaobserwować, że wyselekcjonowane cechy grupują się w 2 klastry. Pierwszy klaster, składający się z 4 cech, charakteryzuje się obniżonym poziomem w grupie HG, a drugi klaster składa się z 5 cech charakteryzujących się podniesio-



Ryc. 3. Algorytm filtracji danych z profilowania metabolomicznego odcisku palca hipoglikemii.



Ryc. 4. Mapa ciepła przedstawiająca wyniki klasteryzacji hierarchicznej (odległość Euklidesowa) 9 cech metabolicznych wytypowanych do identyfikacji jako markery przebiecia epizodu hipoglikemii.

nym poziomem w grupie HG w porównaniu do obu grup porównawczych.

W grupie HG znalazły się dane z podgrupy HG-1 (purpurowe znaczniki na górze mapy) HG-2 (różowe znaczniki) i HG-3 (jasnoróżowe znaczniki) w grupie NDM dane z podgrupy NDM-4 (granatowe znaczniki), NDM-5 (niebieskie znaczniki) i NDM-6 (jasnoniebieskie) i profile od pacjentów z grupy EDM (zielone znaczniki). Na mapie wyróżniono 2 klastry danych (prawa strona wykresu): pierwszy – górny (różowy) skupiający cechy o obniżonym poziomie wśród pacjentów z grupy HG oraz drugi – dolny (seledynowy) skupiający cechy o podniesionym stężeniu wśród pacjentów z grupy HG.

Za pomocą algorytmu CART opracowano drzewo decyzyjne służące do diagnostyki przeszłych epizodów HG. Zostało ono oparte na dwóch najlepszych metabolitach i osiągnęło czułość na poziomie 90% (PU: 72,32–97,38%) oraz swoistość 80% (PU: 68,39–88,26%).

DISKUSJA

Przedstawiony projekt stanowi jedną z pierwszych tego typu prób zastosowania niecelowanej metabolomiki w badaniach nad ostrymi powikłaniami cukrzycy u dzieci. Dotychczas techniki metabolomiczne w diabetologii były stosowane w badaniach na zwie-

rzęta nad nowymi substancjami leczniczymi (hipoglikemizującymi) [20, 21], w przypadku poszukiwania markerów predykcyjnych rozwoju T2DM [22] czy też wystąpienia przewlekłych powikłań T2DM [23], a także biomarkerów prognostycznych cukrzycy ciężkowej [24]. Prace dotyczące cukrzycy typu 1 są nieliczne i dotyczą głównie porównania osób chorych i zdrowych [25, 26]. Potencjał zastosowania technik metabolomicznych w badaniach nad cukrzycą u dzieci wraz z krótkim podsumowaniem dotychczasowych wyników opisali prof. Frohnert i prof. Rewers w pracy z 2016 w *Pediatric Diabetes* [27]. Dodatkowo, szerokie podsumowanie badań wykorzystania metabolomiki w cukrzycy typu 1 i 2 przedstawiono w niedawno opublikowanym przeglądzie literatury [28], zwracając uwagę, iż T1DM związana jest z podniesionym stężeniem LPE, LPC oraz nasyconych kwasów tłuszczowych o krótkim łańcuchu węglowym. Co ciekawe, zaburzenia stężeń fosfolipidów (obniżone stężenie fosfatydylocholine i kwasu bursztynowego) wykryto już w surowicy krwi pępowinowej, które w ciągu najbliższych 12 lat rozwijają T1DM [29], co wskazuje na istotną rolę fosfolipidów w patogenezie rozwoju T1DM.

Jakkolwiek nasze badanie jest pierwszą próbą scharakteryzowania metabolomicznie następstw ostrych powikłań cukrzycy wśród pacjentów z T1DM, to przeprowadzono podobne badanie wśród pacjentów z T2DM. Wu i wsp. badali zmiany profilu metabolomicznego i proteomicznego u pacjentów z T2DM oraz zdrowych ochotników w czasie wykonywania klamry euglikemicznej i hipoglikemicznej [30]. Wykryli oni 78 metabolitów i białek zmieniających się istotnie w trakcie trwania klamry hipoglikemicznej u pacjentów z T2DM. Spośród tych substancji 49 wykazywało również istotne zmiany w grupie kontrolnej w czasie trwania klamry hipoglikemicznej. Co ciekawe, więk-

szość wykrytych zmian ustępowała w ciągu 24 godzin od zakończenia klamry i jedynie trzy metabolity: 1-stearoilglicerofosfoinozytol, 1,6-anhydroglukoza oraz X-16938 (metabolit niezidentyfikowany) utrzymywały zmienione stężenie po dobie od przeprowadzenia doświadczenia.

Nie odnaleziono badania dotyczącego kwasicy ketonowej, w którym wykorzystano by techniki metabolomiczne. Najbardziej zbliżonym scenariuszem do porównania z opisywanym badaniem był projekt wykonany przez Dutta i wsp. Porównano w nim m.in. profil metabolomiczny pacjentów z T1DM, u których odstawiono leczenie insuliną na 8h z pacjentami nadal leczonymi insuliną oraz z grupą zdrowych ochotników [31]. Badacze odnaleźli 176 istotnie zmienionych metabolitów. Wśród nich można odnaleźć 1-linoleoilfosfatydylocholinę (CAS: 1371830), charakteryzującą się prawie dwukrotnie podniesionym stężeniem u pacjentów leczonych insuliną w stosunku do pacjentów, u których odstawiono leczenie.

Ostre powikłania cukrzycy typu 1 wywołują piętno metaboliczne, utrzymujące się pomimo przywrócenia prawidłowego stężenia glukozy oraz wyrównania kwasicy metabolicznej. W przypadku kwasicy ketonowej zmiany metaboliczne utrzymują się co najmniej do 72h. W przypadku hipoglikemii zmiany metaboliczne na poziomie surowicy można wykryć co najmniej do 48h od epizodu.

Opisane wyniki oraz wnioski pochodzą z rozprawy na stopień doktora nauk medycznych pt. „Profilowanie metabolomiczne ostrych powikłań cukrzycy typu 1 u dzieci” dr. n. med. Beaty Małachowskiej, Promotor: dr hab. Wojciech Fendler prof. UM, Zakład Biostatystyki i Medycyny Translacyjnej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Wydział Lekarski.

PIŚMIENNICTWO

1. Wolfsdorf J.I., Glaser N., Agus M., Fritsch M., Hanas R., Rewers A. et al.: ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2018: Diabetic ketoacidosis and the hyperglycemic hyperosmolar state. *Pediatr Diabetes*, 2018; 19(Suppl. 27): 155–77.
2. Edge J.A., Hawkins M.M., Winter D.L.: The risk and outcome of cerebral oedema developing during diabetic ketoacidosis. *Arch Dis Child*, 2001; 85(1): 16–22.
3. Shalitin S., Fisher S., Yackbovitch-Gavan M., de Vries L., Lazar L., Leberthal Y. et al.: Ketoacidosis at onset of type 1 diabetes is a predictor of long-term glycemic control. *Pediatr Diabetes*, 2018; 19(2): 320–8.
4. Duca L.M., Wang B., Rewers M., Rewers A.: Diabetic ketoacidosis at diagnosis of type 1 diabetes predicts poor long-term glycemic control. *Diabetes Care*, 2017; 40(9): 1249–55.
5. Hershey T., Perantie D.C., Warren S.L., Zimmerman E.C., Sadler M., White N.H.: Frequency and timing of severe hypoglycemia affects spatial memory in children with type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 2005; 28(10): 2372–7.
6. Åsvold B.O., Sand T., Hestad K., Bjørgaas M.R.: Cognitive function in type 1 diabetic adults with early exposure to severe hypoglycemia: A 16-year follow-up study. *Diabetes Care*, 2010; 33(9): 1945–7.
7. Gawron W., Pospiech L., Orendorz-Fraczkowska K., Noczyńska A.: Are there any disturbances in vestibular organ of children and young adults with Type I diabetes? *Diabetologia*, 2002; 45(5): 728–34.

8. McCarthy A.M., Lindgren S., Mengeling M.A., Tsalikian E., Engvall J.C.: Effects of diabetes on learning in children. *Pediatrics*, 2002; 109(1): E9.
9. Rovet J.F., Ehrlich R.M.: The effect of hypoglycemic seizures on cognitive function in children with diabetes: A 7-year prospective study. *J Pediatr.*, 1999; 134(4): 503–6.
10. Peczyńska J., Urban M., Głowińska B., Florys B.: How often does decreased consciousness of hypoglycaemia occur in children and adolescents with diabetes type 1 and what are its consequences? *Endokrynol Diabetol Chor Przemiany Materii Wieku Rozw.*, 2004; 10(1): 9–14.
11. Gold A.E., Macleod K.M., Frier B.M.: Frequency of severe hypoglycemia in patients with type I diabetes with impaired awareness of hypoglycemia. *Diabetes Care*, 1994; 17(7): 697–703.
12. Clayman S.G.: Somogyi Effect in Treatment of Diabetes. *JAMA J Am Med Assoc.*, 1970; 214(6): 1119–20.
13. Lucidi P., Rossetti P., Porcellati F., Pampanelli S., Candeloro P., Andreoli A.M. et al.: Mechanisms of insulin resistance after insulin-induced hypoglycemia in humans: The role of lipolysis. *Diabetes*, 2010; 59(6): 1349–57.
14. Kiec-Wilk B., Matejko B., Razny U., Stankiewicz M., Skupien J., Klupa T. et al.: Hypoglycemic episodes are associated with inflammatory status in patients with type 1 diabetes mellitus. *Atherosclerosis*, 2016; 251: 334–8.
15. Ratter J.M., Rooijackers H.M.M., Tack C.J., Hijmans A.G.M., Netea M.G., de Galan B.E. et al.: Proinflammatory effects of hypoglycemia in humans with or without diabetes. *Diabetes*, 2017; 66(4): 1052–61.
16. Daniluk U., Daniluk J., Kucharski R., Kowalczyk T., Pietrowska K., Samczuk P. et al.: Untargeted Metabolomics and Inflammatory Markers Profiling in Children With Crohn's Disease and Ulcerative Colitis – A Preliminary Study. *Inflamm Bowel Dis.*, 2019; 25(7): 1120–8.
17. Dunn W.B., Broadhurst D., Begley P., Zelena E., Francis-Mcintyre S., Anderson N. et al.: Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat Protoc.*, 2011; 6(7): 1060–83.
18. Godzien J., Alonso-Herranz V., Barbas C., Armitage E.G.: Controlling the quality of metabolomics data: new strategies to get the best out of the QC sample. *Metabolomics*, 2015; 11(3): 518–28.
19. Chong J., Soufan O., Li C., Caraus I., Li S., Bourque G. et al.: MetaboAnalyst 4.0: Towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Res.*, 2018; 46(W1): W486–94.
20. Wang W., Zhao L., He Z., Wu N., Li Q., Qiu X. et al.: Metabolomics-based evidence of the hypoglycemic effect of Ge-Gen-Jiao-Tai-Wan in type 2 diabetic rats via UHPLC-QTOF/MS analysis. *J Ethnopharmacol.*, 2018; 219: 299–318.
21. Qin Z., Wang W., Liao D., Wu X., Li X.: UPLC-Q/TOF-MS-Based Serum Metabolomics Reveals Hypoglycemic Effects of Rehmannia glutinosa, Coptis chinensis and Their Combination on High-Fat-Diet-Induced Diabetes in KK-Ay Mice. *Int J Mol Sci.*, 2018; 19(12): E3984.
22. Guasch-Ferré M., Hruby A., Toledo E., Clish C.B., Martínez-González M.A., Salas-Salvadó J. et al.: Metabolomics in prediabetes and diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care*, 2016; 39(5): 833–46.
23. Wu T., Qiao S., Shi C., Wang S., Ji G.: Metabolomics window into diabetic complications. *J Diabetes Investig.*, 2018; 9(2): 244–55.
24. Lu Y.P., Reichetzeder C., Prehn C., von Websky K., Slowinski T., Chen Y.P. et al.: Fetal serum metabolites are independently associated with gestational diabetes mellitus. *Cell Physiol Biochem.* 2018; 45(2): 625–38.
25. Bervoets L., Massa G., Guedens W., Louis E., Noben J.P., Adriaenssens P.: Metabolic profiling of type 1 diabetes mellitus in children and adolescents: A case-control study NCT03014908 NCT. *Diabetol Metab Syndr.*, 2017; 9: 48.
26. Balderas C., Rupérez F.J., Ibañez E., Señorans J., Guerrero-Fernández J., Casado I.G. et al.: Plasma and urine metabolic fingerprinting of type 1 diabetic children. *Electrophoresis*, 2013; 34(19): 2882–90.
27. Frohnert B.I., Rewers M.J. Metabolomics in childhood diabetes. *Pediatr Diabetes*, 2016; 17(1): 3–14.
28. Arneth B., Arneth R., Shams M.: Metabolomics of Type 1 and Type 2 Diabetes. *Int J Mol Sci.*, 2019; 20(10): E2467.
29. Orešič M., Simell S., Sysi-Aho M., Nääntö-Salonen K., Seppänen-Laakso T., Parikka V. et al.: Dysregulation of lipid and amino acid metabolism precedes islet autoimmunity in children who later progress to type 1 diabetes. *J Exp Med.*, 2008; 205(13): 2975–84.
30. Halama A., Kahal H., Bhagwat A.M., Zierer J., Sathyapalan T., Graumann J. et al.: Metabolic and proteomic signatures of hypoglycaemia in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.*, 2019; 21(4): 909–919.
31. Dutta T., Chai H.S., Ward L.E., Ghosh A., Persson X.M.T., Ford G.C. et al.: Concordance of changes in metabolic pathways based on plasma metabolomics and skeletal muscle transcriptomics in type 1 diabetes. *Diabetes*, 2012; 61(5): 1004–16.

Postępy Polskiej Medycyny i Farmacji. Zeszyty Naukowej 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 *Postępie Polskiej Medycyny i Farmacji* informacji w niej zawartych nie wolno ujawnić w prasie do czasu ukazania się numeru czasopisma, w którym artykuł występuje.

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

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

ODPOWIEDZIALNOŚĆ CYWILNA

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

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

KATEGORIE ARTYKUŁÓW

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

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

INSTRUKCJA DLA AUTORÓW

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

PRZYGOTOWYWANIE I NADSYŁANIE MANUSKRYPTÓW

Tekst

Manuskrypt powinien być przygotowany w dowolnej wersji Microsoft Word. Tekst należy pisać czcionką 12-punktową Times New Roman z odstępami półtojej 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

„POSTĘPY POLSKIEJ MEDYCyny I FARMACJI” (ISSN: 2082-8470)

www.ppmf.online

NOWE WYDANIE – 2020, TOM 7



ZAPRASZAMY
DO ZAPOZNANIA SIĘ
Z NAJNOWSZYM
WYDANIEM CZASOPISMA
W WERSJI DRUKOWANEJ
ORAZ ON-LINE

www.ppmf.online/issue/13122

ARCHIWUM ON-LINE



www.ppmf.online/resources/html/archives

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 80 lat cieszymy się zaufaniem lekarzy, farmaceutów i pacjentów, wytwarzając leki wysokiej jakości, bezpieczne i skuteczne.



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 ponad 1,5 mld zł w badania i rozwój – najwięcej w polskiej farmacji.
- Przeznaczyliśmy ok. 20 mln zł na rozwój polskiej nauki i działalność Naukowej Fundacji Polpharmy.
- Wdrażamy najlepsze praktyki społecznej odpowiedzialności biznesu.



**NAUKOWA
FUNDACJA
POLPHARMY**

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

www.polpharma.pl/fundacja