

An abstract, flowing, and translucent blue and purple ribbon-like shape that forms a large, irregular loop, framing the central text. The shape has a glossy, iridescent texture with hints of green and yellow light reflecting off its surface.

REDAKCJA
JAKUB KUFEL
PIOTR LEWANDOWSKI

TERAPIE XXI W.

ARCHAEGRAPH
Wydawnictwo Naukowe

TERAPIE XXI W.

REDAKCJA

JAKUB KUFEL
PIOTR LEWANDOWSKI

REDAKCJA
JAKUB KUFEL
PIOTR LEWANDOWSKI



TERAPIE XXI W.

ARCHAEGRAPH
Wydawnictwo Naukowe

Redakcja
Jakub Kufel
Piotr Lewandowski

Recenzenci
dr hab. n med. Zbigniew Nawrat, prof. IPS
lek. Mateusz Ożóg
lek. Michał Duda
mgr farm. Karol Krystek
lek. Elżbieta Olszewska Mojsej

Korekta i skład
Karol Łukomiak

Projekt okładki
Karol Łukomiak

© COPYRIGHT BY AUTHORS & ARCHAEGRAPH

ISBN: 978-83-67074-94-0

Wersja elektroniczna dostępna na stronie internetowej wydawcy:

www.archaegraph.pl

oraz w Repozytorium Cyfrowym Biblioteki Narodowej
i profilach autorów w internetowych serwisach naukowych

ARCHAEGRAPH
Wydawnictwo Naukowe

ŁÓDŹ, LIPIEC 2022

SPIS TREŚCI

Przedmowa	7
Maciej Kuś, Maciej Bochenek, Regina Wysocka	
Porównanie wpływu rolowania i rozciągania statycznego na sztywność mięśniową, zakres ruchu oraz wybrane zdolności motoryczne – przegląd piśmiennictwa	9
Karolina Gancarczyk, Julia Kaczmarczyk, Joanna Owsiak, Krzysztof Gładkowski	
Terapie z zastosowaniem mikrobioty w chorobach metabolicznych i przewodu pokarmowego	31
Michał Krawiec, Natalia Nafalska, Małgorzata Stopyra, Katarzyna Krzyżak	
Leczenie zachowawcze stulejki jako skuteczna alternatywa dla interwencji chirurgicznej	49
Michalina Masternak, Agnieszka Nowotarska, Tomasz Furgoł, Agnieszka Sawina, Joanna Owsiak, Tola Kotkiewicz	
Laseroterapia jako nowatorskie podejście do nietrzymania moczu u kobiet	67
Małgorzata Dyga, Zuzanna Kasieczka, Patrycja Piłat, Katarzyna Grudnik, Rafał Kołodziej	
Najnowsze technologie w chirurgicznym leczeniu tętniaków aorty brzusznej	83
Michał Maćkowski, Oliwia Pluta, Kamila Meca	
Druk przestrzenny (3D) - rewolucja w chirurgii szczękowo-twarzowej	121
Patrycja Pabis, Aleksandra Włosowicz, Karol Żmudka	
Innowacyjne terapie w leczeniu w endometriozy	137
Aneta Rasińska, Paulina Redel, Krzysztof Feret, Agnieszka Geisler, Marta Gmerek, Magdalena Kałucka-Janik	
Immunoterapia w raku pęcherza moczowego. Przegląd dotychczasowego leczenia i nowych możliwości	173

Konrad Kulka, Wiktoria Król, Donata Kowalczyk, Patryk Kubiak, Julia Koroncok	
Ustekinumab – przełom w leczeniu łuszczycy, choroby Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącego zapalenia jelita grubego	215
Julia Cieśla, Maciej Smreczak, Kinga Dworak, Natalia Trędota	
Mezenchymalne komórki macierzyste szansą dla chorych z COVID-19? Przegląd dotychczasowych osiągnięć i perspektywy zastosowania w praktyce klinicznej	235
Julia Koroncok, Donata Kowalczyk, Wiktoria Król, Konrad Kulka, Patryk Kubiak	
Zastosowanie Adukanumabu w przyczynowym leczeniu choroby Alzheimer	269
Patryk Kubiak, Julia Koroncok, Wiktoria Król, Donata Kowalczyk, Konrad Kulka	
Zastosowanie komórek macierzystych w eksperymentalnej terapii bielactwa	287
Paulina Redel, Aneta Rasińska, Magdalena Kałucka-Janik, Marta Gmerek	
Terapie genowe w dziedzicznych dystrofiach siatkówki	309
Aleksandra Włosowicz, Patrycja Pabis, Karol Żmudka	
Leki antyfibrotyczne – przełom w walce o poprawę jakości życia pacjentów z idiopatycznym włóknieniem płuc	351
Piotr Limanówka, Matylda Kujawińska	
Kannabinoidy w leczeniu bólu neuropatycznego	383
Rafał Górka, Karolina Gancarczyk, Aleksandra Kałuża, Krzysztof Gładkowski	
MDMA w leczeniu PTSD: Psychoterapia wspomagana psychodelikami nadzieją dla chorych?	399
Kamila Meca, Szymon Mikler, Oliwia Pluta, Michał Maćkowski, Jolanta Rudel, Julia Piskor	
Esketamina - znany anestetyk przełomem w terapii depresji lekoopornej	411

PRZEDMOWA

“Terapie XXI w.” to zbiór rozdziałów poświęconych nowatorskim technikom leczenia chorób cywilizacyjnych, które odmieniają nierówne szanse pacjentów na pokonanie choroby.

Monografia zawiera 17 rozdziałów naukowych poświęconych szerokiej tematyce nowoczesnych metod terapeutycznych. W pierwszej części mają Państwo możliwość zapoznania się z nowymi technikami w zakresie metod mających stanowić alternatywę lub uzupełnienie dotychczasowych terapii – fizjoterapię, laseroterapię, przeszczepy mikrobioty czy zastąpienie chirurgii leczeniem farmakologicznym. W dalszej części książki poświęcamy chwilę uwagi tematyce postępu w naukach zabiegowych, by następnie przejść do najważniejszego tematu jakim są nowatorskie terapie farmakologiczne – immunoterapia, leki biologiczne i terapie komórkowe. Monografia kończy się rozdziałami o równie ważnym znaczeniu dla współczesnej medycyny, czyli nowymi zastosowaniami znanych wcześniej leków.

Książka przeznaczona jest dla menadżerów, nauczycieli akademickich, praktyków, medyków oraz wszystkich zainteresowanych omawianą tematyką.

Dziękujemy wszystkim którzy przyczynili się do jej powstania. Mamy głęboką nadzieję, że przyczyni się ona do dalszego rozwoju wiedzy medycznej i chęci tworzenia pasjonujących projektów naukowych.

Jakub Kufel
Piotr Lewandowski

Redaktorzy naukowci

PORÓWNANIE WPŁYWU ROLOWANIA I ROZCIĄGANIA STATYCZNEGO NA SZTYWNOŚĆ MIĘŚNIOWĄ, ZAKRES RUCHU ORAZ WYBRANE ZDOLNOŚCI MOTORYCZNE – PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA

Maciej Kuś¹, Maciej Bochenek², Regina Wysocka³

1. Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Adaptowanej Aktywności Fizycznej i Sportu. Wydział Nauk o Zdrowiu w Katowicach. Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Polska

2. Studenckie Koło Naukowe Fizjoterapii. Wydział Nauk Stosowanych, Akademia WSB Dąbrowa Górnicza

3. Zakład Fizjoterapii. Wydział Nauk o Zdrowiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Abstrakt

Rolowanie jest szeroko używanym sposobem uzyskania rozluźnienia mięśniowo-powięziowego, stosowanego w celu zmniejszenia napięcia mięśni, poprawy zakresu ruchu w stawach, zwiększenia zdolności aktywacji mięśni, ukrwienia tkanek oraz poprawy niektórych zdolności motorycznych. Rozciąganie statyczne stosowane jest w celu poprawy parametrów sztywności tkanek oraz pasywnych zakresów ruchów w stawach. Prezentowana praca przedstawia – w oparciu o przegląd aktualnej literatury, związki tych technik z wybranymi parametrami funkcjonalnymi.

Abstract

Foam rolling is common method of myofascial release, used for muscle relaxation, increase of range of motion, improvement of muscle activation, blood flow and some of the motor skills. Static stretching is used for tissue stiffness reduction and passive range of motion improvement. This study presents relation of this techniques and chosen functional parameters.

1. Wstęp

Rolowanie polega na ucisku tkanki cylindrem, wykonanym z pianki bądź styropianu, nazywanym rolerem. Używane rolery mają różne rozmiary, średnice, również różne faktury oraz stopnie twardości ^{1,2}. Właściwym sposobem aplikacji rozluźnienia mięśniowo powięziowego za pomocą rolera jest jego przetoczenie od przyczepu początkowego do przyczepu końcowego mięśnia, wywierając nacisk związany z grawitacją masy ciała ³. Podczas rolowania mięśnia trójgłowego łydki siła oddziałująca na struktury będące w kontakcie z rolerem może wynosić nawet 32% masy ciała, a podczas rolowania uda 34% masy ciała ⁴. Stretching statyczny polega na doprowadzeniu mięśnia bądź grupy mięśniowej do rozciągnięcia oraz przytrzymania osiągniętej pozycji przez pewien czas – bez żadnego dodatkowego ruchu ⁵.

Jednym z kluczowych przejawów możliwości ruchowych człowieka, leżącym na pograniczu cech strukturalnych i funkcjonalnych, jest gibkość. Gibkość definiowana jest jako zakres ruchu w stawie lub całym łańcuchu kinematycznym. Oprócz innych czynników (np. wiek, płeć, aktywność), na zakres ruchu wpływa budowa oraz stan elementów struktury układu ruchu, takich jak mięśnie, ścięgna, więzadła, powięź oraz kości ⁶. Optymalny (możliwie wysoki) zakres ruchu warunkowany jest osiągnięciem efektywnego rozluźnienia mięśniowo-powięziowego ⁷ oraz tolerancją na rozciąganie ⁸.

Powięź zbudowana jest z tkanki łącznej. Otacza, spaja i łączy ona ze sobą wszystkie narządy wewnętrzne oraz elementy układu ruchu - mięśnie, nerwy i naczynia krwionośne. Charakteryzuje się ona swoistą sztywnością wpływającą na ogólną gibkość oraz zakresy ruchów w stawach ⁹. Sztywność powięzi, jako integralnego elementu układu ruchu, przekłada się bezpośrednio na sztywność pasywną mięśni, czyli ich opór na rozciąganie i skracanie⁸. Rozluźnienie mięśniowo-powięziowe prowadzić może do wielu korzystnych efektów możliwych do zaobserwowania w organizmie, takich jak: poprawa wspomnianych wyżej parametrów funkcjonalnych, przyspieszenie regeneracji mięśni, jak również poprawa pracy i zdolności motorycznych mięśni ¹⁰. Redukcja sztywności pasywnej mięśni, a tym samym poprawa ROM (*range of motion* – zakres ruchu w stawie), może również być jednym ze sposobów zapobiegania kontuzjom w sporcie ^{11,12}. Z wiekiem wpływ sztywności pasywnej na zakres ruch słabnie. Większą rolę przejmuje sztywność tkanki nerwowej, czyli stopień, jakim może ulec ona rozciągnięciu wzdłużnie, przy zachowanym prawidłowym ślizgu względem otaczających ją tkanek. Bez względu na wiek największą rolę w pasywnym zakresie ruchu odgrywa tolerancja na rozciąganie.

Jest subiektywnym, ulegającym adaptacji odczuciem, odnoszącym się do maksymalnego możliwego do zaakceptowania stopnia rozciągnięcia tkanki ⁸. Jednakże, niektórzy badacze twierdzą, że wyższa sztywność pasywna wpływa pozytywnie na zdolności generowania mocy i siły mięśniowej ¹¹. Ta znaczna ilość czynników wpływających na parametry poddane analizie oraz wiele sprzecznych informacji podawanych przez autorów utrudnia wyciągnięcie prawidłowych wniosków na temat tych popularnych wśród sportowców metod. W poniższym opracowaniu dokonano przeglądu aktualnej literatury na temat wpływu różnych metod rolowania (rozluźnienia mięśniowo-powięziowego) oraz rozciągania (stretchingu) statycznego na wybrane aspekty sprawności fizycznej człowieka.

2. Kryteria doboru literatury

W poniższej pracy wykorzystano badania z lat 2014-2021. Wzięto pod uwagę tylko prace, w których uczestniczyli tylko zdrowi kandydaci, bez kontuzji, bez chorób przewlekłych oraz neurologicznych. Literaturę zebrano poprzez wyszukiwanie na stronach pubmed.ncbi.nlm.nih.gov oraz scholar.google.com. Wykorzystano wyszukiwanie logiczne z użyciem fraz: *foam rolling*, *self myofascial release*, *myofascial release*, *static stretching*, *static stretch*, *power*, *strength*, *jump*, *range of motion*, *ROM*, *stiffness* oraz łączników „AND” i „OR”. Kryteria te spełniało 480 pozycji w PUBMED oraz 221 pozycji w Google Scholar. Uwzględniając ustalone kryteria doboru do analizy wybrane zostały 53 prace.

3. Sztywność pasywna mięśni

Sztywność pasywna, szczególnie u młodych osób w znacznym stopniu przekłada się na wiele parametrów sprawnościowych, takich jak głębokość, zakres ruchu w stawach, czy też zdolność generowania mocy mięśniowej¹⁰⁻¹². Jej poziom określany jest pośrednio za pomocą specyficznych testów^{5, 13}, metod opartych o zmiany obrazu ultrasonografii i ich analizę za pośrednictwem specjalistycznego oprogramowania¹⁴⁻²³, analizę wprowadzonego z zewnątrz impulsu mechanicznego (oscylacji)^{24, 25} lub innych metod, takich jak analiza zmian pasywnego oporu podczas ruchu kąтового w stawie ²⁶.

3.1. Wpływ rolowania na sztywność pasywną mięśni

Według Nakamura i wsp. nawet pojedyncza sesja rozluźnienia mięśniowo-powięziowego za pomocą rolera może wpływać na sztywność pasywną tkanki mięśniowej poddanej interwencji ¹⁴. Nie wpływa jednak na zmniejszenie sztywności pasywnej tkanki ścięgnowej ²⁴. Efekt ten utrzymuje się stosunkowo krótko. Jak zauważa Baumgart i wsp. –po jednej sesji rolowania mięśni uda oraz podudzia przez młodych sportowców-amatorów, efekt zmniejszonej sztywności mięśni utrzymywał się przez 15 minut po zastosowaniu danej techniki, a następnie powrócił do wcześniejszej wartości ⁴. D. Junker i wsp. natomiast wykazali również długotrwałe efekty stosowania rozluźnienia mięśniowo-powięziowego. Stosując 8 tygodniowy program rolowania wszystkich grup mięśniowych kończyn dolnych uzyskano istotnie statystycznie zmniejszenie sztywności pasywnej mięśni w obrębie tych grup ¹⁵.

3.2. Wpływ rozciągania statycznego na sztywność pasywną mięśni

Według wyników E. Caliskan'a i wsp. dwie minuty rozciągania statycznego mięśnia prostego uda nie wpłynęły znacząco na sztywność mięśni. Jednakże u grupy rozciągającej się przez 5 minut sztywność zmalała znacząco ¹⁶. Zauważa to również M. Nakamura podczas badania wpływu rozciągania statycznego na sztywność mięśnia brzuchatego łydki. Określając w trakcie badania poziom sztywności pasywnej co 1 minutę podkreśla, że rozciąganie przez minimum 2 minuty skutecznie zwiększa elastyczność mięśnia. Autor ten sugeruje również, że rozciąganie statyczne przez minimum 3 minuty umożliwia zmniejszenie sztywności pasywnej mięśni grupy kulszowo-goleniowej przy jednoczesnej poprawie zakresu ruchu ¹⁷. Dodatkowo, badania wskazują, że zarówno aktywne, jak i pasywne rozciąganie statyczne zmniejsza sztywność pasywną bez istotnych różnic między jedną, a drugą metodą rozciągania ²³.

3.2.1. Intensywność rozciągania statycznego, a jego skuteczność

Na efektywność stretchingu statycznego wpływają przede wszystkim czas jego trwania oraz intensywność rozciągnięcia tkanki ¹⁶. Określana jest subiektywnie przez osobę badaną na podstawie odpowiedniej skali. Najczęściej wykorzystywane są skale *Numeric Rate Scale* (NRS 0-10, gdzie 0 to brak dyskomfortu, a 10 maksymalny dyskomfort) ¹⁸ oraz *POD - Points of Discomfort*

określaną procentowo, gdzie 100% POD –to maksymalny ROM bez odczuwalnych dolegliwości bólowych ¹⁹.

K. Takeuchi i wsp. zwraca uwagę, że podczas aktywnego rozciągania statycznego mięśni grupy kulszowo-goleniowej (3x20s z 30s przerwy) sztywność mięśni zmniejszyła się tylko przy zastosowaniu rozciągania z maksymalną, akceptowalną przez uczestników badania intensywnością równą NRS=6-7. W grupie wykonującej rozciąganie z niską intensywnością (NRS=0) nie zaobserwowano poprawy. Ból związany z wykonywaniem rozciągania zniknął bezpośrednio po jego zakończeniu ¹⁸. Również podczas ciągłego rozciągania statycznego przez 60s z intensywnością 100% POD i 120% POD Takeuchi zauważa, że sztywność jednostki mięśniowo-ścięgnistej w obrębie grupy kulszowo goleniowej zmniejszyła się tylko w grupie poddanej rozciąganiu o wyższej intensywności. Efekt ten utrzymywał się do 20 minut po zakończeniu badania ¹⁹. Autor ten w innym badaniu, wykonując pasywne rozciąganie statyczne z wysoką i średnią intensywności (120% i 110% POD) przez 1 i 3 min zauważa, że w celu zmniejszenia sztywności mięśnia, intensywność rozciągania jest bardziej istotna niż czas jego trwania ²⁰. Natomiast wykonując krótkie (10s, 20s i 30s) rozciąganie statyczne o maksymalnej intensywności (max POD) sztywność jednostki mięśniowo-ścięgnistej zmniejszyła się niezależnie od czasu trwania rozciągania. Według autorów, krótkie 10s rozciąganie wysokiej intensywności może umożliwić zapobieganie występowania urazów dzięki poprawie elastyczności i zmniejszeniu sztywności mięśni ²¹. Również T. Fukaya i wsp. twierdzą, że rozciąganie z większą intensywnością, ale w krótszym wymiarze czasowym powinno być stosowane w celu zmniejszenia sztywności mięśniowej – ze względu na największy wzrost elastyczności tkanki mięśniowej, u osób rozciągających się takim protokołem ²².

Długotrwałe, regularne stosowanie rozciągania statycznego może zmniejszyć sztywność kompleksu mięśniowo-ścięgnistego. Po 6 tygodniach spadła o 11%, a po 12 tygodniach o 16%. Zmniejszenie sztywności kompleksu mięśniowo-ścięgnistego koreluje ze zwiększeniem się zakresu ruchu w stawie. Jednocześnie nie jest zauważalna zmiana sztywności w obrębie głowy przysrodkowej mięśnia brzuchatego łydki, co świadczyć może według autorów, że na poprawę ROM nie ma wpływu bezpośrednio sam mięsień i zmiany w jego obrębie, tylko inne tkanki sąsiadujące. Jednakże sztywność głowy przysrodkowej brzuchatego łydki tylko w niewielkim stopniu wpływa na zmiany adaptacyjne w zakresie ruchu w stawie skokowym ²⁶. Powyższą tezę potwierdził w swoim badaniu A. Yoshimura i wsp. zauważając, że rolowanie nie wpłynęło na morfologię mięśnia poddanego działaniu bodźca ²⁵.

3.3. Porównanie wpływu rolowania i rozciągania statycznego na sztywność pasywną mięśni

W badaniu pośrednim sztywności pasywnej mięśni za pomocą testu *se- atôreach* A. Penichet-Tomas i wsp. wykazali, że choć efekt rolowania po 15 minutach od zakończenia protokołu interwencyjnego był mniejszy niż rozciągania, to nadal się utrzymywał na tym samym poziomie jak podczas pomiaru wykonanego bezpośrednio po zakończeniu interwencji, a efekt rozciągania zmniejszył się po upływie 15 minut ⁵. W porównaniu jazdy na rowerze, jako wstępnego rozgrzania organizmu oraz rolowania zaobserwowano u grupy aktywnych fizycznie amatorów zmniejszenie sztywności pasywnej grupy kulszowo- goleniowej po zastosowaniu rolowania. Autorzy badania wskazują również na kluczową rolę aktywnej rozgrzewki w celu zmniejszenia sztywności pasywnej mięśni oraz na wzięcie pod uwagę odstępu czasowego między rozgrzewką i zawodami żeby zoptymalizować sztywność mięśniową ²⁴.

4. Zakres ruchu w stawach

Zakres ruchu w stawach jest wypadkową wielu czynników. Wpływają na niego sztywność powięzi, więzadeł, torebek stawowych oraz mięśni, jak również strukturalna budowa stawu. Niektórzy autorzy uważają, że na ROM stawów najistotniejszy wpływ ma przede wszystkim sztywność części ścięgnej mięśnia ²⁴. Z kolei inni sugerują wiodący wpływ tkanek sąsiadujących na ROM ^{25, 26}. Bez względu na nadrzędny czynnik odpowiadający za ten parametr, rolowanie oraz stretching statyczny są metodami wpływającymi globalnie zarówno na kompleks mięśniowo-ścięgnisty ^{17,24}, jak i wszystkie tkanki okalające ¹¹.

4.1. Wpływ rolowania na zakres ruchu w stawach

Efekty rozluźnienia mięśniowo-powięziowego są badane na przykładzie wielu różnych grup mięśniowych. Osiągany efekt jest podobny. Szereg badań donosi, że już jedna sesja rolowania mięśnia brzuchatego łydki może wpłynąć na poprawę zakresu ruchu zgięcia grzbietowego w stawie skokowym ^{24,27,28}. Efekt pojedynczej interwencji rozluźnienia mięśniowo- powięziowego jest jednak krótkotrwały. J. C Smith i wsp. zauważają, że poprawa ROM w zgięciu stawu biodrowego została odnotowana bezpośrednio po rozluźnieniu mięśniowo- powięziowym, efekt ten zaniknął już po 5 minutach ²⁹. MacDonald

i wsp. udowadniają, że wynik może utrzymać się dłużej. Stosując 120s rolowania mięśnia czworogłowego uda prowadzi do poprawy ROM w stawie kolanowym po 2 minutach od zakończenia o 12,7%, a po 10 minutach od zakończenia o 10,3%, względem zakresu sprzed rolowania ³⁰. Najdłuższy efekt krótkotrwały uzyskał w swoim badaniu M. Nakamura, stosując przerywane rolowanie o łącznym czasie 90s (3x30s) – poprawę zgięcia w stawie skokowym, utrzymującą się do 30 minut po interwencji. Autor ten zauważa, że poprawa ROM nie była powiązana z jakimikolwiek zmianami dotyczącymi sztywności mięśniowej w obrębie mięśnia brzuchatego łydki, a ze zwiększeniem tolerancji na rozciąganie ¹⁴. Dodatkowo bardziej znaczące zmiany zauważalne są przy badaniu ROM za pomocą globalnych testów, takich jak na przykład test palce-podłoga. Specyficzne testy, wyodrębniające pojedynczą grupę mięśniową lub część łańcucha kinematycznego, jak na przykład test SLR (*Straight Leg Rise*) wypadają gorzej. Świadczyć to może o globalnych adaptacjach obejmujących całe taśmy mięśniowo-powięziowe ³¹.

Wykorzystanie rolera ręcznego przynosi nieznaczne zmiany krótkoterminowe. Sullivan i wsp. używając w swoim badaniu rolera ręcznego przez 5s oraz 10s zaobserwował poprawę zakresu ruchomości w teście *seat and reach* średnio o zaledwie 4,3% ⁹. Jednakże porównując powyższe wyniki badań z zastosowaniem rolera ręcznego i klasycznego cylindrycznego rolera można domniemać braku skuteczności tego pierwszego. Potwierdzenie tej tezy wymaga jednak dokładniejszego sprawdzenia i bezpośredniego porównania obu metod wykorzystując ujednolicony protokół.

W połączeniu z innymi metodami, użycie rolowania jako elementu rozgrzewki może być bardzo efektywnym sposobem poprawy ROM. Zastosowanie rolowania tylnej taśmy mięśniowo-powięziowej z 15 minutową rozgrzewką dynamiczną pozwala osiągnąć poprawę (o $11 \pm 7\%$) w teście SLR bezpośrednio po zakończeniu. Dodatkowo przenieść się to może na poprawę wyniku w teście palce-podłoga (o $50\% \pm 40\%$) ²⁷. Z kolei połączenie rolowania ze stretchingiem dynamicznym nie wpływa na bezpośrednią poprawę ROM stawu skokowego bardziej niż zastosowanie samego stretchingu. Również porównując rolowanie z protokołem standardowej rozgrzewki nie ma zauważalnych różnic ³².

Tabela 1. Porównanie czasu trwania rolowania na uzyskany efekt

Lp.	Czas bodźca	Grupa mięśniowa	Efekt
1.	3x30s z 30s przerwy	m. brzuchaty łydki	Poprawa
2.	2x60s z 30s przerwy	mm. gr. kulszowo- goleniowej	Poprawa przez 5 minut
3.	120s	m. czworogłowy uda	Po 2 min +12,7% ROM Po 10 min +10,3% ROM
4.	3x30s	m. brzuchaty łydki	Poprawa przez 30 minut
5.	10s (roler ręczny)	mm. gr. kulszowo- goleniowej	+4,3% ROM zgięcia stawu biodrowego
6.	3x60s z 30s przerwy +15 min rozgrzewki	Tylna taśma mięśniowo- powięziowa	+11% ROM w teście SLR +50% w teście palce- podłoga

4.1.1. Efekty długoterminowe rolowania

Regularne rolowanie może powodować trwałą poprawę ROM. Stosowanie rozluźnienia mięśniowo-powięziowego mięśni kulszowo-goleniowych przez 8 tygodni (3 razy w tygodniu) wpływa na poprawę zakresu aktywnego wyprostowania stawu kolanowego³³. Również po 12 sesjach o czasie trwania 10-15 minut każda, zauważalna była znaczna poprawa ROM w teście palce-podłoga. Wyniki były porównywalne z uzyskanymi metodą CRPNF (*contract-relax proprioceptive neuromuscular facilitation*), uznawaną za jedną z najskuteczniejszych w kwestii poprawy zakresu ruchu³⁴. Podobny efekt rozluźnienia mięśniowo- powięziowego zauważył również D. Junker. Po zastosowaniu 8 tygodniowego planu rolowania wszystkich grup mięśniowych kończyn dolnych wykazał istotną poprawę w teście palce-podłoga u osób poddanych interwencji¹³. Czterotygodniowa interwencja obejmująca mięśnie grupy kulszowo- goleniowej i mięsień czworogłowy, nie przyniosło żadnego długoterminowego efektu, bez względu na ilość sesji w tygodniu³⁴.

4.2. Wpływ rozciągania statycznego na zakres ruchu w stawach

Zarówno w aktywnym, jak i w pasywnym rozciąganiu statycznym maksymalny ROM ulega poprawie²³. Poziom intensywności rozciągania nie miał wpływu na osiągniętą poprawę zakresu ruchu w stawach. K. Takeuchi porównując pasywne rozciąganie statyczne ze średnią (100POD) oraz wysoką (120POD) intensywnością przez 60 sekund wykazuje, poprawę ROM w obu grupach. Efekt utrzymywał się do 20 minut po zakończeniu próby¹⁹. Stosując pasywny stretching statyczny z intensywnością 110POD oraz 120POD przez 1 oraz 3 minuty, autor ten we wszystkich przypadkach zauważa poprawę²⁰.

W innym badaniu tego samego autora porównującym aktywne statyczne rozciąganie (rozciąganie szczytowe – *Jack knife stretch*) z niską (NRS 0) oraz wysoką intensywnością (NRS 6-7), zakres wyprost kolana również poprawił się bez względu na intensywność ¹⁷. Po jednorazowym rozciąganiu zginaczy podeszwowych stawu skokowego, zarówno przy długim rozciąganiu z małą intensywnością (240s, 50% aktywnego ROM), jak i krótkim rozciąganiu z dużą intensywnością (100s, 120% aktywnego ROM) wystąpiła poprawa zakresu ruchu. Jednakże przy rozciąganiu z większą intensywnością poprawa ta była większa. Autorzy sugerują, że krótsze rozciąganie z większą intensywnością powinno być wykorzystywane w celu poprawy ROM ²².

Według niektórych badaczy stosowanie przerywanego stretchingu statycznego nie wpływa na osiągnięty efekt. O. Donti i wsp., w porównaniu dwóch powyższych metod (gr. I: 3 min, gr. II: 6x30s z przerwami 30s) dla mięśni grupy kulszowo- goleniowej z intensywnością 80-90/100 VAS (*Visual Analogue Scale*- skala umożliwiająca wizualne określenie poziomu bólu), nie zauważyli znaczących różnic między zastosowanymi protokołami. Autorzy ci twierdzą, że na skuteczność rozciągania statycznego wpływ również ma doświadczenie w stosowaniu tej metody. W grupie badanych gimnastyczek (które stosują rozciąganie statyczne w codziennym treningu) poprawa dla ruchu zgięcia w st. biodrowym wyniosła 6%. Natomiast u grupy zawodników sportów zespołowych płci męskiej, tylko protokół z wykorzystaniem przerw przyniósł poprawę (o ok. 13%) w zgięciu stawu biodrowego, natomiast protokół ciągły nie dał istotnej statystycznie poprawy (mniej niż 1% poprawy). Świadczy to o tym, że istotnym aspektem dla poprawy ROM jest również czynnik neurofizjologiczny, taki jak tolerancja na rozciąganie ³⁵.

Tabela 2. Porównanie wpływu intensywności i czasu trwania rozciągania na uzyskany efekt

Lp.	Intensywność	Czas bodźca	Uzyskany efekt
1.	100 POD	60s	Poprawa przez 20 minut
2.	120 POD	60s	Poprawa przez 20 minut
3.	110 POD	60s i 180s	Poprawa
4.	120 POD	60s i 180s	Poprawa
5.	0 NRS (niska)	3x20s z 30s przerwy	Poprawa
6.	6-7 NRS	3x20s z 30s przerwy	Poprawa
7.	50% aktywnego ROM	240s	Poprawa
8.	120% aktywnego ROM	100s	Poprawa wyższa niż w 7.
9.	80-90/100 VAS	6x30s z 30s przerwy	Brak poprawy

4.2.1. Efekty długoterminowe rozciągania statycznego

Skuteczności wpływu długoterminowego rozciągania statycznego wysokiej intensywności na ROM dowiódł w swoim badaniu Stefano Longo i wsp. Po 6 tygodniach stosowania (5 razy w tygodniu, 2250s rozciągania/tyg.) poprawa wyniosła 8.8%, a po 12 tygodniach aż 23,4% ²⁶. I. Panidi i wsp. udowadniają, że efekty jednostronnego rozciągania są w równym stopniu zauważalne po stronie przeciwnej. Badając siatkarzy poddanych 12 tygodniowemu stretchingowi mięśnia trójgłowego łydki nogi dominującej, zauważyli istotną poprawę zgięcia grzbietowego w stawie skokowym zarówno w kończynie rozciąganej jak i kontrolnej. Badacze ci sugerują, że może to świadczyć o kontrlateralnych adaptacjach organizmu ³⁶. Długoterminowe rozciąganie statyczne u sportowców pozwala również na zapobieganie ograniczeniom elastyczności mięśni. T. Raj i wsp. udowodnili ten fakt przeprowadzając w drużynie rugby 8 tygodniowy program stretchingu statycznego na bazie jogi (2 razy w tygodniu po 1h). Zawodnicy poddani rozciąganiu zachowali elastyczność mięśni grupy kulszowo-goleniowej (śr. -1,2% ROM), zawodnicy z grupy kontrolnej uczestniczący w tych samych treningach drużynowych, ale nie poddani rozciąganiu na bazie jogi, zanotowali spadek zakresu ROM śr. o 14,8% ³⁷.

4.3. Porównanie wpływu rozciągania statycznego i rolowania na zakres ruchu w stawach

W porównaniu wpływu rozciągania statycznego i rolowania zauważono, że stretching miał wpływ na pasywny zakres ruchu. Rolowanie miało wpływ zarówno na pasywny, jak i aktywny zakres ruchu w stawie. Autorzy sugerują, że przyczyną poprawy zakresu ruchu bezpośrednio po interwencji może być zarówno czynnik neurofizjologiczny, taki jak odczucie rozciągnięcia, jak i mechanizm morfologiczny czyli mobilność powięzi ¹¹. W porównaniu wpływu rolowania (I), rozciągania statycznego (II) i protokołu łączącego obie te metody (III) na bierny zakres zgięcia grzbietowego stawu skokowego, przy zastosowaniu każdej z metod zauważalna była poprawa w uzyskiwanych wynikach. Zmiana ta niezależnie od metody utrzymywała się przez minimum 10 minut od zakończenia próby. Porównując protokół I i III zdecydowanie lepszy efekt można było zauważyć przy połączeniu rolowania i rozciągania. Rozciąganie statyczne w badaniu wykonywano do pierwszych odczuć dyskomfortu, nie pozwalając na pojawienie się odczuć bólowych ³⁸. Neurofizjologiczne adaptacje po zastosowaniu rolowania obejmują również propriocepcję. Już nawet

jednokrotne zastosowanie rozluźnienia mięśniowo-powięziowego pozwoliło na uzyskanie poprawy w parametrach stabilności o średnio 8% (śr. z 3 badanych osi) ²⁷.

5. Tolerancja na rozciąganie

Tolerancja na rozciąganie ma znaczny wpływ na zakres ruchu w stawach ^{12,14,39}. Interpretowana jest zazwyczaj na podstawie zmniejszających się dolegliwości bólowych podczas rozciągnięcia danej grupy mięśniowej. Już 90 sekund rolowania pozwala na osiągnięcie tego efektu ⁴⁰. Również stosowanie pasywnego stretchingu statycznego średniej i wysokiej intensywności w czasie od 1 do 3 minut powoduje wzrost progu tolerancji na rozciąganie, mierzonej w tym przypadku za pomocą skali VAS ²⁰. We wszystkich powyższych przypadkach zauważalne było zwiększenie ROM.

Kay i wsp. w swoich badaniach potwierdzają, że zarówno rolowanie, jak i stretching statyczny wpływają na wzrost tolerancji na rozciąganie. Badacze ci zaznaczają również, że mechanizm powstawania tej tolerancji jest niejednoznaczny i wymaga dokładniejszego zbadania ³⁹. Informacja ta może być istotna dla sportowców oraz trenerów podczas planowania jednostki treningowej. Jednakże efekty bezpośrednie utrzymują się maksymalnie do 30 minut, dlatego może być to niewystarczające jako środek zapobiegania urazom mięśniowo-szkieletowym ⁴⁰.

W poprawie zakresu ruchomości i budowaniu tolerancji na rozciąganie znaczenie ma również doświadczenie w stosowaniu stretchingu statycznego. Osoby rozciągające się regularnie, mające lepszy ROM i wysoką tolerancję na rozciąganie nie osiągną aż takiej poprawy, jak osoby poddane stretchingowi statycznemu, które wcześniej nie stosowały tej metody na co dzień. Zbudowanie tolerancji na rozciąganie u tych osób pozwoli na osiągnięcie znacznej poprawy ROM ⁴¹. Niektórzy autorzy zauważają ważną rolę zmiennej czasu w długotrwałym wzroście tolerancji na rozciąganie pasywne ²⁶.

6. Siła i zdolność generowania mocy mięśniowej

6.1. Wpływ rolowania na siłę i zdolność generowania mocy mięśniowej

Rozluźnienie mięśniowo-powięziowe u osób amatorsko wykonujących różne formy aktywności fizycznej nie ma wpływu na zdolność generowania mocy mięśniowej przez te osoby. Nie udowodniono bezpośredniego wpływu

rolowania tylnej taśmy mięśniowo- powięziowej na wynik wyskoku wzwyż z miejsca – *Countermovement Jump* (CMJ) ^{4,27}, *Squat Jump* (SQJ) ^{27,31}, skok w dal z miejsca jednonóż ³¹, skok w dal z miejsca obunóż i trójskok jednonóż ¹³. Również łącząc rolowanie z innymi metodami M. Godwin i wsp. nie zauważyli wpływu na zdolność generowania mocy mięśniowej przez badanych podczas testu *drop jump* ³². We wszystkich powyższych badaniach brakowi wpływu na generowaną moc towarzyszyła poprawa ROM przy jednoczesnej redukcji sztywności mięśniowej. Dodatkowo MacDonald i wsp. zauważyli że poza wyżej wymienionymi zmianami, po rolowaniu mięśni czworogłowych nie występuje zauważalna wcześniej negatywna korelacja pomiędzy zakresami ruchomości w stawach i produkowaną mocą. Efekty te utrzymują się do 10 minut po zakończeniu protokołu ³⁰. J. C. Smith i wsp. natomiast nie wykazali poprawy w skoku dosiężnym bezpośrednio po samym rolowaniu, jednakże łącząc je z rozciąganiem dynamicznym, wyniki były lepsze niż biorąc pod uwagę każdą z form z osobna. Efekt ten utrzymywał się przez około 5 minut ²⁹.

Biorąc pod uwagę zmiany długoterminowe, 4 tygodniowe, jednostronne rolowanie rolerem ręcznym mięśni kulszowo-goleniowych oraz czworogłowych nogi dominującej (3 oraz 6 razy w tygodniu) nie wpłynęło na wyniki CMJ jednonóż ⁴². Poprawa parametrów gibkości może zostać osiągnięta bez wpływu na zdolność generowania siły i mocy mięśniowej. Hughes i Ramer udowodnili, że rolowanie przez co najmniej 90 sekund pozwala na poprawę zakresu ruchu w stawie, bez wpływu na możliwą do wygenerowania maksymalną siłę ³⁷. Stosowanie rozluźnienia mięśniowo-powięziowego z użyciem rolera, bez względu na czas aplikacji, nie wpływa również na maksymalną możliwą do wygenerowania siłę izometryczną przy jednoczesnej poprawie ROM ¹⁴. Natomiast w badaniu D. Junker'a i wsp. rolowanie wszystkich grup mięśniowych kończyn dolnych przez 8 tygodni nie wpłynęło na wytrzymałość mięśni *core* badaną w próbach izometrycznych ¹⁵.

Poprawa ROM wynikająca z zastosowania rozluźnienia mięśniowo-powięziowego nie wpływa również na aktywność EMG mięśni, ani na maksymalną moc generowaną podczas pracy ekscentrycznej ⁴³. Podobne wyniki uzyskał L. J. MacGregor i wsp. badając długoterminowe efekty rozluźnienia mięśniowo-powięziowego za pomocą rolera zastosował ten bodziec przez 3 kolejne dni. Maksymalna siła napięcia izometrycznego wzrosła, jednak przeciwnie do stretchingu, nie przełożyło się to na poprawę ROM ⁴⁴. Powyższe wyniki świadczyć mogą o pozytywnym wpływie długotrwałego rolowania na poprawę siły i *performance* w sporcie. Jednakże wymaga to dokładniejszego sprawdzenia.

6.1.1. Powysiłkowe zastosowanie rolowania

Już jednorazowe rolowanie może zostać wykorzystane w celu ograniczenia spadku wyników maksymalnej mocy wynikających ze zmęczenia mięśni oraz samego odczucia zmęczenia i powysiłkowych bólów mięśniowych- DOMS (*delayed onset muscle soreness* – opóźniona bolesność mięśniowa)⁴⁴. E. Jo i wsp. porównując bezpośredni, krótkotrwały wpływ biernego odpoczynku i rolowania, zauważyli, że rolowanie zmniejszyło bezpośrednie krótkoterminowe efekty zmęczenia mięśni. W grupie odpoczywającej aktywnie zauważalnie mniejszy był spadek wyników średniej i maksymalnej mocy oraz średniego przyspieszenia podczas CMJ. Nie zauważono jednak wpływu rolowania na zmiany w wysokości wyskoku. Według autorów wyniki te mogą wskazywać na potencjalne korzyści rolowania śródtreningowego lub podczas zawodów w celu niedopuszczenia do bezpośrednich ograniczeń zdolności motorycznych spowodowanych zmęczeniem związanym z wysiłkiem fizycznym^{45,52}. Po treningu ekscentrycznym, 15 min rozluźnienia mięśniowo-powięziowego, jako narzędzia mającego na celu ograniczenie DOMS, pozwoliło na poprawę wyników CMJ bezpośrednio po rolowaniu. Jednakże największa poprawa była zauważalna dopiero po 72h od zakończenia protokołu. Rolowanie pozwoliło również na redukcję odczuć bólowych. Największa różnica była zauważalna po 48 i 72h od zakończenia treningu. Stosując rozluźnienie mięśniowo-powięziowe po aktywności, nie zauważono zmian w ROM i napięciu mięśni⁴⁶.

Do częściowo przeciwnych wniosków doszli G. Laffaye i wsp. Nie zauważyli w swoim badaniu wpływu rolowania na spadek wyników SQJ i CMJ spowodowanych wcześniejszym przeprowadzeniem HIIT (*High Intensity Interval Training*). Zarówno wysokość, jak i generowana moc po wysiłku spadły, a rozluźnienie mięśniowo-powięziowe nie ograniczyło tego w żadnym stopniu. Odczucie DOMS po zastosowaniu masażu rolerem było podobne bezpośrednio po jego zastosowaniu, ale z czasem (po 24 i 48h) odczucie to ulegało dużo szybszej redukcji niż u grupy bez interwencji rolerem³².

6.2. Wpływ rozciągania statycznego na zdolność generowania mocy mięśniowej

Jedna 5 minutowa sesja rozciągania statycznego nie wpływa na wyskok wertykalny po rozciąganiu mięśni czworogłowych, ani kulszowo-goleniowych. Natomiast po rozciąganiu statycznym mięśni trójgłowych łydki wynik wyskoku ulega pogorszeniu średnio o 3,3%. W każdym przypadku poprawiając

ROM⁴⁷. Również zastosowanie dłuższego, 8 minutowego protokołu ciągłego rozciągania statycznego, poprzedzonego rozgrzewką (ćwiczenia dynamiczne mające na celu podwyższenie temperatury ciała) nie prowadzi do istotnych zmian w skoku w dal z miejsca względem próby wykonanej przed rozciąganiem (ale po rozgrzewce)⁴⁸. Przerywane rozciąganie statyczne (5x20s z 20s przerwy), po wstępnym rozgrzaniu (5min joggingu + 2 min spaceru) prowadzi do pogorszenia wyskoku SQJ o 10,4%, a CMJ o 5,5%. Przy jednoczesnej poprawie wyniku w teście *seat&reach* o 12%. Rozciąganie przerywane połączone z 3 minutami masażu może zapobiec spadkowi wyników w wyskoku wzwyż. Również przy doprowadzeniu do poprawy ROM. Autorzy sugerują, że taki protokół mógłby się sprawdzić jako rozgrzewka przed aktywnością wymagającą generowania dużej mocy mięśniowej przez sportowca⁴⁵.

Intensywność rozciągania ma znaczący wpływ na jego bezpośredni wpływ na zdolność generowania mocy i siły mięśniowej. T. B. Palmer i wsp. wykorzystując krótki stretching mięśni kulszowo- goleniowych (2x15s) do pierwszych odczuć dyskomfortu, wykazali możliwość zmniejszenia sztywności mięśniowej bez negatywnego wpływu na zdolności generowania maksymalnej mocy mięśniowej i siły eksplozywnej⁴³. Wydłużenie czasu trwania rozciągania statycznego o średniej intensywności (2x60s) również nie wpłynie na generowaną siłę w żadnym z badanych kątów¹¹.

Jednakże wysoka intensywność rozciągania może prowadzić do całkowicie odwrotnych efektów. K. Takeuchi i wsp. wykorzystując rozciąganie statyczne z intensywnością 120POD i MaxPOD przez 20 sekund udowodnili spadek sztywności pasywnej grupy poddanej rozciąganiu, przy jednoczesnym wzroście ROM. Jednakże wiązało się to ze spadkiem mocy mięśniowej możliwej do wygenerowania izokinetycznie⁴⁹. Jednym z parametrów wykorzystywanych do pomiaru mocy i siły mięśniowej jest maksymalny moment siły, który bezpośrednio przekłada się na zdolność generowania siły przez osobę badaną. Aktywny stretching o wysokiej intensywności (NRS 6-7) powoduje zauważalny spadek momentu siły generowanego pod koniec ruchu¹⁸. Porównując stretching statyczny z intensywnością MaxPOD o różnym czasie trwania (10s, 15s i 20s) zauważalny jest znaczący wpływ zmiennej czasu. Maksymalny moment siły znacząco spada po stretchingu o czasie 10 sekund, natomiast stosując co najmniej 15 sekundowy bodziec nie są zauważalne zmiany w badanej zmiennej²¹. L. A. Ebadi i wsp. potwierdza powyższe wyniki i sugeruje, że rozciąganie statyczne wysokiej intensywności o czasie trwania powyżej 15s nie powinno być wykorzystywane przez sportowców bezpośrednio przed zadaniami siłowymi⁵⁰.

Długoterminowe rozciąganie statyczne nie wpływa na zdolność generowania mocy i siły koncentrycznej mięśni. Zarówno w teście bezpośrednim, badając izokinetycznie wyodrębnioną pracę grupy mięśniowej poddanej wcześniejszemu rozciąganiu^{51,53}. Jak również pośrednio, na podstawie sprintów na dystansie 5 i 10m³⁷. Wysoka intensywność stretchingu statycznego również nie wpływa na zdolność generowania maksymalnej siły koncentrycznej. Badanej na przykładzie zginaczy podeszwowych stawu skokowego²⁶.

Z kolei według niektórych autorów długotrwałe stosowanie jednostronnego rozciągania statycznego połączone jednocześnie z treningami plyometrycznymi (trening siatkarski) może wpływać pozytywnie na poprawę wyników w CMJ zarówno w nodze rozciąganej jak i będącej grupą kontrolną. Autorzy sugerują również, że adaptacje dotyczące zdolności generowania mocy mogą zachodzić w organizmie kontrlateralnie³⁶. Na tej podstawie można wysunąć tezę, że o ile długoterminowy stretching statyczny nie wpływa na zdolność generowania mocy i siły mięśniowej, to może poprawiać regenerację i stwarzać odpowiednie środowisko dla efektywnego stosowania innych metod.

Wyniki powyższych badań świadczyć mogą o negatywnym bezpośrednim wpływie rozciągania statycznego o wysokiej i średniej intensywności na zdolność generowania mocy i siły mięśniowej, oraz o braku wpływu tej metody w dłuższym wymiarze czasowym.

7. Wnioski

Na podstawie powyższego przeglądu aktualnej literatury na temat zastosowania technik rolowania i rozciągania statycznego można wysunąć szereg przydatnych w klinicyście wniosków.

Chcąc adekwatnie dopasować aplikowany bodziec do pożądanego do osiągnięcia celu należy wziąć pod uwagę, że na poprawę zakresu ruchu w stawach ma wpływ przede wszystkim tolerancja na rozciąganie, a nie sztywność mięśni czy ścięgien. Istotnym jest również fakt, że w celu zmniejszenia sztywności mięśnia, intensywność rozciągania jest bardziej istotna niż czas jego trwania. Długotrwałe stosowanie rozciągania statycznego prowadzi do zmniejszenia sztywności kompleksu mięśniowo- ścięgienistego. Jednakże nie wpływa ono na osiągane wyniki sportowe. Jedynie bezpośrednio po zakończeniu rozciągania statycznego wysokiej intensywności zauważyć można spadek mocy i siły mięśniowej. Ważnym wnioskiem jest to, że długoterminowe rozciąganie statyczne u sportowców pozwala na zapobieganie ograniczeniom

elastyczności mięśni wynikających z innej aktywności, a adaptacje zachodzące podczas stretchingu są kontrlateralne.

Stosowanie rolowania jako bodźca długoterminowego umożliwia zmniejszenie sztywności pasywnej mięśni oraz zwiększenie zakresu ruchu w stawach przy zachowaniu siły i zdolności aktywacji mięśni. Metoda ta zmniejsza opóźnioną bolesność mięśniową występującą po aktywności fizycznej oraz uczucie zmęczenia mięśni. Ogranicza również spadek wyników zdolności motorycznych po intensywnej aktywności.

Powyższe wnioski świadczą o wysokiej przydatności stretchingu statycznego i rozluźnienia mięśniowo- powięziowego za pomocą rolowania w treningu sportowym. Szereg korzyści idących za powyższymi metodami umożliwia ich wszechstronne wykorzystanie zarówno w fizjoterapii, powrocie do zdrowia, amatorskiej aktywności fizycznej jak i sporcie profesjonalnym.

Referencje

1. Junker, Daniel H., et al. „The foam roll as a tool to improve hamstring flexibility” *Journal of Strength and Conditioning Research* 29.12 (2015): 3480–3485.
2. Halperin, I., et al. „Roller massager improves range of motion of plantar flexor muscles without subsequent decreases in force parameters” *Int. J. Sports Phys. Ther.* 9 (2014): 92–102.
3. Baumgart, Christian, et al. „Foam Rolling of the Calf and Anterior Thigh: Biomechanical Loads and Acute Effects on Vertical Jump Height and Muscle Stiffness” *Sports* 27.3 (2019)
4. Penichet-Tomas, Alfonso, et al. „Acute Comparative Effect of Foam Rolling and Static Stretching on Range of Motion in Rowers” *Sustainability* 13.3631 (2021)
5. Anderson, B., et al. „Scientific, medical, and practical aspects of stretching” *Clin. Sports Med.* 10 (1991): 63–86
6. Barnes, M.F. „The basic science of myofascial release: Morphologic change in connective tissue” *J. Bodyw. Mov. Ther.* 1 (1997): 231–238.
7. Sullivan, K.M.; et al. „Roller-massager application to the hamstrings increases sit-and-reach range of motion within five to ten seconds without performance impairments” *Int. J. Sports Phys. Ther.* 8 (2013), 228–236.

8. Nakamura, Masatoshi, et al. „The Acute and Prolonged Effects of Different Durations of Foam Rolling on Range of Motion, Muscle Stiffness, and Muscle Strength” *Journal of Sports Science and Medicine* 20 (2021), 62-68.
9. Beardsley, C., et al. „Effects of self-myofascial release: A systematic review.” *J. Bodyw. Mov. Ther.* 19 (2015), 747–758.
10. Krause, Frieder , et al. „Acute effects of foam rolling on passive stiffness, stretch sensation and fascial sliding: A randomized controlled trial” *Human Movement Science* 18.144 (2017)
11. Pickering Rodriguez, E.C., et al. „The relationship between lower body stiffness and injury incidence in female netballers.” *Sports Biomechanics* 16 (2017), 361-373.
12. Hirata, K., et al. „Associations between Range of Motion and Tissue Stiffness in Young and Older People.” *Med. Sci. Sports Exerc.*, 52.10 (2020): 2179–2188.
13. Caliskan, Emine, et al. „Effects of static stretching duration on muscle stiffness and blood flow in the rectus femoris in adolescents” *Med Ultrason* 21.2 (2019): 136-143.
14. Chang, Tian-Tian , et al. „Effects of Self-Myofascial Release Using a Foam Roller on the Stiffness of the Gastrocnemius-Achilles Tendon Complex and Ankle Dorsiflexion Range of Motion” *Frontiers in physiology* 12.9 (2021): art.:718827.
15. Junker, Daniel, et al. „The Training Effects of Foam Rolling on Core Strength Endurance, Balance, Muscle Performance and Range of Motion: A Randomized Controlled Trial” *Journal of Sports Science and Medicine* 18 (2019): 229-238.
16. Nakamura, M., et al. „Static stretching duration needed to decrease passive stiffness of hamstring muscle-tendon unit.” *The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine* 8 (2019): 113-116.
17. Takeuchi, Kosuke, et al. „The acute effects of high-intensity jack-knife stretching on the flexibility of the hamstrings” *Scientific Reports* 11 (2021):12115

18. Takeuchi, K., et al. „Time course of changes in the range of motion and muscle-tendon unit stiffness of the hamstrings after two different intensities of static stretching.” *PLoS ONE* 16.9 (2021): e0257367
19. Takeuchi, Kosuke, et al. „High-Intensity Static Stretching in Quadriceps Is Affected More by Its Intensity Than Its Duration” *frontiers in physiology* 7.12 (2021): art. 709655
20. Takeuchi, Kosuke, et al. „The optimal duration of high-intensity static stretching in hamstrings” *PLoS ONE* 15.10. (2020): e0240181.
21. Fukaya, Taizan, et al. „Effects of Static Stretching With High-Intensity and Short-Duration or Low-Intensity and Long-Duration on Range of Motion and Muscle Stiffness” *Frontiers in Physiology* 11.11 (2020): art. 601912
22. Nakao, Gakuto, et al. „Acute Effect of Active and Passive Static Stretching on Elastic Modulus of the Hamstrings” *Sports Medicine International Open* 2 (2018): E163–E170
23. Longo, Stefano, et al. „The effects of 12 weeks of static stretch training on the functional, mechanical, and architectural characteristics of the triceps surae muscle–tendon complex” *European Journal of Applied Physiology* 121 (2021):1743–1758
24. Morales-Artacho, A.J, et al. „Effects of warm-up on hamstring muscles stiffness: Cycling vs foam rolling.” *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports* 27 (2017), 1959-1969.
25. Zhang, Qingshan, et al. „The Immediate Effects of Self-Myofacial Release on Flexibility, Jump Performance and Dynamic Balance Ability” *Journal of Human Kinetics* vol. 75 (2020): 139-148
26. Yoshimura, A., et al. „Effects of Self-myofascial Release Using a Foam Roller on Range of Motion and Morphological Changes in Muscle: A Crossover Study.” *The Journal of Strength and Conditioning Research*. (2019)
27. Yoshimura, A., et al. „Effects of Self-Massage Using a Foam Roller on Ankle Range of Motion and Gastrocnemius Fascicle Length and Muscle Hardness: A Pilot Study.” *Journal of Sport Rehabilitation* 28.8, (2020): 1171-1178.

28. Smith, Jason C., et al. „Acute effect of foam rolling and dynamic stretching on flexibility and jump height.” *Journal of Strength and Conditioning Research*; 32.8 (2018)
29. MacDonald, G., et al. „An acute bout of selfmyofascial release increases range of motion without a subsequent decrease in muscle activation or force.” *Journal of Strength and Conditioning Research* 27 (2013): 812– 821
30. Keisuke, I. et al. „Myofascial Release of the Hamstrings Improves Physical Performance—A Study of Young Adults” *Healthcare* 9 (2021): 674
31. Godwin, Mark, et al. „An Acute Bout of Self-Myofascial Release Does Not Affect Drop Jump Performance despite an Increase in Ankle Range of Motion” *Sports* 8.37 (2020)
32. Laffaye, G., et al. „Self-Myofascial Release Effect With Foam Rolling on Recovery After High-Intensity Interval Training” *frontiers in physiology*, 10 (2019): 1287.
33. Junker, Daniel H., et al. „The foam rolling as a tool to improve hamstring flexibility” *Journal of Strength and Conditioning Research* 29.12 (2015)
34. Hodgson, Daniel D., et al. „Four weeks of Toller massage training did not impact range of motion, pain pressure threshold, voluntary contractile properties Or jump performance” *The International Journal of Sports Physical Therapy* 13.5 (2018): 835
35. Donti, O., et al. „Acute Effects of Intermittent and Continuous Static Stretching on Hip Flexion Angle in Athletes with Varying Flexibility Training Background” *Sports* 8.28 (2020)
36. Raj, T., et al. „Association between hamstring flexibility and sprint speed after 8 weeks of yoga in male rugby players.” *Int J Yoga* 14 (2021):71-4
37. Hughes, G.A., et al. „Duration of myofascial rolling for optimal recovery, range of motion, and performance: a systematic review of the literature.” *International Journal of Sports Physical Therapy* 14 (2019): 845-859.

38. Miller, J. K., et al. „Foam rollers show no increase in the flexibility of the hamstring muscle group.” *Journal of Undergraduate Research* 9 (2006): 1-4
39. Takeuchi, K., et al. „Comparison of the effects of static stretching on range of motion and jump height between quadriceps, hamstrings and triceps surae in collegiate basketball players.” *BMJ Open Sport & Exercise Medicine* 5 (2019):e000631.
40. Kay, A.D., et al. „Effects of Contract-Relax, Static Stretching, and Isometric Contractions on Muscle-Tendon Mechanics.” *Medicine and Science in Sports and Exercise* 47 (2015), 2181-2190.
41. Škarabot, Jakob, et al. „Comparing the effects of self-myofascial release with static stretching on ankle range-of-motion i adolescent athletes” *The International Journal of Sports Physical Therapy* 10.2 (2015): 203
42. Bogdanis, Panidi I., et al. „Muscle Architectural and Functional Adaptations Following 12-Weeks of Stretching in Adolescent Female Athletes.” *Front. Physiol.* 12 (2021):701338
43. Palmer, Ty B., et al. „Passive Stiffness and Maximal and Explosive Strength Responses After an Acute Bout of Constant-Tension Stretching” *Journal of Athletic Training* 54.5 (2019):519–526
44. Macgregor, Lewis J. et al. „The Effect of Foam Rolling for Three Consecutive Days on Muscular Efficiency and Range of Motion” *Sports Medicine - Open* 4 (2018):26
45. Jo, Edward, et al. „The Acute Effects of Foam Rolling on Fatigue-Related Impairments of Muscular Performance” *Sports* 6 (2018): 112
46. Drinkwater, Eric J., et al. „Foam Rolling as a Recovery Tool Following Eccentric Exercise: Potential Mechanisms Underpinning Changes in Jump Performance” *Frontiers in physiology*, 6.10 (2019): art. 768
47. Merino-Marban, R., et al. „Acute effect of a static- and dynamic-based stretching warm-up on standing long jump performance in primary schoolchildren.” *Biol Sport.* 38.3 (2021):333–339

48. Yildiz, Suat, et al. „Acute effects of static stretching and massage on flexibility and jumping performance” *J Musculoskelet Neuronal Interact* 20.4 (2020):498-504
49. Takeuchi, Kosuke, et al. „Influence of High Intensity 20-Second Static Stretching on the Flexibility and Strength of Hamstrings” *Journal of Sports Science and Medicine* 19 (2020): 429-435
50. Ebadi, Leyla A., et al. „Duration Dependent Effect of Static Stretching on Quadriceps and Hamstring Muscle Force” *Sports* 24.6 (2018)
51. Longo, S., et al. „The effects of 12 weeks of static stretch training on the functional, mechanical, and architectural characteristics of the triceps surae muscle–tendon complex.” *Eur. J. Appl. Physiol.* 121 (2021): 1743–1758
52. Nakamura, M. et al. „Effects of Adding Inter-Set Static Stretching to Flywheel Resistance Training on Flexibility, Muscular Strength, and Regional Hypertrophy in Young Men.” *Int. J. Environ. Res. Public Health* 18 (2021): 377
53. Madoni, Samantha N., et al. „Effects of foam rolling on range of motion, peak torque, muscle activation, and the hamstrings-to-quadriceps strength ratios.” *Journal of Strength and Conditioning Research* 32.7 (2018)

TERAPIE Z ZASTOSOWANIEM MIKROBIOTY W CHOROBAH METABOLICZNYCH I PRZEWODU POKARMOWEGO

Karolina Gancarczyk, Julia Kaczmarczyk,
Joanna Owsiak, Krzysztof Gładkowski

Studenckie Koło Naukowe im. Zbigniewa Religii, Katedra i Zakład Biofizyki,
Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Abstrakt

Wykazano związki między mikroflorą jelit, a występowaniem chorób zapalnych jelit, czy nawet nowotworów przewodu pokarmowego. Modulacja mikrobioty bywa stosowana jako uzupełnienie terapii chorób metabolicznych i układu pokarmowego. *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* oraz *Bacteroides fragilis* potrafią chronić komórki przed nowotworzeniem poprzez produkowanie kwasu mlekowego nasilającego odnawianie się nabłonka. Bakterie zasiedlające układ pokarmowy, wykazują zdolność do produkowania krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych o właściwościach przeciwnowotworowych. Transplantacja mikrobioty dotychczas wykazywała wysoką skuteczność (nawet 90% wyleczeń) w przypadku leczenia zakażenia wywołanymi opornymi na działanie antybiotyków *Clostridium difficile*. Okazuje się, że odpowiednia modulacja mikrobioty jelitowej poprawia wrażliwość na insulinę, a także znacznie zmniejsza objawy w zespole jelita drażliwego. W rozdziale przedstawiono znacznie więcej efektów terapii skupiających się wokół naturalnie występujących bakterii w organizmie człowieka.

Słowa kluczowe: mikrobiota, bakterie, układ pokarmowy, transplantacja, probiotyki, prebiotyki

Abstract

Relations between the intestinal microflora, occurrence of inflammatory bowel diseases and digestive tract cancers were discovered. Sometimes, the microbiota modulations are used as complementary therapies of metabolic and digestive system diseases. *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Bacteroides fragilis* have the ability to protect host's cells against tumorigenesis through the production of lactic acid which can intensify the renewal of the epithelium. Bacteria inhabiting the digestive system show the ability to produce short-chain fatty acids with anti-cancer properties. Microbiota transplantation has been highly effective (up to 90% of cured cases) so far in the treatment of antibiotic-resistant *Clostridium difficile* infections. It turns out that the appropriate modulation of the gut microbiota improves insulin sensitivity and scientifically reduces the symptoms of irritable bowel syndrome. This chapter presents many more effects of therapies focused on naturally occurring bacteria in the human body.

Keywords: microbiota, bacteria, digestive system, transplantation, probiotics, prebiotics

1. Wstęp

Choroby układu pokarmowego oraz choroby metaboliczne z powodu skali występowania i złożoności ich patogenezy, stanowią duże wyzwanie dla współczesnej medycyny. Wraz ze wzrostem urbanizacji, obserwuje się systematyczny wzrost udziału chorób metabolicznych i chorób układu pokarmowego, których przyczyny nie są do końca poznane, można jednak z całym przekonaniem stwierdzić, że dieta oraz tryb życia mają znaczny wpływ na procesy ich powstawania¹. Wszystkie te czynniki w sposób znaczny prowadzą również do zaburzeń mikroflory jelitowej, czego konsekwencją są zaburzenia nawet całego organizmu^{2,3}.

Wspomniana mikroflora jelitowa składa się z ogromnej liczby bakterii żyjących w symbiozie ze swoim gospodarzem. Bakterie składające się na mikroflorę bytującą w ludzkim jelicie można by podzielić na bakterie tlenowe i beztlenowe, z czego bakterie beztlenowe stanowią zdecydowaną większość wszystkich bakterii. Rolą mikroflory jelitowej jest ochrona przed rozwojem chorobotwórczych patogenów w organizmie oraz udział w procesach trawienia pokarmu^{2,4}.

2. Mikroflora jelitowa i jej znaczenie

Ludzki przewód pokarmowy składa się z tysięcy szczepów bakteryjnych stanowiące tzw. "narząd bakteryjny", ponieważ ich masa dochodzi nawet do 1,5kg⁵. Ich liczba przekracza liczbę komórek somatycznych budujących organizm człowieka nawet dziesięciokrotnie, a 1g kału to aż 10^{12} komórek bakteryjnych⁶. Wśród nich większość stanowią: *Firmicutes* (których jest najwięcej), *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* oraz znacznie mniej liczne takie jak *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* występujące w różnych odcinkach układu pokarmowego w zależności od pH. Jednak najbardziej zasiedlone przez bakterie jest jelito grube^{5,6}. Narząd bakteryjny różni się u poszczególnych osób składem i liczebnością, a wpływ na to ma przede wszystkim dieta, ale także wiek czy unikalne cechy każdego człowieka zapisane w jego materiale genetycznym⁷. Wiadomo także, że jakość narządu bakteryjnego jest uzależniona od sposobu narodzin. W przypadku kiedy dziecko przychodzi na świat drogą naturalną bakterie z rodzaju *Lactobacillus* oraz *Bifidobacterium* pochodzące z dróg rodnych matki kolonizują układ pokarmowy od razu po urodzeniu. Cesarskie cięcie spowalnia ten proces prowadząc do kolonizacji przewodu pokarmowego dziecka przez te bakterie o około 1 miesiąc później. Trzeba

pamiętać, że pożyteczne bakterie o których mowa w rozdziale pełnią funkcje odpornościowe dla organizmu, w którym się znajdują. Zatem dobrze rozwinięta mikroflora bakteryjna stanowi o silnym układzie immunologicznym^{5,8}.

Główną rolą układu pokarmowego jest pobieranie i trawienie pokarmu, a następnie wchłanianie otrzymanych substancji odżywczych z pożywienia. Organizm człowieka jednak nie jest przystosowany do trawienia wszystkich spożywanych składników pokarmowych. Na szczęście, mikrobiota zasiedlająca ludzki układ pokarmowy jest zasobna w enzymy, umożliwiające niejako zastąpienie ludzkich enzymów własnymi. Niestrawiony błonnik pokarmowy z powodu braku odpowiednich ludzkich enzymów jest substratem dla przeprowadzanych przez bakterie procesów fermentacji⁹, dostarczając w ten sposób człowiekowi dodatkowe około 10% energii pochodzącej z pożywienia¹⁰.

Dzięki bakteriom jelitowym możliwy też staje się beztlenowy rozkład białek, biotransformacja sprzężonych kwasów żółciowych, degradacja wszelkich kompleksów na bazie szczawianu oraz synteza niektórych witamin, takich jak witamina B12 i witamina K⁹.

Produktami czynności bakteryjnych są korzystne dla zdrowia krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFA, ang. *short-chain fatty acids*), kwas mlekowy i rozgałęzione kwasy tłuszczowe (z tych ostatnich organizm pozyskuje energię). Końcowe produkty przeprowadzanej fermentacji przez bakterie korzystnie wpływają pod wieloma względami na organizm gospodarza. Istotnie regulują metabolizm glukozy i lipidów co jest szczególnie ważne w przypadku patogenezы chorób metabolicznych takich jak otyłość czy insulinooporność,

Obniżając pH jelita grubego uniemożliwiają rozwój chorobotwórczym patogenom¹¹. Stanowią źródło energii dla komórek nabłonkowych jelita, stymulują ich proliferację, usprawniają perystaltykę jelit oraz procesy wchłaniania (regulując również gospodarkę mineralną poprzez zwiększanie efektywności wchłaniania wapnia, magnezu i żelaza)^{10,12}.

Udział poszczególnych SCFA występuje w stosunku octan, propionian, maślan 60:25:15, a jednak to kwas masłowy stanowi podstawowe źródło energii dla kolonocytów. Jest on związkiem najkorzystniej wpływającym na procesy gojenia i regeneracji, stanowi nawet ochronę przed nowotworami¹³.

Nie można zapomnieć o istotnej roli narządu bakteryjnego w syntezie endogennych witamin. Bakterie przeprowadzają syntezę witaminy K, witamin z grupy B (B₁, B₂, B₆, ale przede wszystkim B₁₂) oraz kwasu foliowego, które są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu^{11-12,14}.

Adsorbcja lipidów i homeostaza cholesterolu jest możliwa dzięki zdolności bakterii do recyrkulacji kwasów żółciowych^{10,15}. Niezbędny jest ich

udział w syntezie aminokwasów takich jak treonina czy lizyna. Mikrobiota pełni funkcję antykancerogenną również poprzez przekształcanie szkodliwych związków (np. heterocykliczne aminy i N-nitrozo związki powstałe po spożyciu czerwonego mięsa) w mniej szkodliwe produkty^{5,10}.

2.1. Zaburzenia składu mikroflory bakteryjnej

Czynniki prowadzące do powstania zaburzeń narządu bakteryjnego wiążą się zazwyczaj z mniejszymi lub większymi konsekwencjami zdrowotnymi. Wspomniana wcześniej dieta jest niewątpliwie przodującym czynnikiem wpływającym na skład mikrobioty układu pokarmowego. Okazuje się, że dieta ubogoresztkowa (niska podaż błonnika) oraz bogata w białko i tłuszcze zwierzęce znacznie zaburza skład oraz aktywność bakterii^{2,11,16}.

Z powodu niewybórczego działania antybiotyków, leki te także naruszają mikroflorę jelitową, prowadząc do zaburzeń. Wśród innych podobnych, negatywnych czynników wymienić należy leki niesteroidowe, terapie lecznicze typu radioterapie.

Obserwuje się negatywny wpływ stresu na powstanie dysbiozy w obrębie układu pokarmowego. Możliwy jest też związek między obniżoną aktywnością fizyczną a zaburzeniami mikrobioty^{2,17-18}.

Inne choroby oraz starzenie się to następne okoliczności występujące równolegle z obniżonym składem i aktywnością jelitowych bakterii. Wszelkie zaburzenia w obrębie układu pokarmowego mogą wręcz stanowić przyczynę zmian mikrobioty np. zapalenie zbiornika kałowego, kiedy ilości *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* są obniżone, natomiast gatunek bakterii *Clostridium* podwyższone¹¹.

Zauważono zależność między obniżoną liczbą bakterii składających się na mikrobiotę, a zaburzonym trawieniem. Kosmki jelita cienkiego u myszy pozbawionej mikroflory są wydłużone a ilość enterocytów krypt jelitowych obniżona, w porównaniu ze zwierzęciem tego samego gatunku i w tym samym wieku z normalnie rozwiniętą mikroflorą bakteryjną⁸. Nie bez znaczenia pozostaje zatem działanie zaburzonej mikrobioty na chociażby zdolności trawienne jelita.

2.2. Badania stanu narządu bakteryjnego

W celu ustalenia procentowej zawartości poszczególnych szczepów mikroorganizmów narządu bakteryjnego przeprowadza się badania, do których

wykorzystuje się próbki kału pobrane od pacjentów. Izolowane bakterie z badanego materiału w sposób tradycyjny hoduje się w warunkach laboratoryjnych, jednak z bardzo słabym skutkiem. Niewielka liczba bakterii występujących w ludzkim przewodzie pokarmowym ma na tyle szeroki zakres tolerancji warunków, aby wytrzymać laboratoryjne warunki hodowli. Takie bakterie są następnie poddawane obserwacjom pod mikroskopem^{11,19}. W typowaniu i ustalaniu dokładnej charakterystyki mikrobioty stosuje się techniki biologii molekularnej opierające się na analizie sekwencji rRNA czy tzw. metodzie genetycznych odcisków palców (ang. *DNA Fingerprinting*). Wiele informacji o danej bakterii można również uzyskać na podstawie genu *recA* powszechnie występującego u bakterii²⁰.

2.3. Choroby metaboliczne i zaburzenia układu pokarmowego

Otyłość, insulinooporność, cukrzyca, to tylko kilka przykładów szeroko występujących na całym świecie chorób metabolicznych. Niestety, w Polsce można mówić już o ponad 10 milionach osób z podejrzeniem zespołu metabolicznego, na który składa się m.in otyłość brzuszna i nadciśnienie tętnicze. Wiąże się to z coraz większym prawdopodobieństwem zachorowania na jedną z chorób stanowiących bezpośrednie niebezpieczeństwo dla zdrowia np. miażdżycę. Należy wspomnieć, że choroba jaką jest otyłość wiąże się z kilkukrotnie wyższym ryzykiem wystąpienia chorób dróg żółciowych oraz trzustki, zaburzeń czynnościowych jelit a nawet nowotworów jelita grubego. Śmiało zatem można stwierdzić, że profilaktyka otyłości może być równoznaczna z profilaktyką tak poważnych chorób jak rak jelita grubego².

2.3.1. Oddziaływanie mikroflory jelitowej na choroby metaboliczne

Spośród najbardziej popularnych chorób metabolicznych na szczególną uwagę zasługują: hiperlipidemia, cukrzyca, insulinooporność oraz otyłość (jako częsta pośrednia przyczyna tych schorzeń) wykazujące związek przyczynowo-skutkowy z jelitową mikrobiotą. Otyłość i choroby metaboliczne są ściśle związane z występującym w organizmie uogólnionym stanem zapalnym. Przewlekły stan zapalny w tkance tłuszczowej prowadzi do obniżonego wydzielania adiponektyny działającej przeciwnowotworowo oraz podwyższonego wydzielania hormonów stymulujących powstawanie nowotworów: leptyny i resistyny²¹⁻²². Widoczna jest zatem ścisła zależność między poszczególnymi schorzeniami.

Przeprowadzone badania na myszach germ-free (GF, ang. *germ-free*), czyli takich, które zostały uprzednio pozbawione mikroflory, umożliwiają postawienie twierdzenia, że bakterie mikrobiotyczne mają szczególnie duży udział w dostarczaniu energii gospodarzowi. Myszy GF wykazywały się niższą masą ciała oraz większą wrażliwością na insulinę niż ich otyłe odpowiedniki z obecnymi bakteriami w jelicie²³. Z tego powodu można by wysnuć wniosek, że mikrobiota promuje powstawanie otyłości, ale czy aby na pewno powinniśmy przypisać jej niekorzystną rolę w patogenezie tej choroby? Niezupełnie. Kolejne badania przeprowadzane również z wykorzystaniem myszy GF pozwoliły na zaobserwowanie ciekawego zjawiska, kiedy myszy GF po wykonanej transplantacji mikrobioty pochodzącej od myszy otyłych zaczęły szybko przybierać na wadze. Inaczej stało się jednak po przeszczepieniu mikrobioty pochodzącej od myszy szczupłych. Wskazuje to na występowanie pewnych różnic w narządzie bakteryjnym u myszy otyłych i chudych²⁴. Postawiona hipoteza została potwierdzona w przeprowadzanych badaniach z udziałem ludzi – u osób otyłych obserwuje się dysbiozę charakteryzującą się m.in. obniżoną ilością *Bacteroidetes* i wzrostem *Firmicutes*²⁵.

W przypadku otyłości, miejsce ma też podwyższona liczba bakterii *Mollicutes*, słynące z wysoce efektywnego pozyskiwania energii z pokarmu, co w konsekwencji będzie wtórnie przyczyniać się do utrzymującej się otyłości. Następnie bakterie te mogą przenikać do innych tkanek wywołując przewlekły stan zapalny²⁴.

Z powodu panującej dysbiozy dochodzi do zmniejszonej syntezy strukturalnych białek czego konsekwencją jest zmniejszenie integralności ścian jelita i przechodzenie z jego światła związków, takich jak bakteryjny LPS (lipopolisacharyd) czy SCFA rozprzestrzeniające się do innych tkanek. Uaktywniona lipaza lipoproteinowa będzie stymulowała magazynowanie tłuszczu w postaci tkanki tłuszczowej, a lipoliza tłuszczu i oksydacja kwasów tłuszczowych będą zahamowane przez supresję odpowiednich

kinaz². Wzrost LPS poprzez podwyższenie stężenia glukozy i triglicerydów stymuluje insulinoporność. U pacjentów z cukrzycą typu 2 zaobserwowano wyższe stężenie LPS w organizmie niż u osób bez chorób metabolicznych²⁶.

2.3.2. Oddziaływanie mikroflory jelitowej na choroby układu pokarmowego

Na podstawie wcześniejszych zagadnień, poprawnym będzie wysunięcie wniosku jakoby poruszane kwestie zazębiają się i jedna wynika z drugiej.

Nie inaczej będzie też w tym wypadku – choroby układu pokarmowego są w mniej i bardziej pośredni sposób powiązane z omawianymi zaburzeniami metabolicznymi i samą mikrobiotą.

Jak już zostało wspomniane, bakterie przewodu pokarmowego mogą pełnić zarówno pozytywną jak i negatywną rolę w patogenezie chorób. Udo- wodniono jednak, że w warunkach równowagi nie dochodzi do ujawniania się negatywnego oddziaływania bakterii na organizm. W przypadku dysbiozy, kiedy dochodzi do zmian ilościowych i jakościowych mikrobiomu, mogą wystąpić różne rodzaje zaburzeń²⁷. Do częstych infekcji (zwłaszcza szpitalnych) należy nadmierne namnożenie się *Clostridium Difficile*, jako konsekwencja przyjmowanych antybiotyków i obniżenia odporności. W trakcie antybiotykoterapii dochodzi do spadku liczby bakterii pozytywnie wpływających na układ pokarmowy, takich jak *Bifidobacterium* i *Lactobacillus spp.*, dając tym samym pole do popisu *Clostridium sp.* będące jedną z przyczyn rzekomobło- niastego zapalenia jelit²⁸. Również bakterie z gatunków *Enterococcus*, *Strepto- coccus*, *Bacteroides* i *Escherichia coli spp.*, które naturalnie występują w jelicie grubym, w przypadku dominacji będą stanowić źródło zapalenia²⁹.

Podejrzewa się, że występujące zjawisko obniżonej tolerancji organizmu w stosunku do zasiedlającej układ pokarmowy mikrobioty może być przyczy- ną nieswoistego zapalenia jelit (IBD, ang. *Inflammatory Bowel Disease*), na który składa się m.in. choroba Leśniowskiego-Crohna oraz wrzodziejące za- palenie jelita grubego. W przypadku tej choroby większa niż zazwyczaj ilość bakterii adheruje do nabłonka jelit (większość stanowią bakterie z rodzaju *Bacteroides sp.*), co będzie w sposób nadmierny pobudzało układ odpornościo- wy, wywołując przy tym reakcje alergiczne i zapalenia^{8,11}.

W chorobie Leśniowskiego-Crohna zaobserwowano znaczne obniżenie różnorodności bakterii typu *Firmicutes* – u osób zdrowych, w układzie po- karmowym znajdują się 43 gatunki tej bakterii, natomiast u chorych tylko 13. Nie wiadomo jednak czy stanowi to przyczynę, czy jest raczej skutkiem tej choroby. Znaczna dysbioza charakteryzuje również wrzodziejące zapalenie jelita grubego, kiedy mamy do czynienia z obniżoną liczbą *Bifidobacterium sp.* i liczną grupą bakterii *Enterobacteriaceae*¹¹.

Produkty fermentacji narządu bakteryjnego to nie tylko SCFA i rozgałę- zione kwasy tłuszczowe (BCFA, ang. *branched-chain fatty acids*), ale również produkty o działaniu toksycznym (wodór, dwutlenek węgla, metan, siarkowo- dór, związki fenolowe i indolowe, kwasy żółciowe) sprzyjające powstawaniu chorób z przebiegającymi reakcjami zapalnymi¹¹. Osoby z IBD okazywały się mieć większą zawartość SCFA i BCFA w kale, a także amoniaku i związków

fenolowych w porównaniu do osób zdrowych³⁰. Wydaje się zatem, że bakterie obok pozytywnych funkcji, pełnią również negatywną rolę, poprzez aktywację prokarcynogenów pochodzących z pożywienia i żółci (kwasy żółciowe) oraz ich syntezę³¹.

Samo nieleczone IBD może przyczyniać się do powstawania nowotworów w obrębie przewodu układu pokarmowego – głównie raka jelita grubego, stanowiący jeden z najczęściej występujących nowotworów w Polsce i na świecie³². Wiadomo, że towarzyszy mu znaczna dysbioza mikrobioty jelitowej³³, a czynnikiem dodatkowo stymulującym powstawanie tego rodzaju nowotworu jest współwystępowanie cukrzycy typu 2, gdyż to właśnie u cukrzyków częściej dochodzi do wykrycia zmian w obrębie jelita grubego².

Również porównanie kału osób z zespołem jelita drażliwego (IBS, ang. *Irritable Bowel Syndrome*) do kału pochodzącego od osób zdrowych przyniosło interesujące rezultaty - w kale osób z IBS wykryto większe ilości SCFA i amoniaku, co sugeruje związek i w tym przypadku dysbiozy z kolejną chorobą, jaką jest IBS. Jako choroba dotykająca około 11.2% dorosłych na całym świecie, stanowi kolejne, duże wyzwanie wobec współczesnej medycyny^{34,35}.

3. Terapie modulujące mikrobiotę

Modulacja mikroflory jelitowej w chorobach metabolicznych i układu pokarmowego polegają na stosowaniu antybiotyków, prebiotyków, probiotyków oraz przeprowadzaniu transplantacji mikrobioty. Wszelkie terapie w obrębie narządu bakteryjnego wykazują się różną skutecznością. I chociaż leczenie antybiotykami daje satysfakcjonujące efekty, przewlekłe stosowanie może przyczynić się do powstawania mikroorganizmów opornych na ich działanie. Stosowane probiotyki i prebiotyki, ze względu na zbyt małą liczbę krótkotrwale przeprowadzanych badań nie dają zadowalających efektów terapeutycznych w zakresie poruszanych w tym rozdziale chorób, jednak mechanizmy ich działania są na tyle ciekawe, że wciąż istnieje nadzieja na wdrażanie leczenia z ich pomocą. Bez wątpliwości, efekty jakie daje transplantacja mikroflory jelitowej pochodzącej z próbek kałowych, są jeszcze bardziej obiecujące^{2,36}.

3.1. Prebiotyki

Prebiotyki to leki niepodlegające trawieniu i zawierające związki oddziałujące na bakterie układu pokarmowego. Umożliwiają wprowadzenie zmian w składzie i aktywności mikrobioty, poprawiając tym samym na samopoczucie

i zdrowie gospodarza. Dla przykładu - fruktooligosacharydy i inulina nie są trawione przez człowieka, dlatego będą substratem dla przeprowadzanej przez bakterie fermentacji. Składniki te pobudzają bakterie jelitowe do wzrostu i aktywności. Wyroby prebiotyczne wykazują pozytywny wpływ na zatwardzenia oraz stan błony śluzowej jelita grubego, co sprawia, że mogą być wykorzystywane w profilaktyce oraz jako środki wspomagające leczenie.

Przeprowadzane badania na zwierzętach wskazują na pozytywne działania prebiotyków wobec leczenia zapaleń jelit i obniżania toksyczności przeprowadzanej fermentacji przez bakterie. Karmienie zwierząt laboratoryjnych inuliną i oligofruktozą skutkowało obniżeniem prozapalnych cyklin i zwiększeniem aktywności komórek NK, co jest wyrazem antynowotworowego działania tych prebiotyków. Mechanizm takiego zjawiska może być związany ze zwiększoną ilością powstających podczas fermentacji SCFA (kwas masłowy, propionowy i octowy) oraz kwasu mlekowego wpływające korzystnie na procesy regeneracyjne nabłonka jelita grubego. Jednocześnie może temu towarzyszyć niski poziom toksycznych i mutagennych związków, nie wpływając istotnie na kancerogenezę nabłonka jelita grubego³⁷.

Oprócz powyższych związków, prebiotyki mogą pobudzać wydzielanie białek podobnych do glukagonu (GLP), biorące udział w regulacji tłuszczowej i cukrowej, a nawet uwalniając komórki gospodarza na działanie insuliny, co zapobiega insulinooporności³⁸. GLP-2 pośrednio wpływa na szczelność ścian jelit, zmniejszając tym samym przechodzenie toksycznych związków z układu pokarmowego i ich rozprowadzaniu na cały organizm³⁹.

Badania przeprowadzane na ludziach nie dają niestety wystarczająco satysfakcjonujących rezultatów. Generalnie, prebiotyki mogą odgrywać korzystną rolę w profilaktyce cukrzycy i otyłości, jednak nie przeprowadzono na tyle dokładnych i długich badań aby jednoznacznie to potwierdzić. Nie mniej, już teraz mają duży potencjał stanowienia jako dodatkowa terapia w przeciwdziałaniu chorobom metabolicznym a nawet powstawaniu nowotworów.

3.2. Probiotyki

Składające się przede wszystkim z żywych bakterii kolejne leki – probiotyki, w szczególny sposób oddziałują na organizm poprzez modulację mikrobioty jelitowej. Znacznie szersze badania nad probiotykami wskazują na korzystny wpływ probiotyków wobec chorób metabolicznych i układu pokarmowego. Środki te, zawierają w większości bakterie z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, które poprzez wytwarzanie kwasu mlekowego obniżają

pH, tworząc w ten sposób niesprzyjające środowisko dla chorobotwórczych mikroorganizmów. Wykazano działanie utrudniające przyleganie patogenów takich jak *Salmonella*, *Shigella* czy *Vibrio cholerae* do komórek jelita. Probiotyki okazały się być pomocne też w infekcjach *Clostridium Difficile*.

Bakterie podawane w probiotykach korzystnie wpływają na szczelność bariery jelitowej, zapobiegając uogólnionej reakcji zapalnej organizmu spowodowanej przedostającymi się poza układ pokarmowy substancjami prozapalnymi, co jednocześnie obniża insulinooporność i usprawnia gospodarkę cukrowo-lipidową. Prowadzone badania na myszach i ludziach potwierdziły hipotezy o pozytywnym działaniu probiotyków w zespole metabolicznym i otyłości. Podawanie probiotyków skutkowało pozytywnym wpływem wobec zwalczania insulinooporności, obniżeniem masy ciała i zmniejszeniem ilości tkanki tłuszczowej. Być może jednoczesne podawanie probiotyków z prebiotykami jest wysoce skutecznym elementem leczenia chorób metabolicznych, jednak, zbyt mało badań zostało przeprowadzonych w tym kierunku aby jednoznacznie to potwierdzić^{37,2}.

Istnieje natomiast wiele badań potwierdzających istotne znaczenie probiotyków w profilaktyce nowotworowej. Liczne badania nad działaniem probiotyków i prebiotyków z udziałem ludzi skutkowały obniżeniem stopnia proliferacji komórek jelit, wzmocnieniem bariery jelitowej i obniżeniem wydzielanych związków prozapalnych. Beta-glukozydaza, kancerogeny enzym bakterii jelitowych, ulega spadkowi. Badanie kohortowe, w którym brało udział 45 241 osób dowiodło, że regularne picie jogurtu również obniża ryzyko wystąpienia raka jelita grubego, co też może sugerować profilaktyczny wpływ probiotyków. Podawanie tych preparatów w okresie pooperacyjnym usunięcia fragmentu jelita grubego z powodu nowotworu, poprawia stan jelit i zmniejsza częstość powikłań pooperacyjnych, a stosowane w trakcie chemioterapii redukowało biegunki i uczucie dyskomfortu w jamie brzusznej u osób z rakiem jelita grubego². W przypadku biegunek infekcyjnych czy tych spowodowanych przyjmowaniem antybiotyków obserwuje się zmniejszenie biegunek³⁷.

Również i w tym przypadku możemy dostrzec potencjał mikrobioty, a omówione środki stanowią uzupełnienie diety mogą, dzięki kolejnym badaniom i udoskonaleniom preparatów pre- i probiotycznych, należeć do grupy leków wspomagających leczenie.

3.3. Transplantacja mikroflory kałowej

Transplantacja mikroflory kałowej (FMT, ang. *Fecal Microbiota Transplantation*) jako najbardziej obiecująca z opisanych w tym rozdziale metod, polega na przekazaniu mikroflory jelitowej pochodzącej z kału dawcy, do układu pokarmowego biorcy. Na ten moment, największą skuteczność wykazuje w terapii chorób spowodowanych działaniem patogennych mikroorganizmów, jednak obserwuje się różny stopień skuteczności także w innych chorobach układu pokarmowego, a nawet zespole metabolicznym i otyłości. Wydaje się być najbardziej efektywną metodą modulacji mikroflory jelitowej.

Pierwsze wzmianki miały miejsce już w IV wieku w Chinach gdzie stosowano tzw. "żółtą zupę" jako lek wobec ciężkich biegunek. Terapeutyczne właściwości przeszczepionej mikrobioty miały swoje zastosowanie w 1958 roku w przypadku ciężkiego zakażenia, zagrażającemu życiu *Clostridium Difficile*, wykazując się wysoką skutecznością. Od tamtego czasu, powstała ogromna ilość prac naukowych, z czego znaczna większość powstała w ciągu kilku ostatnich lat, a obszar badań znacznie się poszerzył, przenosząc skupienie badaczy na inne choroby, takie jak cukrzyca, otyłość czy nowotwory jelita grubego^{4,40-41}.

3.3.1. Przebieg i mechanizm działania

W celu przeprowadzenia FMT, należy dokonać odpowiedniej selekcji dawcy, upewniając się, że jest to osoba całkowicie zdrowa, aby zniwelować ryzyko zakażenia biorcy chorobami wywołanymi przez mikroorganizmy (np. *wirus HIV*, *wirus WZW typu C*). Dawca winien nie chorować na żadną z autoimmunologicznych i atopowych chorób, jednocześnie nie mogą występować zapalenia, choroby metaboliczne. Wskazany jest również brak nadwagi, brak przyjmowania leków i substancji (narkotyków, alkoholu) wpływających na mikroflorę jelitową. Próbkę kału są badane w kierunku wykrycia patogenów m.in.: *Salmonella*, *Helicobacter pylori*, *Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus*.

Dawca nie musi być spokrewniony, a jego wiek może znajdować się w przedziale 18-70 lat. Należy wziąć pod uwagę płeć dawcy, ponieważ kobiety i mężczyźni różnią się sposobem wykorzystywania tej samej mikrobioty.

Przygotowanie materiału do transplantacji polega na dodaniu do 200-300ml wody/mleka 50-60g kału pochodzącego od dawcy, zmieszanie ze sobą do momentu powstania homogennego płynu. Powstały płyn pozostawia się na kilka minut, następnie przefiltrowuje najpierw przez gazę a potem przez

strzykawkę z filtrem. Mikstura może zostać użyta od razu poprzez podanie za pomocą strzykawki lub przechowywana w niskiej temperaturze.

Podaje się doustnie, donosowo lub doodbytniczo, z czego za najskuteczniejszą i najbezpieczniejszą formę uznaje się podawanie doodbytnicze poprzez kolonoskopię. Podawanie doustne może przebiegać za pomocą kapsułek.

Przeszczepiona mikrobiota, przyczynia się do normalizacji panującej dysbiozy w układzie pokarmowym biorcy, co wiąże się ze zmniejszeniem dokuczliwych objawów, a nawet ich całkowitym ustąpieniem. Dochodzi do wzrostu bakterii pozytywnie wpływających na organizm człowieka i do jednoczesnego spadku mikroorganizmów chorobotwórczych. Skutkuje to zmniejszeniem objawów albo przynajmniej częściowym wyleczeniem.

Jak większość terapii, FMT nie jest pozbawione skutków ubocznych. Do częstych należą: dyskomfort w jamie brzusznej, zatwardzenia, wzdęcia, biegunki, nudności, wymioty, krew w stolcu. Skutki uboczne stanowią jednak naturalną odpowiedź organizmu na wprowadzone zmiany w składzie mikrobioty, które szybko ustępują⁴⁰.

3.3.2. W chorobach metabolicznych

Przedstawiona w rozdziale rola mikrobioty w patogenezie chorób metabolicznych, skłania ku postawieniu sobie pytania – czy modulacja mikroflory układ pokarmowy może pełnić funkcje profilaktyczne a nawet lecznicze w przypadku zespołu metabolicznego, cukrzycy i otyłości? Szczególnie w ciągu kilku ostatnich lat badacze powzięli sobie za cel sprawdzenie profilaktycznych i leczniczych właściwości FMT. Efekty badań są znacznie bardziej satysfakcjonujące w porównaniu ze stosowaniem środków pre- i probiotycznych.

Trwająca 6 tygodni obserwacja z udziałem ludzi rozpoczęła się przeprowadzoną transplantacją mikrobioty osób szczupłych do jelita grubego osób otyłych, w celu ustalenia roli mikroorganizmów zasiedlających ludzki układ pokarmowy w chorobach metabolicznych. Nie zarejestrowano zmian w wadze biorców, jednak, co istotne, spostrzeżono obniżenie stężenia triglicerydów w surowicy krwi biorców oraz zmniejszenie insulinooporności. Taki wynik daje podstawy do prowadzenia dalszych badań a sama terapia może spełniać funkcję pomocniczej terapii w przypadku chorób metabolicznych. Jednak z powodów estetycznych i formy w jakiej przeprowadzane jest FMT, pacjenci niezbyt często są chętni do decydowania się na nią, dlatego zamiast tego wybiera się zazwyczaj prebiotyki i probiotyki^{2,42}.

3.3.3. W chorobach układu pokarmowego

Szerokie pole do popisu dla FMT stanowią choroby w obrębie przewodu układu pokarmowego, gdzie ta terapia przynosi zdumiewające efekty.

Najskuteczniejsza wydaje się być w terapii zakażeń *Clostridium difficile*. Nadmierne namnożenie się tych bakterii wynika zazwyczaj z wcześniej zastosowanej intensywnej antybiotykoterapii powodującej dysbiozę jelita grubego. Podczas ciężkich epidemii wybuchających w Europie i Północnej Ameryce skuteczność FMT sięgała ponad 90%, w porównaniu z 25-27% wyleczeń za pomocą antybiotyków. Przeprowadzono badania mające na celu zbadanie tego zjawiska - porównano skuteczność podawania wankomycyny do terapii FMT. Wyniki badań były jednoznaczne: terapia FMT znacznie lepiej radziła sobie z nawracającym i opornym na leczenie antybiotykami rzekomobło-niastym zapaleniem jelit wywołanym przez już wspomnianą bakterię. FMT prowadziło do namnożenia wielu korzystnych bakterii (m.in. *Bacteroidetes*, *Lactobacillus spp.*) i obniżenie bakterii działających patogennie na układ pokarmowy (*Clostridium difficile*, *Escherichia coli*). Sugeruje to ogromny potencjał jaki tkwi w FMT, jednak mimo wysokiej skuteczności tej formy terapii nie jest to pierwsza metoda leczenia po jaką sięgają lekarze, ze względu złożoności całego procesu, ryzyka związanym z przekazywaniem biorcy mikrobioty dawcy oraz aspektach psychologicznych wśród pacjentów^{40, 41}.

Nie pozostawiono bez uwagi nieswoistego zapalenia jelit. Panująca dysbioza w IBD jest wystarczającym argumentem dla badaczy aby podejrzewać terapeutyczne właściwości FMT również i w tym przypadku. W podwójnie ślepej próbie zdecydowanie więcej osób osiągnęło terapeutyczny efekt w porównaniu z grupą placebo. Kolejne badanie z udziałem grupy z IBD oraz grupy bez tego zespołu wykazały się powstawaniem korzystnych zmian w obrębie mikrobioty po zastosowanym FMT. Wszyscy pacjenci doświadczyli mikrobiologicznej remisji, jednak u niektórych osób (25% osób z IBD) doszło do nawrotu choroby po 24 miesiącach. W innych analizach zanotowano u myszy supresję prozapalnych cytokin i mieloperoksydazy oraz większe ilości IL-10 działającej przeciwzapalnie w jelicie grubym, co też może sugerować wysoce terapeutyczny potencjał stosowania FMT w przyszłości^{40,41}.

Jak wspomniano wcześniej, długotrwałe nieleczone zapalenie w obrębie jelita grubego (np. w IBD) mogą prowadzić w konsekwencji do wystąpienia raka jelita grubego. Pewnością jest panująca dysbioza w obrębie tego narządu w przypadku nowotworu, różniącą się od IBD wzrostem czynników patogennych (IBD charakteryzuje się obniżeniem korzystnych bakterii).

Do mikroorganizmów związanych z nowotworem jelita grubego zaliczane są *Escherichia coli*, *Fusobacterium nucleatum* i *Bacteroides fragilis*. U myszy, modulacja mikrobioty z użyciem FMT spowodowała normalizację mikrobioty i zmniejszenie wielkości guza w jelicie grubym. Zmiana stosunku bakterii choro- i nie chorobotwórczych może więc potencjalnie w pozytywny sposób wpływać na leczenie nowotworu jelita grubego, potrzebna jest jednak większa ilość badań^{41,43}.

Znacznie więcej danych dostarczają nam obszerne badania nad terapią zespołu jelita drażliwego z zastosowaniem FMT. Wyniki badań są bardzo satysfakcjonujące, na tyle, że mogą stanowić dla stosunkowo dużej części społeczeństwa nadzieję na wyleczenie lub obniżenie natężenia dokuczliwych objawów. Wdrożenie FMT u osób z IBS skutkowało bardzo dużym powodzeniem – u około 70% pacjentów doszło do znacznego spadku objawów i polepszenia jakości życia. Ze względu jednak na skłonność do nawrotów choroby, należałoby poddawać się terapii FMT regularnie. Już w ciągu jednego tygodnia po FMT dochodzi do zmiany mikrobiomu biorcy w mikrobiom dawcy³⁵.

4. Podsumowanie

Mikrobiota to skomplikowany, nieodłączny element każdego organizmu. Wszelkie zmiany ilościowe i jakościowe w obrębie narządu bakteryjnego wiążą się z występowaniem zaburzeń metabolicznych lub przewodu pokarmowego. Osiągnięte efekty modulacji mikrobiomu dają szansę na udoskonalenie leczenia wielu chorób poszerzając dotychczasowe metody o nowe możliwości terapeutyczne. Bez wątpienia, przedstawione terapie wymagają kolejnych badań, a być może potencjał mikrobioty będzie w pełni wykorzystywany jako regularna procedura w terapii omówionych chorób.

Referencje

1. Marchesi JR, Dutilh BE, Hall N, et al. Towards the human colorectal cancer microbiome. *PLoS One*. 2011;6(5):e20447. doi:10.1371/journal.pone.0020447
2. Marlicz W, Łoniewski I. Mikroflora jelitowa a otyłość i rak jelita grubego *Gastroenterologia Kliniczna. Postępy i Standardy. Via Medica Journals*. 2012;4(2):69-78 https://journals.viamedica.pl/gastroenterologia_kliniczna/article/view/29260

3. Tilg H, Moschen AR, Kaser A. Obesity and the microbiota. *Gastroenterology*. 2009;136(5):1476-1483. doi:10.1053/j.gastro.2009.03.030
4. Wang JW, Kuo CH, Kuo FC, et al. Fecal microbiota transplantation: Review and update. *J Formos Med Assoc*. 2019;118 Suppl 1:S23-S31. doi:10.1016/j.jfma.2018.08.011
5. Nawrocka M, Szulińska M, Bogdański P. Rola mikroflory jelitowej w patogenezie i leczeniu otyłości oraz zespołu metabolicznego Forum Zaburzeń Metabolicznych. *Via Medica Journals*. 2015;6(3):95-102. https://journals.viamedica.pl/forum_zaburzen_metabolicznych/article/view/44020
6. Hattori M, Taylor TD. The human intestinal microbiome: a new frontier of human biology. *DNA Res*. 2009;16(1):1-12. doi:10.1093/dnares/dsn033
7. Mariat D, Firmesse O, Levenez F, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol*. 2009;9:123. Published 2009 Jun 9. doi:10.1186/1471-2180-9-123
8. Pai R, Kang G. Microbes in the gut: a digestable account of host-symbiont interactions. *Indian J Med Res*. 2008;128(5):587-594.
9. Cani PD, Delzenne NM. Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2007;10(6):729-734. doi:10.1097/MCO.0b013e3282efdebb
10. Olszewska J, Jagusztyn-Krynicka EK. Human Microbiome Project – Mikroflora jelit oraz jej wpływ na fizjologię i zdrowie człowieka. *Post Mikrobiol* 2012;51:243-256.
11. Nowak A, Libudzisz Z. Mikroorganizmy jelitowe człowieka The intestinal microbiota of humans Adriana Nowak, Zdzisława Libudzisz Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka. *Standardy medyczne/pediatrica*. 2008; T. 5; 372–379
12. O'Hara AM, Shanahan F. Gut microbiota: mining for therapeutic potential. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007;5(3):274-284. doi:10.1016/j.cgh.2006.12.009
13. Kuczyńska B, Wasilewska A, Biczysko M, Banasiewicz T, Drews M. Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe – mechanizm działania,

- potencjalne zastosowania kliniczne oraz zalecenia dietetyczne, Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej, Chirurgii Onkologii Gastroenterologicznej i Chirurgii Plastycznej Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, *Nowiny Lekarskie*. 2011; 80.4: 299-304. https://jms.ump.edu.pl/uploads/2011/4/299_4_80_2011.pdf
14. Hill MJ. Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *Eur J Cancer Prev*. 1997;6 Suppl 1:S43-S45. doi:10.1097/00008469-199703001-00009
 15. Kapila S; Vibha, Sinha PR. Antioxidative and hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus casei ssp casei* (biodefensive properties of lactobacilli). *Indian J Med Sci*. 2006;60(9):361-370.
 16. Duncan SH, Belenguer A, Holtrop G, Johnstone AM, Flint HJ, Loble GE. Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(4):1073-1078. doi:10.1128/AEM.02340-06
 17. Marlicz W, Zawada I, Starzyńska T. Zespół nadwrażliwego jelita--nadwrażliwe jelito czy nadwrażliwy umysł? [Irritable bowel syndrome--irritable bowel or irritable mind?]. *Pol Merkur Lekarski*. 2012;32(187):64-69.
 18. Mai V. Dietary modification of the intestinal microbiota. *Nutr Rev*. 2004;62(6 Pt 1):235-242. doi:10.1301/nr2004.jun235-242
 19. Furrie E. A molecular revolution in the study of intestinal microflora. *Gut*. 2006;55(2):141-143. doi:10.1136/gut.2005.081695
 20. O'Sullivan DJ. Methods for analysis of the intestinal microflora. *Curr Issues Intest Microbiol*. 2000;1(2):39-50.
 21. Tilg H, Kaser A. Adiponectin and JNK: metabolic/inflammatory pathways affecting gastrointestinal carcinogenesis. *Gut*. 2009;58(12):1576-1577. doi:10.1136/gut.2009.190959
 22. Park J, Scherer PE. Leptin and cancer: from cancer stem cells to metastasis. *Endocr Relat Cancer*. 2011;18(4):C25-C29. Published 2011 Jul 11. doi:10.1530/ERC-11-0163
 23. Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free

- mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(3):979-984. doi:10.1073/pnas.0605374104
24. Turnbaugh PJ, Bäckhed F, Fulton L, Gordon JI. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe*. 2008;3(4):213-223. doi:10.1016/j.chom.2008.02.015
 25. Zhang H, DiBaise JK, Zuccolo A, et al. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(7):2365-2370. doi:10.1073/pnas.0812600106
 26. DiBaise JK, Zhang H, Crowell MD, Krajmalnik-Brown R, Dekker GA, Rittmann BE. Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo Clin Proc*. 2008;83(4):460-469. doi:10.4065/83.4.460
 27. Mitsuoka T. Intestinal flora and human health. *Asia Pac J Clin Nutr*. 1996;5(1):2-9.
 28. Limdi JK, O'Neill C, McLaughlin J. Do probiotics have a therapeutic role in gastroenterology?. *World J Gastroenterol*. 2006;12(34):5447-5457. doi:10.3748/wjg.v12.i34.5447
 29. Mickael B, Marteau P, Miller GD, Antoine JM. Probiotics and the Intestinal Microflora: What Impact on the Immu...: Ingenta Connect. Current Nutrition & Food Science. 2006, pp. 79-95(17) <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cnf/2006/00000002/00000001/art00010>
 30. van Nuenen MH, Venema K, van der Woude JC, Kuipers EJ. The metabolic activity of fecal microbiota from healthy individuals and patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 2004;49(3):485-491. doi:10.1023/b:ddas.0000020508.64440.73
 31. Bresnick E. Colon carcinogenesis: an overview. *Cancer*. 1980;45(5 Suppl):1047-1051. doi:10.1002/1097-0142(19800315)45:5+<1047::a-id-cncr2820451303>3.0.co;2-1
 32. Lukas M. Inflammatory bowel disease as a risk factor for colorectal cancer. *Dig Dis*. 2010;28(4-5):619-624. doi:10.1159/000320276
 33. Marchesi JR, Dutilh BE, Hall N, et al. Towards the human colorectal cancer microbiome. *PLoS One*. 2011;6(5):e20447. doi:10.1371/journal.pone.0020447

34. van Nuenen MH, Venema K, van der Woude JC, Kuipers EJ. The metabolic activity of fecal microbiota from healthy individuals and patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 2004;49(3):485-491. doi:10.1023/b:ddas.0000020508.64440.73
35. El-Salhy M, Mazzawi T. Fecal microbiota transplantation for managing irritable bowel syndrome. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018;12(5):439-445. doi:10.1080/17474124.2018.1447380
36. Zuo T, Ng SC. The Gut Microbiota in the Pathogenesis and Therapeutics of Inflammatory Bowel Disease. *Front Microbiol*. 2018;9:2247. Published 2018 Sep 25. doi:10.3389/fmicb.2018.02247
37. de Vrese M, Schrezenmeir J. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2008;111:1-66. doi:10.1007/10_2008_097
38. Cani PD, Delzenne NM. The gut microbiome as therapeutic target. *Pharmacol Ther*. 2011;130(2):202-212. doi:10.1016/j.pharmthera.2011.01.012
39. Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*. 2009;58(8):1091-1103. doi:10.1136/gut.2008.165886
40. Antushevich H. Fecal microbiota transplantation in disease therapy. *Clin Chim Acta*. 2020;503:90-98. doi:10.1016/j.cca.2019.12.010
41. Borody TJ, Eslick GD, Clancy RL. Fecal microbiota transplantation as a new therapy: from *Clostridioides difficile* infection to inflammatory bowel disease, irritable bowel syndrome, and colon cancer. *Curr Opin Pharmacol*. 2019;49:43-51. doi:10.1016/j.coph.2019.04.017
42. Kootte RS, Vrieze A, Holleman F, et al. The therapeutic potential of manipulating gut microbiota in obesity and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab*. 2012;14(2):112-120. doi:10.1111/j.1463-1326.2011.01483.x
43. Perillo F, Amoroso C, Strati F, et al. Gut Microbiota Manipulation as a Tool for Colorectal Cancer Management: Recent Advances in Its Use for Therapeutic Purposes. *Int J Mol Sci*. 2020;21(15):5389. Published 2020 Jul 29. doi:10.3390/ijms21155389

LECZENIE ZACHOWAWCZE STULEJKI JAKO SKUTECZNA ALTERNATYWA DLA INTERWENCJI CHIRURGICZNEJ

**Michał Krawiec, Natalia Nafalska,
Małgorzata Stopyra, Katarzyna Krzyżak**

Studenckie Koło Naukowe im. Prof. Zbigniewa Religi przy Katedrze Biofizyki,
Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Abstrakt:

Stulejka to przypadłość występująca nawet u 10% mężczyzn w różnym wieku. Wiąże się ona z trudnościami w utrzymaniu higieny prącia, bólem i pogorszeniem sprawności seksualnej. W przypadku dzieci wczesne rozpoznanie schorzenia i wdrożenie leczenia zachowawczego często pozwala uniknąć interwencji chirurgicznej, która u dorosłych mężczyzn jest zwykle koniecznością. Zabieg niesie za sobą ryzyko powikłań, takich jak krwotoki, zakażenia, zdarzenia niepożądane związane ze znieczuleniem czy stres dla dzieci i ich rodziców. W związku z powyższym coraz większą popularnością cieszy się leczenie z użyciem miejscowych steroidów. Stosuje się leki bazujące m.in. na betametazonie, hydrokortyzonie, klobetazolu czy triamcynolonie. Wyniki terapii steroidami są obiecujące: uzyskuje się odsetek powodzeń wynoszący nawet ponad 90%, przy jednoczesnej redukcji kosztów kuracji. W niniejszej pracy skupiono się na steroidoterapii, jako metodzie leczenia stulejki o udowodnionej skuteczności.

Słowa kluczowe: stulejka, leczenie zachowawcze, steroidoterapia miejscowa

Abstract:

Phimosis is a condition that affects up to 10% of men of all ages. It is associated with difficulties in maintaining penile hygiene, pain and deterioration of sexual performance. In the case of children, when we recognize phimosis early and then quickly implement steroid therapy, avoiding surgical intervention is very likely. When it comes to adult men, surgical intervention is usually a necessity. The surgery carries the risk of complications such as hemorrhages, infections, adverse health events related to anesthesia. Additionally, each operation is a huge stress for both the child and the parent. Therefore, local steroid therapy is becoming more and more popular. Drugs based on, inter alia, on betamethasone, hydrocortisone, clobetasol or triamcinolone. The results of steroid therapy are promising. Success rates of up to 90% are achieved while reducing treatment costs. The study focuses on steroid therapy as a proven effective method of treating phimosis.

Keywords: phimosis, conservative treatment, local steroid treatment

1. Czym jest stulejka?

Dystalna część prącia (żołędź) pokryta jest fałdem skórny (napletkiem). Stulejka (łac. *phimosis*) to stan, w którym nie istnieje możliwość cofnięcia napletka do rowka założednego i tym samym całkowitego lub częściowego odsłonięcia żołędzi. Bezpośrednią przyczyną tego stanu mogą być zrosty pomiędzy żołędzią a napletkiem lub zbyt wąskie ujście napletka. Może to prowadzić m.in. do zbierania się pod napletkiem drobnoustrojów chorobotwórczych oraz do problemów w trakcie współżycia^{1,2}.

1.1. Klasyfikacja stulejek

Phimosis może być klasyfikowana ze względu na etiologię i okres wystąpienia (jako fizjologiczna - pierwotna lub patologiczna - wtórna) oraz stopień zaawansowania^{2,3}. Klasyfikacja ta ma znaczenie kliniczne, ponieważ właściwe różnicowanie stulejki zapobiega niepotrzebnemu kierowaniu pacjentów do poradni specjalistycznych⁴. W początkowym okresie życia występuje stan nazywany stulejką fizjologiczną. Występuje ona od urodzenia, a w badaniu fizykalnym napletek ma prawidłowy wygląd, jednak jego odciągnięcie do rowka założednego jest niemożliwe ze względu na istnienie naturalnych zrostów pomiędzy fałdem skórny a żołędzią. W warunkach prawidłowych resztki nabłonka (smegma) zbierające się pod napletkiem oraz krótkie erekcje prącia powodują, że w miarę dorastania napletek staje się zupełnie odsuwalny. Pełna retrakcja jest zwykle możliwa ok. 4. roku życia^{1,2,5}. W przeciwieństwie do fizjologicznej *phimosis*, patologię można stwierdzić w przypadku wtórnego pojawienia się stulejki i/lub przy zauważeniu zmian w napletku obejmujących jego obkurczenie, stwardnienie i błąd i/lub gdy występuje ból podczas erekcji czy stosunku seksualnego (dyspareunia)^{2,5}.

Najpopularniejszym podziałem ze względu na zaawansowanie stulejki jest V-stopniowa klasyfikacja opracowana przez Kikirosa i wsp. Wówczas stopień 0 to brak stulejki, I - możliwość całkowitego odsłonięcia żołędzi i ciasność napletka już za nią, II - możliwość częściowego odsłonięcia żołędzi, III - częściowe przesunięcie napletka z uwidocznieniem żołędzi, IV - delikatne przesunięcie napletka bez uwidocznienia żołędzi, zaś V stopień to zupełny brak możliwości retrakcji napletka^{2,6,7}. Część naukowców zwraca uwagę, że pojęcie "stulejki" powinno być używane z ostrożnością. Jak zauważają, *phimosis* spowodowaną przez zwężenie otworu napletkowego należy różnicować z obecnością zrostów pomiędzy żołędzią i napletkiem. Stan ten nie stanowi

podstaw do leczenia nawet po przekroczeniu 4. roku życia i zawsze ustępuje samoistnie przed 18. rokiem życia. Jednocześnie badacze przyznają, że pełne zróżnicowanie jest trudne i część napletków usuniętych z powodu stulejki rozpoznanej jako fizjologiczna wykazuje cechy patologii⁵.

1.2. Epidemiologia

Brak możliwości odciągnięcia napletka stwierdza się u 96%-100% noworodków. Stan ten stopniowo się cofa: wśród dzieci 1-roczych 50% ma nieodprowadzalny napletek, wśród 3-letnich jest to 10%, wśród 7-letnich - 6-8%, zaś wśród 16- i 17-latków tylko 1%. Zgodnie z różnymi szacunkami, w wieku dorosłym 0,6-13% nieobrzezanych mężczyzn ma stulejkę^{2,5-6,8-10}. Odmienności w tych szacunkach zależą od miejsca prowadzenia badań (czynników rasowych, kulturowych, środowiskowych i rozpowszechnienia schorzeń powodujących wtórne powstanie stulejki) oraz od różnic w definiowaniu stulejki fizjologicznej i patologicznej przez badaczy².

1.3. Przyczyny stulejek

Powstaniu stulejki patologicznej sprzyja już niewłaściwe postępowanie ze stulejką fizjologiczną w okresie niemowlęcym. Wówczas to próby siłowego odciągnięcia napletka powodują jego urazowe uszkodzenie i wytworzenie nieelastycznych blizn, utrudniających retrakcję¹. Stanowi to "błędne koło" w opiece nad dziećmi narządami płciowymi.

Do innych przyczyn wystąpienia stulejki należą predyspozycje genetyczne, otyłość, cukrzyca oraz choroby zapalne, takie jak zapalenie żołądki (łac. *balanitis*), zapalenie napletka (łac. *posthitis*), zapalenie żołądki i napletka (łac. *balanoposthitis*), pieluszkowe zapalenie skóry (PZS, łac. *diaper dermatitis*; nazywane jest również amoniakalnym zapaleniem skóry ze względu na obecność amoniaku w moczu) czy liszaj twardzinowy (LSA, łac. *lichen sclerosus*; jego postać genitalna to BXO - *balanitis xerotica obliterans*)^{2,3}. Nawracające stany zapalne często same stanowiące powikłanie cukrzycy lub nieprawidłowej glikemii - obecność glukozy w moczu sprzyja namnażaniu się bakterii w okolicach ujścia cewki moczowej⁶. Zapalenia powodują bliznowacenie napletka i zmniejszenie jego rozciągliwości^{2,11}.

1.4. Powikłania stulejek

Do objawów, które są najczęściej zgłaszane przez pacjentów z *phimosis* należą: ból, świąd, zaczerwienienie, krwawienia, powstawanie smegmy, trudności z oddawaniem moczu, dyspareunia oraz tzw. balonikowanie - zwiększanie objętości napletka podczas mikcji^{6,10,12-13}. Powikłaniem stulejki, które często wymaga pilnej interwencji chirurgicznej jest załupek (łac. *paraphimosis*). Jest to stan, w którym napletek cofnięty do rowka założędnego nie może powrócić na swoje miejsce, co w ciężkich przypadkach powoduje ból, obrzęk i niedokrwienie dystalnej części prącia. Załupek może być konsekwencją próby siłowego ściągnięcia napletka w ramach niewłaściwego postępowania ze stulejką^{1,3}. Ciężkimi skutkami stulejki są zmiany zapalne, takie jak zapalenie żołądki i napletka, BXO czy zakażenia układu moczowego (ZUM). Stulejka oraz rozdarcia napletka znacznie zwiększają ryzyko rozwoju nowotworów prącia^{2,14-15}. Posiadanie stulejki wpływa na negatywne postrzeganie własnego ciała. Jak wykazali badacze z Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, w grupie osób cierpiących na *phimosis* wszyscy wstydzili się swoich narządów płciowych, zaś mimo posiadania partnerów seksualnych, tylko 65% respondentów odczuwało satysfakcję ze współżycia¹⁰. Kompleksy związane z wyglądem prącia mogą także opóźniać rozpoczęcie współżycia. La Pera i wsp. wykazali, że w badanej grupie pełnoletnich uczniów szkół średnich 60,3% ma za sobą pierwszy stosunek seksualny, zaś częstość występowania *phimosis* wynosiła 12,9%. Stulejka była jednak znacznie częstsza wśród mężczyzn, którzy jeszcze nie przeszli inicjacji seksualnej w porównaniu z grupą, która już odbyła stosunek (21,1% vs 7,5%)⁹.

1.5. Klasyczne metody leczenia stulejki

Phimosis nie zawsze wymaga leczenia. W przypadku stulejki fizjologicznej wystarczy dbanie o higienę przy pomocy wody z neutralnym mydłem oraz delikatne odciąganie napletka przy okazji mikcji i mycia, co u małych dzieci powinno być wykonywane przez rodziców^{6,16-17}. Próby zbyt silnego odciągania napletka (czasem wykonywane przez lekarzy po znieczuleniu pacjenta) mogą powodować ból, uraz oraz BXO¹.

Do najczęstszych metod leczenia stulejki u pacjentów w różnym wieku należą zabieg usunięcia napletka - obrezanie (MC, ang. *male circumcision*). Zabieg ten może być także wykonywany bez wskazań medycznych jako MC rytualne (nieterapeutyczne), co jest praktykowane z powodów religijnych

m.in. wśród wyznawców judaizmu i islamu oraz z powodów tradycyjnych w USA^{1,3}. Wskazaniem do MC jest np. stulejka powstała w konsekwencji BXO¹⁸. W niektórych sytuacjach rodzice sami nalegają na zabieg¹⁹. MC, obok licznych zalet (małe ryzyko nawrotu *phimosis*, zwiększenie ochrony przed ZUM, rakiem prącia i infekcjami przenoszonymi drogą płciową, w tym HIV) niesie także ryzyko negatywnych skutków, takich jak stres związany z pobytem w szpitalu, powikłania zastosowanego znieczulenia, ból, obrzęk, krwawienia, zakażenia, powstanie zrostów i mostków skórnych, zgorzel Fourniera, konieczność powstrzymania się od czynności seksualnych na okres rekonwalescencji czy dyskomfort związany z wyglądem prącia i przekonaniami kulturowymi. Ogólna częstość powikłań wynosi ok. 1,5%. Ostateczny stosunek zalet i wad MC jest przedmiotem licznych badań i dyskusji^{2,12-13,16,19-23}.

Alternatywą wobec MC chirurgiczną metodą leczenia *phimosis* jest plastyka napletka (preputioplastyka). Występuje ona w wielu wariantach: jako podłużne nacięcie napletka po stronie grzbietowej, większa ilość nacięć (także po stronie brzusznej i/lub po bokach napletka) lub w połączeniu z przecięciem wędzidełka napletka (frenulotomia)¹. Preputioplastyka jest prostszym zabiegiem niż MC, wiąże się więc z mniejszą ilością powikłań i stanowi skuteczne leczenie w sytuacji, w której stulejka powstała na skutek izolowanych zmian włóknistych w napletku^{12,18}. Jednocześnie jednak ryzyko późniejszego nawrotu stulejki jest wyższe niż w przypadku MC^{6,20}.

2. Rola i skuteczność leczenia zachowawczego w *phimosis*

2.1. Rys historyczny miejscowej steroidoterapii w leczeniu *phimosis*

Do niedawna metodą z wyboru w leczeniu stulejki u chłopców powyżej 3. roku życia było postępowanie operacyjne. W 1930 roku w Anglii około jedna trzecia chłopców poddawana była obrzezaniu w okresie noworodkowym. W 1949 roku Gairdner w swojej publikacji przedstawił pogląd, że stulejka w większości przypadków ustępuje samoistnie do 5. roku życia, co przyczyniło się do obniżenia wskaźnika postępowania zabiegowego²⁴⁻²⁵.

W ostatnich latach coraz częściej stosuje się leczenie zachowawcze (miejscowa sterydoterapia), ze względu na jego dużą skuteczność, niższe koszty oraz możliwość uniknięcia powikłań pooperacyjnych¹³. Gdy podstawowe i najważniejsze etapy postępowania, czyli szczegółowe przeszkolenie dziecka w jaki sposób dbać o higienę napletka, powtarzanie próby delikatnego odprowadzania fałdu skórniego podczas kąpieli i mikcji nie wyeliminują stulejki, wskazane

jest miejscowe stosowanie glikokortykosteroidów (najczęściej dipropionianu betametazonu przez okres 4-8 tygodni)⁶. Pierwszy raz glikokortykosteroidy zostały wprowadzone do leczenia stulejki przez Jørgensena i Kikirosa w 1993 roku²⁶⁻²⁷. W 1996 roku Golubovic i wsp. wykazali, że miejscowe zastosowanie 0,05% betametazonu było skuteczne i bezpieczne w leczeniu *phimosis* zarówno u dzieci, jak i u dorosłych²⁷.

2.2. Mechanizm działania wykorzystywanych w terapii steroidów

Znane są dwa mechanizmy zapewniające skuteczność działania kremów steroidowych w ustępowaniu stulejki. Pierwszy to powszechnie znany efekt przeciwzapalny i immunosupresyjny. Kortykosteroidy stymulują produkcję lipokortyny. Ta z kolei hamuje aktywność fosfolipazy A2, która uwalnia kwas arachidonowy (prekursor prostanoidów i leukotrienów, mediatorów zapalenia skóry) z fosfolipidów. Wiadomo, że kortykosteroidy hamują zarówno wczesne zjawiska procesu zapalnego (obrzęki, odkładanie fibryny, rozszerzenie naczyń włosowatych, migrację leukocytów do obszaru objętego stanem zapalnym i fagocytność), jak i późniejsze jego przejawy (proliferyzację naczyń włosowatych i fibroblastów, zubożenie kolagenu i bliznowacenie). Głównym efektem antyfibrotycznym jest zmniejszenie syntezy kolagenu typu I i III w wielu typach komórek, w tym w fibroblastach²⁹. Drugim mechanizmem jest efekt ścięćczenia skóry. Steroidy hamują skórną syntezę glikozaminoglikanów przez fibroblasty, co przyczynia się do utraty substancji podstawowej w następstwie zmniejszonego efektu wiązania płynu tkankowego z kwasem hialuronowym. W konsekwencji dochodzi do zmniejszenia macierzy zewnątrzkomórkowej skóry, a włókna kolagenowe i elastynowe stają się ciasno upakowane. Steroidy hamują syntezę kolagenu i działają antyproliferacyjne na naskórek. Wchłanianie przez skórę miejscowych steroidów i ich aktywność zależą od wielu czynników, na przykład integralności zrogowaciałej skóry, nośnika i receptorów steroidowych w cytoplazmie komórek docelowych. Po aktywacji tych receptorów lek pobudza wytwarzanie substancji przeciwzapalnych i hamuje syntezę substancji prozapalnych²⁹. Niektóre badania wskazują na związek liczby komórek Langerhansa (LC, ang. *Langerhans cells*) w napletku z większą predyspozycją do zakażeń układu moczowego i występowania stulejki. Ilościowe określenie włókien elastycznych, ekspresji aneksyny 1 i grubości naskórka może okazać się w przyszłości pomocnym w eliminowaniu skutków ubocznych oraz w dążeniu do większej selektywności działania glikokortykosteroidów miejscowych³⁰.

2.3. Wskazania kliniczne do zastosowania leczenia zachowawczego

Odpowiedni wiek jest istotnym czynnikiem decydującym o skuteczności miejscowej steroidoterapii. Lepszy efekt uzyskuje się u dzieci niż u dorosłych ze względu na większą podatność skóry na leki hormonalne. Dodatkowo większą pewność sukcesu terapeutycznego uzyskamy w przypadku niewielkiej stulejki. Gdy zwężenie umożliwia dziecku swobodne opróżnianie pęcherza moczowego, nie występują nawracające infekcje bakteryjne pod napletkiem, nie ma obrzęków i bólu, wówczas wskazane jest leczenie zachowawcze. Brak efektu tej terapii lub rozpoznanie stulejki wtórnej jest z kolei wskazaniem do leczenia operacyjnego³¹.

Jednak leczenie zachowawcze nie zawsze gwarantuje pełne wyleczenie schorzenia. Istnieje ryzyko nawrotu stulejki w późniejszym wieku. Jednakże taka forma terapii jest w ostatnim czasie coraz częściej rekomendowana w początkowym stadium choroby i wykazuje się satysfakcjonującą skutecznością. Stosowanie maści połączone z odpowiednią higieną u większości dzieci skutkuje ustąpieniem zwężenia napletka oraz zazwyczaj jego pełnym odprowadzeniem³². Niestety w przypadku stulejki patologicznej terapia ta nie znajduje zastosowania. Wówczas należy rozważyć przeprowadzenie zabiegu chirurgicznego. Najczęściej stosowanym leczeniem jest zabieg obrezania³². Skuteczność zastosowania miejscowej steroidoterapii u dorosłych oraz w przypadku stulejki wtórnej jest ograniczona, zwłaszcza w przypadkach blizn i zrostów. Tylko w nielicznych przypadkach stulejki rozpoznanej u dorosłych mężczyzn można podejmować próby leczenia opartego na miejscowej steroidoterapii. Jest to możliwe tylko wtedy gdy schorzenie wynika z niewłaściwej higieny³³.

2.4. Wady i zalety stosowania GKS jako procedury alternatywnej dla interwencji chirurgicznej

2.4.1. Aspekt komfortu psychicznego pacjenta

Możliwość podjęcia próby leczenia zachowawczego jest znacznie lepiej przyjmowana przez rodziców niż decyzja o konieczności przeprowadzenia zabiegu operacyjnego³⁴. Postępowanie zabiegowe wiąże się ze stresem obciążającym dziecko i jego opiekunów wynikającym z samej operacji, jak i pobytu w szpitalu, ryzyka znieczulenia ogólnego, powikłań pooperacyjnych, takich jak krwawienie, ból, nadmierne usunięcie skóry prącia (wymagające interwencji

z zakresu chirurgii plastycznej lub powodujące nawrót stulejki), infekcji oraz dyskomfortu pooperacyjnego³⁴.

2.4.2. Analiza kosztów

Analiza kosztów leczenia również zdecydowanie przemawia za stosowaniem terapii zachowawczej. Według analizy van Howe'a oraz Berdeu i wsp. leczenie tego typu obniża koszty do około 25%³⁵⁻³⁶. Zaskakuje w tym momencie polityka finansowania leczenia operacyjnego stulejki w Polsce. Dysponując takim samym wyposażeniem, lekami, narzędziami i kwalifikacjami, przeznaczając się na leczenie stulejki w znieczuleniu ogólnym (dane z 2004 roku) 300 zł. Jest to 32 razy mniej niż w USA i 11 razy mniej niż we Francji lub w Wielkiej Brytanii. Tak powstaje wewnętrzny dług szpitala. Wobec braku odpowiedniego nakładu budżetu na procedury chirurgiczne wydaje się, że procedury zachowawcze pozwalają osiągnąć znaczące oszczędności. Przez ekstrapolację, na terenie Polski, przyjmując za reprezentatywne wyniki z województwa kujawsko-pomorskiego, koszty leczenia operacyjnego stulejki wynoszą w skali jednego roku (22 800 pacjentów rocznie i dwie wizyty) około 7 980 000 zł. Przy zwrocie rzeczywistych kosztów zabiegu (1300 zł) suma, wzrasta do 30 780 000 zł. Koszt leczenia zachowawczego w skali kraju (22 800 pacjentów, dwie wizyty), łącznie z kosztami dodatkowego zastosowania maści przeciwbólowej u 44% pacjentów oraz dodatkowo z kosztem leczenia operacyjnego 8% pacjentów, to 2 396 280 zł. Oszczędności powstałe w wyniku leczenia zachowawczego wynoszą od 5 583 720 zł (koszt leczenia operacyjnego 300 zł) do 26 559 720 zł (koszt operacji - 1300 zł). Przedstawione analizy nie obejmują kosztów leczenia powikłań pooperacyjnych³⁷. Koszty trzech strategii leczenia stulejki: obrzezania, plastyki napletka (zastosowanie plastycznych technik chirurgicznych w celu powiększenia otworu napletka bez usuwania tkanki) oraz miejscowej terapii sterydami i niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi porównano już w 1998 roku. Opublikowane dane niepowodzeń i powikłań zostały wykorzystane do obliczenia kosztu w przeliczeniu na przypadek. Najbardziej opłacalnym sposobem leczenia stulejki okazało się rozpoczęcie terapii miejscowej. Wykazano, że codzienna zewnętrzna aplikacja od czubka napletka do korony żołądźci prącia 0,05% kremem betametazonu przez 4 do 6 tygodni jest najskuteczniejsza i daje 75% oszczędności w porównaniu z obrzezaniem³⁶.

2.4.3. Czas spędzony w poradni chirurgii dziecięcej

Kolejną zaletę procedur zachowawczych przedstawili Zwolińska i wsp. poddając analizie czas opieki w poradni chirurgii dziecięcej. Okazał się on znacznie krótszy u dzieci ze stulejką pierwotną leczonych zachowawczo (9,6 miesiąca) niż u dzieci poddanych zabiegowi operacyjnemu (11,8 miesiąca)³⁰.

Niewątpliwie wiąże się to nie tylko z zaoszczędzonym czasem rodziców i dziecka, ale również działaniem na rzecz odciążenia systemu ochrony zdrowia³⁴.

2.4.4. Ryzyko ogólnoustrojowej absorpcji steroidu

Zarówno rodziców, jak i świadczeniodawców niepokoi ryzyko ogólnoustrojowej absorpcji steroidu i zahamowania osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (HPA). Jednak zagrożenie to jest nieznaczne, biorąc pod uwagę fakt, że ilość użytego kremu sterydowego i powierzchnia aplikacji jest niewielka. Poza tym sterydy stosuje się tylko przez 4-6 tygodni. Golubovic i wsp. stwierdzili, że poranne poziomy kortyzolu nie były istotnie podwyższone u pacjentów otrzymujących maść betametazonową w porównaniu z grupą kontrolną. Naukowcy objęli stanowisko, iż sterydy miejscowe mogą być rekomendowane jako leczenie pierwszego rzutu w przypadku *phimosi* i stanowią realną możliwość uniknięcia interwencji chirurgicznej³⁰.

2.4.5. Wątpliwa skuteczność w przypadku pacjentów z BXO

Niekorzystnym jest fakt, iż pacjenci z BXO słabo reagują na miejscowe steroidy (może to jednak służyć jako narzędzie przesiewowe w takich przypadkach)³⁰. W randomizowanym kontrolowanym badaniu, Kiss badał odpowiedź BXO na miejscowe zastosowanie 0,05% maści mometazonu, wszystkie dzieci zostały obrzezane pod koniec badania. Tylko osoby z wczesnymi lub pośrednimi postaciami BXO, reagowały na leczenie kortykosteroidami. Dlatego więc istotnym kryterium włączenia leczenia zachowawczego stulejki jest wczesna, niepowikłana postać schorzenia³⁹.

3. Skuteczność opisywanej strategii

Dostępnych jest wiele badań, analiz i przychylnych wniosków mówiących o skuteczności leczenia objawowej stulejki za pomocą miejscowo używanego

steroidu w pierwszym rzucie terapii. Za “skuteczność” czy “sukces terapeutyczny” uważa się zazwyczaj pełną retrakcję skóry napletka.

Poniżej przedstawiono wybrane doniesienia naukowe omawiające zagadnienie.

3.1. Analiza najnowszych raportów

Zhou i wsp. w 2021 roku przekazali znaczące wnioski w omawianej kwestii. Celem ich badania była ocena długoterminowej skuteczności i bezpieczeństwa miejscowego aplikowania steroidu w leczeniu ciężkiej stulejki. Zebrano dane na temat objawów klinicznych związanych ze stulejką, takich jak zapalenie *balanoposthitis*, wzdęcie napletka lub przebyte ZUM, a także działania niepożądane *local steroid treatment* (LST), w tym miejscowy rumień, pieczenie, zmiany pigmentacyjne i nadmierne owłosienie. Zakwalifikowani chłopcy byli leczeni 0,1% preparatem mometazonu furoinianowego, dwa razy dziennie nakładanym na delikatnie rozciągnięty napletek przez okres 4 tygodni. Pacjenci byli ponownie badani w 2., 4. i 8. tygodniu oraz 6. miesiącu od rozpoczęcia leczenia. Do oceny wykorzystano kryteria systemu klasyfikacji Kikiros i Woodward. Do analizy włączono ostatecznie 1550 pacjentów ze stopniem nasilenia wg Kikiros IV lub V. W 23 przypadkach wystąpiły działania niepożądane- miejscowy rumień lub uczucie pieczenia, objawy ustąpiły po odstawieniu sterydów. Nie odnotowano ogólnoustrojowych skutków ubocznych. Już pod koniec drugiego tygodnia 65,7% leczonych dzieci odpowiedziało na terapię. Pacjenci z początkowym stopniem V wykazywali korzystniejszą odpowiedź w porównaniu z pacjentami stopnia IV. Najlepiej reagującą na leczenie grupą wiekową byli chłopcy w przedziale 5-7 lat. Łącznie 138 przypadków doświadczyło nawrotu stulejki, z czego 81 (58,7%) w ciągu 8 tygodni, a 57 (41,3%) po 8 tygodniach. 89 przypadków z nich było w początkowym stopniu V, a 49 w grupie IV stopnia. Wśród tych pacjentów przeważała grupa z *balanoposthitis* obecnie lub w przeszłości. Analiza wieloczynnikowa wykazała, że niezależnymi czynnikami ryzyka nawrotu stulejki były początkowy stopień V i objaw *balanoposthitis*. Chłopcy z zapaleniem żołądki i napletka prezentowali niższy efekt leczenia (48,6%) w porównaniu z osobami z samą stulejką, wzdęciem napletka i historią ZUM (odpowiednio 76,3%, 73,1% i 69,3%)⁴⁰. Pacjenci z *balanoposthitis* są podatni na rozwój procesu patologicznego, a tkanka ich napletka zawiera nadmiar włókien kolagenowych i komórek zapalnych, co może wpływać na skuteczność terapii LST⁴¹.

Inni naukowcy zaobserwowali, że zahamowanie proliferacji hodowanych ludzkich fibroblastów było przemijające i nastąpiła odbudowa skóry właściwej i naskórka po zaprzestaniu stosowania sterydów. Nawrót może być związany ze zjawiskiem odbicia, które może wynikać ze zmian patologicznych struktury tkanki u pacjentów⁴². Codzienne odciąganie napletka jak również higiena były ważne dla trwałego ustąpienia stulejki. Stwierdzono, że pacjenci z nawracającym schorzeniem prawdopodobnie nie stosowali się do zaleceń⁴⁰.

Sabino i wsp. przekazali, że zmiany we włóknach kolagenowych w łuku napletka mogą być związane z odkładaniem się w tym miejscu kremu. Spekulowano, że maść kortykoidowa może nie mieć żadnego wpływu na wewnętrzny napletek stulejki V stopnia. Ponadto gorszy wynik terapeutyczny leczenia stulejki stopnia V (61,5%) jest prawdopodobnie spowodowany dalszym bliznowaceniem występującym, gdy stopień V rozwija się ze stopnia IV (71,4%)⁴².

Europejskie Towarzystwo Urologiczne (EAU, ang. *European Association of Urology*) zdecydowało, że LST należy stosować u dzieci powyżej 2. roku życia⁴³.

Długoterminowe wyniki opisywanego leczenia pogarszały się wraz z wiekiem, a najniższe powodzenie (56,6%) odnotowano w grupie wiekowej 12 lat. Changole i wsp. stwierdzili słabszą odpowiedź u chłopców w wieku powyżej 5 lat w porównaniu z dziećmi młodszymi⁴⁴. Ku i wsp. wywnioskowali, iż starsi pacjenci byli bardziej skłonni do samodzielnego aplikowania leków, więc świadomie mogli odstąpić od stosowania się do zaleceń⁴⁵. Inni naukowcy odnotowali jednak wskaźniki powodzenia rosnące wraz z wiekiem, chociaż bez znaczenia statystycznego⁴⁶. Z kolei Ghysel i wsp. opowiedzieli się za tym, iż wiek pacjenta nie miał wpływu na odległe wyniki leczenia. Stąd powodzenie omawianej terapii w stosunku do wieku chorego wymagają dalszych badań⁴⁷.

Wytyczne EAU dotyczące urologii dziecięcej z 2019 r. donoszą, że maść lub krem z kortykoidami (0,05-0,1%) można podawać dwa razy dziennie przez 20-30 dni, ze wskaźnikiem powodzenia >90%⁴⁴. Okres miejscowego stosowania sterydów różni się w dostępnych analizach. Istnieją badania udawadniające, że kontynuacja terapii przez dłuższy czas może nie być korzystna. Inni podają jednak, że 17,6% pacjentów odpowiedziało na leczenie między 4 a 6 tygodniem⁴⁵. Nascimento i wsp. zalecili wydłużenie okresu leczenia do 8 tygodni, ponieważ wyniki po 8 tygodniach (54,8%) były znacznie lepsze niż po 4 tygodniach (31,3%), co było zgodne z badaniem Zavrása i wsp.⁴⁸⁻⁴⁹. Pojawiło się też badanie pokazujące satysfakcjonujący efekt uzyskany po 12 tygodniu. Podsumowując, można sugerować, iż wskaźniki sukcesu terapeutycznego

rosną wraz z czasem terapii. Dlatego warto rozważyć przedłużenie podstawowego cyklu terapii. Należy jednak unikać przewlekłego stosowania steroidów ze względu na ryzyko atroficznego ścieńczenia skóry.

Reasumując, miejscowe stosowanie 0,1% furoinianu mometazonu jest bezpiecznym i skutecznym leczeniem ciężkiej stulejki. Steryd do stosowania miejscowego może być stosowany w leczeniu z wyboru dla pacjentów z ciężką stulejką i zaleca się nakładanie dwa razy dziennie przez min. 4 tygodnie. Stulejka stopnia V i *balanoposthitis* można traktować jako niezależne czynnikami ryzyka nawrotu⁴⁰.

3.2. Wybór optymalnego stężenia steroidu

Pomimo że skuteczność miejscowo stosowanych GKS w leczeniu *phimosis* została potwierdzona w wielu raportach, nadal istnieją wątpliwości co do wyboru optymalnego stężenia steroidu. Najczęściej stosowanym preparatem jest 0,05% betametazon, którego skuteczność szacuje się na 67–95%³⁴. Według Lee i wsp. efektywność GKS jest wprost proporcjonalna do ich zastosowanego stężenia, co potwierdzone zostało także przez Berdeu i wsp., którzy stwierdzili, że betametazon w stężeniu 0,12% spowodował ustąpienie stulejki u 96,8% pacjentów, zaś przy stężeniu 0,025% efekt ten uzyskano tylko u 55,6% pacjentów^{24,35,50}. W leczeniu zachowawczym stulejki zastosowanie mają również inne GKS, takie jak: hydrokortyzon, klobetazol, mometazon i flutikazon³⁴.

3.3. Ocena wpływu LST na tkankę napletka

Pojawiło się również badanie mające na celu analizę morfologii napletka i ocenę wpływu miejscowej terapii kortykosteroidami na tę tkankę. Oceniono retrospektywnie czterdzieści próbek materiału pobranego od dzieci w wieku od 2 do 15 lat ze stulejką poddawanych obrzezaniu. Przeanalizowano włókna elastyczne (barwienie metodą Verhoeffa), grubość naskórka (barwienie hematoksyliną i eozyną) oraz ekspresję aneksyny 1 i LC (metodą immunohistochemiczną). 18 (45%) pacjentów stosowało miejscowo kortykosteroidy, 22 (55%) nie, a 4 (10%) miało w wywiadzie zapalenie *balanoposthitis* jako wcześniejsze powikłanie. Stwierdzono, iż włókna elastyczne nie są jedynym czynnikiem odpowiedzialnym za etiologię stulejki i nie ulegają one ilościowym zmianom po zastosowaniu miejscowych sterydów. Zanik skóry jest rzadkim działaniem niepożądanym u dzieci poddawanych miejscowemu leczeniu

sterydami. W tym badaniu nie zidentyfikowano takiego efektu ubocznego, ale należy mieć na uwadze taką ewentualność. Ekspresja aneksyny 1 była niższa w grupie osób, które stosowały kortykosteroidy w porównaniu z osobami, które nigdy ich nie aplikowały. Populacja LC nie ulega zmianie pod wpływem miejscowych kortykosteroidów.

Badanie potwierdza bezpieczeństwo leczenia *phimosis* miejscowymi kortykosteroidami³⁰.

4. Wnioski

Leczenie zachowawcze w przypadku *phimosis* jest metodą znaną i powszechnie stosowaną. W porównaniu z leczeniem operacyjnym jest terapią znacznie tańszą, mniej obciążającą system ochrony zdrowia, ale przede wszystkim znacznie lepiej tolerowaną przez pacjenta oraz jego rodziców. Przegląd dostępnych raportów pokazuje, iż stosowanie miejscowej steroidoterapii w leczeniu *phimosis* jest wysoce skuteczne, przede wszystkim w postaciach mało zaawansowanych. Ta metoda nie sprawdza się natomiast u pacjentów ze zmianami zapalnymi napletka i żołądzi. Nie jest również rekomendowana u pacjentów poniżej 2. roku życia. LST, jak pokazują badania, jest bezdyskusyjnie bezpieczną formą leczenia, wiąże się z marginalnym odsetkiem działań niepożądanych. Na rynku dostępnych jest wiele preparatów zawierających różne GKS i pomimo, że proces wyboru najbardziej optymalnego i skutecznego stężenia leku nadal trwa, LST jest metodą z wyboru, korzyściami przeważającą nad interwencją chirurgiczną.

Referencje

1. Hayashi Y, Kojima Y, Mizuno K, Kohri K. Prepuce: phimosis, paraphimosis, and circumcision. *ScientificWorldJournal*. 2011;11:289-301. Published 2011 Feb 3. doi:10.1100/tsw.2011.31
2. Morris BJ, Matthews JG, Krieger JN. Prevalence of Phimosis in Males of All Ages: Systematic Review. *Urology*. 2020;135:124-132. doi:10.1016/j.urology.2019.10.003
3. Lourenção PLTA, Queiroz DS, de-Oliveira WE Junior, et al. Observation time and spontaneous resolution of primary phimosis in children. *Rev Col Bras Cir*. 2017;44(5):505-510. doi:10.1590/0100-69912017005013

4. McGregor TB, Pike JG, Leonard MP. Phimosis--a diagnostic dilemma?. *Can J Urol*. 2005;12(2):2598-2602.
5. Moreno G, Corbalán J, Peñaloza B, Pantoja T. Topical corticosteroids for treating phimosis in boys. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;(9):CD008973. Published 2014 Sep 2. doi:10.1002/14651858.CD008973.pub2
6. Shahid SK. Phimosis in children. *ISRN Urol*. 2012;2012:707329. doi:10.5402/2012/707329
7. Kikiros CS, Beasley SW, Woodward AA. The response of phimosis to local steroid application. *Pediatric Surgery International*. 1993;8(4):329-332.
8. Yang C, Liu X, Wei GH. Foreskin development in 10 421 Chinese boys aged 0-18 years. *World J Pediatr*. 2009;5(4):312-315. doi:10.1007/s12519-009-0060-z
9. La Pera G, De Luca F, Guerani A, Palmieri A, Franco G. Prevalence of phimosis and foreskin sliding abnormalities in male adolescents and their correlation with later onset of first sexual intercourse. *Arch Ital Urol Androl*. 2017;89(4):310-312. Published 2017 Dec 31. doi:10.4081/aiua.2017.4.310
10. Czajkowski M, Czajkowska K, Zarańska K, et al. Male Circumcision Due to Phimosis as the Procedure That Is Not Only Relieving Clinical Symptoms of Phimosis But Also Improves the Quality of Sexual Life. *Sex Med*. 2021;9(2):100315. doi:10.1016/j.esxm.2020.100315
11. Bromage SJ, Crump A, Pearce I. Phimosis as a presenting feature of diabetes. *BJU Int*. 2008;101(3):338-340. doi:10.1111/j.1464-410X.2007.07274.x
12. Chan IH, Wong KK. Common urological problems in children: prepuce, phimosis, and buried penis. *Hong Kong Med J*. 2016;22(3):263-269. doi:10.12809/hkmj154645
13. Hotonu S, Mohamed A, Rajimwale A, Gopal M. Save the foreskin: Outcomes of preputioplasty in the treatment of childhood phimosis. *Surgeon*. 2020;18(3):150-153. doi:10.1016/j.surge.2019.08.004

14. Daling JR, Madeleine MM, Johnson LG, et al. Penile cancer: importance of circumcision, human papillomavirus and smoking in in situ and invasive disease. *Int J Cancer*. 2005;116(4):606-616. doi:10.1002/ijc.21009
15. Larke NL, Thomas SL, dos Santos Silva I, Weiss HA. Male circumcision and penile cancer: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Causes Control*. 2011;22(8):1097-1110. doi:10.1007/s10552-011-9785-9
16. Simpson E, Carstensen J, Murphy P. Neonatal circumcision: new recommendations & implications for practice. *Mo Med*. 2014;111(3):222-230.
17. Zampieri N, Corroppo M, Zuin V, Bianchi S, Camoglio FS. Phimosis and topical steroids: new clinical findings. *Pediatr Surg Int*. 2007;23(4):331-335. doi:10.1007/s00383-007-1878-x
18. Angotti R, Molinaro F, Ferrara F, et al. Preputialplasty: can be considered an alternative to circumcision? When, how, why? Experience of Italian centre. *Gland Surg*. 2018;7(2):228-233. doi:10.21037/ggs.2018.02.04
19. Morris BJ, Waskett JH, Banerjee J, et al. A 'snip' in time: what is the best age to circumcise?. *BMC Pediatr*. 2012;12:20. Published 2012 Feb 28. doi:10.1186/1471-2431-12-20
20. Morris BJ, Moreton S, Krieger JN. Critical evaluation of arguments opposing male circumcision: A systematic review. *J Evid Based Med*. 2019;12(4):263-290. doi:10.1111/jebm.12361
21. Stehr M, Schuster T, Dietz HG, Joppich I. Die Zirkumzision--Kritik an der Routine [Circumcision--criticism of the routine]. *Klin Padiatr*. 2001;213(2):50-55. doi:10.1055/s-2001-12876
22. Williams N, Kapila L. Complications of circumcision. *Br J Surg*. 1993;80(10):1231-1236. doi:10.1002/bjs.1800801005
23. Bonner K. Male circumcision as an HIV control strategy: not a 'natural condom'. *Reprod Health Matters*. 2001;9(18):143-155. doi:10.1016/s0968-8080(01)90101-6

24. Pileggi Fde O, Vicente YA. Phimotic ring topical corticoid cream (0.1% mometasone furoate) treatment in children. *J Pediatr Surg.* 2007;42(10):1749-1752. doi:10.1016/j.jpedsurg.2007.05.035
25. Gairdner D. The fate of the foreskin, a study of circumcision. *Br Med J.* 1949;2(4642):1433-1437. doi:10.1136/bmj.2.4642.1433
26. Sookpotarom P, Asawutmangkul C, Srinithiwat B, Leethochawalit S, Vejchapipat P. Is half strength of 0.05 % betamethasone valerate cream still effective in the treatment of phimosis in young children?. *Pediatr Surg Int.* 2013;29(4):393-396. doi:10.1007/s00383-012-3253-9
27. Jørgensen ET, Svensson A. The treatment of phimosis in boys, with a potent topical steroid (clobetasol propionate 0.05%) cream. *Acta Derm Venereol.* 1993;73(1):55-56. doi:10.2340/00015555735556
28. Golubovic Z, Milanovic D, Vukadinovic V, Rakic I, Perovic S. The conservative treatment of phimosis in boys. *Br J Urol.* 1996;78(5):786-788. doi:10.1046/j.1464-410x.1996.21724.x
29. Tomic-Canic M, Komine M, Freedberg IM, Blumenberg M. Epidermal signal transduction and transcription factor activation in activated keratinocytes. *J Dermatol Sci.* 1998;17(3):167-181. doi:10.1016/s0923-1811(98)00016-4
30. Sabino Borges LG, Meirelles MF, Bernardes N, et al. Evaluation of topical corticosteroids in children with phimosis through morphological and immunohistochemical analyses of the foreskin. *Afr J Paediatr Surg.* 2019;16(1):17-22. doi:10.4103/ajps.AJPS_119_16
31. Bréaud J, Guys JM. Décalottage ou circoncision: quelle indication dans le phimosis? [Phimosis: medical treatment or circumcision?]. *Arch Pediatr.* 2005;12(9):1424-1432. doi:10.1016/j.arcped.2005.02.029
32. Raban M, Żak A, Litak J, Smolińsk R, Budny A, Turska M. Phimosis – physiology vs pathology. *Journal of Education, Health and Sport.* 2017;7(7):605-613. eISSN 2391-8306. DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.838736>

33. Słowikowska-Hilcz J. Andrologia. Zdrowie mężczyzny od fizjologii do patologii.: PZWL Wydawnictwo Lekarskie. Warszawa. 2020;1.
34. Malczyk Ż, Jarzumbek A, Kleszyk M, Ziora K, Oswiecimska J. Postępowanie ze stulejką u chłopców. *Pediatrics Polska*. 2014;89: 361-365. doi:10.1016/j.pepo.2014.04.011.
35. Berdeu D, Sauze L, Ha-Vinh P, Blum-Boisgard C. Cost-effectiveness analysis of treatments for phimosis: a comparison of surgical and medicinal approaches and their economic effect. *BJU Int*. 2001;87(3):239-244. doi:10.1046/j.1464-410x.2001.02033.x
36. Van Howe RS. Cost-effective treatment of phimosis. *Pediatrics*. 1998;102(4):E43. doi:10.1542/peds.102.4.e43
37. Orkiszewski M, Mackiewicz M, Madej J. Leczenie stulejki za pomocą miejscowo stosowanego betamethazonu: analiza skuteczności i kosztów. *Urologia Polskiej*. 2004;57:1.
38. Zwolińska E, Janik P, Ratajczak D. Analiza i ocena wyników leczenia chłopców kierowanych do poradni chirurgii dziecięcej z powodu trudności w odprowadzeniu napletka. *Wiad Lek* 2008;61:195–200.
39. Kiss A, Király L, Kutasy B, Merksz M. High incidence of balanitis xerotica obliterans in boys with phimosis: prospective 10-year study. *Pediatr Dermatol*. 2005;22(4):305-308. doi:10.1111/j.1525-1470.2005.22404.x
40. Zhou G, Jiang M, Yang Z, Xu W, Li S. Efficacy of topical steroid treatment in children with severe phimosis in China: A long-term single centre prospective study. *J Paediatr Child Health*. 2021;57(12):1960-1965. doi:10.1111/jpc.15628
41. Sabino Borges LG, Perez-Bóscollo AC, Rocha LP, et al. Foreskin analysis of circumcised boys with and without previous topical corticosteroid. *Fetal Pediatr Pathol*. 2012;31(5):265-272. doi:10.3109/15513815.2012.659381
42. Zheng PS, Lavker RM, Lehmann P, Kligman AM. Morphologic investigations on the rebound phenomenon after corticosteroid-induced atrophy in human skin. *J Invest Dermatol*. 1984;82(4):345-352. doi:10.1111/1523-1747.ep12260665

43. Silay MS, Hoen L, Quadackaers J *et al.* PT332 – Treatment of varicocele in children and adolescents: A systematic review and meta-analysis from European Association of Urology/European Society for Paediatric Urology Guidelines Panel. *Eur. Urol. Suppl.* 2019; 3: e2116.
44. Changole S, Dhane S, Agrawal N. Role of topical steroid in primary treatment of childhood phimosis. *Int. J. Res. Med. Sci.* 2017; 5: 3680– 3.
45. Ku WH, Chiu BSK, Huen KF. Outcome and recurrence in treatment of phimosis using topical betamethasone in children in Hong Kong. *J. Paediatr. Child Health* 2007; 43:74– 9.
46. Dewan PA, Tieu HC, Chieng BS. Phimosis: Is circumcision necessary? *J. Paediatr. Child Health* 1996; 32: 285– 9.
47. Ghysel C, Vander Eeckst K, Bogaert GA. Long-term efficiency of skin stretching and a topical corticoid cream application for unretractable foreskin and phimosis in prepubertal boys. *Urol. Int.* 2009; 82:81– 8.
48. Nascimento FJ, Pereira RF, Silva JN, Tavares A, Pompeo AC. Topical betamethasone and hyaluronidase in the treatment of phimosis in boys: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Int. Braz. J. Urol.* 2011;37:314– 9.
49. Zavras N, Christianakis E, Mpourikas D, Ereikat K. Conservative treatment of phimosis with fluticasone propionate 0.05%: A clinical study in 1185 boys. *J. Pediatr. Urol.* 2009;5:181– 5.
50. Lee KS, Koizumi T, Nakatsuji H, Kojima K, Yamamoto A, Kawanishi Y, et al. Treatment of phimosis with betamethasone ointment in children. *Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi* 2001;92:619–623.

LASEROTERAPIA JAKO NOWATORSKIE PODEJŚCIE DO NIETRZYMANIA MOCZU U KOBIET

**Michalina Masternak, Agnieszka Nowotarska,
Tomasz Furgoł, Agnieszka Sawina, Joanna Owsiak, Tola Kotkiewicz**

Studenckie Koło Naukowe im. Zbigniewa Religii przy Katedrze Biofizyki w Zabrze,
Wydział Nauk Medycznych w Zabrzu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Abstrakt

Wysiłkowe nietrzymanie moczu (WNM) to problem zdrowotny dotyczący wielu kobiet ze wskaźnikiem chorobowości w zakresie od 10% do 40% żeńskiej populacji. Pośród głównych przyczyn WNM wyróżniamy uraz porodowy pochwy, niedobór hormonów płciowych oraz zmniejszoną produkcję kolagenu. Kolagen odznacza się jako ważny czynnik, ponieważ jest składnikiem struktur podtrzymujących dno miednicy. W tym rozdziale przedstawiamy jedną z najnowszych metod leczenia WNM – terapię laserową z wykorzystaniem frakcyjnych laserów ablacyjnych (głównie typu CO₂ oraz Er:YAG). Stosowanie tej techniki prowadzi do strukturalnej poprawy kolagenu łonowo-szyjkowego w powięzi, mając pozytywny wpływ na grubość błony śluzowej i tym samym wzmacniając podparcie cewki moczowej. Terapie laserowe są efektywną i minimalnie inwazyjną metodą zwalczania WNM z rzadkimi krótkoterminowymi powikłaniami. Jak potwierdzają przedstawione w tekście dane medyczne, są one szczególnie korzystne dla pacjentów z przeciwwskazaniami do zabiegów inwazyjnych, mając podobną efektywność do zabiegów z wykorzystaniem taśmy dopochwowej bez napięcia i taśmy przezczasłoniowej.

Słowa kluczowe: laseroterapia, wysiłkowe nietrzymanie moczu, laser CO₂, laser Er:YAG, kolagen

Abstract

The stress urinary incontinence (SUI) is a health issue affecting many women with incidence rates ranging from 10% to 40% of female population. Main causes of SUI include vaginal childbirth injury, sex hormone deficiency and reduced collagen production. The collagen is very important to the problem as it is a vital component of pelvic floor support structures. This essay explores one of the newest SUI treatment methods – laser therapy using fractional lasers (predominantly CO₂ and Er:YAG types). Using this procedure leads to a structural enhancement of pubic-cervical collagen in fascia, having a positive effect on the thickness of the mucosa thereby strengthening the supports of the urethra. Laser therapies are an effective and minimally invasive method of fighting SUI with rare short-term complications. According to medical data presented in the text, they are particularly beneficial to patients with contraindications to invasive procedures, having similar effectiveness to procedures requiring use of a tension free vaginal tape or transobturator tape.

Keywords: laserotherapy, stress urinary incontinence, CO₂ laser, Er:YAG laser, collagen

1. Wstęp

Wysiłkowe nietrzymanie moczu (WNM) jest to nagły wzrost ciśnienia w jamie brzusznej oraz mimowolny wyciek moczu z ujścia cewki moczowej przy braku moczenia w stanie normalnym.¹

Częstość występowania w populacji kobiet waha się od 10 do 40%.²

Głównymi przyczynami są:

- Pogorszenie funkcji podporowej dna miednicy spowodowane rozluźnieniem lub urazem tych mięśni np. podczas porodu
- Uszkodzenie tkanek otaczających i podtrzymujących cewkę moczową
- Patologiczne zmiany zwieracza cewki moczowej

Tabela 1. Klasyfikacje stopni nietrzymania moczu. [opracowanie własne],³

ST. NIETRZYMANIA	SYTUACJE POWODUJĄCE WYCIEK MOCZU
I	kaszel, kichanie, podnoszenie ciężkich przedmiotów
II	szybkie chodzenie, skakanie, lekko forsowne ćwiczenia
III	zmiana pozycji ciała
IV	wyciek w spoczynku, moczenie nocne

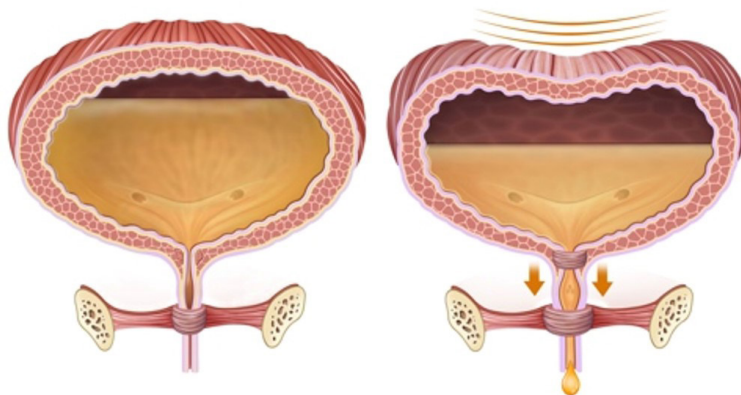
Ryzyko wystąpienia WNM zwiększa się wraz z wiekiem. Do innych czynników ryzyka zaliczymy: ciążę, poród pochwowy, stan pomenopauzalny, otyłość czy przebyte operacje ginekologiczne jak histerektomia¹

WNM wpływa na samopoczucie psychospołeczne, fizyczne czy seksualne, dlatego tak dużą wagę stawia się na szukanie coraz to nowszych i mniej inwazyjnych możliwości leczniczych.⁴

Leczenie WMN obejmuje leczenie zachowawcze oraz interwencję chirurgiczną.

Do leczenia zachowawczego zaliczamy: modyfikację stylu życia, trening oraz elektroniczną stymulację mięśni dna miednicy. Ten sposób leczenia może przynieść zadowalające efekty, niestety w większości przypadków wyniki są słabe. Spowodowane jest to brakiem regularności i samodyscypliny pacjentów. Dlatego interwencja chirurgiczna – z wykorzystaniem taśm TVT oraz TOT jest uważana za skuteczny sposób leczenia i stanowi obecnie złoty standard. Niemniej jednak w ostatnich latach wzrosło zastosowanie laserów w uroginekologii będących alternatywą i skuteczną interwencją w przypadku WNM. Stanowią one minimalnie inwazyjny i niehormonalny sposób

przywrócenia fizjologii układu moczowo-płciowego oraz poprawy jakości życia kobiet.^{5,6}



Rycina 1. Wpływ działania wzrostu ciśnienia wewnątrzbrzuszego na pęcherz moczowy⁷

2. Rodzaje laserów i ich mechanizm działania

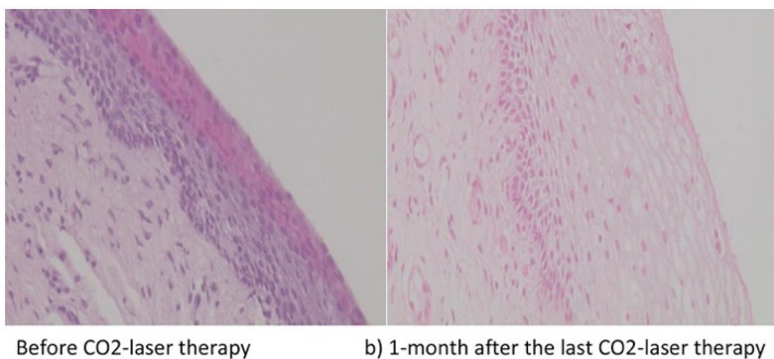
Dwa najczęściej wykorzystywane lasery to laser CO₂ oraz Er:YAG. Mają one nakładające się widma absorpcyjne i można je stosować na ludzką błonę śluzową, taką jak błona śluzowa pochwy. Celem jest wywołanie przebudowy kolagenu, zaciśnięcie tkanki podporowej i poprawa jędrności tkanki.⁵ Badania wykazały wzrost:

- proliferacji komórek powierzchniowych,
- tkanki łącznej leżącej poniżej
- grubości nabłonka pochwy
- czynnika wzrostu fibroblastów
- transformującego czynnika wzrostu beta 1 (TGF-β1),

Odpowiadają one za indukowaną laserem neokolagenezę i neoangiogenezę⁸, co zostało potwierdzone w badaniach histologicznych. Mamy do czynienia z trzema procesami: etap wczesnej utraty ciepła, etap proliferacji kolagenu i macierzy zewnątrzkomórkowej oraz końcowy etap przebudowy.¹ Celem wyżej wymienionych procesów jest wzmocnienie dna miednicy, ponieważ kobiety z WNM wykazują zmniejszone podparcie dna miednicy przy jednocześnie obniżonej ilości kolagenu.⁵

2.1. Laser CO₂

Każdy punkt wiązki składa się z kilku małych wiązek laserowych – mają one kształt siatki. Tkanki znajdujące się między punktami wiązki są podgrzewane i usuwane pod wpływem CO₂ w celu większej kontroli temperatury. Prowadzi to do rozkurczu naczyń, przebudowy i syntezy kolagenu, neowaskularyzacji, tworzenia elastyny. W dodatku napinana jest tkanka pochwy, wzrasta ciśnienie zamykania cewki moczowej – poprawia to nietrzymanie moczu, jak i ulepsza doznania seksualne.⁹ Isaza i in. wykonując analizę histologiczną przed i 6 tygodni po pierwszym leczeniu wykazali zasadniczo grubszy nabłonek pochwy z wysokim stopniem złuszczenia komórek.¹⁰ Zmiany w swoich badaniach zostały wcześniej również potwierdzone przez Zerbinati i in.¹¹



Rycina 1. Wzrost grubości nabłonka pochwy po leczeniu laserem CO₂ ¹²

Korzystne jest łączenie lasera CO₂ z osoczem bogatopłytkowym (PRP). Osocze napędza migrację, proliferację oraz różnicowanie komórek. Bierze również udział w usuwaniu resztek tkankowych, dzięki mediatorom oraz czynnikom wzrostu uwalnianym przez płytki krwi. PRP może wspomagać naprawę, gojenie i regenerację tkanek, jak również zmniejszać stan zapalny obszarów poddanych działaniu lasera, co umożliwi potencjalnie lepszy efekt terapeutyczny.⁴

2.2. Laser Er:YAG – tryb SMOOTH

Er:YAG czyli nieinwazyjny laser wykorzystujący podłoże erbowo-ityrowo-aluminiowo-granatowe emituje impulsy laserowe z sondy dopochwowej i pulsacyjnie uwalnia ciepło do ścian pochwy, aby:

- Skrócić międzycząsteczkowe poprzeczne połączenia kolagenu
- Obkurzyć włókienka kolagenowe
- Zwiększyć produkcję kolagenu

Powoduje on podparcie ściany pochwy przez neokolagenezę i w ten sposób pomaga w WNM.

Tryb techniki SMOOTH ma wielkość plamki 7mm, częstotliwość 1,6Hz oraz fluencję* 10J/cm². Tryb ten rozprowadza ciepło na kilkaset µm i osiąga głęboki i kontrolowany efekt termiczny. Powoduje to, że zabieg jest bezpieczny i pozwala uniknąć perforacji z przypadkowymi uszkodzeniami cewki moczowej, pęcherza moczowego czy odbytnicy.^{13,14} Skuteczność lasera jest porównywalna do lasera CO₂, ponieważ przy większej liczbie przejść laser osiąga podobną głębokość martwicy tkanek jak przebudowa laserem CO₂.⁵

3. Rola kolagenu w WNM

Związek między WNM, a kolagenem jest dobrze ugruntowany. Poziom kolagenu I i III jest niższy u osób dotkniętych tą dolegliwością. WNM dotyczy również wielu kobiet przed porodem. Może to wynikać z defektu tkanki łącznej z ilościową i jakościową redukcją kolagenu. Pierworódki z prawdziwym wysiłkowym nietrzymaniem moczu miały znacznie mniej kolagenu w tkankach w porównaniu z grupą kontrolną. Zaobserwowano obniżony stosunek kolagenu typu I do typu III oraz spadek zawartości usieciowania u kobiet z prawdziwym WNM^{15,16} Proces starzenia i zmiany hormonalne w okresie pomenopauzalnym zmienia metabolizm tkanek łącznych i zmniejsza się produkcja kolagenu, co skutkuje dysfunkcją dna miednicy.⁶

4. Przebieg zabiegu

4.1. Leczenie pacjentek laserem CO₂

1. Pacjentki układają się w pozycji litotomicznej
2. Pochwę pacjentki przemywa się roztworem dezynfekującym i osusza wacikiem.
3. Ksyllokaina 2% jest aplikowana do przedsionka i wlotu na 3–5 minut jako znieczulenie miejscowe - jeśli pacjentka boi się bólu.
4. Narzędzie umieszcza się w pochwie pacjentek.

* Energia lasera dostarczana na jednostkę powierzchni

5. Leczenie rozpoczyna się od szczytu pochwy.
6. Po każdym naświetlaniu, narzędzie obraca się o 60° i przesuwa się o 1 cm w kierunku ujścia pochwy
7. Napromienianie zatrzymuje się w odległości około 1 cm od zewnętrznego ujścia cewki moczowej⁹

4.2. Leczenie pacjentek laserem ER:YAG

1. Pacjentki układa się w pozycji do litotomii ginekologicznej
2. Oczyszczenie i dezynfekcja obszarów poddanych zabiegowi
3. Naświetlenie laserem z rękojeścią z okrągłym adapterem całej ścian pochwy, przez dwa przejścia pod strumieniem $3\text{J}/\text{cm}^2$
4. Napromienienie laserem z rękojeścią z adapterem kątowym przedniej ściany pochwy od najbardziej dystalnej części w kierunku wejścia z natężeniem światła $6\text{J}/\text{cm}^2$, wykonując 6 przejść pod różnym kątem (30° różnicy między sobą)
5. Naświetlenie przedsionka i wejścia do pochwy z prostym adapterem i fluktuacją $10\text{J}/\text{cm}^2$ ⁵

5. Efekty terapii

Efekt fototermiczny sprawia, że zarówno terapie laserowe ER:YAG, jak i CO₂ przebudowują i naprawiają tkankę poprzez zwiększenie grubości nabłonka pochwy i zwiększenie magazynowania glikogenu w komórkach nabłonka, co prowadzi do wzmocnienia podparcia cewki moczowej i napięcia tkanki podporowej.⁵

Jednakże badania Hutchinson-Colasa i in. wykazały, że dodatkowe działanie ablacyjne polegające na odparowaniu wody w komórkach wskutek błyskawicznego jej podgrzania wiązką lasera dotyczy tylko lasera CO₂.¹⁷

Do zbadania satysfakcji pooperacyjnej pacjentek po menopauzie z wysiłkowym nietrzymaniem moczu o nasileniu od łagodnego do umiarkowanego poddanych terapii laserowej CO₂ w szpitalu Uniwersytetu Hebei wykorzystano trzy kwestionariusze:

1. Stopień nietrzymania moczu,
2. Wynik Kwestionariusza Nietrzymania Moczu (ICI-Q-SF),
3. Skalę Jakości Życia Nietrzymania Moczu (I-QOL)).

Wykazano wówczas wyraźną poprawę jakości życia pacjentów i świadczą o tym podwyższenie wyniku w skali I-QOL oraz zmniejszenie wycieku moczu, czyli zmniejszenie wyniku w skali ICL-Q-SF. U pacjentów nie wystąpiły żadne oczywiste powikłania. Trend uzyskania wyników w czasie wykazuje, że skuteczność terapii staje się mniej oczywista, ale pacjenci mogą korzystać z efektów leczenia.⁹

Z kolei metaanaliza Yunong Wang i in. wykazała w podgrupach ICIQ-SF po 3 miesiącach, że sesje leczenia osiągały większą poprawę w stosunku do wyników z 1 lub 2 sesji. Optymalnie przeprowadza się trzy sesje w odstępach miesięcznych, przy większej ilości sesji tendencja do poprawy nie została odnotowana w badaniach. Ważnym jest, aby przeprowadzać coroczne zabiegi podtrzymujące w celu utrzymania efektów laseroterapii na satysfakcjonującym poziomie.¹⁸

6. Bezpieczeństwo terapii

Laseroterapia wydaje się być skuteczną i mało inwazyjną opcją leczenia WMM. Wśród poważnych zdarzeń niepożądanych wyróżniamy: blizny, oparzenia, dyspareunię oraz przewlekły ból.^{18,19} Laser CO₂ powoduje większe szcążkowe uszkodzenie termicznie, co wiąże się z większą przebudową tkanek, ale i częstszym występowaniem przedłużonego rumienia pooperacyjnego. W przypadku lasera ER:YAG, gdzie termiczne uszkodzenie szcążkowe jest mniejsze jest on niezauważalny ze względu na szybszy proces gojenia się.⁵ Najczęściej zgłaszane objawy niepożądane podczas leczenia laserem Er:YAG to pieczenie podczas zabiegu i delikatne krwawienie z pochwy przez pierwszy tydzień.¹⁴ W badaniu prowadzonym przez Szpital Uniwersytecki w Hebei jedna z 29 pacjentek biorących udział w badaniu skarżyła się na zwiększoną wydzielinę z pochwy pierwszego dnia, trwającą do dnia trzeciego po zabiegu. Pojawił się również przypadek swędzenia pochwy. Objaw ten również ustąpił 3 dni po zabiegu. Nie wystąpiły powikłania takie jak: bolesne czy częste oddawanie moczu, parcie na mocz, infekcja, dyspareunia i ból podczas stosunku.⁹

W przypadku obu laserów zaleca się unikanie stosunków płciowych w pochwie przez co najmniej 3 dni (najlepiej 7 dni) po zastosowaniu lasera, by zapobiec reakcji zapalnej.^{5,6} Porównując do chirurgicznego leczenia WNM to laseroterapia stanowi rozwiązanie znacznie łatwiejsze w praktyce i bezpieczne, ze względu na zgłaszane tylko minimalne skutki uboczne przez pacjentów. Zarówno badania Tiena i in. oraz Orginic i in. wykazały, że laser ER:YAG stanowi obiecującą strategię leczenia WNM z korzyściami leczenia trwającego

co najmniej rok.^{16,20}

7. Inne możliwe terapie

Tabela 2. Przedstawia wybrane metody leczenia WNM [opracowanie własne]⁶

Metody leczenia	Trening MDM	Farmakoterapia	PESSARY	Operacje z użyciem taśm	Operacje bez użycia taśm
Inwazyjność metody	Nieinwazyjne	Nieinwazyjne	Minimalnie inwazyjne	Mało inwazyjne	Inwazyjne

7.1. Fizjoterapia i wzmocnienie mięśni dna miednicy (MDM)

Trening mięśni dna miednicy jest metodą nieinwazyjną i w związku z tym jest zalecany jako leczenie pierwszego rzutu nietrzymania moczu u kobiet.⁶ Badania naukowe w dalszym ciągu nie wykazały jednak, które obciążenie treningowe zapewni najlepsze efekty u kobiet z WNM. Powyższa opcja terapeutyczna wymaga konsekwentnego wysiłku i jest czasochłonna, oczekując dużych efektów program powinien trwać 6-12 tygodni, przy więcej niż trzech sesjach tygodniowo i każdej o długości do około 45 min. Analizując test wkładek udowodniona została skuteczność treningów pod postacią zmniejszenia utraty moczu u kobiet z WNM niezależnie od protokołu zastosowanego w badaniach.²¹ Jest natomiast mało prawdopodobne, aby pacjentki przestrzegały obowiązku wykonywania regularnych ćwiczeń dna miednicy.¹⁰

7.2. Operacje z użyciem taśm

Najpopularniejszymi zabiegami przeprowadzanymi u kobiet cierpiących na WNM są operacje z użyciem taśm i stanowią one tzw. złoty standard leczenia. Wykonywane są operacje: zasłonowe taśmą dopochwową bez napięcia TVT oraz przezasłoniowe TOT pętlą śródczewkowa MUS. Wyższe wskaźniki wyleczeń osiąga TVT niż TOT, ale związane jest to również z większym ryzykiem powikłań i objawów z dolnych dróg moczowych.²² W metodzie zasłonowej TVT od strony pochwy wprowadzana jest taśma, a następnie nad spojeniem łonowym wykonywane są dwa nacięcia do wyprowadzenia końcówek taśmy na zewnątrz by wszyć je pod skórę. Metoda TOT polega na zastosowaniu syntetycznej taśmy, która zostaje wprowadzona przez nacięcia w pachwinach. Wszczepiana zostaje pod cewkę moczową polipropylenową

taśma, która z czasem przerasta tkanki pacjentki i stymuluje miejscową produkcję kolagenu podpierając cewkę moczową i zapobiegając wyciekowi moczu. Ten rodzaj taśmy przechodzi przez otwór zasłonowy, będący otworem między kośćmi miednicy.²³ Do powikłań zabiegów zaliczamy krwawienia, ból podczas stosunku płciowego, nadżerki, uraz cewki moczowej, infekcje, przewlekły ból podczas oddawania moczu i wtórne zatrzymanie moczu, co prowadzi do niechęci pacjentek do poddania się temu zabiegowi chirurgicznemu.^{6,18}

7.3. Operacje bez użycia taśm

Metodą najbardziej znaną i sprawdzoną jest zawieszenie pochwy inaczej zwane kolposuspensją metodą Burcha. Stanowi ona opcję leczenia wtórnego, po pętlach śródcewkowych jest leczeniem kolejnego rzutu, ponieważ jest bardziej inwazyjna.⁴ Wykonywane jest zwłaszcza w przypadkach, gdy WNM związane jest z nadmierną ruchomością cewki moczowej. U takich pacjentów laseroterapia nie odniesie sukcesu terapeutycznego, ponieważ poza osłabieniem lub/i przerwaniem mięśni dna miednicy, dodatkowo mamy do czynienia z osłabieniem zwieracza cewki moczowej, co przyczynia się do nasilenia zaburzeń pracy zwieracza wewnętrznego.⁶ Celem kolposuspensji jest zapewnienie podparcia cewki moczowej i zaciśnięcie tkanki podtrzymującej dolne drogi moczowe. Polega on na uniesieniu szyi pęcherza i proksymalnej cewki moczowej w obszarze ucisku śródbrzusznego za spojeniem łonowym. Dzięki zabiegowi uzyskujemy wyleczenie umiarkowanego lub ciężkiego wysiłkowego nietrzymania moczu.³ Technika posiada wiele zalet i jest stosunkowo łatwa, rezultaty są satysfakcjonujące, oraz koszty zabiegu są niskie w porównaniu do innych metod leczenia chirurgicznego. Niemniej jednak wiąże się ona z dużą ilością poważnych zdarzeń niepożądanych takich jak perforacja pęcherza, uszkodzenie jelit, duże krwawienie wymagające przetoczenia krwi, krwimocz oraz pooperacyjne zatrzymanie moczu.²⁴

7.4. Pessary pochwy

Pessary są to urządzenia dopochwowe, które podnoszą kąt pęcherzowo-cewkowy i tym samym stabilizują cewkę moczową oraz połączenia cewki moczowo-pęcherzowej. Umożliwia to prawidłowe przenoszenie ciśnienia oraz aktywnie zwiększa opór cewki moczowej na wycieki moczu między innymi w sytuacjach wysiłkowych.²⁵ W przypadku kobiet aktywnych seksualnie mogą powodować problemy ze współżyciem. Ponadto mogą być problematyczne

u kobiet z zanikiem pochwy i z problemami z poruszaniem się, ze względu na konieczność regularnych badań. Może być to traumatyczne, bolesne i wymagające dodatkowo miejscowej terapii estrogenowej.²⁶

7.5. Miejscowo stosowane estrogeny

Receptory estrogenowe występują w całym układzie moczowo-płciowym oraz w mięśniach dna miednicy. Miejscowo stosowane estrogeny (w szczególności estriol) wpływają na zwiększenie syntezy kolagenu, zwiększają napięcie mięśnia zwieracza cewki moczowej oraz zmniejszają częstotliwość skurczów rozwieracza promując rozluźnienie mięśnia.^{2,4} Wybór tej terapii odradza się kobietom z historią występowania powikłań sercowo-naczyniowych, zakrzepowo-zatorowych lub nowotworów estrogenozależnych zwłaszcza raka piersi. Ponadto korzyści utrzymują się tylko podczas stosowania estrogenów. Wymaga to od pacjenta skrupulatności i regularności.²⁶

7.6. Farmakoterapia ogólna - duloksetyna

Duloksetyna jest lekiem zatwierdzonym w Europie do leczenia WNM. Do działań niepożądanych leku należą zaburzenia psychiczne i samobójstwa, stąd szkody terapii powyższym lekiem przewyższają korzyści. Co sprawia, że treningi mięśni dna miednicy, czy operacja są bardziej opłacalne niż duloksetyna.²

8. Ograniczenia badań

Należy wziąć pod uwagę, że badania prowadzone nad skutecznością laseroterapii mają często charakter subiektywny, co może wpływać na jakość wyników. Ponadto pacjenci nie zawsze uzupełniają dane dotyczące przebiegu i efektów zabiegu. Niektórzy przerywają udział w badaniu i nie kontynuują zabiegu, co również negatywnie wpływa na rzetelność wyników.²⁶

9. Podsumowanie

Wysiłkowe nietrzymanie moczu jest powszechnym i uciążliwym problemem, zarówno na poziomie osobistym, jak i gospodarczym kraju.⁴

Laseroterapia stanowi obiecującą metodę leczenia, ale aby uzyskać

wnioski bardziej zgodne z naukowymi standardami, należałoby powtórzyć badanie, z większą ilością pacjentów oraz podzielić ich na grupy, a następnie zastosować:

1. Terapię laserem CO₂ (grupa I)
2. Terapię laserem Er:YAG (grupa II)

Pacjenci powinni być obserwowani przez dłuższy czas, aby lepiej określić skuteczność leczenia.^{9,26} Większość pacjentek wykazywać powinna WNM I lub II stopnia. Skuteczność leczenia cięższych postaci powinna zostać dokładniej przebadana, na chwilę obecną są pojedyncze doniesienia o możliwości uniknięcia lub odroczenia operacji dzięki stosowaniu terapii laserowej, jednakże znaleźć możemy również badania wykluczające zastosowanie lasera w ciężkim WNM.^{14,18} Wiele prospektywnych badań wykazuje skuteczność leczniczą porównywalną z miejscowym leczeniem hormonalnym, jak i z zabiegami TVT oraz TOT. Zabiegi pętlą śródcewkową MUS są standardem leczenia, jednak inwazyjność i długi czas rekonwalescencji są wadami tej procedury, dlatego tak ważne jest wdrażanie nowych rozwiązań terapeutycznych.^{4,6} Jednym z nich jest laserowa terapia WNM, ponieważ stanowi opcję niechirurgiczną, niehormonalną, minimalnie inwazyjną, trwałą i niskiego ryzyka, a co za tym idzie może ona stanowić alternatywę leczniczą lub opóźnić chirurgiczną operację leczenia tego schorzenia.^{9,26}

Referencje

1. Zhang, L., Lai, Y., Pan, W., Zhou, B., Qiang, X., Mao, Z., & Wan, T. (2021). Application of ultra pulse CO₂ lattice laser in the treatment of female urinary incontinence. In *Translational Andrology and Urology* (Vol. 10, Issue 6, pp. 2471–2477). AME Publishing Company. <https://doi.org/10.21037/tau-21-337>
2. Capobianco, G., Madonia, M., Morelli, S., Dessole, F., De Vita, D., Cherchi, P. L., & Dessole, S. (2018). Management of female stress urinary incontinence: A care pathway and update. In *Maturitas* (Vol. 109, pp. 32–38). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2017.12.008>
3. Veit-Rubin, N., Dubuisson, J., Ford, A., Dubuisson, J., Mourad, S., & Digesu, A. (2019). Burch colposuspension. In *Neurourology and Urodynamics* (Vol. 38, Issue 2, pp. 553–562). Wiley. <https://doi.org/10.1002/nau.23905>

4. Behnia-Willison, F., Nguyen, T. T. T., Norbury, A. J., Mohamadi, B., Salvatore, S., & Lam, A. (2020). Promising impact of platelet rich plasma and carbon dioxide laser for stress urinary incontinence. In *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology: X* (Vol. 5, p. 100099). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.eurox.2019.100099>
5. Lin, H.-Y., Tsai, H.-W., Tsui, K.-H., An, Y.-F., Lo, C.-C., Lin, Z.-H., Liou, W.-S., & Wang, P.-H. (2018). The short-term outcome of laser in the management of female pelvic floor disorders: Focus on stress urine incontinence and sexual dysfunction. In *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* (Vol. 57, Issue 6, pp. 825–829). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2018.10.010>
6. Franić, D., & Fistonić, I. (2019). Laser Therapy in the Treatment of Female Urinary Incontinence and Genitourinary Syndrome of Menopause: An Update. In *BioMed Research International* (Vol. 2019, pp. 1–9). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2019/1576359>
7. https://brisbaneurologyclinic.com.au/urinary-incontinence/?fbclid=IwAR2kJsbZc-01Mt_H86ZPLkYRhkV751A-kelXjVkydD8jaQsnEtjB078kans dostęp 12.02.2022
8. Charalampous, I., Tailor, V. K., & Digesu, A. (2020). Vaginal laser for overactive bladder syndrome. In *International Urogynecology Journal* (Vol. 31, Issue 8, pp. 1515–1517). Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1007/s00192-020-04319-z>
9. Wu, Y., Shen, D., Zhang, Y., Cui, Z., & Yang, W. (2021). Efficacy evaluation of Lattice Carbon Dioxide Laser Therapy in the treatment of postmenopausal patients with mild to moderate stress urinary incontinence. In *Pakistan Journal of Medical Sciences* (Vol. 37, Issue 7). Pakistan Journal of Medical Sciences. <https://doi.org/10.12669/pjms.37.7.4077>
10. González Isaza, P., Jaguszewska, K., Cardona, J. L., & Lukaszuk, M. (2017). Long-term effect of thermoablative fractional CO2 laser treatment as a novel approach to urinary incontinence management in women with genitourinary syndrome of menopause. In *International Urogynecology Journal* (Vol. 29, Issue 2, pp. 211–215). Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1007/s00192-017-3352-1>

11. Zerbinati, N., Serati, M., Origoni, M., Candiani, M., Iannitti, T., Salvatore, S., Marotta, F., & Calligaro, A. (2014). Microscopic and ultrastructural modifications of postmenopausal atrophic vaginal mucosa after fractional carbon dioxide laser treatment. In *Lasers in Medical Science* (Vol. 30, Issue 1, pp. 429–436). Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1007/s10103-014-1677-2>
12. Pitsouni E, Grigoriadis T, Zacharakis D, et al. CO₂-laser therapy in women with severe symptoms of vaginal atrophy: a pilot histopathological study. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2017;211:201. doi:10.1016/j.ejogrb.2017.01.031
13. Su, C.-F., Chen, G.-D., & Tsai, H.-J. (2019). Preliminary outcome of non-ablative vaginal Erbium laser treatment for female stress and mixed urinary incontinence. In *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* (Vol. 58, Issue 5, pp. 610–613). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2019.07.006>
14. Lin, K.-L., Chou, S.-H., & Long, C.-Y. (2019). Effect of Er:YAG Laser for Women with Stress Urinary Incontinence. In *BioMed Research International* (Vol. 2019, pp. 1–7). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2019/7915813>
15. Keane DP, Sims TJ, Abrams P, Bailey AJ. Analysis of collagen status in premenopausal nulliparous women with genuine stress incontinence. *BJOG:An international journal of O&G*. 1997;104(9):994-998. doi:10.1111/j.1471-0528.1997.tb12055.x
16. Tien, Y.-W., Hsiao, S.-M., Lee, C.-N., & Lin, H.-H. (2016). Effects of laser procedure for female urodynamic stress incontinence on pad weight, urodynamics, and sexual function. In *International Urogynecology Journal* (Vol. 28, Issue 3, pp. 469–476). Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1007/s00192-016-3129-y>
17. Hutchinson-Colas, J., & Segal, S. (2015). Genitourinary syndrome of menopause and the use of laser therapy. In *Maturitas* (Vol. 82, Issue 4, pp. 342–345). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2015.08.001>

18. Wang, Y., Wang, C., Song, F., Zhou, Y., & Wang, Y. (2021). Safety and efficacy of vaginal laser therapy for stress urinary incontinence: a meta-analysis. In *Annals of Palliative Medicine* (Vol. 10, Issue 3, pp. 2736–2746). AME Publishing Company. <https://doi.org/10.21037/apm-20-1440>
19. Bhide, A. A., Khullar, V., Swift, S., & Digesu, G. A. (2018). The use of laser in urogynaecology. In *International Urogynecology Journal* (Vol. 30, Issue 5, pp. 683–692). Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1007/s00192-018-3844-7>
20. Ogrinc, U. B., Senčar, S., & Lenasi, H. (2015). Novel minimally invasive laser treatment of urinary incontinence in women. In *Lasers in Surgery and Medicine* (Vol. 47, Issue 9, pp. 689–697). Wiley. <https://doi.org/10.1002/lsm.22416>
21. García-Sánchez, E., Ávila-Gandía, V., López-Román, J., Martínez-Rodríguez, A., & Rubio-Arias, J. Á. (2019). What Pelvic Floor Muscle Training Load is Optimal in Minimizing Urine Loss in Women with Stress Urinary Incontinence? A Systematic Review and Meta-Analysis. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 16, Issue 22, p. 4358). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijerph16224358>
22. Fusco, F., Abdel-Fattah, M., Chapple, C. R., Creta, M., La Falce, S., Waltregny, D., & Novara, G. (2017). Updated Systematic Review and Meta-analysis of the Comparative Data on Colposuspensions, Pubovaginal Slings, and Midurethral Tapes in the Surgical Treatment of Female Stress Urinary Incontinence. In *European Urology* (Vol. 72, Issue 4, pp. 567–591). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2017.04.026>
23. <https://www.yourpelvicfloor.org/conditions/mid-urethral-sling-mus-procedures-for-stress-incontinence/> dostęp 12.02.2022
24. Chang, C.-P., Chang, W.-H., Hsu, Y.-M., Chen, Y.-J., Wen, K.-C., Chao, K.-C., Yen, M.-S., Horng, H.-C., Wang, P.-H., Chuang, C.-M., Chang, Y.-H., Wu, H.-H., Lau, H.-Y., Tseng, J.-Y., Tsai, H.-W., Twu, N.-F., & Chao, H.-T. (2015). Comparison of single-incision mini-slings (Ajust) and standard transobturator midurethral slings (Align) in the management of female stress urinary

- incontinence: A 1-year follow-up. In *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* (Vol. 54, Issue 6, pp. 726–730). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2015.10.007>
25. Bhatia, N. N., Bergman, A., & Gunning, J. E. (1983). Urodynamic effects of a vaginal pessary in women with stress urinary incontinence. In *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (Vol. 147, Issue 8, pp. 876–884). Elsevier BV. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(83\)90239-9](https://doi.org/10.1016/0002-9378(83)90239-9)
26. Behnia-Willison, F., Nguyen, T. T. T., Mohamadi, B., Vancailie, T. G., Lam, A., Willison, N. N., Zivkovic, J., Woodman, R. J., & Skubisz, M. M. (2019). Fractional CO2 laser for treatment of stress urinary incontinence. In *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology: X* (Vol. 1, p. 100004). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.eurox.2019.100004>

NAJNOWSZE TECHNOLOGIE W CHIRURGICZNYM LECZENIU TĘTNIAKÓW AORTY BRZUSZNEJ

Małgorzata Dyga¹, Zuzanna Kasieczka¹,
Patrycja Piłat¹, Katarzyna Grudnik¹, Rafał Kołodziej²

1. Studenckie Koło Naukowe im. Zbigniewa Religii przy Katedrze Biofizyki w Zabrze,
Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

2. Studenckie Koło Patomorfologii przy katedrze Nauk Morfologicznych
Uniwersytetu Rzeszowskiego, Kolegium Nauk Medycznych uniwersytetu Rzeszowskiego

Abstrakt:

Tętniaki aorty zajmują drugie miejsce, zaraz po miażdżycy, w klasyfikacji najczęstszych chorób aorty. Możemy je zdefiniować jako lokalne poszerzenie wspomnianego naczynia o co najmniej 50% normy. Podstawowym, ale jednocześnie sztucznym podziałem tętniaków jest anatomiczny podział na tętniaki aorty brzusznej i piersiowej. Celem tego rozdziału jest przybliżenie najnowszych metod chirurgicznych i technologii w leczeniu tętniaków aorty brzusznej (AAA). Głównymi czynnikami ryzyka zachorowania są: wiek, płeć męska, palenie papierosów oraz pozytywny wywiad rodzinny w tym kierunku. U mężczyzn występowanie AAA jest nawet ośmiokrotnie częstsze niż u kobiet- w przedziale wiekowym 75-84 lat i wynosi aż 12,5%. Postępowanie terapeutyczne zależy od średnicy tętniaka. W przypadku asymptomatycznego tętniaka poniżej 55mm stosujemy leczenie zachowawcze i eliminujemy czynniki ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. Jeśli jednak jego wymiar jest większy niż 55mm lub dojdzie do pęknięcia zmiany konieczne jest leczenie inwazyjne. Planując postępowanie operacyjne możemy rozważać zabieg „na otwarto” lub endowaskularny (EVAR). Odkąd w 1991 roku implantowano pierwszy stentgraft u pacjenta z tętniakiem aorty brzusznej. Metody endowaskularne w leczeniu tego schorzenia zaczęły się dynamicznie rozwijać i zdominowały leczenie inwazyjne. W rozdziale zostały przedstawione zalety i wady metod operacyjnych takich jak: klasyczny zabieg otwarty, EVAR, przeszkojnej techniki endowaskularnej (pEVAR). Ponadto omówione zostały najnowsze protezy naczyniowe takie jak TREO® czy GORE® EXCLUDER® oraz zaawansowane techniki mocowania stentgraftów z rozgałęzieniami dla tętnic trzewnych lub nerkowych m.in. technika fenestracji i kominowa.

Słowa kluczowe: tętniak aorty brzusznej, EVAR, metody endowaskularne, stentgraft, chirurgia naczyniowa

Abstract:

Aortic aneurysms rank second after atherosclerosis in the classification of the most common aortic diseases. We can define them as a local widening of the vessel by at least 50% of the norm. The basic, yet artificial, division of aneurysms is the anatomical division into aneurysms of the abdominal and thoracic aorta. The aim of this chapter is to introduce you to the

latest surgical techniques and technologies for the treatment of abdominal aortic aneurysms (AAA). The main risk factors for the disease are: age, male gender, smoking and family history of AAA. In men, the occurrence of AAA is even eight times more frequent than in women - in the 75-84 age group it amounts to as much as 12.5%. Treatment depends on the size of the aneurysm. In the case of an asymptomatic aneurysm below 55mm, we apply conservative treatment and eliminate risk factors for cardiovascular diseases. However, if its dimension is greater than 55mm or the lesion ruptures, invasive treatment is required. When planning the surgical procedure, we can consider an "open" or endovascular (EVAR) procedure. Since 1991 when the first stent graft was implanted in a patient with abdominal aortic aneurysm. Endovascular methods for the treatment of this disease began to develop dynamically and dominated invasive treatment options. This chapter presents the advantages and disadvantages of surgical methods such as: classic open surgery, EVAR, percutaneous endovascular technique (pEVAR). In addition, we discuss the latest vascular prostheses such as TREO® or GORE® EXCLUDER®, as well as advanced techniques for attaching stent grafts with branches for visceral or renal arteries, including fenestration and chimney technique.

Keywords: AAA, EVAR, endovascular surgery, stentgraft, vascular surgery

1. Wstęp

Tętniaki aorty brzusznej (AAA- abdominal aortic aneurysm) definiujemy jako poszerzenie średnicy ścian aorty o ponad 3 cm. W niektórych publikacjach używa się też alternatywnej definicji określającej zmianę jako wzrost średnicy aorty o ponad 50%. Jednak w praktyce nie zawsze jest możliwa ocena poszerzenia w procentach, gdyż granice zdrowej części naczynia są często zatarte i trudno definitywnie stwierdzić konkretne miejsce, w którym rozpoczyna się zmieniona tętniaka¹. Patogeneza powstawania AAA nie została dokładnie poznana. Przez długi czas dominowała teoria, że jest to końcowe stadium miażdżycy. Mechanizm kompensacyjny organizmu na nadbudowę płytki miażdżycowej przebudowuje naczynie, ostatecznie je poszerzając. Nieprawidłowy przepływ krwi w naczyniu wywołuje jego remodeling, idealnie powinien być on nieznacznym poszerzeniem naczynia umożliwiającym właściwy przepływ, jednak u niektórych pacjentów jest on patologiczny i prowadzi do powstania tętniaka. Obecnie badacze skłaniają się ku alternatywnej teorii sugerującej, że to reakcja zapalna odgrywa dużą rolę w rozwoju i progresji tętniaka. Wiele wskazuje, że chroniczne zapalenie aorty prowadzi do zniszczenia warstwy środkowej naczynia oraz powoduje dysfunkcje i apoptozę komórek mięśniowych gładkich. Potwierdzeniem tej teorii są badania na modelach zwierzęcych, w których wykryto mediatory zapalne w okolicy poszerzenia aorty oraz wyniki badań histopatologicznych usuniętych fragmentów aorty u pacjentów po otwartej operacji naprawczej AAA². Czynnikiem ryzyka tego schorzenia jest palenie tytoniu, płeć męska, wiek, występowanie w rodzinie AAA, miażdżyca, choroby tkanki łącznej np. zespół Marfana. Co ciekawe, mimo iż cukrzyca jest wiodącym czynnikiem ryzyka chorób kardiowaskularnych, w przypadku

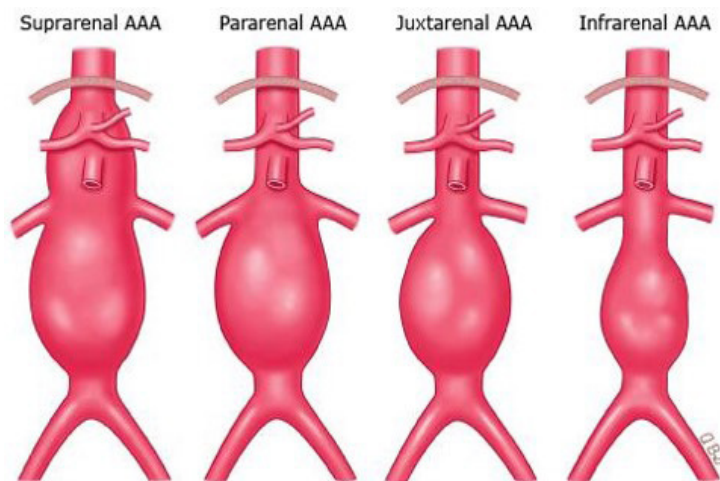
tętniaków nie stanowi zagrożenia³. Istnieją nawet badania sugerujące, że terapia metforminą prowadzi do zatrzymania wzrostu tętniaka, a u niektórych pacjentów nawet do zmniejszenia jego średnicy⁴. Ryzyko zachorowania wzrasta wraz z wiekiem u mężczyzn w wieku 45-54 lat wynosi 1,3%, a w grupie 75-85 lat aż 12,5%. Zapadalność w grupie kobiet jest znacznie niższa i stanowi odpowiednio w obu przedziałach wiekowych 0,5% oraz 2%. Geneza tak dużych różnic w statystykach zachorowania pozostaje nieznana⁵. Badając różnice w zapadalności na AAA próbowano sprawdzić skąd wynikają różnice między płciami. Sprawdzano np. czy obecność lub brak hormonów męskich lub żeńskich wpływa na formację tętniaków jednak wyniki były niekonkluzywne. Ludzki układ hormonalny i jego zmienność prezentowana np. w cyklu menstruacyjnym czy andro/menopauzie jest trudna do odwzorowania na modelach zwierzęcych i przez to skomplikowana do monitorowania. Nie można jednoznacznie określić czy poziomy hormonów są czynnikiem predysponującym do rozwoju AAA. Istnieje natomiast wiele badań na temat związku między płcią a wynikami leczenia już istniejących zmian. Ryzyko zgonu w przypadku nieleczonych tętniaków aorty jest większe u kobiet niż u mężczyzn, szacuje się że nawet 4 razy większe. Występuje również wyższa śmiertelność okołozabiegowa i poważne powikłania u kobiet niezależnie czy zabieg jest przeprowadzany endowaskularnie, czy metodą otwartą. Może to wynikać z faktu, iż u kobiet tętniaki pojawiają się w późniejszym wieku. Śmiertelność pooperacyjna w opiece szpitalnej również jest oceniana jako wyższa w przypadku kobiet^{6,7,8}. Na podstawie tych danych można wysnuć wniosek, iż tętniaki występują częściej u mężczyzn, jednak u płci żeńskiej stanowią zagrożenie obarczone wyższą śmiertelnością. AAA jest przyczyną około 172 000 śmierci rocznie na świecie, co stanowi 0,31%. W Polsce odpowiada za około 2300 zgonów rocznie czyli 0,56%, porównując ten wynik do statystyk globalnych śmierć z powodu AAA jest prawie dwukrotnie wyższa w naszym kraju⁹. U większości pacjentów tętniaki nie dają żadnych objawów dopóki nie dojdzie do ich pęknięcia. To najpoważniejsze powikłanie jest stanem zagrażającym życiu charakteryzującym się ostrym bólem i wstrząsem. W badaniu palpacyjnym brzucha możemy wykryć dopiero bardzo zaawansowane zmiany, które są znacznie powiększone i grożą pęknięciem. Do diagnostyki i kontroli stanu pacjenta najlepszym badaniem jest USG jamy brzusznej. Natomiast CT i MRI służą do przedoperacyjnej i pooperacyjnej oceny oraz planowania zabiegu¹. Zważywszy, że przyjmuje się, iż ryzyko pęknięcia tętniaka wynosi średnio 81% w niektórych krajach prowadzi się badania przesiewowe w tym kierunku (USA, Anglia, Szwecja). WHO sugeruje, że takie działania mogą być efektywne i opłacalne. Natomiast

USPSTF zdecydowanie zaleca jednorazowe badanie mężczyzn między 65-75 rokiem życia którzy kiedykolwiek byli palaczami. USG ma wysoką czułość 94-100% i swoistość 98-100%, jest nieinwazyjne i proste do przeprowadzenia nie narażając przy tym pacjentów na radiację. Te wszystkie czynniki sprawiają, iż badanie przesiewowe jest skuteczne i nie generuje dużych kosztów^{10,11,12}.

2. Anatomia aorty brzusznej i podstawowe pojęcia

Aorta jest główną tętnicą ludzkiego organizmu od której odchodzą wszystkie naczynia doprowadzające utlenowaną krew na obwód ciała. Pod względem przebiegu dzielimy ją na aortę wstępującą, łuk aorty i aortę zstępującą. W najdłuższej z części aorty- aorta zstępująca, wyróżniamy jeszcze część piersiową i brzuszną. W tym rozdziale skupimy się na chirurgicznych metodach leczenia odcinka brzuszego. Rozciąga się on od rozworu aortalnego przepony (poziom 12 kręgu piersiowego) i sięga aż do 4 kręgu lędźwiowego¹³. Jej wielkimi odgałęzieniami są: pień trzewny, t. kręzkowa górna i dolna, oraz tt. nerkowe. W tym odcinku aorty lokalizuje się około 80% AAA, z których większość jest podnerkowa¹⁴. Tętniaki aorty brzusznej dzielimy zależnie od ich lokalizacji w odniesieniu do naczyń nerkowych:

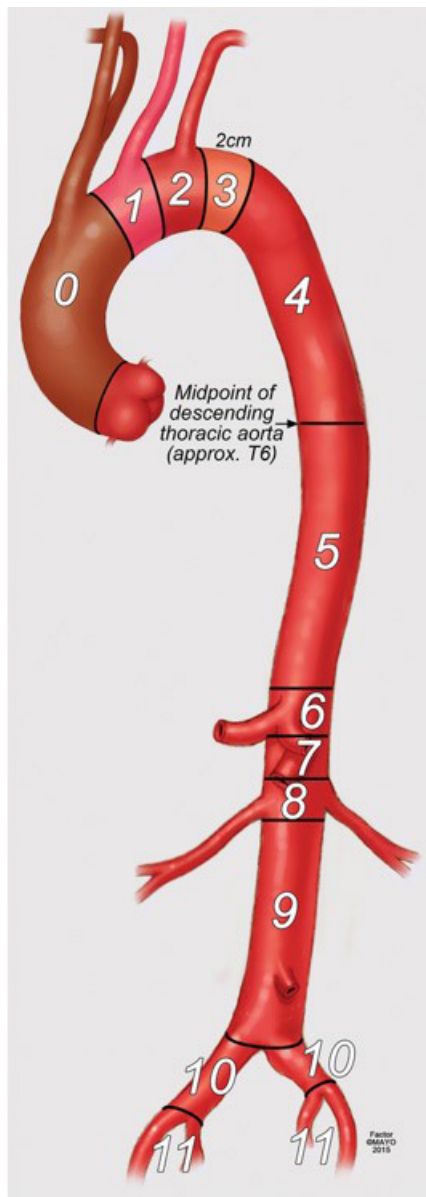
- **Suprarenal (Nadnerkowe) AAA:** Tętniak rozpoczyna się ponad tętnicami nerkowymi, obejmuje początek jednej lub więcej tętnic trzewnych, ale nie rozciąga się do klatki piersiowej.
- **Pararenal AAA:** Tętnice nerkowe wychodzą z aorty zmienionej tętniakiem, ale aorta na poziomie tętnicy kręzkowej górnej nie jest tętniakiem. Jest on wyróżniany w anglosaskiej literaturze jako odrębny od okołonerkowego, jednak w polskiej klasyfikacji są one traktowane wspólnie i określane mianem okołonerkowych.
- **Juxtarenal (Okołonerkowe) AAA:** Tętniak powstaje tuż za początkiem tętnic nerkowych. Nie ma odcinka aorty nie tętniakowatej dystalnie od tętnic nerkowych, ale aorta na poziomie tętnic nerkowych nie jest tętniakowata.
- **Infrarenal (Podnerkowe) AAA:** tętniak rozpoczyna się poniżej odejścia tętnic nerkowych od aorty¹⁵



Ryc.1 Klasyfikacja tętniaków aorty brzusznej¹⁵

Anatomicznie w tętniaku podnerkowym wyróżniamy szyję (odcinek od najniższej tętnicy nerkowej do początku tętniaka), worek (od końca szyjki podnerkowej do 20 mm proksymalnie od początku tętnicy biodrowej wspólnej) i aortę końcową (pomiędzy 20 mm proksymalnie od początku tętnicy biodrowej wspólnej a odejściem tętnicy biodrowej wspólnej)¹⁶. Inne tętniaki o bardziej skomplikowanej anatomii nazywamy złożonymi. Wśród nich wyróżniamy tętniaki okolicy podnerkowej krótkiej szyi (<10 i >4 mm szyja podnerkowa), tętniaki okolicy okołonerkowej (0–4 mm szyjka podnerkowa) oraz tętniaki okolicy nadnerkowej. Ostatnie z wymienionych dzielą się jeszcze na tętniaki okołonerkowe, które obejmują co najmniej jedną tętnicę nerkową i rozciągają się do tętnicy kręzkowej górnej oraz tętniaki okołotrzewne, obejmujące tętnice nerkowe i tętnicę kręzkową górną, ale nie wykraczają poza oś trzewną. Ostatnią grupą są tętniaki piersiowo-brzuszne aorty (TAAA) typu IV charakteryzujące się rozszerzeniem tętniaka powyżej osi trzewnej i sięgają do rozworu przeponowego.

Istnieje jeszcze jedna, bardzo ważna dla tego rozdziału, klasyfikacja odcinków aorty. Stworzona na podstawie doświadczenia operatorów podczas licznych zabiegów dzieli aortę na tak zwane strefy lądowania, w których możliwe jest stabilne zakotwiczenie końca stentgraftu. Zasadniczo jest to rozszerzenie podziału na aortę brzuszną i piersiową, wyróżniające 11 stref. W tym rozdziale zostanie omówione leczenie chirurgiczne tętniaków zlokalizowanych w strefach od 6 do 11. Statystycznie najczęściej mamy do czynienia z tętniakami zlokalizowanymi w obrębie strefy 9¹⁵.



Ryc.2 Strefy lądowania stentgraftów aortalnych¹⁵

3. Klasyczny zabieg metodą otwartą

Jak wiemy, zdecydowana większość tętniaków pozostaje bezobjawowa. Zalecenia postępowania są uzależnione od wielkości tętniaka. Ogólnie przyjmuje się, iż zmiany o średnicy mniejszej niż 4 cm mają niskie ryzyko

pęknięcia i wystarczy ich monitorowanie (30-39 mm badanie obrazowe co 3 lata, 40-44 cm co 2 lata). W badaniach porównujących wczesną interwencję przezskórną oraz bierną obserwację kontrolną nie wykazano różnicy w wynikach w grupie pacjentów z tętniakiem o średnicy 40-54mm. Dlatego też wytyczne wskazują, że dla pacjentów bezobjawowych z AAA o średnicy mniejszej niż 55mm i wolnej progresji (<10mm/rok) wystarczającym działaniem jest okresowa obserwacja. Wskazania do leczenia operacyjnego- gdy średnica przekracza 55mm lub tętniak powiększa się o więcej niż 10mm/rok. Jeśli jednak występują objawy jednoznacznie wynikające z obecności, AAA zalecana jest jego naprawa w trybie pilnym. Natomiast podejrzenie pęknięcia tętniaka powinno być zweryfikowane natychmiastowo w badaniu obrazowym jamy brzusznej (USG lub CT) i w przypadku potwierdzenia diagnozy zoperowane w trybie nagłym^{1,17,18}.

Zalecenia	Klasa ^a	Poziom ^b	Piśmiennictwo ^c
U pacjentów z tętniakiem aorty brzusznej o średnicy 25–29 mm powinno się rozważyć wykonanie kolejnego badania ultrasonograficznego po 4 latach	IIa	B	[367]
Obserwacja jest wskazana i bezpieczna u pacjentów z AAA o maksymalnej średnicy < 55 mm i wolnym powiększaniu się (< 10 mm/rok) ^d	I	A	[340, 373]
U pacjentów z małym (30–55 mm) AAA powinno się rozważyć następujące przedziały czasowe do wykonywania badań obrazowych ^e : • co 3 lata w przypadku AAA o średnicy 30–39 mm • co 2 lata w przypadku AAA o średnicy 40–44 mm • co roku w przypadku AAA o średnicy > 45 mm^f	IIa	B	[365]
Zaleca się zaprzestanie palenia tytoniu w celu spowolnienia powiększania się AAA	I	B	[351]
Można rozważyć zastosowanie statyn i inhibitorów ACE u pacjentów z małymi AAA w celu zmniejszenia powikłań aortalnych	IIb	B	[355, 345]
Zabieg naprawy AAA jest wskazany jeśli: • średnica AAA przekracza 55 mm^g • powiększanie się tętniaka przekracza 10 mm/rok	I	B	[363, 373]
W przypadku dużych tętniaków o anatomii odpowiedniej do wykonania EVAR, zaleca się otwartą lub wewnątrznaczyniową naprawę aorty u pacjentów z akceptowalnym ryzykiem chirurgicznym	I	A	[397, 398]
W przypadku dużych tętniaków o anatomii nieodpowiedniej do wykonania EVAR, zaleca się wykonanie otwartego zabiegu operacyjnej naprawy aorty	I	C	
U pacjentów z bezobjawowym AAA, których stan nie pozwala na otwartą operację naprawczą, można rozważyć EVAR w połączeniu z najlepszym leczeniem zachowawczym ^h	IIb	B	[388, 399]

AAA — tętniak aorty brzusznej; ACE — konwertaza angiotensyny; EVAR — wewnątrznaczyniowy zabieg naprawy aorty

^aKlasa zaleceń

^bPoziom wiarygodności danych

^cPiśmiennictwo potwierdzające zalecenia

^dPrzy ryzyku pęknięcia < 1% między kolejnymi badaniami obrazowymi AAA

^eWymienione przedziały czasowe mogą być skrócone u kobiet lub w przypadku szybkiego powiększania się tętniaka między wcześniejszymi badaniami
^fNa indywidualne decyzje co do operacyjnej korekcy tętniaka powinna wpływać także płeć pacjenta. Przy określonych wymiarach tętniaka, prawdopodobieństwo pęknięcia AAA u kobiet w czasie obserwacji jest do czterech razy większe, stąd operację naprawczą aorty można rozważyć już przy niższej wartości progowej, prawdopodobnie 50 mm. Przed decyzją o interwencji należy uwzględnić spodziewaną długość dalszego życia pacjenta

^gPonieważ występuje tylko poprawa umieralności związanej z tętniakiem, a nie umieralności ogólnej, należy uwzględnić także świadomą zgodę pacjenta

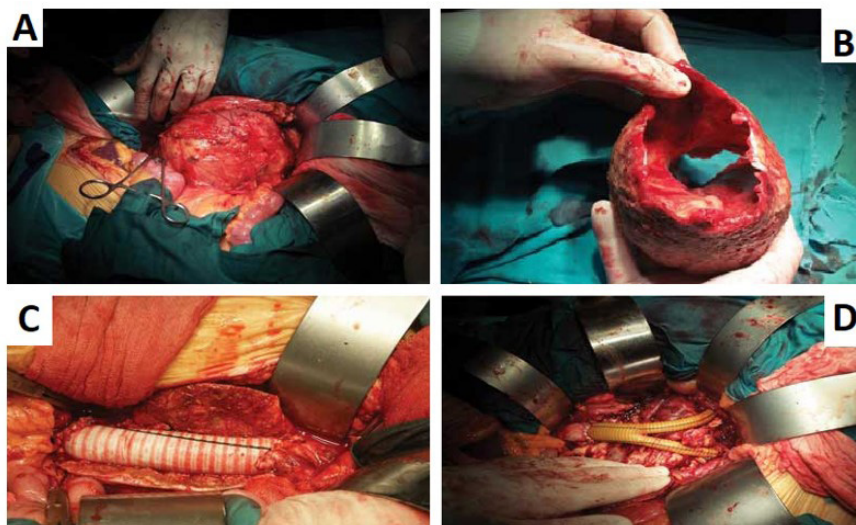
Ryc.3 Podsumowanie zaleceń dotyczących postępowania w przypadku bezobjawowych pacjentów z powiększoną aortą lub tętniakiem aorty brzusznej¹

Metoda klasyczna jest skutecznym i standardowym postępowaniem w leczeniu chirurgicznym tętniaków aorty brzusznej. Statystycznie jednak większość operacji AAA jest przeprowadzana metodą wewnątrznaczyniową

ze względu na utwierdzający się od lat pogląd, iż ta metoda poprzez swoją małą inwazyjność przynosi większe korzyści dla pacjenta^{19,20}. Wg danych z USA w latach 2003–2013 odsetek zabiegów otwartych zmniejszył się o 80%, natomiast odsetek zabiegów endowaskularnych wzrósł aż o 500%. Trend ten nadal się utrzymuje i w większości szpitali chętniej wykonywanym zabiegiem naprawczym AAA jest EVAR. Skutkuje to również zmniejszeniem ilości młodych lekarzy szkolonych do wykonywania zabiegów klasycznych, nacisk dydaktyczny jest kładziony na małoinwazyjne metody leczenia²¹. Zabieg naprawy AAA metodą klasyczną trwa około 4 godzin. Pacjent podczas operacji jest w znieczuleniu ogólnym. Standardowo korzystamy z dostępu zaotrzewnowego, natomiast w wyjątkowych sytuacjach np. gdy są obecne liczne zrosty w jamie brzusznej lub stomia, używamy dostępu przez jamę otrzewnej. Cięcie wykonujemy w linii pośrodkowej brzucha, rzadziej poprzeczne poniżej pępka. Sieć większą przesuwamy dogłównowo, jelito cienkie na prawą stronę obie struktury okrywamy mokrymi chustami. Uzyskujemy dostęp do więzadła Treiza i przecinamy je elektrokoagulując wzdłuż jelita czczego do poziomu aorty. Zwykle przecinamy też żyłę kręzkową dolną, by uzyskać lepszy dostęp do podnerkowej części aorty. Zależnie od potrzeb podwiązujemy lub odsuwamy mniejsze naczynia. Gdy pole operacyjne jest właściwie odsłonięte, zakładamy klemy nad poszerzonym odcinkiem aorty oraz pod nim. Należy pamiętać, że zacisk powinien być umieszczony w miejscu bez zwąpień i dużych skrzeplin, unikamy w ten sposób dystalnej embolizacji oraz uszkodzenia aorty. W przypadku obecności dużych ilości materiału potencjalnie zatorowego należy rozważyć odsłonięcie odcinka aorty ponad tętnicą kręzkową górną i klemowanie powyżej niej. Oceniamy również czy tętnice biodrowe są poszerzone lub miażdżycowo zmienione, by ewentualnie zastosować rozwidloną protezę. Usuwamy chorobowo zmieniony odcinek aorty i zastępujemy go protezą. Łączenia muszą być wykonane precyzyjnie, by nie doszło do przecieków w okolicy zespolenia^{22,23}.

Protezy naczyniowe mogą być poliestrowe, politetrafluoronowe lub autologiczne z naczynia żylnego pacjenta. Standardowo stosuje się protezy z tworzyw sztucznych. Najnowsze modele są hybrydowe- łączą strukturę dzianin i tkanin, co zwiększa ich wytrzymałość jednocześnie nadając elastyczność. Sztuczne grafty są często pokrywane kolagenem lub albuminą, by ograniczyć wykrzepianie krwi wewnątrz protezy. Grafty autologiczne są używane niezwykle rzadko, ich rozmiar i morfologia nie jest wystarczająco kompatybilna z aortą. Stosujemy je tylko w wyjątkowych sytuacjach, gdy nie może być użyty syntetyczny graft np. przy istniejącej infekcji. Powikłaniami zabiegu są między

innymi: krwawienie, infekcja, uszkodzenie śledziony, niewydolność nerek, zawał mięśnia sercowego, udar mózgu, niedokrwienie rdzenia kręgowego, przerwanie zespolenia, przetoka aortalno-jelitowa, zapalenie trzustki. Obecnie do zabiegu klasycznego są kwalifikowani głównie pacjenci wymagający złożonego zabiegu ze względu na morfologię lub lokalizację zmian. Dlatego też statystyki śmiertelności okołoperacyjnej znacznie różnią się między jednostkami. Średnio wynosi ona około 5%²⁵. Największym badaniem porównującym skuteczność klasycznej i endowaskularnej metody naprawczej AAA było badanie kliniczne EVAR 1. Pacjentów zakwalifikowanych do zabiegu losowo przydzielano do grup operacji otwartej lub EVAR. W okresie 30 dni od zabiegu odnotowano znamienne niższe ryzyko zgonu w okresie 30 dni od zabiegu oraz w trakcie hospitalizacji w przypadku EVAR. Jednak w perspektywie wieloletniej wyniki są diametralnie różne. W ciągu 3 lat od zabiegu śmiertelność w grupie pacjentów EVAR była pięciokrotnie wyższa niż w klasycznej. Przeprowadzano też więcej reinterwencji u pacjentów EVAR- 20%, natomiast w metodzie klasycznej-6% w ciągu 4 lat. Nowsze badania sugerują poprawę długoletnich wyników EVAR, niektóre nawet wyrównanie skuteczności EVAR i metody otwartej. Nadal jednak nadal posiadamy za mało danych by ocenić, które podejście jest nadrzędne^{26,27}.



Ryc.4 Tętniak aorty brzusznej widok śródoperacyjny, B- usunięty worek tętniaka, C- wszczepiona proteza aortalno-aortalna, D- wszczepiona proteza aortalno-dwuudowa²⁴

4. Endowaskularne techniki naprawy tętniaków aorty

Wysokie ryzyko związane z zabiegiem otwartym od lat skłaniało lekarzy do poszukiwania innych możliwości naprawy naczyń oraz narządów od wewnątrz. Idea zabiegu wewnątrznaczyniowego istniała już w połowie lat osiemdziesiątych. Badania były przeprowadzane na modelach zwierzęcych, używano samorozprężalnych stentów poliuretanowych i nitinolowych wprowadzanych dostępem udowym przy pomocy haków i nadmuchiwanych balonów. Pierwszej angioplastyki dokonał Charles Dotter w 1964 roku rozpoczynając erę terapii wewnątrznaczyniowej. W 1986 roku pojawił się na rynku pierwszy komercyjnie produkowany stent Palmaz i rozpoczęto leczenie wewnątrznaczyniowe kanalikowych struktur żylnych, a nawet dróg żółciowych. Kolejne lata testów i udoskonalania technologii pozwoliły na pierwszy na świecie zabieg EVAR u człowieka, najpierw przeprowadzony jako leczenie tętniaka pourazowego aorty piersiowej w 1987 roku, a następnie aorty brzusznej w 1993 roku. Oba były przeprowadzone przez Nikołaja Volodosa z zespołem. Badania nad EVAR z innych części świata, szczególnie Argentyny, były niezależnymi od postępów Volodosa odkryciami. Można powiedzieć, że technika EVAR narodziła się niezależnie od siebie w wielu ośrodkach. Skuteczność i bezpieczeństwo, które niosły za sobą metody endowaskularne sprawiły, że technika szybko się rozprzestrzeniła na cały świat. Zaczęto pracować na coraz lepszych materiałach, tworzyć rozgałęzione stentgrafty i rozwijać techniki mocowania i łączenia stentów systemy wprowadzania moduły. W 1996 roku radiolodzy interwencyjni z Korei Południowej zastosowali pierwszy stentgraft z fenestracją, a niemal równocześnie w innych krajach prowadzono badania nad tym samym pomysłem fenestracji dla tętnic nerkowych w innych ośrodkach. Kolejnym odwzorowaniem prawidłowej anatomii inkorporowanym do EVAR były odgałęzienia kierunkowe stentgraftów. Przez ostatnie około 30 lat od pierwszych zabiegów, EVAR przeszedł niesamowitą drogę rozwoju i obecnie nadal jest jedną z najbardziej innowacyjnych metod chirurgicznych, która nie przestaje zaskakiwać^{28,29}.

4.1. EVAR

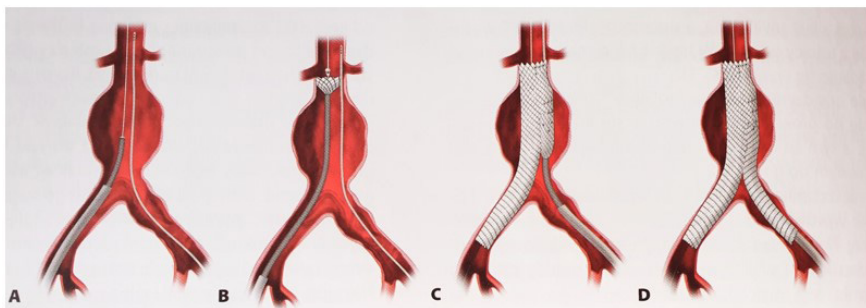
Do zabiegu wewnątrznaczyniowego można zakwalifikować pacjenta bezobjawowego u zostały spełnione kryteria anatomiczne. Podejmując decyzję należy również uwzględnić preferencje chorego. Kwalifikacja do EVAR

przebiega tak jak do klasycznej operacji dodatkowo uwzględniając ocenę warunków anatomicznych na podstawie obrazu tomografii komputerowej.

Tabela 1. Przeciwwskazania anatomiczne do zabiegu EVAR³⁰

1.	Szyja tętniaka tj. obszar powyżej poszerzenia aorty o średnicy co najmniej 15mm i kształcie cylindrycznym
2.	Obecność skrzeplin lub zwapnień która może zaburzać prawidłowe przyleganie stentgraftu do ściany aorty
3.	Kąt zgięcia szyi większy niż 60 stopni
4.	Zbyt kręte lub niedrożne naczynia „dostępowe” kończyny dolnej
5.	Unaczynienie jelit zaopatrywane jedynie przez tętnice kręzkową górną
6.	Towarzyszące tętniaki w tętnicach trzewnych lub aorticę piersiowej
7.	Dodatkowe tętnice nerkowe, szczególnie u chorych na cukrzycę i mających podwyższoną kreatyninę u których zamknięcie dod t.nerkowych może pogorszyć czynność nerek
8.	Rozwidlenie aorty o średnicy niewystarczającej do rozprężenia obu odnóg rozwidlonego stentgraftu
9.	Inne: anomalie żyłne, nietypowe ułożenie organów np. nerka podkowiasta lub miednicza

Zabieg jest przeprowadzany pod kontrolą rtg w sali hybrydowej lub posiadającej ramię C nad stołem operacyjnym. Dostęp uzyskujemy przez chirurgiczną ekspozycję i nakłucie tętnicy udowej lub biodrowej, tasiemki naczyniowe są zakładane proksymalnie i dystalnie od miejsca wprowadzenia cewnika. Po uzyskaniu dostępu należy podać heparynę (80-100 jedn/kg masy ciała), by uzyskać czas aktywowanego krzepnięcia dłuższy niż 250 sekund i utrzymać go przez cały zabieg. Następnym etapem jest wprowadzanie coraz szerszych przewodników aż do powiększenia arterotomi do wymaganego dla stentgraftu rozmiaru. Następnie umieszczamy główne body stentgraftu w naczyniu i po ustawieniu w pożądanym miejscu rozprężamy je. W sytuacji, gdy pacjent wymaga naprawy również tętnic biodrowych, kolejnym etapem jest kaniulacja naczynia dodatkowym przewodnikiem i wprowadzenie nówek stentgraftu. Pozycjonowanie nówek następuje pojedynczo poprzez angiografię wsteczną. Na koniec zabiegu wykonuje się końcową arteriografię używając dużych ilości kontrastu, który wypełnia stent, co pozwala wykryć ewentualne przecieki krwi. Jeśli wszystko przebiegło prawidłowo wyciągamy przewodnik i zakładamy szwy^{23,24,31,32}.

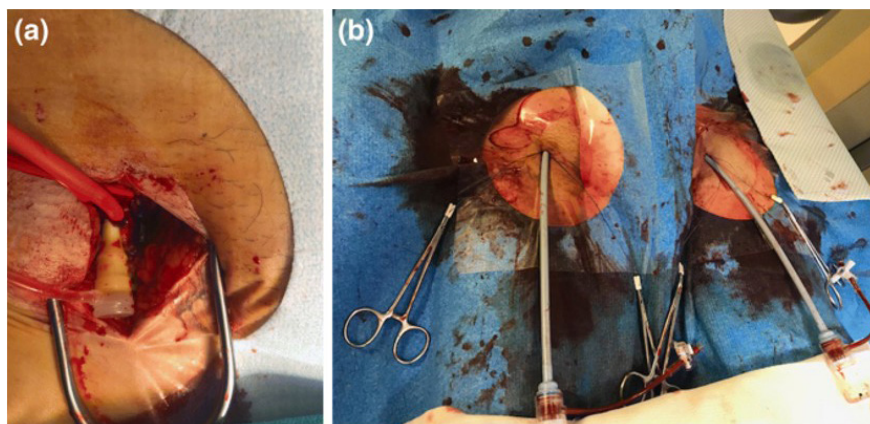
Ryc.5 Kolejne etapy zakładania stentgraftu aortalno-biodrowego²³

Wraz z pojawianiem się na rynku nowszych generacji systemów do endowaskularnej naprawy tętniaków aorty wyniki leczenia z każdym rokiem wciąż się poprawiają. Trzeba jednak pamiętać, że występują powikłania tego zabiegu i niektóre są częstsze niż w przypadku metody klasycznej np. reperfuzja worka tętniaka. Szacuje się też że 1,6-1,8% zabiegów wewnątrznaczyniowych wymaga konwersji na zabieg otwarty. Współczynnik śmiertelności operacyjnej EVAR wynosi 1,4%. Tak jak to było opisane na koniec podrozdziału dotyczącego zabiegu otwartego długookresowa skuteczność metody endowaskularnej jest kwestią wątpliwą i wciąż jest weryfikowana. Pacjenci po zabiegu pozostają do końca życia w obserwacji, a ich regularne badania obrazowe służą do wychwytywania późnych powikłań. W okresie pooperacyjnym komplikacje występują rzadko i zwykle są niegroźne, typową jest np. krwiak czy zakażenie w pachwinie. Poważnymi powikłaniami, które mogą wystąpić są m.in.: przecieki okołoprotezowe, przemieszczenie się stentgraftu, opóźnione pęknięcie, upośledzenie funkcji nerek, zatorowość, zamknięcie odnogi stentgraftu, niedokrwienie okrężnicy^{1,6}.

Podsumowując, najważniejszymi zaletami zabiegu wewnątrznaczyniowego jest redukcja czasu znieczulenia ogólnego poprzez skrócenie czasu zabiegu, a nawet zupełna rezygnacja z generalnej anestezji na rzecz znieczulenia miejscowego. W przeciwieństwie do zabiegu otwartego inwazyjność EVAR jest minimalna, co pozwala pacjentom na szybszy powrót do pełnej sprawności, skraca czas hospitalizacji i umożliwia szybką rehabilitację pacjenta. Mała inwazyjność przekłada się również na ograniczenie utraty krwi podczas operacji, co pozwala uniknąć lub zredukować ilość przetoczeń.

4.2. pEVAR

Przezsłonna endowaskularna naprawa tętniaka aorty brzusznej (pEVAR) jest odmianą zabiegu wewnątrznaczyniowego, w którym zgodnie z nazwą dostęp jest przezsłorny. Ze względu na liczne zalety tego podejścia jest ono bardzo często stosowane. Przed rozpoczęciem zabiegu wprowadza się zwykle dwa urządzenia Preclose ProGlide za pomocą prowadników i pozycjonuje w stosunku do tętnicy dostępowej. Jest to część techniki operacyjnej „preclose” ułatwiającej szybkie zamknięcie naczynia (zostanie ona dokładnie omówiona w dalszej części rozdziału). W kolejnym kroku pod kontrolą USG nakłuwamy cewnikiem tętnicę udową wspólną lub gdy jest to niemożliwe, udową powierzchowną i wprowadzamy prowadnik. Dalsze postępowanie jest takie samo jak w typowym EVAR²³. Badania kliniczne nie wykazały znaczącej różnicy w ilości powikłań pooperacyjnych, zakażeń rany operacyjnej, krwawień i krwiaków między EVAR a pEVAR. Śmiertelność okołoperacyjna była mniejsza lub taka sama jak w przypadku EVAR. Zauważono jednak redukcję występowania seromy- płynu zbierającego się między skórą a głębiej położonymi tkankami oraz zmniejszenie występowania pooperacyjnego nieprawidłowego przepływu limfy, która spływa na zewnątrz z uszkodzonych naczyń limfatycznych lub jest zatrzymywana w ranie. Kolejną zaletą pEVAR jest możliwość zastosowania znieczulenia miejscowego, co może być szczególnie korzystne u pacjentów niestabilnych hemodynamicznie nie kwalifikujących się do znieczulenia ogólnego^{33,34}. Dzięki swojej minimalnej inwazyjności pEVAR może być nawet stosowany w systemie przyjęcia jednodniowego. Oznacza to, że pacjent może być wypisany do domu po kilku godzinach od zabiegu, oczywiście jeśli nie ma do tego przeciwwskazań i po 3 oraz 30 dniach wrócić na kontrolę ambulatoryjną. W badaniach nad takim modelem pacjenci byli dobierani wg konkretnych kryteriów- asymptomatyczny tętniak nie większy niż 5cm, anatomicznie możliwy do zoperowania standardowymi zestawami bez plastyki oraz bez użycia zaawansowanych metod, z oceną w skali ASA nie większą niż III. W tej grupie nie wystąpiła żadna śmierć okołoperacyjna, a częstość występowania komplikacji była porównywalna z grupą pacjentów standardowo hospitalizowanych. Według dostępnych badań schemat jednodniowego przyjęcia jest bezpieczny, komfortowy dla pacjenta oraz obniża koszty niepowikłanego leczenia o prawie połowę poprzez skrócenie czasu i kosztów hospitalizacji^{35,36}.

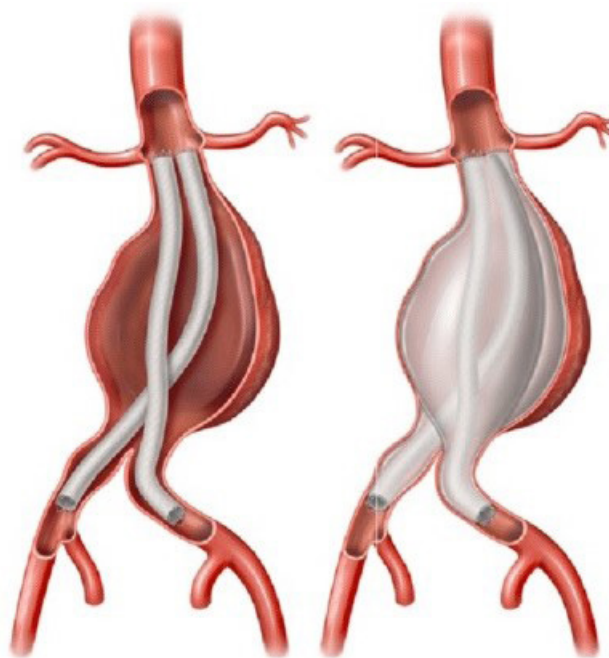


Ryc.6 A – Dostęp naczyniowy w metodzie EVAR, B- dostęp naczyniowy w metodzie pEVAR³⁷

4.3. EVAS - Wewnątrznaczyniowe uszczelnianie tętniaków systemem

System EVAS (The Nellix endovascular aneurysm sealing) został stworzony z zamiarem rozwiązania problemów, które napotymano podczas przeprowadzania klasycznych zabiegów endowaskularnych. Chciano też ułatwić kwalifikację do zabiegu endowaskularnego szerszej grupie pacjentów, którzy ze względu na niekorzystne cechy morfologiczne nie kwalifikowali się do EVAR. W EVAR wymagana długość szyi tętniaka możliwa do zoperowania tym systemem wynosi 15 mm, natomiast aby pacjent mógł się kwalifikować do leczenia systemem Nellix szyja tętniaka musi mieć więcej niż 10mm. Można powiedzieć, że Nellix jest w pewnym sensie rozwinięciem EVAR. Tak jak było to opisane w poprzednich podrozdziałach EVAR ma na celu umieszczenie protezy wewnątrz tętniaka, która staje się nową drogą przepływu krwi odłączając worek tętniaka od czynnego krążenia. Natomiast Nellix oprócz stworzenia prawidłowej drogi przepływu również uszczelnia worek tętniaka i zamyka jego światło. System jest wprowadzany do światła aorty i tętnic biodrowych tak samo jak EVAR przez tętnice kończyny dolnej, zwykle udowej. Dwa stentgrafty stanowią nowy kanał przepływowy od szyi tętniaka aż za rozwidlenie aorty, a po ich rozprężeniu następuje wypełnienie otaczających ich worków- endobagów, biokompatybilnym polimerem glikolu polietylenowego. Polimer uszczelnia tętniaka i utrzymuje stentgrafty w prawidłowej pozycji zapobiegając ich przemieszczaniu. Idea endobagów jest obiecująca, ponieważ przez wypełnienie można potencjalnie zmniejszyć częstość przecieków typu

II (czyli przecieku spowodowanego wstecznym przepływem krwi do worka tętniaka z gałęzi naczyń pobocznych) oraz może on ułatwić dopasowanie się stentgraftu w obrębie szyi tętniaka ograniczając tym samym przecieki typu IA (definiowane jako utrzymujący się kanał przepływu krwi wokół graftu z powodu nieodpowiedniego lub nieskutecznego uszczelnienia proksymalnego końca przeszczepu)^{38,39,40}.



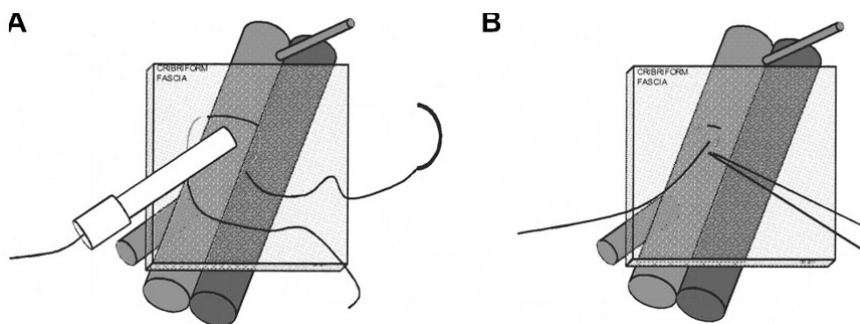
Ryc.7 Schemat układu nóg i rozprężania endobaga firmy Nellix⁴¹

Początkowe badania były obiecujące, system wykazuje prawie 100% techniczną skuteczność i w okresie pooperacyjnym oraz roku od wszczepienia nie powoduje poważnych komplikacji. Statystyki przecieków w ciągu pierwszego roku wynosiły około 3%. Jednak w długoterminowej perspektywie system niestety nie spełnił swoich założeń. W trakcie wieloletnich badań wykazano niepowodzenia terapeutyczne, u co trzeciego pacjenta występowały powikłania takie jak przecieki, migracja graftu, rozszerzenie lub pęknięcie worka. Nellix nie posiada haczyków ani systemu kotwiczącego protezę w ścianie naczynia, a sam endobag nie był wystarczający, by utrzymać graft we właściwej pozycji. Przypuszczalnie to właśnie przez brak mocowania zdarzały się częste migracje i przecieki. Ogólny odsetek powikłań wynosi około 33%

i z powodu wymienionych wyżej wyników badań w 2019 roku wstrzymano sprzedaż pierwszej generacji systemu Nellix^{39,42,43}. Warto też spojrzeć na konsekwencje niepowodzenia tego systemu i wyciągnąć z nich wnioski na przyszłość. Według badań dotyczących następstw błędów tego systemu ustalono wskaźnik niepowodzenia terapeutycznego w 2 letnim okresie obserwacji na poziomie 43,5%. Po czterech latach 100% pacjentów z Nellix jest zagrożona wzrostem tętniaka związanym z migracją stentów. Osoby po zabiegu wszczępienia tego systemu powinny być pod rozszerzonym nadzorem, a jeśli stan pacjenta na to pozwala należy spróbować usunąć system podczas zabiegu otwartego i zastąpić go klasyczną protezą. Obecnie trwają prace nad wyeliminowaniem błędów w projekcie i ulepszeniem systemu. Jeśli uda się stworzyć rozwiązania, które spełnią założenia projektu i wyeliminują przecieki Nellix może się stać dominującym systemem leczenia AAA. Niestety aktualnie projekt ma przed sobą długą drogę⁴⁴.

5. Urządzenia do uzyskiwania hemostazy po zabiegu endowaskularnym

Po zakończonym zabiegu EVAR kaniulowane naczynie jest zwykle zamykane klasycznym szwem (cutdown technic) albo poprzez zszywanie naczyń razem z powięzią (fascial clousure technic). Pozwala to na założenie trwałych, trudnych do przerwania szwów oraz stosunkowo szybkie uzyskanie hemostazy. Metoda fascial clousure ma skuteczność na poziomie około 80% i polega na nakłuciu tętnicy wspólnej udowej i połączeniu jej z więzadłem pachwinowym, przewodnik i koszulka wciąż pozostają na miejscu. Robimy nacięcie około 3-5cm i preparujemy obszar aż do powięzi. Wokół pochewki udowej zakładany jest szew kapciuchowy i następuje zamknięcie arteriotomi. Wysuwamy koszulkę, sprawdzamy czy hemostaza została uzyskana, jeśli tak- usuwamy przewodnik i zawiązujemy szwy.



Ryc. 8 A- Koszulka i przewodnik pozostają w naczyniu, szew materacowy założony na więzadło, B- Koszulka i przewodnik zostały usunięte, a szew zacieśniony⁴⁵.

Jednak podczas zabiegów pEVAR, które są coraz częściej przeprowadzane i obecnie dominują nad chirurgiczną ekspozycją naczyń, stosujemy urządzenia do zamykania naczyń, które są wprowadzane i pozycjonowane już przed zabiegiem. Pozwala to na bardzo szybkie, nie wymagające ucisku osiągnięcie hemostazy i minimalną utratę krwi⁴⁶.

5.1. Preclose ProGlide

System Preclose ProGlide jest obecnie najczęściej i najszerszej stosowanym urządzeniem zapewniającym hemostazę po zabiegu. Zważywszy na średnicę używanych prowadnic do wprowadzania systemów EVAR do zamknięcia rany wymagane jest użycie dwóch urządzeń ProGlide. Zabieg pEVAR rozpoczyna się nakłuciem tętnicy pod kontrolą USG za pomocą zestawu do mikropunkcji, następnie jest wprowadzany cewnik w celu potwierdzenia, że dane miejsce nadaje się jako dostęp tętniczy do zabiegu. Kolejny krok to wprowadzenie prowadnika i koszulki. W tym momencie należy zastosować technikę preclose i zastąpić koszulkę urządzeniem ProGlide oraz wyjąć prowadnik. W świetle urządzenia pojawia się przepływ krwi, wtedy przekreślamy urządzenie zgodnie z instrukcją naciskamy tłoki i tym samym aktywujemy kotwiczkę i zostaje założony automatyczny szew. Wymieniamy urządzenie na prowadnik i powtarzamy czynności tak, aby założyć drugi szew po przeciwnej stronie. Układamy zaklemowane szewy pod chustą i rozpoczynamy właściwy zabieg. Na koniec wystarczy odklemać i zacisnąć szwy^{47,48}. Założenie systemu na początku zabiegu znacznie ułatwia i przyspiesza zamknięcie naczynia zapobiegając przy tym niepowodzeniom. Sukces techniczny Preclose ProGlide zależnie od badania waha się między 98-100%. Wskaźnik awarii urządzenia wynosi około 5%. Zaletami zastosowania ProGlide jest mniejsza utrata krwi pacjenta, szybkie uzyskanie hemostazy, brak długoterminowych powikłań, a krótkoterminowe takie jak np. krwiak w pachwinie są łatwo odwracalnymi komplikacjami i nie stanowią bezpośredniego zagrożenia dla pacjenta^{49,50}.

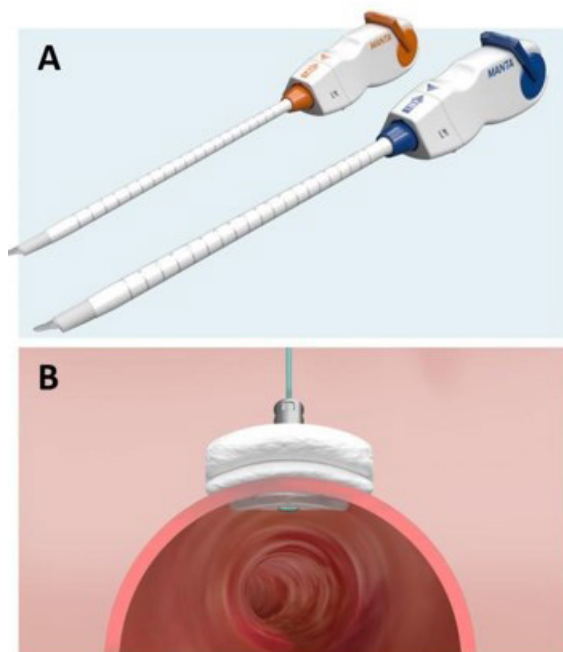


Ryc. 9 Zdjęcie poglądowe systemu Preclose ProGlide⁴⁸

5.2. Manta

Drugim urządzeniem do zamykania naczyń jest Manta firmy Teleflex. Jest ono zaprojektowane do szybkiego zamykania dostępów tętniczych w naczyniach udowych o dużej średnicy. W przypadku zabiegu pEVAR wystarczy użyć jednego systemu Manta do zamknięcia naczynia i nie trzeba pozycjonować go przed zabiegiem. Po zakończonym zabiegu endowaskularnym należy wprowadzić system po przewodniku. Zwalniając przełącznik umieszczamy w naczyniu od wewnętrznej strony polimerowy komponent, który jest połączony z kolagenowym warstwowym korkiem zamykającym naczynie od zewnątrz. Oba elementy zamykające tętnice są połączone ze sobą zamkiem ze stali nierdzewnej i szwem, które są nieabsorbowalne. Polimer oraz kolagenowy korek są w pełni bioresorbowalne. Jeśli zaistnieje potrzeba reinterwencji zamek jest widoczny we fluoroskopii i należy ponownie otworzyć naczynie w odległości co najmniej 2,5 cm od niego.

Według badań, na które powołuje się producent sukces techniczny urządzenia wynosi 97,7%, czas uzyskania hemostazy to 24 sekundy, a częstość występowania powikłań naczyniowych stanowi 4,2%. Komplikacje były porównywalne do tych występujących przy używaniu innych systemów do zamykania naczyń, a wg niektórych badań mniej nasilone. Rzadziej występowały powikłania krwotoczne, przez co również rzadsza była konieczność transfuzji^{52,53}. Na podstawie między innymi tych wyników badania FDA w 2019 zatwierdziła wprowadzenie systemu na rynek. Jednak wyniki jego



Ryc.10 A- Urządzenie Manta, B- Przekrój przez naczynie zamknięte za pomocą systemu Manta (Wewnątrz naczynia resorbowalny polimer, na zewnętrznej stronie kolagenowy korek, oba połączone poliestrowym szwem zakończonym od góry nienaruszonym zamkiem, który nie przepuszcza promieni rtg)⁵¹

użytkowania w kolejnych latach są mniej optymistyczne. Analizy wskazują, że powikłaniami wynikającymi z użytkowania systemu mogą być uszkodzenia naczyń, a nawet śmierć. Najczęściej zgłaszanymi zdarzeniami związanymi ze zgonem lub urazem były krwawienia, a następnie niedrożność i rozwarstwienie naczynia. Badania sprzed wprowadzenia systemu na rynek prezentowały bardzo wysoką skuteczność i dobre wyniki, jednak grupa chorych, na której były prowadzone badania była wysoce selektywna i jak się okazało z biegiem czasu nie odzwierciedlała właściwego obrazu pacjentów kwalifikowanych do zabiegów endowaskularnych. Zidentyfikowano w jakich sytuacjach urządzenie jest awaryjne, gdy naczynie mniejszego kalibru lub zwapnione jest zamykane systemem Manta zmieniona morfologia naczynia może unieść łącznik, co skutkuje mechanicznym lub zakrzepowym zamknięciem tętnicy. Niepełne założenie zatyczki przez system powoduje zwiększone ryzyko krwawienia, również zaotrzewnowego. Niepełne przyłożenie polimerowego czopa może prowadzić do powstania tętniaka rzekomego zagrożonego opóźnionym

pęknięciem. Te wady systemu nie zostały wychwycone we wstępnych badaniach, a są zagrożeniem dla życia pacjentów. Dlatego należy cofnąć się o kilka kroków, ponownie przemyśleć system i naprawić jego awarię tak, by był naprawdę niezawodny. Na dzień dzisiejszy jednak urządzenie Manta nie jest rutynowo stosowane podczas zabiegu pEVAR w przeciwieństwie do obiecującego Preclose ProGlide⁵⁴.

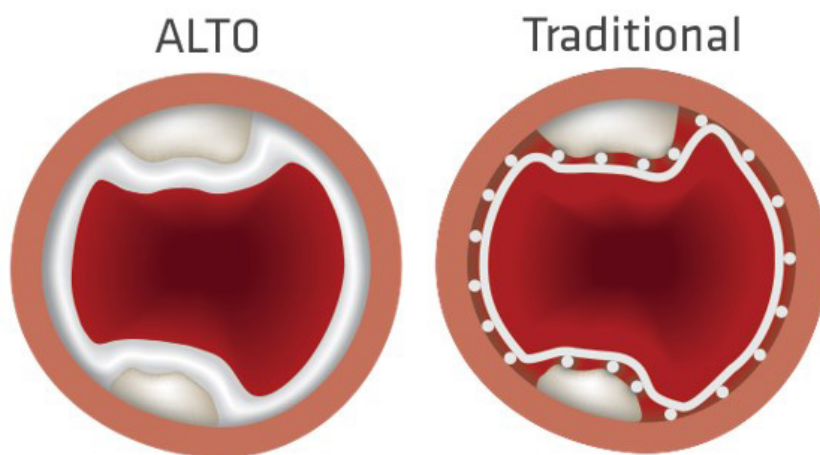
6. Nowoczesne stentgrafty wewnątrzaoortalne

6.1. OVATION Alto™

Implant do zabiegu EVAR o nazwie Alto (firmy Ovation) został wprowadzony do użytku przez FDA w 2020 roku. W pierwszym badaniu tego systemu brało udział 7 pacjentów, odnotowano 100% sukces techniczny, a w trakcie 12-miesięcznej obserwacji nie zgłoszono przecieku typu I ani typu III, migracji stentgraftu, pęknięcia tętniaka aorty brzusznej, śmiertelności związanej z tętniakiem aorty brzusznej ani wtórnej interwencji. Mediana czasu trwania zabiegu wynosi 58 minut, a mediana utraty krwi 40 ml. Po 7 miesiącach od implantacji nie odnotowano przypadków powiększenia worka, a sukces kliniczny wyniósł 100%^{38,55}. Ten najnowszy model systemu firmy Ovation został stworzony, by umożliwić kwalifikację do EVAR szerszej grupie pacjentów. Obecnie tylko około 50% pacjentów wymagających endowaskularnej naprawy AAA spełnia wytyczne anatomiczne. Kwalifikowalność do użytkowania stentgraftu Alto jest na poziomie 72%, a innych podobnych systemów waha się między 35% a 63%. Ten stentgraft składa się z korpusu aortalnego i dwóch gałęzi biodrowych mocowanych niezależnie od siebie. Korpus zawiera sieć nadmuchiwanych kanałów i pierścieni uszczelniających, które podczas rozprężania stentu w naczyniu zostają wypełnione nieprzepuszczalnym dla promieni rentgenowskich ciekłym polimerem o niskiej lepkości, który utwardza się in situ. Gałęzie biodrowe składają się z elastycznych stentów nitinolowych (wykonanych ze stopu nikłowo-tytanowego) otoczonych politetrafluoroetylenem o niskiej przepuszczalności. Ulepszeniami wprowadzonymi do tego modelu są:

- Zintegrowany balon ze znacznikiem wskazującym położenie pierścienia uszczelniającego. Balon odpowiada za rozszerzanie tkaniny i segmentu środkowego korony stentu
- Ulepszone części stentów biodrowych, dodanie taśmy do rozwidlenia

- i zwiększenie średnic stentów biodrowych
- Pierścień uszczelniający przesunięty bliżej górnej części stentu, dzięki czemu długość szyi tętniaka wymagania do kwalifikacji do zabiegu wynosi tylko 7mm
- Uszczelnienie za pomocą wypełnianych polimerem pierścieni to technologia CustomSeal™, która w przeciwieństwie do tradycyjnych stentgraftów, w których szczelność uzyskuje się tylko przez przyłożenie endoprzeszczepu do ściany naczynia, co uniemożliwia przesuwanie się stentu



Ryc. 11 Pierścień uszczelniający założony w szyi tętniaka w systemie Alto, porównany z tradycyjnymi stentgraftami pozbawionymi custom seal technologii⁵⁷

Początkowe wyniki Alto są bardzo obiecujące. Czekamy na długoterminowe oraz badania na większej grupie pacjentów. Obecnie trwa 5 letnie badanie tego stentgraftu o nazwie ELEVATE, którego wyniki zostaną opublikowane w 2023 roku. Ulepszenia zastosowane w projekcie systemu Alto mogą sprawić, że będzie on bardzo wszechstronnym stentgraftem o szerokim zastosowaniu^{56,57}.

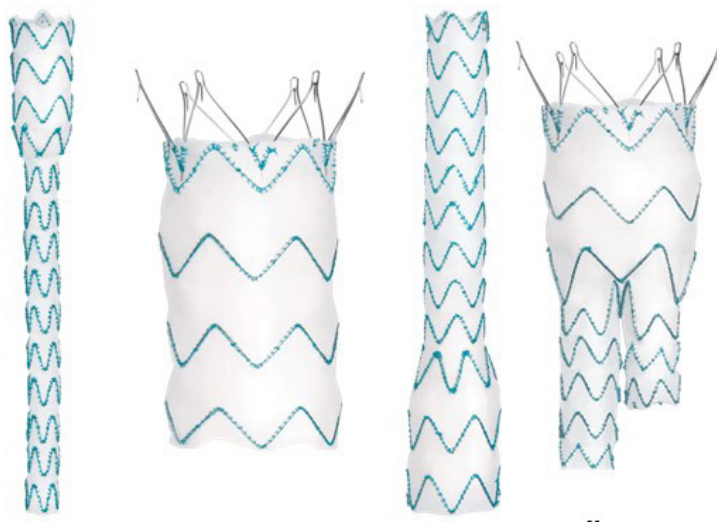


Ryc. 12 Zdjęcie poglądowe systemu Alto oraz jego umiejscowienia w naczyniu^{38,55}

6.2. TREO*

System Treo został zatwierdzony do użytku w US w 2020 roku, jednak na rynku Europejskim był obecny już kilka lat wcześniej. Został zaprojektowany w celu zapobiegania dalszemu wzrostowi lub pęknięciu tętniaka po zabiegu EVAR. Zawiera on trójmodułowy, rozwidlony stentgraft wykorzystujący egzoszkielet nitynolowy i tkaninę poliestrową. Urządzenie posiada trzy różne długości stentów biodrowych, każda w kilku wariantach różnych średnic proksymalnych i dystalnych. Ostatecznie system pozwala stworzyć 29400 kombinacji różnych konfiguracji wymiarów. TREO dostosowuje się do pacjenta, ponieważ za pomocą mechanizmu można dokonać korekt w pozycjonowaniu tak, by jak najlepiej dopasował się do kształtu aorty^{58,59}. Jest on unikalnym projektem, ponieważ posiada punkty mocowania nad i pod tętnicami nerkowymi oraz zaokrąglone haczyki w głównym korpusie stentgraftu. Zabezpieczają one odnogi stentgraftu przed przemieszczeniem się niwelując tym samym przecieki typu II. Według rejestru Vascular Study Group of New England regresja wymiarów worka tętniaka prognozuje niższą późną śmiertelność pacjenta oraz wskaźnik 5-letniego przeżycia dla pacjentów z rozszerzeniem worka był znacznie niższy (68% vs 83%). Dlatego wyznaczono za cel w projekcie TREO sprawienie, by jego cechy wpłynęły na zmniejszenie worka tętniaka po EVAR⁶⁰. Pierwszym badaniem po wprowadzeniu na rynek tego systemu było badanie kliniczne Rationale, które wykazało sukces kliniczny na poziomie 96%, brak przecieku typu I/III na poziomie 95,5%, odsetek interwencji wtórnych na poziomie 3,5% oraz zmniejszenie worka tętniaka o ≥ 5 mm u 54,1% pacjentów. Wyniki, szczególnie te o zmniejszeniu worka

tętniaka, są bardzo korzystne w porównaniu do innych urządzeń dostępnych na rynku⁶¹. Kolejne badania kliniczne przynoszą prawie identyczne wysokie wyniki skuteczności systemu i wykazują, że jest on bezpieczną opcją terapeutyczną. Dalsze obserwacje są wciąż prowadzone z nadzieją, że pozytywne wyniki utrzymają się w dłuższej perspektywie. Na dzień dzisiejszy można powiedzieć, że TREO spełnia swoje założenia i rzeczywiście wpływa na kurczenie się worka tętniaka, poprawiając tym samym wyniki przeżycia pacjentów, u których został zastosowany^{62,63}.



Ryc. 13 Zdjęcie poglądowe systemu TREO⁵⁹

6.3. GORE® EXCLUDER® i GORE® CONFORMABLE

Ten stentgraft jest już na rynku ponad 20 lat. W tym czasie były ulepszone jego systemy wprowadzające, ale istota projektu pozostawała taka sama. Jest to najlepiej przebadany i najszerzej stosowany system na świecie. EXCLUDER to samorozprężalny, modułowy stentgraft wykonany materiału politetrafluoroetylenowego połączony z egzoszkieletem nitinolu i pokryty wzmacniającą tuleją z folii kompozytowej stworzonej z fluorowanego etylen-propylenu (ePTFE). Proksymalny przeszczep i dystalne kończyny są wyposażone w mankiety uszczelniające z ePTFE, który poprawia przyleganie do ściany tętnicy. Jego sukces techniczny jest oceniany na około 100%. Przeprowadzono 10-letnie badanie kliniczne wykazujące przeżycie pacjentów w tym okresie w 63%, a brak zgonów związanych z chorobami aorty jest szacowany na 97%.

Brak powikłań po 5 latach wynosił 90,5%, 89% po 7 i 88% po 10 latach, a wolność od ponownej interwencji po 5 latach- 87%, po 7 latach-82% i po 10 latach 80%. Podczas trwania badania wykryto, że u około 27% pacjentów wystąpił przeciek okołoprotezowy, ale co ciekawe zdarzały się one tylko na początku obserwacji. Tylko jeden przeciek został zidentyfikowany po 5 latach od zabiegu. Dane potwierdzają dużą trwałość i bezpieczeństwo systemu w perspektywie długoterminowej^{64,65}.

System Conformable jest najnowszym projektem firmy Gore i przedłużeniem linii Excluder. Obecnie pozostaje jeszcze w fazie badań klinicznych. System został zaprojektowany do leczenia tętniaków o bardziej wymagającej anatomii, to jest z krótką szyjką aorty, do 10 mm, wysokim zgięciem szyi, do 90 stopni, i szyjką aorty o małej średnicy, do 16 mm. W tym systemie istnieje możliwość aktywnego zmieniania kąta zgięcia stentgraftu i dopasowywania proksymalnego końca do anatomii aorty. Pierwsza grupa pacjentów z wszczepionym GORE® CONFORMABLE składała się z 10 chorych o nietypowej anatomii aorty. U wszystkich uczestników system został dopasowany i wszczepiony z powodzeniem, nie wystąpiły powikłania okołoperacyjne. Obecnie czekamy na zakończenie kilku większych europejskich badań nad tym systemem. Jeśli Conformable okaże się skuteczny, może być nadzieją dla pacjentów, którzy do tej pory nie kwalifikowali się do zabiegu EVAR^{66,67}.



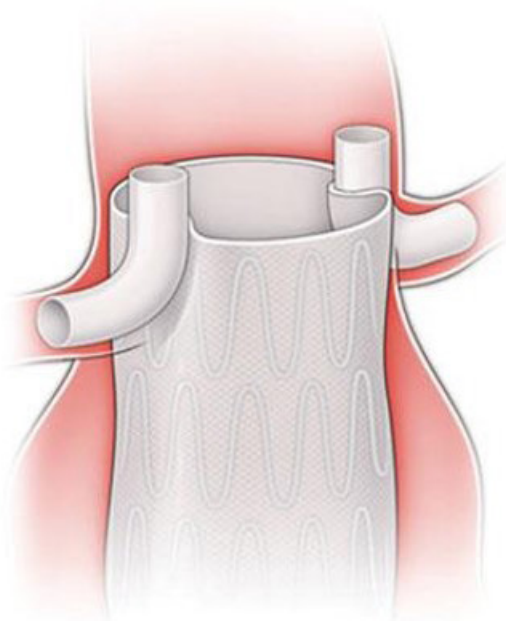
Ryc.14 Zdjęcie poglądowe systemu GORE® EXCLUDER⁶⁸

7. Metody inkorporacji tętnic trzewnych i nerkowych podczas naprawy tętniaka aorty brzusznej

Do tej pory omawiając postępowanie w przypadku AAA skupiliśmy się głównie na leczeniu najczęstszego i najprościej położonego tętniaka podnerkowego. Były to rozwiązania ogólnie omówione dla zmian znajdujących się w strefach lądowania 9-11 (ryc. 2). Najczęściej mamy do czynienia z tętniakami zlokalizowanymi w obrębie strefy 9. W ich przypadku korzystając z metody otwartej naprawiamy zmianę dodając wstawki naczyniowe lub omijając odejścia głównych naczyń. Chcąc przeprowadzić zabieg metodą EVAR musimy skorzystać z technik kominowych, fenestracji lub branchowanych stent-graftów, by utrzymać przepływ w głównych odgałęzieniach aorty⁶⁹.

7.1. Technika kominowa - ChEVAR

Synonimem techniki ChEVAR (chimney technique)- kominowej jest technika snorkel, pojęcia te są używane w literaturze zamiennie. Ta metoda pozwala na umieszczenie stentu w aorcie o krótkiej szyi, przy zachowaniu perfuzji trzewnych odgałęzień aorty. Pierwotnie była używana jako procedura ratunkowa w wypadku przypadkowego pokrycia tętnic stentgraftem, jednak z czasem stała się skuteczną endowaskularną techniką naprawy tętniaków o trudnej anatomii. Zabieg jest przeprowadzany w sali hybrydowej, która umożliwia lepsze obrazowanie w angiografii 3D. Pacjent jest znieczulony ogólnie i zapewniony jest dostęp ramienny oraz udowy. Wprowadza się do aorty wstępującej prowadnik i umieszcza dwie koszulki blisko docelowych gałęzi trzewnych. Dla ułatwienia procedury wprowadzamy cewnik przez tętnicę udową i wykonujemy angiografię, aby móc uzyskać obraz 3D, dzięki któremu precyzyjnie ustawimy koszulki naczyniowe w docelowej lokalizacji. Sprawdzamy drożność naczyń przez kontrolną angiografię. Teraz, tak jak to już zostało wcześniej opisane, stosujemy technikę EVAR i przez dostęp udowy wprowadzamy stent aortalny. Najpierw pozycjonujemy i ropyżamy główny stent aortalny, a później wycofujemy koszulki i równocześnie rozprężamy trzewne stenty. Celem zabiegu jest ułożenie stentów naczyń trzewnych ponad proksymalną krawędź głównego stentu artalnego^{23,70}.



Ryc.15 Wizualizacja układu stentu głównego i pobocznych stentów w technice kominowej⁷¹

Największym badaniem długoterminowym oceniającym technikę kominową był rejestr Pericles. Retrospektywne badanie ewaluujące 898 przeszczepów kominowych u 517 pacjentów leczonych Ch-EVAR w latach 2008-2014. Średni okres obserwacji wynosił 17,1 miesiąca. W tym czasie drożność pierwotna wyniosła 94%, drożność wtórna 95,3%, a przeżycie całkowite pacjentów było na poziomie 79%. Śródoperacyjny przeciek typu Ia stwierdzono u 41 (7,9%) pacjentów. W wynikach sugerowano, że istnieje możliwość minimalizacji ilości przecieków typu Ia poprzez kwalifikację pacjentów, u których strefa lądowania wynosi co najmniej 20 mm^{72,73}. W perspektywie 3 lat łączne całkowite przeżycie wynosiło 81%, reinterwencja nie była wymagana w 86% przypadków, a drożność naczynia została zachowana u 95,1% pacjentów. Potwierdza to, że ChEVAR jest realną alternatywą dla leczenia aortalnych tętniaków okołonerkowych wysokiego ryzyka. W 2019 r. wytyczne Europejskiego Towarzystwa Chirurgii Naczyniowej (ESVS) zaleciły ChEVAR jako alternatywę w sytuacjach nagłych lub gdy nie można zastosować stentgraftu fenestrowanego. Wg badań kluczowym w tej technice jest właściwy dobór pacjentów wg kryteriów anatomicznych⁷⁴.

7.2. Stentgrafty fenestrowane oraz rozgałęzione

Stentgrafty z fenestracją (FEVAR) są unikalnym rozwiązaniem przeznaczonym do leczenia AAA. Ich zasada budowy jest identyczna jak standardowych stentgraftów, jednak różnią się one obecnością okienek dla naczyń odchodzących od aorty. Stentgraft zakłada się jak w typowym zabiegu EVAR, a po umieszczeniu urządzenia kaniuluje się naczynia nerkowe lub trzewne i pozycjonuje okienka, by uzyskać prawidłowy przepływ. W okolicy fenestracji obecne są znaczniki nieprzepuszczane dla promieni RTG, co ułatwia ustawienie stentgraftu. Zaletą systemów fenestrowanych jest brak tworzenia się układu rynny w przekroju naczynia, która powstaje w przypadku zastosowania techniki kominowej. Brak tego wewnętrznego zagięcia ciała stentgraftu wywołanego przez zewnętrznie położone stenty naczyń pobocznych wpływa na zmniejszenie się prawdopodobieństwa wystąpienia przecieku okołoprotezowego typu I. Urządzenia produkowane są na zamówienie i dostosowywane do anatomii konkretnego pacjenta. Projektowanie systemu odbywa się na podstawie tomografii komputerowej wysokiej rozdzielczości. Ich wyprodukowanie zwykle zajmuje kilka tygodni, co sprawia, że system jest zarezerwowany jedynie dla stabilnych, planowych pacjentów. Wyniki badań klinicznych sugerują że FEVAR jest bezpieczną metodą o 100% wskaźniku powodzenia technicznego w okresie 2 lat i 20% całkowitą śmiertelnością. Porównując chEVAR i FEVAR, wyniki 30 dniowej śmiertelności, późnej śmiertelności i działań niepożądanych ze strony nerek były korzystniejsze w przypadku stentgraftów fenestrowanych. Jednak w grupie FEVAR średni czas zabiegu był dłuższy, a pacjenci byli narażeni na większą utratę krwi⁷⁵.

Do stentgraftów okienkowych można również dołączać rozgałęzienia wprowadzane do naczyń docelowych. Rozgałęzione urządzenia można uzyskać na dwa sposoby, przyszywając ramiona w okolicy fenestracji lub wprowadzając w nią samorozprężalne ramiona. Systemy z fenestracją oraz rozgałęzione zostały dopuszczone do użytku klinicznego w Europie, ale w Stanach Zjednoczonych są uważane za urządzenia eksperymentalne i nadal pozostają w fazie badań klinicznych. Początkowy sukces techniczny wynosił około 99%. Perfuzja naczyń docelowego wahała się od 90,5% do 100%. Śmiertelność okołoperacyjna (30-dniowa) wyniosła 2%. Stentgrafty z fenestracją i rozgałęzieniem zostały uznane jako minimalnie inwazyjna alternatywa leczenia złożonych tętniaków u pacjentów z grupy wysokiego^{76,77}.

Odmianą FEVAR są stentgrafty modyfikowane przez lekarza. W przypadku tętniaków, dla których nie da się stworzyć fenestrowanych fabrycznych

stentgraftów lub zabieg jest przeprowadzany w trybie nagłym opcją mogą być modyfikowane przez operatora systemy. Niezbędne jest zaplanowanie przebiegu modyfikacji przed zabiegiem na podstawie tomografii komputerowej. W dniu zabiegu stentgraft jest zdejmowany z osłonki i na sterylnym polu wycina się w nim ręcznie fenestracje. Następnie w każdym otworze umieszcza się zakryty stent, który służy jako odgałęzienia do tętnic nerkowych lub trzewnych. Markery nieprzepuszczalne dla promieni rentgenowskich są wszyte na początku gałęzi oraz w przedniej i tylnej pozycji dla ułatwienia pozycjonowania. Urządzenie zostaje ponownie osłonięte i za pomocą cewnika wprowadzone do naczynia pacjenta. Kolejne kroki przebiegają standardowo, rozpoczynając od pozycjonowania body stentgraftu, przez kaniulowanie docelowych rozgałęzień aorty i rozprężanie urządzenia. Takie postępowanie daje lekarzom doatkowe możliwości leczenia pacjentów nawet tych o bardzo złożonej anatomii. Obecnie istnieje mało danych na temat bezpieczeństwa i skuteczności modyfikowanych przez lekarzy systemów. Ta metoda jest stosowana rzadko i jedynie przez doświadczonych specjalistów posiadających właściwe zaplecze sprzętowe. Badania kliniczne sugerują, że stentgrafty modyfikowane mają wysoki wskaźnik regresji worka tętniaka- 95% w okresie 50 miesięcy oraz 94% przeżywalność w tym okresie. FEVAR ma jednak około trzykrotnie mniejszą częstość reinterwencji. Zaletami modyfikowalnych stentgraftów jest ich szeroki zakres dostosowania do anatomii pacjenta i możliwość zastosowania w przypadku operacji w trybie nagłym. Jednak urządzenia fenestrowane fabrycznie pozwalają na podwójną kontrolę projektu i jakości systemu. Po wstępnej ocenie i zarysowaniu kształtu stentgraftu przez lekarza prowadzącego dane wysyłane są do firmy w której inżynierowie weryfikują i ulepszają projekt. Połączenie medycyny i wiedzy doświadczonych naukowców, którzy zaplanowali setki systemów dla różnych pacjentów pozwala wyeliminować wiele błędów. Fabrycznie systemy są również kontrolowane pod względem jakości i niezawodności, czego nie można zrobić modyfikując urządzenie ręcznie^{76,78}.

8. Podsumowanie

Badania długoterminowe porównujące klasyczną metodę operacji AAA i EVAR do tej pory nie dostarczyły wystarczającej ilości danych, by określić które podejście jest nadrzędne. Jednak z roku na rok liczba endowaskularnych zabiegów wykonywanych na całym świecie intensywnie wzrasta. Specjaliści wierzą, że jest to przyszłość chirurgii i w jej kierunku szkoła kolejne pokolenia. Pierwszy zabieg EVAR został przeprowadzony mniej niż 30 lat temu, ale od

tego czasu metody i systemy dostarczania stentgraftów niezwykle szybko się rozwijały i były ulepszone. Nowe generacje materiałów, innowacyjne projekty stentgraftów i urządzenia ułatwiające przeprowadzenie zabiegu w rękach doświadczonych specjalistów dają pacjentom szansę na małoinwazyjny, bezpieczniejszy okołoperacyjny zabieg. Pozwalają też uniknąć poważnych powikłań oraz bólu związanego z rozległą raną pozabiegową. Komfort życia pacjenta po zabiegu EVAR jest znacznie lepszy niż po zabiegu otwartym, co skraca czas hospitalizacji i pozwala na szybszy powrót do pełnej sprawności. W naszej opinii dalszy rozwój EVAR powinien nadal podążać w kierunku systemów umożliwiających poszerzenie kryteriów kwalifikacji pacjentów. Mając na uwadze, że chorzy z AAA są zwykle w podeszłym wieku, obciążeni chorobami współistniejącymi, które często uniemożliwiają przeprowadzanie zabiegów w znieczuleniu ogólnym EVAR może być jedyną szansą leczenia dla większości z tych pacjentów. Stentgrafty przyszłości powinny jak najlepiej odwzorowywać ludzką anatomię i być dostosowywane indywidualnie do chorego. Początkiem tego podejścia są urządzenia z fenestracją. Za niezwykle uważamy rozwój chirurgii naczyniowej na przestrzeni ostatnich lat. Jednak projekty takie jak Nellix powinny być dla nas ostrzeżeniem przed zbyt pochopnym wprowadzaniem nowych rozwiązań do ogólnego użytku. Każda innowacja powinna być dokładnie przetestowana, również długoterminowo przed wprowadzeniem na rynek. Warto też biorąc przykład z krajów prowadzących badania przesiewowe w kierunku AAA zastanowić się czy wcześniejsze wykrycie obecności tętniaka nie mogłoby być pomocne w jego leczeniu. Wykrywając zmiany wcześniej, mamy możliwość lepszego zaplanowania zabiegu i stworzenia stentgraftu personalizowanego. Naszym marzeniem jest rozwój technologii EVAR tak, aby była to metoda łatwodostępna, dostosowana do pacjenta i dająca mu szansę na pełen powrót do sprawności.

Referencje

1. Iung B. New ESC guidelines: aortic disease. *Heart*. 2015;101(6):421-423. doi:10.1136/heartjnl-2014-306777
2. Golledge J. Abdominal aortic aneurysm: update on pathogenesis and medical treatments. *Nat Rev Cardiol*. 2019;16(4):225-242. doi:10.1038/s41569-018-0114-9
3. Jim J. Clinical features and diagnosis of abdominal aortic aneurysm. UpToDate. <https://www.uptodate.com/contents/clinical-features-and-diagnosis-of-abdominal-aortic-aneurysm>. Published

January 2022.

4. Itoga NK, Rothenberg KA, Suarez P, et al. Metformin prescription status and abdominal aortic aneurysm disease progression in the U.S. veteran population. *Journal of Vascular Surgery*. 2019;69(3). doi:10.1016/j.jvs.2018.06.194
5. Gajewski P, Szczeklik A. *Interna Szczeklika 2019*. Kraków: Medycyna Praktyczna; 2019.
6. Aber A, Tong TS, Chilcott J, et al. Sex differences in national rates of repair of emergency abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg*. 2019;106(1):82-89. doi:10.1002/bjs.11006
7. de Guerre LEVM, Varkevisser RRB, Swerdlow NJ, et al. Sex differences in perioperative outcomes after complex abdominal aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg*. 2020;71(2):374-381. doi:10.1016/j.jvs.2019.04.479
8. Abdominal aortic aneurysm: Sex Villard C, Hultgren R. Abdominal aortic aneurysm: Sex differences. *Maturitas*. 2018;109:63-69. doi:10.1016/j.maturitas.2017.12.012
9. GBD data visualizations. Institute for Health Metrics and Evaluation. <https://www.healthdata.org/gbd/data-visualizations>. Published May 3, 2014. Accessed February 11, 2022.
10. US Preventive Services Task Force, Owens DK, Davidson KW, et al. Screening for Abdominal Aortic Aneurysm: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *JAMA*. 2019;322(22):2211-2218. doi:10.1001/jama.2019.18928
11. Eriksen CU. *What Is the Effectiveness of Systematic Population-Level Screening Programmes for Reducing the Burden of Cardiovascular Diseases?* Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2021.
12. Abdominal aortic aneurysm: Screening. Recommendation: Abdominal Aortic Aneurysm: Screening | United States Preventive Services Taskforce. <https://www.uspreventiveservicestaskforce.org/uspstf/recommendation/abdominal-aortic-aneurysm-screening>. Published December 10, 2019.
13. Bochenek A. *Anatomia Człowieka*. Vol Tom 3. PZWL Wydawnictwo Lekarskie; 2012.

14. **Oderich, G. and Tallarita, T., 2017.** Classification Systems Relevant to Complex Endovascular Aortic Repair. *Endovascular Aortic Repair*, pp.73-93.
15. Dalman R. Overview of abdominal aortic aneurysm. UpToDate. <https://www.uptodate.com/contents/overview-of-abdominal-aortic-aneurysm>. Published 2021.
16. Schuurmann RC, Ouriel K, Muhs BE, et al. Aortic curvature as a predictor of intraoperative type Ia endoleak. *J Vasc Surg*. 2016;63(3):596-602. doi:10.1016/j.jvs.2015.08.110
17. Chaikof EL, Dalman RL, Eskandari MK, et al. The Society for Vascular Surgery practice guidelines on the care of patients with an abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg*. 2018;67(1):2-77.e2. doi:10.1016/j.jvs.2017.10.044
18. Guirguis-Blake JM, Beil TL, Senger CA, Coppola EL. *Primary Care Screening for Abdominal Aortic Aneurysm: A Systematic Evidence Review for the U.S. Preventive Services Task Force*. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); December 2019.
19. Smith ME, Andraska EA, Sutzko DC, Boniakowski AM, Coleman DM, Osborne NH. The decline of open abdominal aortic aneurysm surgery among individual training programs and vascular surgery trainees. *J Vasc Surg*. 2020;71(4):1371-1377. doi:10.1016/j.jvs.2019.06.204
20. Kinio A, Ramsay T, Jetty P, Nagpal S. Declining institutional memory of open abdominal aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg*. 2021;73(3):889-895. doi:10.1016/j.jvs.2020.06.125
21. Suckow BD, Goodney PP, Columbo JA, et al. National trends in open surgical, endovascular, and branched-fenestrated endovascular aortic aneurysm repair in Medicare patients. *J Vasc Surg*. 2018;67(6):1690-1697.e1. doi:10.1016/j.jvs.2017.09.046
22. Dalman R. *Techniki Operacyjne w Chirurgii Naczyniowej*. Wrocław: Edra Urban & Partner Wydawnictwo; 2019.
23. Moore W. *Chirurgia Naczyniowa i Wewnętrzznaczyniowa Przegląd*

Wiedzy. Vol Tom 1. Oficyna Wydawnicza Atena; 2019.

24. Renata Piotrkowska, G., 2015. *Methods for surgical treatment of abdominal aortic aneurysm – therapeutic and nursing implications*. Czytelniamedyczna.pl. Available at: <<http://www.czytelniamedyczna.pl/5196,chirurgiczne-metody-leczenia-tetniaka-aorty-brzuszej-implikacje-terapeutyczne.html>>
25. Eidt J. Open surgical repair of abdominal aortic aneurysm. UpToDate. <https://www.uptodate.com/contents/open-surgical-repair-of-abdominal-aortic-aneurysm>. Published 2022.
26. Powell JT, Sweeting MJ, Ulug P, et al. Meta-analysis of individual-patient data from EVAR-1, DREAM, OVER and ACE trials comparing outcomes of endovascular or open repair for abdominal aortic aneurysm over 5 years [published correction appears in Br J Surg. 2018 Aug;105(9):1222]. *Br J Surg*. 2017;104(3):166-178. doi:10.1002/bjs.10430
27. Lederle, F., Kyriakides, T., Stroupe, K., Freischlag, J., Padberg, F., Matsumura, J., Huo, Z. and Johnson, G., 2019. Open versus Endovascular Repair of Abdominal Aortic Aneurysm. *New England Journal of Medicine*, 380(22), pp.2126-2135.
28. Ivancev K, Vogelzang R. A 35 Year History of Stent Grafting, and How EVAR Conquered the World. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2020;59(5):685-694. doi:10.1016/j.ejvs.2020.03.017
29. Criado FJ. EVAR at 20: the unfolding of a revolutionary new technique that changed everything. *J Endovasc Ther*. 2010;17(6):789-796. doi:10.1583/10-3291.1
30. Chaikof EL, Dalman RL, Eskandari MK, et al. The Society for Vascular Surgery practice guidelines on the care of patients with an abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg*. 2018;67(1):2-77.e2. doi:10.1016/j.jvs.2017.10.044
31. Abdul Jabbar A, Chanda A, White CJ, Jenkins JS. Percutaneous endovascular abdominal aneurysm repair: State-of-the art. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2020;95(4):767-782. doi:10.1002/ccd.28576
32. Watts MM. Percutaneous Endovascular Aneurysm Repair: Current Status and Future Trends. *Semin Intervent Radiol*.

- 2020;37(4):339-345. doi:10.1055/s-0040-1714728
33. Antoniou GA, Antoniou SA. Editor's Choice - Percutaneous Access Does Not Confer Superior Clinical Outcomes Over Cutdown Access for Endovascular Aneurysm Repair: Meta-Analysis and Trial Sequential Analysis of Randomised Controlled Trials. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2021;61(3):383-394. doi:10.1016/j.ejvs.2020.11.008
34. DeVito P Jr, Kimyaghalam A, Shoukry S, et al. Comparing and Correlating Outcomes between Open and Percutaneous Access in Endovascular Aneurysm Repair in Aortic Aneurysms Using a Retrospective Cohort Study Design. *Int J Vasc Med.* 2020;2020:8823039. Published 2020 Nov 27. doi:10.1155/2020/8823039
35. Lo TC, Hsin CH, Shie RF, et al. Outpatient Percutaneous Endovascular Abdominal Aortic Aneurysm Repair: A Single-Center Experience. *J Vasc Interv Radiol.* 2021;32(3):466-471. doi:10.1016/j.jvir.2020.11.012
36. Hong JC, Yang GK, Delarmente BA, et al. Cost-minimization study of the percutaneous approach to endovascular aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg.* 2020;71(2):444-449. doi:10.1016/j.jvs.2019.03.040
37. Huff CM, Silver MJ, Ansel GM. Percutaneous Endovascular Aortic Aneurysm Repair for Abdominal Aortic Aneurysm. *Curr Cardiol Rep.* 2018;20(9):79. Published 2018 Jul 26. doi:10.1007/s11886-018-1023-6
38. Endologix. 2022. *International - Endologix*. [online] Available at: <<https://endologix.com/united-states/>>
39. Choo XY, Hajibandeh S, Hajibandeh S, Antoniou GA. The Nellix endovascular aneurysm sealing system: current perspectives. *Med Devices (Auckl).* 2019;12:65-79. Published 2019 Feb 19. doi:10.2147/MDER.S155300
40. Ouriel K. The Nellix EndoVascular Aneurysm Sealing System. *J Vasc Surg.* 2020;71(2):353-354. doi:10.1016/j.jvs.2019.05.025
41. Carpenter JP, Cuff R, Buckley C, et al. Results of the Nellix system investigational device exemption pivotal trial for endovascular aneurysm sealing. *J Vasc Surg.* 2016;63(1):23-31.e1. doi:10.1016/j.

jvs.2015.07.096

42. Najafi, A., Sheikh, G., Wigger, P. and Binkert, C., 2019. Outcome of Nellix-EVAS: single center mid-term results. *CVIR Endovascular*, 2(1).
43. Sonetto A, Laukontaus S, Vikatmaa L, Aho P, Venermo M. Three-Year Results of the Nellix Endovascular Aneurysm Sealing System for Treatment of Abdominal Aortic Aneurysms in Frail Patients with Poor Anatomical Features. *Scand J Surg*. 2021;110(2):233-240. doi:10.1177/1457496920917267
44. Singh AA, Benaragama KS, Pope T, et al. Progressive Device Failure at Long Term Follow Up of the Nellix EndoVascular Aneurysm Sealing (EVAS) System. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2021;61(2):211-218. doi:10.1016/j.ejvs.2020.11.004
45. Montán C, Lehti L, Holst J, Björres K, Resch TA. Short- and mid-term results of the fascia suture technique for closure of femoral artery access sites after endovascular aneurysm repair. *J Endovasc Ther*. 2011;18(6):789-796. doi:10.1583/11-3621.1
46. Majid K, Anwar MA, Shepherd A, Malina M, Hussain T. Effectiveness of fascial closure technique following percutaneous endovascular aneurysm repair. *Ann R Coll Surg Engl*. 2019;101(1):14-16. doi:10.1308/rcsann.2018.0200
47. cardiovascular.abbott. 2022. *Perclose ProGlide Suture-Mediated Closure System*. [online] Available at: <https://www.cardiovascular.abbott/us/en/hcp/products/peripheral-intervention/vessel-closure/perclose-proglide-suture-mediated-closure-system/overview.html>
48. Bradley NA, Orawiec P, Bhat R, et al. Mid-term follow-up of percutaneous access for standard and complex EVAR using the ProGlide device [published online ahead of print, 2021 May 3]. *Surgeon*. 2021;S1479-666X(21)00070-6. doi:10.1016/j.surge.2021.03.005
49. Moonen HPFX, Koning OHJ, van den Haak RF, Verhoeven BAN, Hinnen JW. Short-term outcome and mid-term access site complications of the percutaneous approach to endovascular abdominal aortic aneurysm repair (PEVAR) after introduction in a vascular teaching hospital. *Cardiovasc Interv Ther*. 2019;34(3):226-233. doi:10.1007/s12928-018-0547-4

50. Lee CH, Huang JK, Yang TF. Use of a Perclose ProGlide device for percutaneous endovascular aortic aneurysm repair in a general hospital experience. *Discov Med.* 2016;22(121):173-179.
51. Toggweiler, S., Brinkert, M., Fornaro, J., Kobza, R. and Ockert, S., 2020. Simultaneous endovascular aortic aneurysm repair and transcatheter aortic valve implantation in the hybrid operating room. *Cardiovascular Medicine*,.
52. Summary of safety and effectiveness data for MANTA device. FDA. gov. https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf18/p180025b.pdf. Published 2019.
53. Wood DA, Krajcer Z, Sathananthan J, et al. Pivotal Clinical Study to Evaluate the Safety and Effectiveness of the MANTA Percutaneous Vascular Closure Device. *Circ Cardiovasc Interv.* 2019;12(7):e007258. doi:10.1161/CIRCINTERVENTIONS.119.007258
54. Case BC, Yerasi C, Forrestal BJ, et al. Real-World Experience of the MANTA Closure Device: Insights From the FDA Manufacturer and User Facility Device Experience (MAUDE) Database. *Cardiovasc Revasc Med.* 2021;27:63-66. doi:10.1016/j.carrev.2020.11.023
55. Center for Devices and Radiological Health. Alto™ Abdominal Stent Graft System. U.S. Food and Drug Administration. <https://www.fda.gov/medical-devices/recently-approved-devices/altotm-abdominal-stent-graft-system-p120006s031>
56. Holden, A. and Lyden, S., 2020. Initial experience with polymer endovascular aneurysm repair using the Alto stent graft. *Journal of Vascular Surgery Cases, Innovations and Techniques*, 6(1), pp.6-11.
57. de Donato G, Pasqui E, Panzano C, Galzerano G, Cappelli A, Palasciano G. Early Experience with the New Ovation Alto Stent Graft in Endovascular Abdominal Aortic Aneurysm Repair. *EJVES Vasc Forum.* 2021;54:7-12. Published 2021 Nov 27. doi:10.1016/j.ejvsf.2021.11.003
58. Center for Devices and Radiological Health. Treo® abdominal stent-graft. U.S. Food and Drug Administration. <https://www.fda.gov/medical-devices/recently-approved-devices/treor-abdominal-stent-graft-system-p190015>.

59. Treo® abdominal aortic stent grafts. Terumo Aortic. <https://terumoaortic.com/products/treo/>. Published January 18, 2022
60. Balceniuk MD, Zhao P, Terbush MJ, Schroeder AC, Cybulski L, Stoner MC. TREO Aortic Endograft Demonstrates Significant Aneurysmal Sac Shrinkage. *J Surg Res.* 2019;241:48-52. doi:10.1016/j.jss.2019.03.048
61. Uberoi R, Setacci C, Lescan M, et al. Global Post-Market Clinical Follow-up of the Treovance Stent-Graft for Endovascular Aneurysm Repair: One-Year Results From the RATIONALE Registry. *J Endovasc Ther.* 2018;25(6):726-734. doi:10.1177/1526602818803939
62. Eagleton MJ, Stoner M, Henretta J, et al. Safety and effectiveness of the TREO stent graft for the endovascular treatment of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 2021;74(1):114-123.e3. doi:10.1016/j.jvs.2020.10.083
63. Reina N, Galzerano G, Diliberti S, et al. Midterm outcomes of 71 consecutive abdominal aortic aneurysm patients treated with the TREO stent-graft in a single center. *Int Angiol.* 2020;39(5):405-410. doi:10.23736/S0392-9590.20.04336-9
64. Pratesi G, Piffaretti G, Verzini F, De Blasis G, Castelli P, Pratesi C. Ten-year outcome analysis of the Italian Excluder Registry with the Gore Excluder endograft for infrarenal abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 2018;67(3):740-746. doi:10.1016/j.jvs.2017.07.133
65. Chaer R. Endovascular devices for abdominal aortic repair. UpToDate. <https://www.uptodate.com/contents/endovascular-devices-for-abdominal-aortic-repair>. Published 2020.
66. Chaer R. Endovascular repair of abdominal aortic aneurysm. UpToDate. <https://www.uptodate.com/contents/endovascular-repair-of-abdominal-aortic-aneurysm>. Published 2021.
67. Rhee R, Peterson B, Moore E, Lepore M, Oderich G. Initial human experience with the GORE EXCLUDER Conformable AAA Endoprosthesis. *J Vasc Surg Cases Innov Tech.* 2019;5(3):319-322. Published 2019 Jun 29. doi:10.1016/j.jvscit.2019.03.014
68. Gore Medical. 2022. *GORE® EXCLUDER® AAA Endoprosthesis*. [online] Available at: <https://www.goremedical.com/products/excluder>

69. Rod, X. and Becquemin, J., 2018. Preservation of the Inferior Mesenteric Artery With a Surgeon-customised Fenestration. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 56(5), p.739.
70. Schmieder, F., 2017. Advanced Endovascular Abdominal Aortic Aneurysm Repair: Recent Developments – Temple Heart & Vascular Institute. Thvi-newsletter.org. Available at: <https://www.thvi-newsletter.org/2016/11/29/advanced-endovascular-abdominal-aortic-aneurysm-repair-recent-developments/>
71. Kansagra K, Kang J, Taon MC, et al. Advanced endografting techniques: snorkels, chimneys, periscopes, fenestrations, and branched endografts. *Cardiovasc Diagn Ther*. 2018;8(Suppl 1):S175-S183. doi:10.21037/cdt.2017.08.17
72. Taneva GT, Criado FJ, Torsello G, et al. Results of chimney endovascular aneurysm repair as used in the PERICLES Registry to treat patients with suprarenal aortic pathologies. *J Vasc Surg*. 2020;71(5):1521-1527.e1. doi:10.1016/j.jvs.2019.08.228
73. Touma J, Caradu C, Sylvestre R, et al. Multicentre Experience with the Chimney Technique for Abdominal Aortic Aneurysms in French University Hospitals. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2020;59(5):776-784. doi:10.1016/j.ejvs.2020.01.040
74. Prapassaro T, Teraa M, Chinsakchai K, et al. Mid-Term Outcomes of Chimney Endovascular Aortic Aneurysm Repair: A Systematic Review and Meta-analysis. *Ann Vasc Surg*. 2022;79:359-371. doi:10.1016/j.avsg.2021.08.013
75. Kansagra K, Kang J, Taon MC, et al. Advanced endografting techniques: snorkels, chimneys, periscopes, fenestrations, and branched endografts. *Cardiovasc Diagn Ther*. 2018;8(Suppl 1):S175-S183. doi:10.21037/cdt.2017.08.17
76. Chaer R. Endovascular devices for abdominal aortic repair. UpToDate. <https://www.uptodate.com/contents/endovascular-devices-for-abdominal-aortic-repair>. Published January 2022.
77. Oderich GS, Mendes BC. Results of fenestrated, branched, and parallel stent grafts for pararenal and thoracoabdominal aortic aneurysms. *Endovascular Aortic Repair*. 2017;449-462. doi:10.1007/978-3-319-15192-2_29

78. Dossabhoy SS, Simons JP, Flahive JM, et al. Fenestrated endovascular aortic aneurysm repair using physician-modified endovascular grafts versus company-manufactured devices. *J Vasc Surg.* 2018;67(6):1673-1683. doi:10.1016/j.jvs.2017.10.055

DRUK PRZESTRZENNY (3D) - REWOLUCJA W CHIRURGII SZCZĘKOWO-TWARZOWEJ

Michał Maćkowski, Oliwia Pluta, Kamila Meca

Studenckie Koło Naukowe im. prof. Zbigniewa Religii przy Katedrze Biofizyki, Wydział
Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Abstrakt:

Ostatnie dekady dostarczyły nam wielu przełomowych rozwiązań we wszystkich dziedzinach życia i były złotym czasem, szczególnie dla rozwoju nauki i technologii. Opatentowana już w 1986 roku technika druku 3D na przestrzeni ostatnich 10 lat mocno zyskała na popularności i stała się rewolucyjną metodą wytwarzania fizycznych obiektów na podstawie modeli widocznych na ekranie komputera. Coraz większa powszechność i jakość drukarek 3D oraz szeroki wachlarz dostępnych materiałów, sprawiają, że technologia ta daje ogromne możliwości, przez co coraz częściej i chętniej wykorzystywana jest jako narzędzie w środowisku medycznym, między innymi w chirurgii szczękowo-twarzowej. Chirurgi i inżynierowie zajmujący się rekonstrukcją twarzy stoją przed wieloma wyzwaniami, związanymi głównie ze złożonością struktur anatomicznych w tym obszarze. Technika druku przestrzennego ułatwia nie tylko odbudowę ubytków, ale również w znacznym stopniu przyczynia się do skrócenia czasu trwania całego zabiegu. Liczne modele anatomiczne, odwzorowujące dokładną budowę czaszki pacjenta, implanty, szablony, czy też szyny chirurgiczne, to tylko kilka z wielu przykładów zastosowania tej technologii, przywracającej unikalne struktury i funkcjonalność twarzoczaszki.

Słowa kluczowe: druk trójwymiarowy, druk 3D, chirurgia szczękowo-twarzowa

Abstract:

Recent decades have provided us with many breakthroughs in all areas of life and have been a golden time, especially for the development of science and technology. Patented already in 1986, the 3D printing technique has grown in popularity over the last 10 years and has become a revolutionary method of producing physical objects based on models visible on a computer screen. The increasing popularity and quality of 3D printers and a wide range of available materials make this technology offer great opportunities, which is why it is more often and more willingly used as a tool in the medical environment, including maxillofacial surgery. Facial reconstruction surgeons and engineers face many challenges, mainly related to the complexity of the anatomical structures in this area. The 3D printing technique not only facilitates the reconstruction of defects, but also significantly contributes to shortening the duration of the entire procedure. Numerous anatomical models reflecting the exact structure of the patient's skull, implants, guides or surgical splints are just a few of the many examples of the use of this technology, restoring the unique structures and functionality of the craniofacial.

Keywords: three-dimensional printing, 3D printing, maxillofacial surgery

1. Wprowadzenie

Chirurgia szczękowo-twarzowa to niezwykle ważna dziedzina medycyny, zajmująca się głównie rekonstrukcją defektów w obrębie twarzoczaszki, wynikających z wad wrodzonych lub nabytych, na przykład w wyniku poważnego wypadku. Niwelując nieprawidłowości daje ona wielu osobom szansę na lepsze życie, przywracając unikalne, anatomiczne, funkcjonalne i estetyczne cechy każdego człowieka, takie jak wygląd, czy mowa, przez co w znacznym stopniu poprawia interakcje ze społeczeństwem. Dziedzina ta zajmuje się leczeniem chirurgicznym zarówno tkanek miękkich, głównie: uszu, powiek, nosa, języka, warg i twarzy, jak również kości szkieletu czaszkowo-twarzowego¹. Liczne ubytki tkanek miękkich lub kości prowadzą do powstawania nieestetycznych, trudno gojących się ran. Rekonstrukcja wad w obrębie twarzoczaszki jest dość skomplikowana, głównie ze względu na dużą liczbę różnych typów tkanek, złożoność struktur anatomicznych znajdujących się w bliskiej odległości oraz nacisk na pozytywne wyniki estetyczne ze strony pacjentów. Obecnie najpopularniejszymi metodami stosowanymi w chirurgii rekonstrukcyjnej są przeszczepy, implanty, czy też mikrochirurgiczne transfery tkanki. Te powszechne rozwiązania, mimo częstego stosowania niosą za sobą wiele zagrożeń, w tym liczne powikłania związane z komplikacjami przy wprowadzaniu implantów, długi czas operacji, czy niepełne wygojenie ran pooperacyjnych^{2,3}. Kłopotliwe w niektórych przypadkach staje się również pozyskanie wystarczającej ilości tkanki o takich samych właściwościach, jak tkanka otaczająca ubytek, w celu przywrócenia jej prawidłowej budowy anatomicznej i pierwotnych funkcji. W takiej sytuacji pomocna, a zarazem najbardziej optymalna okazuje się innowacyjna technika druku przestrzennego, inaczej trójwymiarowego (ang. *three dimensional printing* – 3DP), która ewoluowała na przestrzeni kilku ostatnich dekad i wiele zakończonych sukcesem implementacji tej technologii utwierdza nas w przekonaniu, że w niedługim czasie zrewolucjonizuje ona dziedzinę medycyny rekonstrukcyjnej^{4,5}. Od momentu jej opatentowania w 1986 roku, dzięki szybkiemu wprowadzeniu nowoczesnych drukarek 3D i licznym ulepszeniom, takim jak obrazowanie w wysokiej rozdzielczości, czy zwiększona precyzja druku, technologia 3DP bardzo się rozwinęła, co pozwoliło na zastosowanie jej w wielu dziedzinach, w tym w lotnictwie, inżynierii, sztuce, przemyśle spożywczym, edukacji, produkcji i wreszcie w medycynie^{5,6}. Przy wykorzystaniu zróżnicowanych, zwykle ogólnodostępnych materiałów, takich jak metale, ceramika, czy tworzywa sztuczne, z użyciem technologii 3DP jesteśmy w stanie wytworzyć fizyczne trójwymiarowe obiekty o konkretnych

kształtach i właściwościach⁷. Proces druku przestrzennego jest zdefiniowany przez Międzynarodową Organizację Normalizacyjną (ISO) i Amerykańskie Towarzystwo Badań i Materiałów (ASTM), jako „proces łączenia materiałów w celu wykonania części z danych dla modelu 3D, zwykle warstwa po warstwie, w przeciwieństwie do metodologii wytwarzania subtraktywnego i formatywnego”⁸. Z biegiem czasu technika 3DP zyskała wiele różnych nazw, takich jak: druk przestrzenny, bezpośrednia produkcja cyfrowa, wytwarzanie addytywne, wytwarzanie brył swobodnych, szybkie wytwarzanie i szybkie prototypowanie⁹. Warto także podkreślić, że ze wszystkich publikacji naukowych napisanych na podstawie wykorzystania 3DP w medycynie, te skupiające się wokół rekonstrukcji okolic twarzoczaszki stanowią bardzo wysoki odsetek, a wiąże się to głównie z wieloma możliwościami zastosowania tej technologii we wspomnianym obszarze¹⁰.

2. Najczęściej wykorzystywane techniki druku trójwymiarowego

Pomimo tego, iż w medycynie, a szczególnie w chirurgii rekonstrukcyjnej dostępnych jest obecnie wiele wariantów 3DP, wszystkie z nich mają bardzo podobną koncepcję wytwarzania trójwymiarowych modeli.

Cały proces rozpoczyna się od wykonania skanu określonych struktur anatomicznych, przy użyciu popularnych technik obrazowania, takich jak rezonans magnetyczny (ang. *magnetic resonance imaging* - MRI) i tomografia komputerowa (ang. *computed tomography* - CT). Projektowany model jest przetwarzany i optymalizowany przy użyciu określonych programów komputerowych, przekształcany w standardowy plik, a następnie importowany do drukarki 3D. Każdy model zostaje sformatowany do wybranego kształtu geometrycznego, po czym jest krojony na cienkie warstwy, a ruchy głowicy i platformy drukującej umożliwiają tworzenie modelu warstwa po warstwie, według ściśle określonych i precyzyjnie zaprogramowanych parametrów^{7,11}.

3. Stereolitografia

Pierwszą z technik 3DP jest stereolitografia (SLA), w tej metodzie model 3D jest wytwarzany w procesie nakładania się warstw, które odpowiadają osiowym rzutom obrazów uzyskanych, dzięki wykorzystaniu CT.

Technika ta opiera się na procesie fotopolimeryzacji, w którym materiał stanowi płynna żywica, która następnie zostaje utwardzona pod wpływem światła ultrafioletowego (UV). Każda warstwa jest zwykle polimeryzowana

na grubość 0,05-0,15 mm. Proces ten jest kontynuowany, aż każdy wycinek obrazu uzyskanego dzięki CT zostanie zduplikowany na modelu żywicy. Wykorzystywane w chirurgii modele są w większości przygotowywane z żywicy akrylowej lub epoksydowej. Duża dokładność wydrukowanych obiektów, zgodność z anatomią pacjenta, a także ich przydatność w postępowaniu okołoperacyjnym zostały sprawdzone i potwierdzone w licznych doniesieniach naukowych¹²⁻¹⁴.

4. Selekttywne spiekanie laserowe

Selektywne spiekanie laserowe (SLS), będące kolejną znaną techniką 3DP jest klasyfikowane jako proces stapiania złoża proszkowego, które jest obecnie szeroko stosowane w licznych dyscyplinach medycznych. System umożliwiający tworzenie trójwymiarowych obiektów składa się z lasera, urządzenia do nakładania kolejnych warstw proszku, komputera z odpowiednim oprogramowaniem do sterowania całym procesem i niektórych dodatkowych mechanizmów, takich jak systemy podgrzewania złoża proszku.

Funkcja systemu SLS polega na skupieniu lasera o dużej mocy na pierwszej warstwie proszku, powodując jej stopienie w pożądany kształt. Gdy początkowa warstwa zostanie utwardzona, kolejna warstwa proszkowego materiału jest dodawana na wierzch rozwijającej się konstrukcji, a laser spieka jej określone obszary¹⁵. Do tego celu wykorzystywane są różne rodzaje laserów, takie jak lasery CO₂, lasery włóknowe lub lasery dyskowe, wybierane w zależności od materiału użytego do produkcji oraz mechanizmu metalurgicznego zagęszczania proszku¹⁶. Wspomnianą procedurę nakładania warstw proszku powtarza się, warstwa po warstwie, aż do momentu uzyskania gotowego obiektu¹⁵. Dostępność tego procesu umożliwia wytwarzanie szerokiej gamy bardzo precyzyjnych obiektów, w tym szyn chirurgicznych, wykonanych na zamówienie tytanowych implantów do orbity oczodołu, płytek uzupełniających ubytki kości czaszki i wielu innych, które doskonale dostosowują się do indywidualnych potrzeb pacjentów^{17,18}.

5. Technologia FDM

Technologia FDM (ang. *Fused Deposition Modeling*), znana także jako technologia FFF (ang. *Fused Filament Fabrication*), to kolejny szeroko dostępny i bardzo popularny sposób wytwarzania przestrzennych obiektów. Podstawowa zasada tej techniki opiera się na topieniu materiału przez głowicę

drukarki, a następnie przetłaczaniu go przez dyszę o średnicy ok. 0,6 mm i rozprowadzaniu w kontrolowany sposób, zgodnie z wcześniej zdefiniowaną ścieżką. Po utworzeniu jednej warstwy o grubości 0,1-0,3 mm, platforma robocza przesuwa się w dół lub głowica drukarki porusza się w górę, a nowa warstwa materiału jest nakładana na warstwę poprzednią¹⁹. Ten proces 3DP jest popularny w środowisku medycznym, głównie ze względu na duże bezpieczeństwo, niski koszt sprzętu i dostępność szerokiej gamy materiałów do druku. Zastosowanie trójwymiarowych modeli stworzonych z wykorzystaniem technologii FDM jest bardzo szerokie, natomiast najczęściej przy pomocy tej metody tworzy się szablony chirurgiczne, które nie tylko podnoszą precyzję wykonywanych zabiegów, ale również mocno skracają sam czas trwania operacji, co z kolei przekłada się na znacznie mniejsze ryzyko powikłań pooperacyjnych²⁰.

6. Materiały używane w druku trójwymiarowym

Każdy proces wytwarzania fizycznych trójwymiarowych obiektów wymaga zewnętrznego źródła energii, zwykle w postaci ciepła lub światła. Dobór odpowiedniego materiału jest kluczowy i uzależniony od konkretnych wymagań, co do pożądanych cech drukowanego modelu oraz wybranej techniki 3DP. Obecnie dostępnych jest wiele materiałów o różnych właściwościach, zarówno fizycznych, jak i chemicznych.

Najbardziej powszechnie stosowane są tworzywa sztuczne, takie jak polietylen, poliamid i nylon, które cechują się wysoką trwałością i elastycznością²¹. Często wykorzystywanymi materiałami są również akrylonitrylo-butadieno-styren (ABS) oraz łatwo biodegradowalny kwas polimlekowy (PLA), występujący między innymi w postaci żywicy. Do wytwarzania biorusztowań, głównie metodą FDM wykorzystywany jest kopolimer glikolidu z laktidem (PLGA), stanowiący rusztowanie dla komórek osteogennych ścian ubytku kostnego i umożliwiający jego szybszą regenerację oraz odbudowę²². Mniej popularnym tworzywem sztucznym jest alumid, który powstaje przez połączenie aluminium z poliamidem i spotykany jest zazwyczaj w postaci proszku, używanego do spiekania.

Inną bardzo często wykorzystywaną grupą materiałów są metale, głównie stal nierdzewna oraz pochodne tytanu i kobaltu. Posiadają one optymalne właściwości mechaniczne oraz wysoką biokompatybilność²¹.

Ceramika stanowi kolejny powszechnie używany materiał w 3DP, zwykle wykorzystywany jest proszek ceramiczny, który po stopieniu tworzy silne

wiązania. Dodatkowo wykazano, że dodawanie do proszku ceramicznego związków wapniowo-fosforanowych daje wytworzonym modelom, pełniącym rolę implantów możliwość tworzenia biokompatybilnego środowiska, co z kolei przekłada się na lepsze różnicowanie i proliferację okolicznych komórek²³. Warto podkreślić, że cały czas prowadzone są nowe badania nad wykorzystaniem licznych biomateriałów w technice 3DP do zastosowań medycznych.

7. Zastosowanie technologii druku trójwymiarowego

Technika 3DP znajduje coraz więcej zastosowań w chirurgii, jednak jej ściśle określone role wymagają skrupulatnego usystematyzowania. Z pomocą przychodzi analiza systematyczna, zatytułowana jako „Nowa klasyfikacja technologii druku trójwymiarowego: systematyczny przegląd druku trójwymiarowego w chirurgii czaszkowo-szczękowo-twarzowej specyficznej dla danego pacjenta”²⁴, której autorzy wyróżniają cztery podstawowe możliwości zastosowania techniki 3DP w tej dziedzinie.

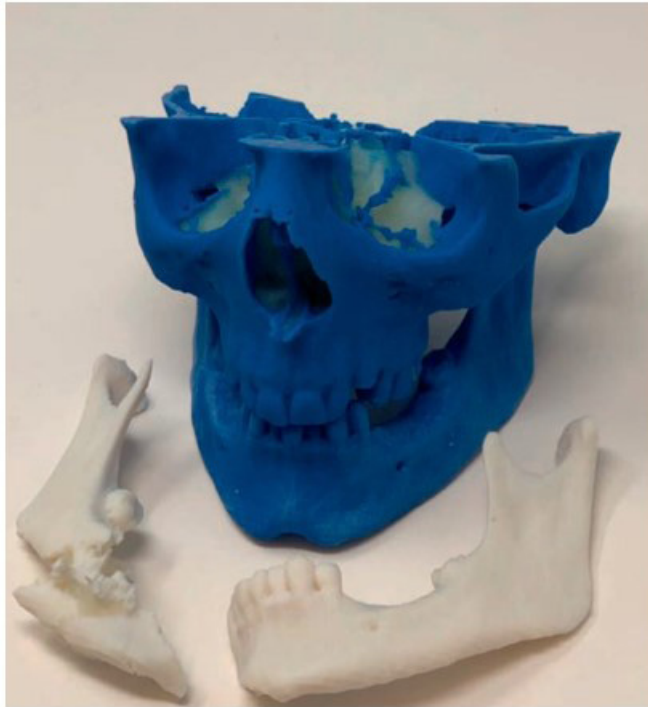
Pierwsza z nich obejmuje wytwarzanie przestrzennych modeli, na podstawie powszechnie dostępnych metod obrazowania, na przykład CT, które następnie są wykorzystywane do wizualizacji chirurgicznej (Zdjęcie 1). Możliwość obejrzenia takiego modelu przed, jak i w trakcie operacji jest bardzo przydatna, daje szansę poznania szczegółowej anatomii pacjenta, a w efekcie może pomóc w przeprowadzeniu szybkiego i sprawnego zabiegu. Modele te są również bardzo pomocne w sytuacji, kiedy konieczne jest dopasowanie implantu do kształtu ubytku lub zastosowanie płytek rekonstrukcyjnych, na przykład przy złamaniu żuchwy. Umożliwiają one wówczas wcześniejsze i bardziej precyzyjne wygięcie takiej płytki na wydrukowanym modelu, nawet przed operacją (Zdjęcie 2).

Drugą opisaną możliwością wykorzystania 3DP jest tworzenie precyzyjnych szablonów chirurgicznych, znajdujących zastosowanie najczęściej przy rekonstrukcji po urazach twarzoczaszki. Przy użyciu nowoczesnego oprogramowania możliwe jest stworzenie modelu idealnie uzupełniającego ubytek kości, na podstawie którego podczas przeprowadzanej operacji można pobrać przeszczep kostny o wymaganym kształcie, co znacznie zaoszczędzi czas i zwiększy bezpieczeństwo zabiegu, w porównaniu do tradycyjnej metody ciągłego rzeźbienia kości i sprawdzania kształtu, aż do momentu jej całkowitego dopasowania do ubytku.

Kolejnym pomysłem zastosowaniem technologii 3DP jest tworzenie szyn chirurgicznych, używanych najczęściej w chirurgii ortognatycznej. Ich

zadaniem jest ułatwienie korekcji zgryzu, między górnym i dolnym łukiem zębowym, przy leczeniu operacyjnym deformacji szkieletu czaszkowo-twarzowego. Zaletą zastosowania w tym przypadku 3DP jest przede wszystkim zmniejszenie strat materiałów oraz oszczędność czasu w porównaniu z tradycyjnymi metodami.

Ostatnią z wymienionych możliwości zastosowania tej technologii jest tworzenie implantów. Niesie to za sobą jednak pewne ograniczenia, głównie z uwagi na znacznie większe wymagania co do samego procesu wytwarzania modelu, który miałby służyć jako implant oraz trudności w doborze odpowiednich materiałów, które muszą wykazywać między innymi takie cechy jak biokompatybilność i pełna funkcjonalność. Mimo licznych niedogodności coraz częściej obserwuje się zastosowanie 3DP właśnie w dziedzinie implantologii i nieustannie prowadzone są nowe badania naukowe na ten temat.



Zdjęcie 1. Model prawidłowej czaszki pacjenta z mocnym złamaniem prawej strony żuchwy, wydrukowany przy użyciu technologii druku trójwymiarowego. Projekt został uzyskany przez stworzenie lustrzanego odbicia mniej uszkodzonej lewej strony żuchwy i nałożeniem go na stronę przeciwną, celem odtworzenia pierwotnego wyglądu czaszki¹.

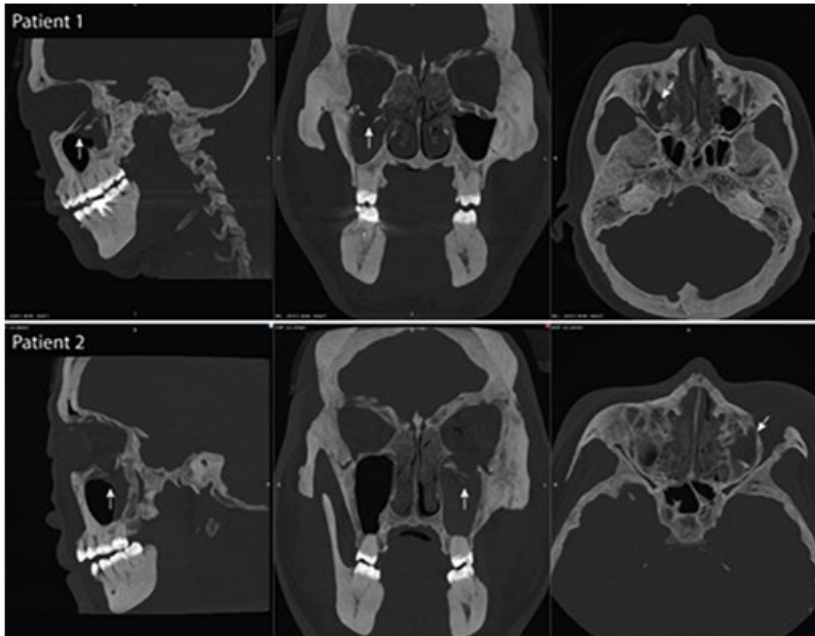


Zdjęcie 2. Płytki rekonstrukcyjne, wygięte na podstawie przygotowanego wcześniej modelu żuchwy, stworzonego za pomocą techniki druku trójwymiarowego¹.

8. Zastosowanie technologii druku trójwymiarowego przy rekonstrukcji złamania dna oczodołu

Złamanie dna oczodołu jest powszechnie występującym urazem twarzoczaszki. Jednym z jego najczęstszych powikłań, a zarazem wskazaniem do wykonania zabiegu chirurgicznej rekonstrukcji może być podwójne widzenie. Zastosowanie w tym przypadku wydrukowanego modelu dna oczodołu wykonanego techniką 3DP, na podstawie którego uformowany został implant, umożliwiło między innymi skrócenie czasu całej operacji oraz czasu trwania znieczulenia i zostało opisane w jednej z publikacji naukowych²⁵. Do badania włączono dwóch pacjentów. Pierwszym z nich był 37-letni mężczyzna, u którego po wykonaniu CT wykazano złamanie dna prawego oczodołu z przepukliną mięśnia prostego dolnego gałki ocznej (Zdjęcie 3). W wyniku powyższych urazów u pacjenta wystąpiło podwójne widzenie oraz ograniczenie ruchów zewnętrznych mięśni gałki ocznej. Drugą pacjentką była

50-letnia kobieta, u której na zdjęciu wykonanym za pomocą CT zaobserwowano złamanie dna lewego oczodołu z przepukliną mięśniową (Zdjęcie 3).



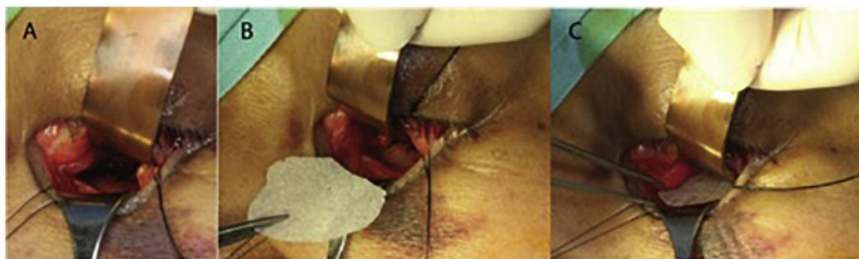
Zdjęcie 3. Skan uzyskany przy użyciu CT w trzech płaszczyznach. Pacjent 1 – złamanie dna prawego oczodołu, pacjent 2 – złamanie dna lewego oczodołu²⁵.

Z wykorzystaniem zaawansowanego oprogramowania do modelowania 3D, na podstawie skanów otrzymanych dzięki użyciu CT zaprojektowano modele, będące dokładnym odwzorowaniem rzeczywistej anatomii pacjentów. Do ich wykonania użyto drukarki przemysłowej, wykorzystującej technologię FDM, natomiast zastosowanym materiałem był ABS (Zdjęcie 4).

Przed przystąpieniem do zabiegów wydrukowane modele zostały wysterylizowane z użyciem niskotemperaturowej plazmy gazowej nadtlenu wodoru. Operacje wykonywane były przy znieczuleniu ogólnym. Na początku wykonano niewielkie nacięcie i przeprowadzono preparację do dolnego obrzeża oczodołu. Po odsłonięciu dna oczodołu wprowadzono płytkę wykonaną z polietylenu o grubości 0,85 mm, pełniącą rolę implantu (Zdjęcie 5).



Zdjęcie 4. Model z defektem prawego oczodołu, wykonany techniką druku trójwymiarowego z wykorzystaniem technologii FDM²⁵.



Zdjęcie 5. Zdjęcia wykonane podczas operacji, ukazujące wprowadzanie polietylenowej płytki w miejsce ubytku kostnego dna oczodołu²⁵.

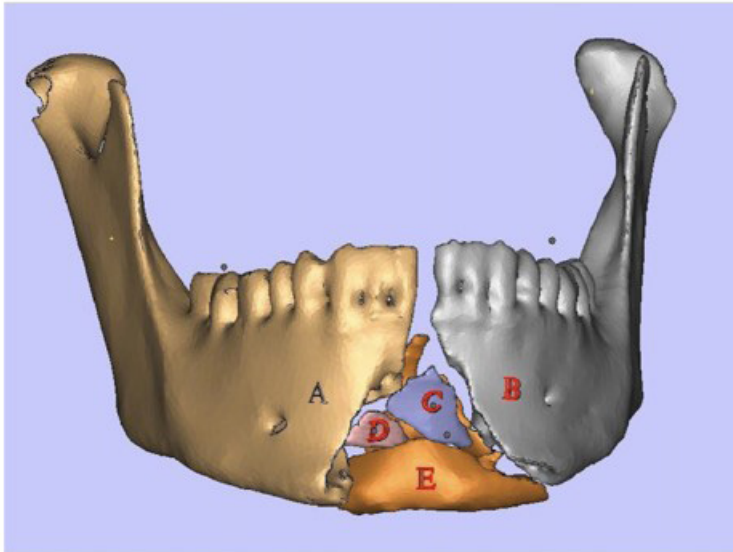
Dzięki możliwości wcześniejszego przycięcia i uformowania implantów na sterylnych modelach 3D, tak aby pasowały do rozmiaru ubytków, wprowadzono i stabilnie osadzono je już za pierwszym razem, a co za tym idzie uniknięto konieczności wielokrotnego wyjmowania i ponownego wprowadzania płytek w celu uzyskania oczekiwanego kształtu. Takie rozwiązanie pozwoliło skrócić czas każdego z zabiegów o prawie 30 minut, w porównaniu do wcześniej wykonywanych operacji rekonstrukcji dna oczodołu z wykorzystaniem tradycyjnej metody formowania implantów.

Przez kolejne dwa miesiące obaj pacjenci byli pod stałą obserwacją, w wyniku której nie stwierdzono żadnych nieprawidłowości. Rany chirurgiczne zostały prawidłowo zagojone, a podwójne widzenie ustąpiło. Oprócz samego planowania chirurgicznego, wydrukowane modele 3D zostały również użyte do edukacji pacjentów, dla lepszego zrozumienia przez nich procedury i celu wykonywanego zabiegu na podstawie własnej anatomii.

9. Zastosowanie technologii druku trójwymiarowego przy rekonstrukcji wieloodłamkowego złamania żuchwy

Rekonstrukcja wieloodłamkowego złamania żuchwy jest dość skomplikowanym zabiegiem, głównie z uwagi na trudność w odtworzeniu odpowiedniego kształtu łuku żuchwy podczas operacji. Bardzo pomocnym rozwiązaniem okazuje się zastosowanie w tej sytuacji technologii 3DP. Pozawala ona na wydrukowanie trójwymiarowego modelu żuchwy pacjenta, na podstawie skanu uzyskanego, dzięki użyciu popularnej techniki obrazowania, jaką jest CT, a następnie odpowiednie wygięcie płytki rekonstrukcyjnej jeszcze przed operacją.

Autorzy jednej z publikacji naukowych opisali w niej zastosowanie takiego rozwiązania przy rekonstrukcji wieloodłamkowego złamania kości żuchwy u pięciu różnych pacjentów²⁶. Postępowanie okołooperyacyjne oraz przebieg każdej z operacji były bardzo podobne. Na początku dokonano skanu twarzoczaszki przy użyciu CT, na podstawie którego z wykorzystaniem zaawansowanego oprogramowania stworzono trójwymiarowy projekt uszkodzonej żuchwy pacjenta (Zdjęcie 6) i z pomocą przemysłowej drukarki 3D, opierającej się na technologii SLA wydrukowano modele, będące odwzorowaniem fragmentów złamanej żuchwy. użytym materiałem był ABS.



Zdjęcie 6. Wirtualny trójwymiarowy projekt uszkodzonej żuchwy pacjenta, stworzony na podstawie skanu, uzyskanego z użyciem CT²⁶.

Chirurg odpowiedzialny za przeprowadzenie operacji zweryfikował, czy skalowanie modelu jest prawidłowe, porównując wymiary wydrukowanych zębów z zębami pacjenta. Następnym krokiem było sklejenie wydrukowanych fragmentów przy pomocy kleju cyjanoakrylowego oraz ich dodatkowe wzmocnienie metalowymi płytkami, w wyniku czego odtworzono model prawidłowej żuchwy pacjenta (Zdjęcie 7). Po jego przygotowaniu możliwe było przystąpienie do wstępnego wygięcia płytki rekonstrukcyjnej, która przed operacją została starannie wysterylizowana.



Zdjęcie 7. Trójwymiarowy model prawidłowo odtworzonej żuchwy pacjenta, wraz ze wstępnie wygiętą płytką rekonstrukcyjną²⁶.

We wszystkich pięciu przypadkach, zarówno w trakcie, jak i po operacji nie wystąpiły żadne poważne komplikacje. Ponadto dzięki zastosowaniu technologii 3DP czas trwania każdej z operacji został skrócony od 45 do nawet 60 minut. Potencjalną wadą takiego rozwiązania pozostaje koszt 3DP, który wynosił w tym przypadku od 1500 do 2000 dolarów za pojedynczy model.

10. Podsumowanie

Technologia 3DP jest stosunkowo nowym, ale bardzo obiecującym i prężnie rozwijającym się rozwiązaniem, dającym szerokie możliwości wykorzystania w chirurgii szczękowo-twarzowej. Wirtualna symulacja trójwymiarowych obiektów, połączona z 3DP umożliwia między innymi bardzo dokładne odtworzenie uszkodzonych kości twarzoczaszki, zachowując przy tym naturalny kształt i symetrię, co stanowi ogromne ułatwienie w ich późniejszej

rekonstrukcji na sali operacyjnej. Swoje zastosowanie znajduje również przy produkcji implantów, a także szablonów i szyn chirurgicznych. Zaawansowane programy komputerowe, szeroka gama dostępnych materiałów oraz technik druku, warunkują niemalże nieograniczone możliwości, co do tworzenia trójwymiarowych modeli. Opisane przez nas zastosowania stanowią zapewne jedynie mały procent możliwości wykorzystania technologii 3DP w tej dziedzinie. Jej głównymi zaletami są skrócenie czasu trwania operacji, zwiększenie ich dokładności, a zarazem zmniejszenie inwazyjności, co w znacznym stopniu wpływa na jakość pracy chirurgów oraz komfort samych pacjentów. Potencjalne wady 3DP obejmują dodatkowe koszty, które pojawiają się przy procesie produkcji trójwymiarowych modeli, potrzebę znajomości skomplikowanego oprogramowania do tworzenia wirtualnych projektów 3D i niekiedy długi czas realizacji, szczególnie kiedy wykonanie modelu zlecane jest zewnętrznej firmie. Mimo, iż technologia 3DP jest obecnie wykorzystywana w stosunkowo wąskim zakresie, z biegiem czasu ma szansę zrewolucjonizować dziedzinę chirurgii i być tym samym kolejnym krokiem milowym w rozwoju nauk medycznych.

Referencje

1. Lin AY, Yarholar LM. Plastic Surgery Innovation with 3D Printing for Craniomaxillofacial Operations. 2020;117(2):136-142.
2. Broyles JM, Abt NB, Shridharani SM, Bojovic B, Rodriguez ED, Dorafshar AH. The fusion of craniofacial reconstruction and microsurgery: a functional and aesthetic approach. *Plast Reconstr Surg.* 2014;134(4):760-769.
3. Fisher M, Dorafshar A, Bojovic B, Manson PN, Rodriguez ED. The evolution of critical concepts in aesthetic craniofacial microsurgical reconstruction. *Plast Reconstr Surg.* 2012;130(2):389-398.
4. Colaco M, Igel DA, Atala A. The potential of 3D printing in urological research and patient care. *Nat Rev Urol.* 2018;15(4):213-221.
5. Murphy SV, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol.* 2014;32(8):773-785.
6. Zhu W, Ma X, Gou M, Mei D, Zhang K, Chen S. 3D printing of functional biomaterials for tissue engineering. *Curr Opin Biotechnol.* 2016;40:103-112.

7. Singh S, Ramakrishna S, Singh R. Material issues in additive manufacturing: a review. 2017;25:185–200.
8. Rengier F, Mehndiratta A, von Tengg-Kobligk H, Zechmann CM, Unterhinninghofen R, Kauczor HU, Giesel FL. 3D printing based on imaging data: review of medical applications. *Int J Comput Assist Radiol Surg.* 2010;5(4):335-41.
9. Gibson I, Rosen D, Stucker B. Additive Manufacturing Technologies: 3D Printing, Rapid Prototyping, and Direct Digital Manufacturing. 2015;375–397.
10. Tack P, Victor J, Gemmel P, Annemans L. 3D-printing techniques in a medical setting: a systematic literature review. 2016;15(1):115.
11. Bourell D. Perspectives on Additive Manufacturing. 2016;46:1–18.
12. Cunningham LL Jr, Madsen MJ, Peterson G. Stereolithographic modeling technology applied to tumor resection. 2005;63(6):873-8.
13. Barker TM, Earwaker WJ, Lisle DA. Accuracy of stereolithographic models of human anatomy. 1994;38(2):106-11.
14. Mehra P, Miner J, D'Innocenzo R, Nadershah M. Use of 3-d stereolithographic models in oral and maxillofacial surgery. 2011;10(1):6-13.
15. Gu D, Meiners W, Wissenbach K, Poprawe R. Laser additive manufacturing of metallic components: Materials, processes and mechanisms. 2012;57:133–164.
16. Fischer P, Romano V, Blatter A, Weber H. Highly precise pulsed selective laser sintering of metallic powders. 2005;2:48–55.
17. Mangano FG, Cirotti B, Sammons RL, Mangano C. Custom-made, root-analogue direct laser metal forming implant: a case report. 2012;27(6):1241-1245.
18. Rotaru H, Baciut M, Stan H, Bran S, Chezan H, Iosif A et al. Silicone rubber mould cast polyethylmethacrylate-hydroxyapatite plate used for repairing a large skull defect. 2006;34(4):242-246.
19. Turner B, Gold S. A review of melt extrusion additive manufacturing processes: II. Materials, dimensional accuracy, and surface roughness. 2015;21:250–261.

20. Honigmann P, Sharma N, Okolo B, Popp U, Msallem B, Thieringer FM. Patient-Specific Surgical Implants Made of 3D Printed PEEK: Material, Technology, and Scope of Surgical Application. ;2018;4520636.
21. <http://3dprintingindustry.com/3d-printing-basics-free-beginners-guide/materials/> (Dostęp:14.03.2022).
22. Whitcombe MJ, Kirsch N, Nicholls IA. Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years 2004-2011. 2014;27(6):297-401.
23. Michna S, Wu W, Lewis JA. Concentrated hydroxyapatite inks for direct-write assembly of 3-D periodic scaffolds. 2005;26(28):5632-9.
24. Jacobs CA, Lin AY. A New Classification of Three-Dimensional Printing Technologies: Systematic Review of Three-Dimensional Printing for Patient-Specific Craniomaxillofacial Surgery. 2017;139(5):1211-1220.
25. Pang SSY, Fang C, Chan JYW. Application of three-dimensional printing technology in orbital floor fracture reconstruction. 2018;17:23-28.
26. Chew KY, Kok YO, Pek WS, Too CW, Tan BK. Surgical planning using facial fracture 3D models: The role of cyanoacrylate glue and miniplating for anatomical reduction. 2021;28:19-24.

INNOWACYJNE TERAPIE W LECZENIU ENDOMETRIOZY

Patrycja Pabis¹, Aleksandra Włosowicz², Karol Żmudka¹

1. Studenckie Koło Naukowe im. Prof. Zbigniewa Religi przy Katedrze Biofizyki,
Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

2. Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze Chorób Wewnętrznych,
Diabetologii i Nefrologii, Wydział Nauk Medycznych w Zabrze,
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Abstrakt:

Endometrioza jest przewlekłą chorobą około 10% kobiet w wieku rozrodczym, charakteryzującą się obecnością gruczołów i podścieliska endometrium poza jamą macicy. Stanowi duży problem kliniczny ze względu na brak odpowiedniej formy leczenia oraz jej wczesnego wykrywania. Obecnie stosowane leki przeciwbólowe, terapie hormonalne, zabiegi chirurgiczne są często nieskuteczne i wiążą się z poważnymi skutkami ubocznymi, oraz wysokim odsetkiem nawrotów, dlatego niezbędne jest opracowanie nowych terapii ukierunkowanych na mechanizmy komórkowe i molekularne odpowiedzialne za endometriozę. Nadzieję na innowacyjną formę leczenia daje terapia inhibitorami NPSR1 wykorzystywana w leczeniu stadium III i IV endometriozy oraz połączenie terapii genowej i leczenia hormonalnego, czyli jednoczesne podawanie nanocząstek CPP/siRNA wraz z danazolem, które hamują proliferację i inwazję komórek. Celem pracy jest przybliżenie inhibitorów NPSR1 oraz terapii genowej z danazolem jako nowoczesnych form terapii.

Słowa kluczowe: endometrioza, nowoczesne leczenie, NPSR1, CPP/siRNA

Abstract:

Endometriosis is a chronic disease of approximately 10% of women of reproductive age, characterized by the presence of endometrial glands and stroma outside the uterine cavity. It is a major clinical problem due to the lack of an appropriate form of treatment and its early recognition. Medications that are currently used such as painkillers, hormone therapies, and surgical procedures are often ineffective and are associated with severe side effects and a high recurrence rate, so it is necessary to develop new therapies targeting the cellular and molecular mechanisms responsible for endometriosis. Therapy with NPSR1 inhibitors is giving a hope for the innovative form of treatment, which is used in the treatment of III and IV stage of endometriosis and the combination of gene therapy and hormone therapy, which is simultaneous administration of CPP/siRNA nanoparticles with danazol, which inhibit proliferation and invasion of a cell. The aim of the study is to introduce NPSR1 inhibitors and gene therapy with danazol as modern forms of therapy.

Keywords: endometriosis, new treatment, NPSR1, CPP/siRNA

1. Wstęp

Endometrioza jest przewlekłą chorobą zapalną zależną od estrogenu, charakteryzującą się obecnością tkanki podobnej do endometrium poza jamą macicy¹. Występuje u prawie 10% kobiet w wieku rozrodczym, z czego aż 30 do 50% z nich cierpi na przewlekły ból i/lub niepłodność². Sumarycznie powoduje ból i niepłodność u około 8-10% kobiet w wieku rozrodczym³. Najczęściej zgłaszanymi objawami są bolesne miesiączkowanie, głęboka dyspareunia, dyschezja i dyzuria¹ coelomic metaplasia and Müllerian remnants. Choroba ta głównie obejmuje narządy rozrodcze, miednicę mniejszą, ale jej lokalizacja może być również bardzo odległa. Najczęściej występuje endometrioza jajnika, otrzewnej i jajnika, pochwy, oraz otrzewnej. W 64% przypadków schorzenie to diagnozowane jest dopiero w III i IV stadium, co jest ogromnym problemem dla pacjentek pozostających bez rozpoznania w pierwszych okresach choroby⁴. Patogeneza jest złożona, a leczenie polega na łagodzeniu bólu, terapiach hormonalnych, leczeniu chirurgicznym, ale niestety żaden z dostępnych leków nie jest w stanie całkowicie jej wyleczyć. W przeglądzie systematycznym oceny metod leczenia endometriozy Becker i in. szacują, że około 10% pacjentów nie ulega poprawie dzięki terapii hormonalnej i wymaga innych leków, takich jak NLPZ. Do tej pory nie można zaproponować optymalnego leczenia endometriozy, ponieważ wybrane terapie często zawodzą. Pilnie potrzebny jest rozwój nowych celów biologicznych. Opisano wiele kryteriów idealnego leku na endometriozę. Wśród tych kryteriów głównym jest opracowanie środków leczniczych, zamiast leków tłumiących, które mają równoczesny wpływ na ból i niepłodność, mają niski profil skutków ubocznych, nie są antykoncepcją i które można bezpiecznie stosować przez długi okres.

1.1. Podział endometriozy

Endometriozę można podzielić na trzy podtypy na podstawie jej histopatologii i lokalizacji anatomicznych: endometriozę powierzchowną (otrzewnową), endometriozę głęboko naciekającą (DIE)- definiowana jako zmiany naciekające o głębokości powyżej 5 mm⁵ i torbiele endometriotyczne jajnika (tzw. torbiele czekoladowe). Amerykańskie Towarzystwo Medyczne Rozrodu (ASRM) dokonało klasyfikacji ze względu na stopień zaawansowania choroby, bazując na liczbie, lokalizacji i głębokości implantów oraz obecności zrostów, co zostało przedstawione w Tabeli 1.⁶ Chociaż podział ten został opracowany do oceny płodności, jest powszechnie stosowany w celu oceny nasilenia

endometriozy i ujednolicenia zarówno badań naukowych, jak i opieki nad pacjentką.

Tabela 1. Podział endometriozy według ASRM⁷

Stopień	Nazwa stopnia	Opis
I	Minimalny	Kilka niewielkich i powierzchownych ognisk endometriozy.
II	Mały	Zmiany osiągają większą średnicę i sięgają głębiej, obecność pojedynczych zrostów.
III	Średni	Dużo głębokich implantów, obecność małych torbieli czekoladowych na jednym lub obu jajnikach, obecność zrostów.
IV	Ciężki	Wiele głębokich implantów, ogniska endometriozy w różnych lokalizacjach, duże torbiele czekoladowe na jednym lub obu jajnikach, gęste zrosty obecne również w jelitach. Macica może pozostawać nieruchoma, jej tylna część może być przyrośnięta do odbytnicy.

1.2. Nietypowe lokalizacje endometriozy

Endometrioza powierzchowna pojawia się zwykle na powierzchni lub w podsukowicowej tkance miękkiej otrzewnej lub narządów trzewnych, podczas gdy DIE obejmuje zmiany sięgające głęboko do warstwy mięśniowej jelita, ściany pęcherza moczowego, przepony i innych narządów. Nietypowe lokalizacje endometriozy zostały przedstawione w tabeli 2⁸. Różne typy endometriozy charakteryzują się odrębnymi cechami biologicznymi i klinicznymi. W przeciwieństwie do endometriozy powierzchownej, DIE często powoduje poważne objawy kliniczne, w tym znaczny ból oraz nieprawidłowości ze strony przewodu pokarmowego i układu moczowo-płciowego². Dlatego w przyszłości priorytetem powinno być zwiększenie hamowania i unikanie rozwoju nowych zmian, a także możliwość leczenia wszystkich fenotypów endometriozy oraz zmian poza miednicą i adenomiozy.

Tabela 2. Opis najczęstszych typów endometriozy pozagenitalnej⁸

Lokalizacja	Endometrioza klatki piersiowej	Endometrioza pachwinowa	Endometrioza w ścianie jamy brzuszej	Endometrioza dróg moczowych	Endometrioza przewodu pokarmowego
Cechy	Jest bardzo rzadka i można ją podzielić na endometriozę opłucnową i płucną- objawy opłucnowe są znacznie częstsze niż oskrzelowo-płucne. Dominującym, ale rzadkim objawem endometriozy oskrzelowo-płucnej jest krwio-płucie, zwykle występujące w ścisłym związku z krwawieniem miesięcznym. Zmiany obecne są na opłucnej ściennej, w przeponie, a także na opłucnej trzewnej oraz w miąższu płuc	Zwykle zlokalizowana w okolicy kanału pachwinowego, w rzadkich przypadkach w rejonie kręgosłupa kulszowego lub kości łonowej. Opisano przypadki zlokalizowane w kości podudzia i krzyżowo-guzicznej. Głównymi objawami są bóle- kiedy zajęty jest jeden z większych nerwów, ból promieniuje do obszaru dystrybucji nerwu. Ból może być związany z określonymi pozycjami ciała lub ruchami. Z czasem pojawia się jeden lub więcej innych objawów neurologicznych.	Występuje w bliznach po operacji podbrzusza, najczęściej antefleksji macicy i histerektomii, oraz innych operacji ginekologicznych, a także wycięcia wyrostka robaczkowego, przezbrzusznym nakłuciu macicy, lub po urazie ściany brzucha i chirurgii plastycznej przepukliny pachwinowej. Zmiana często znajduje się między skórą a powięzią, rzadko pod powięzią i nie przechodzi przez otrzewną. Objawy pojawiają się najczęściej w ciągu 1 roku od operacji, najbardziej wyraźnym jest cykliczna tkliwość ponad ograniczony obszar. Stopniowo rozwija się guzek, który może zmieniać wielkość/ zanikać w zależności od cyklu miesięcznego. Zwykle są to pojedyncze guzki na jednym lub obu końcach blizny.	Zajęcie dróg moczowych jest prawie zawsze wskazanem agresywnej postaci choroby. Najczęściej pierwotną lokalizacją są wężadła krzyżowo-maciczne, odnotowano jednak izolowaną pierwotną endometriozę w pęcherzu i moczowodach, gdzie stanowi ważną przyczynę niedrożności. Większość kobiet z endometriozą pęcherza przeszła w przeszłości operację na miednicy, a zmiany często były zlokalizowane w bliznach po zabiegu. Symptomy to głównie ból, zaburzenia oddawania moczu, krwiomocz. Charakterystyczne dla endometriozy moczowodu jest przewlekły, podstępny przebieg bez objawów.	Najczęstsze miejsce endometriozy pozagenitalnej, występuje u około 5% wszystkich przypadków. Dotyczy segmentów jelita zlokalizowanych głównie w pobliżu narządów płciowych (esica, odbytnica, wyrostek robaczkowy). Wyrażna lub całkowita niedrożność rozwija się w około 20% wszystkich przypadków endometriozy okrężnicy, ale wyraźne zwężenie jelita cienkiego występuje znacznie rzadziej.

1.3. Mutacje genów w endometriozie

Odkryciem ostatnich lat jest to, że somatyczne mutacje genów związanych z rakiem są powszechnie spotykane w różnych typach endometriozy, w tym DIE, torbielach endometrialnych i jatrogennej endometriozie. Mimo to tkanka endometriotyczna wydaje się normalna i histopatologicznie nie różni się od endometrium eutopowego, a w przeciwieństwie do komórek rakowych, komórki endometriotyczne mają ograniczoną aktywność proliferacyjną. Niemniej jednak oryginalne badanie przeprowadzone przez Anglesio et al. w 2017r⁹. zgłosiło, że 83% łagodnych zmian DIE zawierało mutacje somatyczne, a 26% nosiło mutacje prowadzące, w tym w KRAS, PIK3CA, ARID1A i PPP2R1A, z których wszystkie były ograniczone do nabłonka. Te dobrze znane geny są również często zmutowane w rakach macicy i rakach jajnika związanych z endometrioza². Jednak częstość występowania złośliwej transformacji w endometriozie wynosi blisko 1%¹⁰, a wyniki sugerują, że sama obecność mutacji kierujących nie jest wystarczająca do wywołania transformacji endometriozy ani nie wskazuje na prawdopodobną progresję do raka. Co najmniej jedno badanie na mysim modelu endometriozy dostarczyło już dowodów na to, że (subklonalne) aktywujące mutacje Kras mogą podtrzymywać endometriozę, ale nie są wystarczające do transformacji nowotworowej¹¹. Endometriotyczne komórki zrębowe wykazują specyficzne nieprawidłowości epigenetyczne, które zmieniają ekspresję kluczowych czynników transkrypcyjnych. Na przykład nadekspresja czynnika 6 wiążącego GATA przekształca komórkę zrębu endometrium w fenotyp endometriotyczny, a nadekspresja czynnika 1 steroidogennego powoduje nadmierną produkcję estrogenu, co prowadzi do zapalenia poprzez patologicznie wysoki poziom receptora estrogenowego- β . Niedobór receptora progesteronu powoduje zaś oporność na progesteron¹².

2. Patofizjologia endometriozy

Podczas cyklu menstruacyjnego tkanka endometrium może rozprzestrzenić się poza jej normalne położenie i zostać wszczepiona w inne miejsca, co aktywuje odpowiedź immunologiczną, która w tym przypadku wydaje się niewystarczająca do usunięcia tych zmian. Zmiany przyciągają makrofagi, komórki NK i cytotoksyczne limfocyty T, a następująca po tym aktywacja odpowiedzi zapalnej sprzyja wydzielaniu cytokin i chemokin w jamie otrzewnej. Tworzy to mikrośrodowisko, które przyczynia się do rozwoju ektopowej

tkanki endometrium, ułatwiając zlokalizowaną angiogenezę i zakłócając prawidłowe procesy apoptotyczne¹³. Wśród czynników związanych ze zwiększonym ryzykiem rozwoju endometriozy są m.in. pochodzenie azjatyckie¹⁴, oraz przedłużona ekspozycja na estrogeny (np. wczesny wiek pierwszej miesiączki, krótsze cykle miesiączkowe)¹⁵. Ze względu na to, że wieloczynnikowy charakter endometriozy wiąże się z udziałem mechanizmów immunologicznych, procesów angiogenetycznych i zmian biochemicznych, można wywnioskować, że czynniki genetyczne oraz modyfikacje epigenetyczne współdziałają w manifestacji choroby. Wzorec dziedziczenia endometriozy został po raz pierwszy zaproponowany przez Goodalla w 1943 roku, w jego odniesieniach do 5 przypadków historii rodziny¹⁶. Od tego czasu prowadzone są dalsze badania rodzinne¹³.

2.1. Czynniki genetyczne

Badania bliźniąt i członków ich rodzin sugerują składnik genetyczny wystąpienia endometriozy¹⁷. Wyniki badań eksperymentalnych, dotyczących analizy genów ESR1, ESR2, PGR i CYP19A1 wskazują na istnienie pewnych korelacji ich ekspresji z endometriozą. W badanych grupach kobiet z endometriozą zaobserwowano istotny wzrost ekspresji genów ESR2 i CYP19A1, co może wskazywać na pewną rolę tego czynnika w patogenezie endometriozy¹⁸. Analiza ostatnich publikacji dotyczących genetyki endometriozy wykazała rozbieżność wyników w zależności od danej populacji. Niemniej jednak dane podkreślają znaczenie oceny wariantów genetycznych w różnych populacjach, możliwe że w różnych grupach etnicznych określone allele ryzyka mogą działać inaczej w patogenezie choroby¹⁹. U podstaw progresji endometriozy leżą cztery wyraźne nieprawidłowości w jamie macicy i tkance endometriozy pozamaciczej:

- rozregulowanie różnicowania komórek mezenchymalnych endometrium,
- nieprawidłowe oznaki epigenetyczne,
- zapalenie aktywowane nadmiarem estrogenów
- rozwój oporności na progesteron.

Większość zmian stanowią komórki zrębowe endometriozy, które wykazują rozległe nieprawidłowości epigenetyczne. Komórki zrębu endometrialnego wykazują również szeroki zakres nieprawidłowej ekspresji NR. Sierocce NR5A1 i NR2F2 konkurują o regulację genów syntetyzujących steroidy w komórkach zrębu endometriozy. Dominacja NR5A1 powoduje nadmierne

tworzenie estrogenów. Komórki zrębu endometrialnego wykazują nienormalnie niski stosunek ESR1:ESR2 z powodu nadmiernego poziomu ESR2, który pośredniczy w procesie zapalnym napędzanym estrogenem i tworzeniu prostaglandyn. Komórki te mają również niedobór PGR, co prowadzi do oporności na progesteron i nieprawidłowej syntezy retinoidów. Biologiczne konsekwencje tych nieprawidłowości w tkance endometriotycznej obejmują intensywne zapalenie, wadliwe różnicowanie i zwiększoną przeżywalność komórek²⁰. Jako integralną składową choroby wskazuje się metylację DNA, uwzględniając nową rolę rodziny GATA jako kluczowych regulatorów fizjologii macicy. Nieprawidłowa metylacja DNA w komórkach endometriotycznych koreluje ze zmianą ekspresji izoformy GATA, która ułatwia oporność na progesteron i stymuluje postęp choroby²¹.

2.2. Zmniejszona apoptoza

Apoptoza jest znacznie zmniejszona w endometriotycznym nabłonku gruczołowym i utraczona jest jej cykliczna zmienność w stosunku do grupy kontrolnej. Zauważono tendencję do zmniejszenia nasilenia apoptozy wraz z postępującym stadium choroby, ale różnice nie były istotne statystycznie²². Badania sugerują, że tkanka endometrium zlokalizowana w lokalizacjach ektopowych różni się od endometrium eutopowego szybkością proliferacji, poziomem hormonów steroidowych i markerami apoptozy. Nie stwierdzono korelacji między apoptozą a poziomem receptora estrogenowego w tkankach endometrialnych, bez cyklicznej modulacji, ale stwierdzono mniejszą ilość receptora steroidowego w porównaniu z endometrium eutopowym²³. Dodatkowo w pracy z 2016 roku dowiedziono, że ERβ (Estrogen receptor- receptor estrogenowy β) prowadzi do nadekspresji SGK1 (glucocorticoid-regulated kinase 1- Kinaza regulowana przez glukokortykoidy) w endometriozie, co przyczynia się do przeżycia zmian endometrialnych poprzez hamowanie apoptozy²⁴. Ekspresja ERβ może być >100 razy wyższa w tkance endometriotycznej niż w endometrium. ERβ hamuje ekspresję ERα, co może być powodem oporności tych tkanek na progesteron. Wysoki poziom ERβ symuluje wytwarzanie prostaglandyn w tkankach i komórkach endometriozy poprzez indukcję ekspresji COX2, co skutkuje indukowaniem bólu²⁵. Również cząsteczki miRNA mogą wpływać na zahamowanie apoptozy i postęp choroby²⁶.

2.3. Angiogeneza

W zmianach endometrialnych często obserwuje się nadmierne tworzenie nowych naczyń krwionośnych zależne od hormonów steroidowych. Cytokiny, takie jak IL-17A, mogą nasilać angiogenezę w jamie otrzewnej i powodować wzrost zmian endometrialnych¹². Co więcej, ER β stymuluje ekspresję SLIT3, który może odgrywać kluczową rolę we wzmacnianiu angiogenezy w endometriozie²⁷. Nawracające i przewlekłe krwawienia widoczne dzięki makrofagom obciążonym hemosyderyną są unikalną cechą histologiczną endometriozy.

2.4. Wadliwe różnicowanie

Kluczową obserwacją w endometriozie jest niedostateczne różnicowanie (decidualizacja) komórki zrębu, które powiązano z opornością na progesteron^{21,28,29}.

2.5. Zapalenie

Zapalenie jest jednym z przyczyn bólu w endometriozie. Prowadzi również do przebudowy sąsiednich tkanek, zwłóknienia, tworzenia zrostów i niepłodności¹². Powszechnie wiadomo, że mediatory zapalne promują angiogenezę i oddziałują z neuronami czuciowymi indukującymi sygnał bólu. Hamowanie syntezy mediatorów stanu zapalnego może zaoferować nowatorskie i skuteczne leczenie bólu spowodowanego stanem zapalnym w endometriozie. W szczególności, rodzina chemokin CXC, fraktalkina i PGE2 odgrywają aktywną rolę w wywoływaniu bólu. Dodatkowo IL-1 β wydaje się być główną interleukiną, która wraz z IL-6 stymuluje większość czynników zapalnych, które biorą udział w neuroangiogenezie³⁰. Nieprawidłowa autofagia występująca w eutopowych ogniskach endometrium i ectopowych ogniskach endometriozy, przyczynia się do patogenezy endometriozy poprzez promowanie hiperplazji tkanek endometrialnych i komórek zrębu, ograniczanie apoptozy i wywoływanie nieprawidłowych odpowiedzi immunologicznych. Obserwuje się również zmienioną ekspresję genów związanych z autofagią (ATG). Obecnie w nieprawidłową autofagię tkanek endometrialnych zaangażowanych jest wiele czynników, w tym hormony żeńskie, niektóre leki, niedotlenienie i stres oksydacyjny³¹. U kobiet z endometriozą płyn otrzewnowy charakteryzuje się zwiększoną liczbą aktywowanych makrofagów i istotnymi różnicami w profilu cytokin/chemokin. Zidentyfikowano unikalne białko strukturalnie

podobne do haptoglobiny w płynie otrzewnowym, które to wiąże się z makrofagami, zmniejsza ich zdolność fagocytarną i zwiększa produkcję interleukiny 6. Zwiększoną aktywność w płynie otrzewnowym mają również czynnik hamujący migrację makrofagów, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1. Mikrośrodkowisko otrzewnej w endometriozie jest szczególnie bogate w prostaglandyny, a mediatory te prawdopodobnie odgrywają kluczową rolę w patofizjologii choroby, jak również w klinicznych następstwach bólu i niepłodności. Makrofagi otrzewnej kobiet z endometriozą wykazują wyższy poziom cyklooksygenazy-2 (COX-2) i uwalniają znacznie większe ilości prostaglandyn niż makrofagi kobiet zdrowych. TNF- α promuje wytwarzanie prostaglandyny F2 α i prostaglandyny E2 w komórkach endometrium³². Transkrypcja genu PTGS2 dla COX-2 jest związana z wieloma sygnałami wewnątrzkomórkowymi, które powodują aktywację kinaz białkowych aktywowanych mitogenami (MAPK). Ekspresja COX-2 może być regulowana przez kilka czynników, takich jak estrogen, hipoksja, cytokiny prozapalne, zanieczyszczenia środowiska, metabolity i enzymy metaboliczne oraz płytki krwi. Wysokie stężenia COX-2 prowadzą do dużej proliferacji komórek, niskiego poziomu apoptozy, dużej inwazji, angiogenezy, bólu związanego z EMS i niepłodności³³. Dodatkowo aktywacja COX-2 przez IL-1 β zwiększa produkcję PGE2, która aktywuje ostry regulator steroidogenny (StAR) i aromatazę. Regulując w górę syntezę PGE2, estrogen uzupełnia pętlę dodatniego sprzężenia zwrotnego, która promuje zwiększoną lokalną biodostępność estradiolu. Ta ścieżka podkreśla wzajemne oddziaływanie estrogenów i stanu zapalnego w endometriozie³⁴. W badaniu z 2001 roku u pacjentek z endometriozą ekspresja COX-2 w nabłonku gruczołowym była wyższa niż w grupie kontrolnej, chociaż zmieniała się w trakcie cyklu miesięczkowego. Wyraźną ekspresję COX-2 obserwowano w komórkach gruczołowych z ektopowej tkanki endometrium ścian endometrium jajnika we wszystkich przypadkach, niezależnie od fazy menstruacyjnej³⁵. Wydaje się, że zmiany endometrialne rozrastają się dość intensywnie w podskórnej tkance tłuszczowej ściany jamy brzusznej, można więc brać pod uwagę wpływ aromatazy obecnej w fibroblastach tej tkanki³⁶.

3. Terapia inhibitorami NPSR1³⁷

Jedną z coraz częściej poszukiwanych przez pacjentki form leczenia endometriozy jest terapia niehormonalna. Wynika to z faktu, że stosowana dotąd jako leczenie pierwszego rzutu terapia hormonalna, ma wiele wad, m.in. wpływa na owulację, dlatego jej stosowanie jest kontrowersyjne u kobiet

starających się o zajście w ciążę. Ponadto jest to terapia długotrwała, po której zaprzestaniu często nawracają objawy choroby³⁸. Bezpieczeństwo i skuteczność większości leków niehormonalnych nie zostały jeszcze dokładnie ocenione w ramach dużych badań klinicznych, niemniej jednak badania na modelach zwierzęcych są bardzo obiecujące. W przedstawionym poniżej badaniu skupimy się na niehormonalnym celu interwencji terapeutycznej, czyli receptorze powierzchniowym komórek NPSR1 sprzężonym z białkiem G, który jest związany w większości z rodzinną endometriozą w stadium III/IV według ASRM. Dotychczas pojawiła się tylko jedna praca badająca receptory NPSR1 jako możliwy punkt uchwytu dla leczenia endometriozy³⁷.

3.1. Receptor powierzchniowy komórek NPSR1 i jego ligand NPS

Podstawowa sekwencja NPS u ludzi to SFRNGVGTGMKKT SFQRAKS. Aminokwasem N-końcowym peptydu jest seryna (S) u wszystkich gatunków zwierząt, dlatego było to powodem nazwania go Neuropeptydem S. NPS charakteryzuje się wysoce konserwatywną wśród kręgowców N-końcową sekwencją aminokwasową Ser-Phe-Arg-Asn-Gly-Val-Gly, która jest identyczna u wszystkich gatunków zwierząt i reprezentuje bioaktywną część cząsteczki, co zostało przedstawione na rycinie 1. Dla ludzkiego NPSR opisano kilka wariantów splicingu i wiele polimorfizmów pojedynczego nukleotydu. Najintensywniej badanymi izoformami NPSR są hNPSR Asn107 i hNPSR Ile107. Wydaje się, że ten polimorfizm receptora ma implikacje funkcjonalne, gdyż izoforma hNPSR Ile107 ma 10-krotnie wyższą siłę działania niż na hNPSR Asn107³⁹. W badaniach laboratoryjnych jedynym typem komórki obwodowej, który jest wrażliwy na NPS, jest makrofag, który reaguje na NPS zmniejszoną adhezją oraz zwiększoną fagocytozą i chemotaksją⁴⁰. Te wyniki wraz z wynikami badań genetycznych, wskazują, że układ NPS–NPSR może odgrywać rolę w modulowaniu wrodzonej odporności i przewlekłych chorób zapalnych nabłonkowych narządów barierowych³⁹. NPS selektywnie wiąże i aktywuje swój receptor NPSR1 (receptor neuropeptydu S, znany również jako GPR154 lub receptor sprzężony z białkiem G dla podatności na astmę, GPRA), a także 7-transbłonowy receptor sprzężony z białkiem G (GPCR), który może indukować sygnalizację wewnątrzkomórkową poprzez kilka mechanizmów: mobilizację wapnia, wzrost poziomu cyklicznego monofosforanu adenozyiny (cAMP) i szlak kinazy białkowej aktywowanej mitogenami (MAPK)⁴¹. NPS i NPSR1 są wyrażane są głównie w określonych obszarach mózgu i wydają się modulować kilka funkcji biologicznych, w tym lęk, poruszanie się, pobudzenie,

przyjmowanie pokarmu, pamięć strachu i uzależnienia od narkotyków. Działają w tych procesach za pośrednictwem osi podwzgórze-przysadka-nadnercza. Dodatkowo układ ten jest wyrażany w tarczycy, gruczołach ślinowych i sutkach⁴². Ponadto ostatnie badania wykazały bezpośredni wpływ NPS na przyleganie makrofagów, migrację i fagocytozę bakterii, indukcję transkrypcji cytokin prozapalnych (interleukiny 8 i substancji P) po stymulacji NPS komórek nabłonka stabilnie transfekowanych cDNA NPSR oraz podwyższone poziomy mRNA NPSR1 w aktywowanych leukocytach, w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej stymulowanych LPS oraz w stanach zapalnych tkanek od pacjentów cierpiących na astmę i nieswoiste zapalenie jelit (IBD)⁴³. Zauważono powiązanie szlaku sygnałowego NPS-NPSR1 z astmą⁴⁴, chorobami zapalnymi jelit⁴⁵, reumatoidalnym zapaleniem stawów⁴⁶, zaburzeniami paniki i pośrednimi fenotypami zaburzeń czynnościowych przewodu pokarmowego⁴⁷. Dodatkowo badania wykazały, ekspresję NPSR1 w komórkach neuroendokrynnych, oraz wpływ jego ligandu NPS na proliferację komórek, oraz to, że NET (guzy neuroendokrynnne) są źródłem NPS i NPSR1 oraz że NPS wpływa na szlaki związane z rakiem⁴⁸.

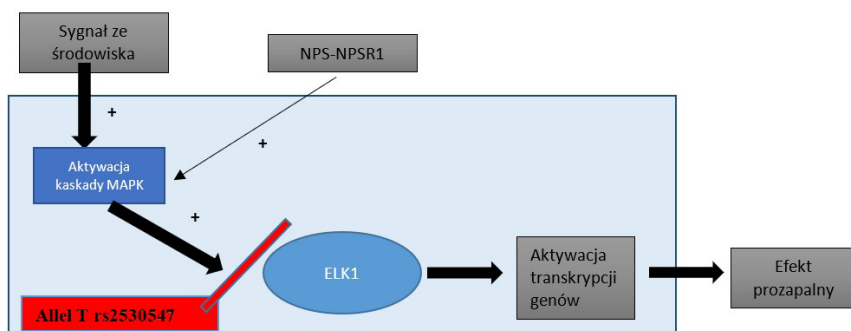


Rycina 1. Wysoce konserwatywna sekwencja aminokwasowa NPS

3.2. Analiza funkcjonalna polimorfizmów promotora NPSR1

W badaniu z 2011 roku Anedda F. i wsp. uwzględniono wszystkie promotory NPSR1 i kodujące SNP powszechnie spotykane w populacji kaukaskiej. Wyniki wskazują, że niektóre z tych polimorfizmów wpływają zarówno na regulację ekspresji mRNA NPSR1, jak i właściwości sygnalizacyjne odpowiedniego receptora. Cztery powszechne SNP (rs1963499, rs2168890, rs2530547 i rs887020) mapują się w obrębie promotora NPSR1, odpowiednio w pozycjach -565, -553, -103 i -43, od kodonu start. Oceniono ich potencjalny wpływ na transkrypcję NPSR1 i chociaż nie wykryto żadnej istotnej różnicy dla innych SNP, zastąpienie cytozyny (C) tymidyną (T) w miejscu -103 SNP skutkowało znacznym zmniejszeniem (62%) aktywności lucyferazy. rs2530547 (-103), był związany z efektami allelicznymi na aktywność transkrypcyjną, zarówno w testach lucyferazy in vitro, jak i w leukocytach krwi

obwodowej zdrowych ochotników i dlatego może mieć to znaczenie dla patogenezy choroby. Co ciekawe, przewiduje się, że mniejszy allel T rs2530547 znosi konsensusowe miejsce wiązania dla czynnika transkrypcyjnego ELK1. ELK1 jest celem jądrowym dla kaskady sygnałowej kinazy białkowej aktywowanej mitogenami (MAPK), która jest prozapalna i jest również indukowana przez sygnałowanie NPS-NPSR1, a zatem ELK1 stanowi doskonałego kandydata do dalszych badań nad regulacją ekspresji NPSR1. Schemat tego procesu został przedstawiony na rycinie 2. Scharakteryzowano również niesynonimiczne polimorfizmy Cys197Phe (rs34705969), Arg241Ser (rs727162) i Gln344Arg (rs6972158) ze względu na ich wpływ na NPSR1 pod względem ekspresji błonowej, zmian transkryptomu w dół od sygnalizacji NPS, aktywności farmakologicznej i przewidywanych właściwości strukturalnych receptora (rs34705969). Wyniki sugerują, że zarówno Cys197Phe i Arg241Ser, mają istotny wpływ funkcjonalny na receptor NPSR1. Polimorfizm kodującego rs727162, który odpowiada zmianie aminokwasu z Arg na Ser w pozycji 241 (Arg241Ser) wiąże się ze zmniejszoną sygnalizacją indukowaną przez NPS, co widać zarówno na poziomie zmian transkrypcyjnych w genach docelowych w dół, jak i w wielkości aktywacji zależnej od cAMP ekspresji lucyferazy⁴³.



Rycina 2. Mniejszy allel T rs2530547 znosi konsensusowe miejsce wiązania dla czynnika transkrypcyjnego ELK1. ELK1 jest celem jądrowym dla kaskady sygnałowej kinazy białkowej aktywowanej mitogenami (MAPK), indukowanej również przez sygnałowanie NPS-NPSR1. Elk-1 działa jako aktywator transkrypcji, mogąc wywoływać np. efekt prozapalny. [opracowanie własne]

3.3. Metodologia

W omawianym badaniu przeprowadzono nieparametryczną analizę sprzężeń z dokładnym mapowaniem i analizę haplotypów tego regionu przy użyciu 32 rodzin, które przyczyniły się do sygnału sprzężenia i zawęziły interesujący

region do 5-Mb segmentu flankowanego przez D7S683 i D7S510, wyselekcjonowanego wokół D7S2251, zawierającego 28 genów. Następnie zsekwencjonowano ten 5-Mb region u ośmiu niespokrewnionych kobiet z ośmiu rodzin. Spośród 28 genów w regionie 5 nosiło ≥ 1 niesynonimiczne, przewidywane szkodliwe warianty kodujące w co najmniej 50% zsekwencjonowanych rodzin: EEPD1, KIAA0895, AOA1, ELMO1 i NPSR1. [Wykres 1] Znalezione nadreprezentację przypadków z ≥ 1 wariantami o niskiej częstotliwości, niesynonimicznymi wariantami kodowania w NPSR1 w porównaniu do kontroli. W sumie znaleziono trzy różne warianty mutacji zmiany sensu (missense) w NPSR1 w 9 z 32 rodzin:

- Wariant c7_34698148 (p.Gly42Cys), dotychczas nieznan, wariant był obecny u wszystkich dotkniętych chorobą sióstr.
- Dwa warianty o niskiej częstotliwości, (p.Cys197Phe), w czterech rodzinach, obecne w 6 z 12 genotypowanych przypadków
- rs116825950 (p.Gly358Asp) w innym zestawie czterech rodzin, obecne w 11 z 12 genotypowanych przypadków.

Spośród 25 przypadków ze znanym stadium choroby, u 18 (72%) zdiagnozowano stadium III/IV, a 7 (38%) stadium I/II. Genotypowano wszystkie 3 warianty zmiany sensu związane z rodzinną endometriozą, a także 20 innych wariantów kodowania w NPSR1 obecnych w macierzy w 3155 przypadkach endometriozy i 2332 kontrolach populacji z dwóch zestawów danych jako części genomu w szeroko zakrojonym badaniu asocjacyjnym (GWAS). Wariant rs34705969 nie mógł być genotypowany z powodu problemów z projektowaniem starterów, a z pozostałych 22 wariantów tylko 5 z MAF $< 0,01$ i 2 z MAF $< 0,10$ były polimorficzne. Analiza SNP wariantów o niskiej częstotliwości nie wykazała znaczącego związku z endometriozą, podobnie jak analiza obciążenia mniejszą liczbą alleli w obrębie SNP. Jednak analiza zbiorcza ograniczona do przypadków ze znaną rodzinną historią endometriozy wykazała istotny związek.

3.4. Typowe warianty NPSR1 związane z endometriozą

Warianty związane z NPSR1 były wariantami kodowania o niskiej częstotliwości. Zbadano, czy wspólne warianty mapujące w pobliżu NPSR1 i jego liganda NPS były również związane z endometriozą. Przeanalizowano wszystkie powszechne warianty NPSR1 z opublikowanego zbioru danych asocjacyjnych całego genomu dla wszystkich przypadków endometriozy

(3194 przypadki), dla stadium I/II (1364 przypadki), stadium III/IV (1686 przypadków) i rodzinnego stadium III/IV (606 przypadków) w porównaniu z 7060 próbami kontrolnymi. Zaobserwowano istotny związek rs142885915 w NPSR1 ze stadium III /IV endometriozy, ale nie w przypadku włączenia wszystkich stadiów endometriozy i nie w stadium I/II. Dane z bazy danych Genotype-Tissue Expression (GTEx)⁴⁹ sugerują, że delecja (G- versus GA) w rs142885915 jest związana ze zmniejszoną ekspresją NPSR1 w mózdku, ale ze zwiększoną ekspresją w korze czołowej. Rs142885915 nie znajdował się w nierównowadze sprzężeń z dwoma wariantami o niskiej częstotliwości rs34705969 i rs116825950 znalezionymi w analizie sekwencjonowania opartego na rodzinie. Nie zaobserwowano istotnego związku z powszechnymi wariantami w NPS.

3.5. Warianty NPSR1 są obecne u makaków rezus

Równolegle do badań na ludziach została przeprowadzona analiza genetyczna w wielopokoleniowym rodowodzie makaków rezus z samoistną endometriozą, u których wykazano rodzinne występowanie choroby. Używając markerów mikrosatelitarnych specyficznych zarówno dla ludzi, jak i dla makaków rezus przeprowadzono genotypowanie względem dwóch istotnych regionów sprzężeń zidentyfikowanych wcześniej u ludzi: chromosomów ludzkich 10q26 (14) i 7p13-15. Chociaż nie znaleziono znaczącego powiązania w ortologu makaka ludzkiego chromosomu 10, znaleziono istotne powiązanie między D7S497 zlokalizowanym na chromosomie 3 makaka rezus (ortolog ludzkiego chromosomu 7), a endometriozą. Podczas ukierunkowanego sekwencjonowania NPSR1 w 62 przypadkach makaków rezus i 49 kontroli, zidentyfikowano 10 wariantów missense. W sumie 44 z 544 (8,09%) alleli w przypadkach makaków rezus nosiło co najmniej jeden z sześciu wariantów zmiany sensu wyłącznie lub przeważających w przypadkach w porównaniu z 26 z 512 (5,08%) alleli w kontroli makaków rezus. Wielkość próby była niewystarczająca, aby uzasadnić testy statystyczne pod kątem związku genetycznego z chorobą po uwzględnieniu relacji rodzinnych. Te równoległe analizy genetyczne na dwóch gatunkach sugerują rolę NPSR1 w patogenezie endometriozy.

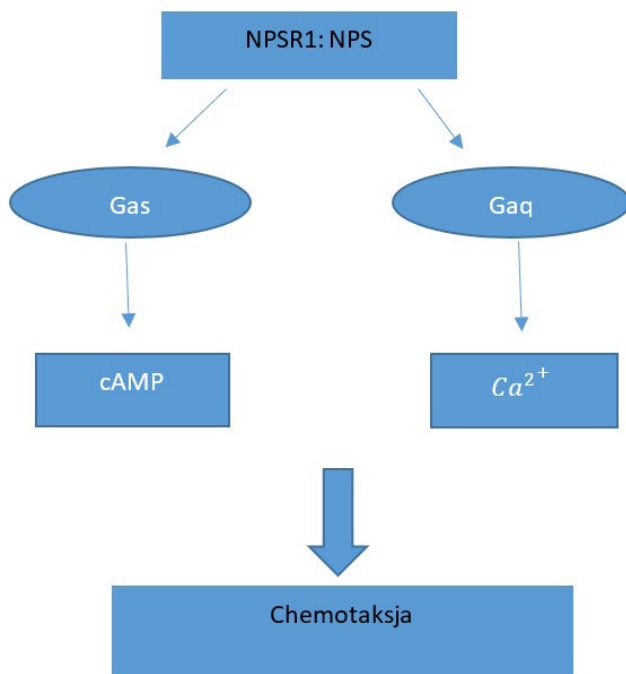
3.6. NPSR1 ulega ekspresji w tkankach endometrium i monocytach w płynie otrzewnowym

W przytoczonym badaniu zbadano również obecność NPSR1 i pokrewnego mu ligandu NPS w tkance endometrium, a także na komórkach układu odpornościowego obecnych w płynie otrzewnowym. NPSR1 ulegał silnej ekspresji w gruczołowych komórkach nabłonka zarówno w endometrium eutopowym, jak i ektopowym wykazując ciemno zabarwione jądra otoczone jaśniej zabarwionymi błonami komórkowymi. Odwrotnie, NPS był wyrażany w zrębie, ale nie w nabłonku gruczołowym, podczas gdy barwienie NPSR1 było nieliczne w zrębie. Nie znaleziono wzorca okołonaczyniowej ekspresji ani NPSR1 ani NPS. Sugeruje to parakrynnny mechanizm sygnalizacji w narządzie z ligandem i receptorem w bliskiej odległości, podobny do tego, który zaobserwowano w płucach i przewodzie pokarmowym

W badaniu zastosowano drobnocząsteczkowy inhibitor SHA 68 (3-okso-1,1-difenylo-tetrahydrooksazolo[3,4-a]pirazyno-7-karboksylowy-4-fluoro-benzylamid) do zahamowania sygnalizacji NPSR1 w monocytach, w celu oceny hamującego wpływu na różne etapy przekazywania sygnału NPS/NPSR1 *in vitro*, w tym dimeryzację receptora, późniejsze uwalnianie wtórnych przekazników Ca^{2+} i cAMP oraz uwalnianie $TNF-\alpha$ i chemotaksję ludzkich monocytów ze zdrowych kontroli w kierunku NPS. [Rycina 3] Zastosowano enancjomer R (SHA 68R) czyli izomer hamujący. Inhibitor wykazał zależne od dawki hamowanie aktywacji receptora NPSR1, co określono przez zmniejszone wiązanie β -arrestyny, wykazując medianę skutecznego stężenia dla NPS wynoszącą 88 nM i medianę stężenia hamującego 86 nM. Stwierdzono, że zarówno sygnalizacja cAMP, jak i Ca^{2+} jest hamowana przez SHA 68R w sposób zależny od dawki. Zaobserwowano hamowanie indukowanej przez NPS mobilizacji Ca^{2+} przez 0,16 μM SHA 68R na pierwotnych ludzkich monocytach. Zbadano również zdolność SHA 68R do hamowania uwalniania $TNF-\alpha$ po stymulacji lipopolisacharydem (LPS) i NPS komórek monocytowych THP-1, ponieważ cechą charakterystycznych endometriozy jest przewlekłe zapalenie otrzewnej, i stwierdzono, że SHA 68R znacząco zmniejsza ilość $TNF-\alpha$ w dawce 10 nM.

Na koniec określono również dawkę NPS, która może być zastosowana do hamowania infiltracji monocytów *in vivo*. Przy użyciu 100 nM NPS określono IC_{50} 28 nM dla SHA 68R przeciwko chemotaksji indukowanej przez NPS. Dodatkowo wstrzyknięcie SHA 68R (40 mg/kg, podskórnie)

wystarczyło, aby zahamować chemotaksję monocytów przez okres do 4 godzin bez żadnych skutków ubocznych w zachowaniu lub wyglądzie.



Rycina 3. Swoisty inhibitor NPSR1, SHA 68R, zmniejsza sygnalizację zapalną, w której pośredniczy NPSR1 w sposób zależny od dawki. Po związaniu swojego liganda NPS, NPSR1 uwalnia Ca^{2+} i cAMP co skutkuje późniejszym uwalnianiem $TNF-\alpha$ i chemotaksją [opracowanie własne]

3.7. Hamowanie NPSR1 zmniejsza ból i stan zapalny w mysich modelach zapalenia otrzewnej i endometriozy

Zbadano również wpływ hamowania NPSR1 *in vivo* w modelu zapalenia otrzewnej indukowanego zymostanem (który ma wiele cech wspólnych z ludzkim zapaleniem otrzewnej) na zmniejszenie bólu i stanu zapalnego. Po- przez zmierzenie liczby naciekających monocytów w porównaniu z makrofagami rezydującymi stwierdzono, że:

- SHA 68R skutecznie zmniejsza liczbę naciekających monocytów przy dawce 40 mg/kg.
- Stężenie cytokin zapalnych, interleukiny-4, IL-12p40 i IL-17 w osoczu krwi było znacząco obniżone.

Działanie przeciwzapalne SHA 68R zostało już potwierdzone w eksperymentalnym modelu endometriozy u myszy BALB/c, polegającym na wszczepieniu do jamy otrzewnej 12 fragmentów tkanki macicznej pochodzących od myszy w fazie rujowej. Tutaj również ilość cytokin zapalnych została zmniejszona przez SHA 68R. W teście dynamicznego obciążenia zmierzono wpływ hamowania NPSR1 na ból brzucha i stwierdzono, że SHA 68R jest skuteczny w zmniejszaniu bólu brzucha w obu modelach ZIP oraz modelu inokulacji endometriozy. Model ZIP obejmuje wszystkie etapy zapalenia, w tym fazę ustępowania, co pozwala na badanie różnych typów komórek odpornościowych zaangażowanych na różnych etapach, podczas gdy model endometriozy obejmuje obecność zrostów endometrium w jamie otrzewnej. Indukcja zachowań związanych z bólem stała się widoczna w grupach kontrolnych w ciągu 2 dnia, przy czym SHA 68R znacząco zmniejszał zachowanie związane z bólem w czasie okna terapeutycznego.

3.8. Wnioski

Pomimo badań genetycznych sugerujących, że patogenezę choroby ASRM w stadium I/II jest genetycznie odrębna od stadium III/IV, nie opracowano jeszcze terapii ukierunkowanych na określone podtypy choroby.

Przytoczone badanie połączyło dowody z analiz genetycznych endometriozy u ludzi i makaków rezus, które miały pomóc zidentyfikować niehormonalny cel interwencji terapeutycznej: receptor powierzchniowy komórek NPSR1 sprzężony z białkiem G. Metody dokładnego mapowania, haplotypowania i sekwencjonowania nowej generacji w rodzinach ujawniły związek wariantów kodowania zmiany sensu o niskiej częstotliwości w NPSR1 z rodzinną endometriozą w stadium III/IV, głównie ASRM.

Ukierunkowane analizy danych GWAS na dużą skalę dla przypadków potwierdzonych chirurgicznie również wskazały na związek powszechnych niekodujących wariantów NPSR1 z endometriozą w stadium III/IV w populacji ogólnej.

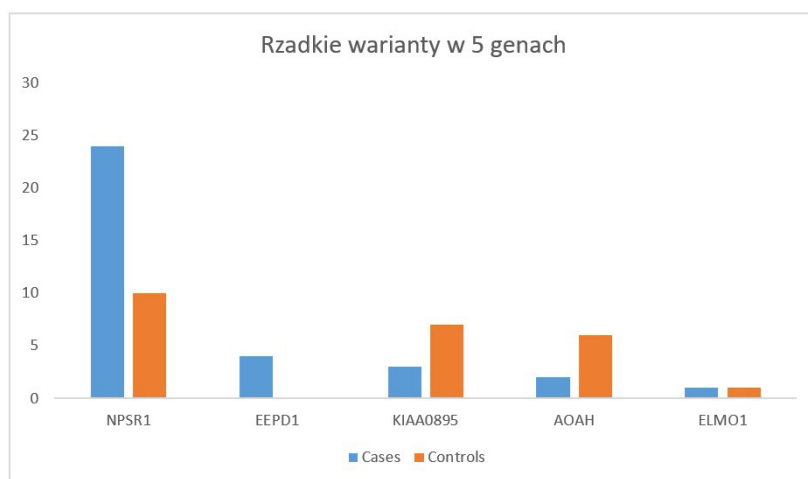
Warianty genetyczne w NPSR1 powiązano z szeregiem fenotypów zapalnych i neuropsychiatrycznych. Powszechny wariant insercji/delecji związany z endometriozą w NPSR1, rs142885915, ma charakter introniczny i jest niezależny od powszechnych wariantów wcześniej związanych z IBD, astmą i fenotypami neuropsychiatrycznymi.

Jedna z mutacji zmiany sensu o niskiej częstotliwości obserwowanych jako związana z rodzinną endometriozą, rs34705969, została opisana jako

powodująca zmniejszoną zdolność do indukowania zmian w ekspresji genów w dół lub sygnalizacji za pośrednictwem cAMP. Wpływ pozostałych dwóch wariantów missense rs116825950 i dotychczas nieznanego wariantu C7_34698148 na strukturę lub funkcję NPSR1 jest nieznaną.

Niezbędne są dalsze badania, które umożliwią zastosowanie receptora NPSR1 jako cel w leczeniu endometriozy.

Po przeprowadzeniu analiz genetycznych wykazano funkcjonalny wpływ NPSR1 na procesy prozapalne zarówno w eksperymentach *in vitro*, jak i *in vivo*. Zidentyfikowano populację naciekających monocytów wysoce pozytywnych dla NPSR1 u kobiet z endometriozą oraz dowiedziono, że hamowanie NPSR1 przez selektywny inhibitor, SHA 68R, powodowało zmniejszoną migrację monocytów indukowanych przez NPS *in vitro*. Ponadto wykazano działanie przeciwzapalne i zmniejszenie zachowań wywołanych bólem brzucha po podaniu SHA 68R u myszy, przy jednoczesnym zmniejszeniu liczby naciekających monocytów i obniżonym stężeniu cytokin we krwi.



Wykres 1. Liczba kobiet z niekodującymi, przewidywanymi szkodliwymi, rzadkimi wariantami w pięciu genach wśród 100 przypadków rodzinnych (kolor pomarańczowy) i 105 przypadków rodzinnych i populacyjnych (kolor niebieski) ³²

4. Peptyd penetrujący komórki (CPP) i działanie terapeutyczne za pośrednictwem siRNA na endometriozę i raka w modelach *in vitro*⁵⁰

W omawianym poniżej badaniu z 2021 roku, zbadano działanie terapeutyczne nanocząstek CPP i siRNA przy użyciu modeli *in vitro* łagodnej endometriozy i glejaka złośliwego, ponieważ oba te stany wykazują wiele

podobieństw, takich jak nadmierna, nieskoordynowana i autonomiczna proliferacja i inwazja komórek, której towarzyszą nakładające się wzorce ekspresji genów. Wykorzystano wysoce skuteczne wektory dostarczania- peptydy penetrujące komórki (CPP), jako nośniki oligonukleotydów w celu opracowania podejścia terapeutycznego do endometriozy i raka. Jest to jedyne dostępne badanie, które zwraca uwagę na możliwe działanie za pośrednictwem CPP i siRNA w leczeniu endometriozy.

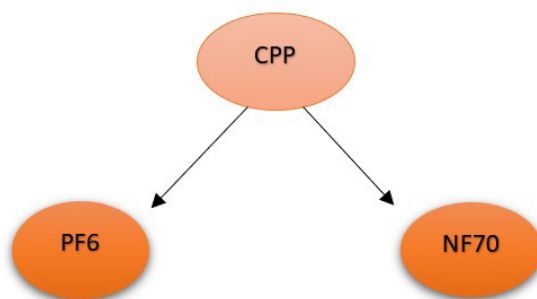
Jednocześnie badano wpływ danazolu, który jest znanym i powszechnie stosowanym lekiem w leczeniu endometriozy. Jest on skuteczny w łagodzeniu bólu i indukowaniu regresji zmian, dzięki jego androgennym właściwościom, zwiększaniu stężenia wolnego testosteronu oraz hamowaniu produkcji steroidów przez jajniki⁵¹, niemniej jednak jego zastosowanie jest ograniczone, gdyż powoduje ciężkie hiperandrogenne działania niepożądane w przypadku podania ogólnoustrojowego, w tym nieprawidłowe zmiany w gospodarce hormonalnej, zaburzenia cyklu miesięczkowego i ogólne efekty męskie.

Terapia genowa może służyć jako odpowiednia strategia leczenia, ponieważ jest ukierunkowana na geny, które ulegają nieprawidłowej ekspresji w chorej tkance. Niestety endometrioza jest chorobą wysoce heterogeniczną, dlatego sugerowano tylko kilka potencjalnych kandydatów jako geny docelowe. Jednym z nich jest czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego (VEGF), który ulega nadekspresji w zmianach endometrialnych w porównaniu do zdrowych tkanek i jest z powodzeniem stosowany jako cel w przedklinicznej terapii endometriozy⁵². W niniejszej pracy zbadano potencjalną rolę wyciszania podjednostki M2 reduktazy rybonukleotydowej (RRM2) w leczeniu endometriozy, oprócz opisanego powyżej VEGF-A, jako terapeutycznego celu dla siRNA- wysoce wydajnego wektora niezbędnego do osiągnięcia przez kwasy nukleinowe swoich celów wewnątrzkomórkowych.

4.1. Peptydy penetrujące komórki (CPP)

CPP są jednymi z bardziej wydajnych i obiecujących wektorów niewirusowych, które są ogólnie uważane za bezpieczne, łatwe w syntezie i modyfikacji oraz umożliwiają proste niekowalencyjne formułowanie nanocząstek CPP/siRNA⁵³. Pozwalają na transport dużych, hydrofilowych biomakromolekuł przez pozornie nieprzepuszczalną błonę plazmatyczną bez pęknięcia komórek⁵⁴. CPP kondensują oligonukleotydy i plazmidowy DNA (pDNA) w nanocząsteczki, umożliwiając w ten sposób transfekcję materiału genetycznego do komórek. Opracowano kilka nośników dostarczających siRNA do

komórek, ale ich użyteczność jest często ograniczona przez uwięzienie po endocytozie⁵⁵. Użyte w badaniu rodzaje CPP przedstawiono na Rycinie 4. Uważa się, że PF6 i NF70 mogą odnieść sukces w modelach *in vivo* nowotworu i endometriozy, m.in. ze względu na ich wrażliwość na pH, co może promować wychwyt nanocząstek tylko w tkankach o niższym pH, podczas gdy uważa się, że zarówno rak, jak i endometrioza mają kwaśne środowisko^{56,57}.



Rycina 4. Peptydy penetrujące komórki (CPP) wykorzystane w badaniu. [opracowanie własne]

4.1.1. PepFect6

Jednym z wysoce skutecznych CPP do dostarczania oligonukleotydów jest PepFect6 (PF6), który zawiera peptyd stearylo-TP10, mający ugrupowania trifluorometylocholinoliny włączone w celu ułatwienia uwalniania endosomalnego⁵⁵. Dzięki temu stabilne nanocząstki wnikają do całych populacji komórek i szybko promują ucieczkę endosomalną, co skutkuje silnymi odpowiedziami w różnych typach komórek, zarówno w transfekcji komórek pierwotnych jak i w hodowlach organotypowych 3D⁵⁸. Już w 2016 roku wykazano, że PF6 jest odpowiednim nośnikiem transportowym dla siRNA w hodowli komórkowej i ogólnoustrojowo *in vivo* u myszy⁵⁹. Ponadto dostarczanie za pośrednictwem PF6 jest niezależne od konfluencji komórek i w większości przypadków, nie jest znacząco hamowane przez białka surowicy^{60,61}. Ponadto PF6 okazał się nietoksyczny *in vitro* i nie wykazał immunogenności *in vivo*^{50,62}.

4.1.2. NickFect70

Inny CPP, niedawno zaprojektowany NickFect70 (NF70)⁶³, może z powodzeniem dostarczać terapeutyczne miRNA do pierwotnych ludzkich keratynocytów i komórek dendrytycznych (DC)^{64,65}. Jest on wysoce skuteczny

w transfekcji hodowli pierwotnych jak i komórkowych 3D. W badaniu dostarczającym miRNA i/lub siRNA do hodowli komórkowych i in vivo za pomocą PF i NF, miR-146a dostarczane przez NF wykrywano częściej poza endosomami w DC. Zarówno nanokompleksy PF-, jak i NF-miR-146a były równie skuteczne w keratynocytach, podczas gdy NF były bardziej wydajne w komórkach dendrytycznych. Potwierdzono również, że wstępne wstrzyknięcie nanokompleksów NF71:miR-146a hamuje reakcje zapalne w mysim modelu kontaktowego zapalenia skóry z podrażnienia, jak wykazano przez zmniejszoną odpowiedź obrzęku ucha i regulację w dół cytokin prozapalnych, w tym IL-6, IL-1 β , IL-33 i TNF- α ⁶⁵.

4.2. Zastosowane hodowle komórkowe

W badaniu zastosowano trójwymiarowe hodowle komórkowe, ponieważ bardziej przypominają rzeczywistą patologiczną tkankę, a także są bardziej odporne na leki niż hodowle jednowarstwowe⁶⁶. Po potwierdzeniu, że PF6 i NF70 są zdolne do transfekcji sferoid 3D, hodowle 3D potraktowano terapeutycznymi nanocząsteczkami CPP/siRNA.

4.3. Cele terapeutyczne w leczeniu endometriozy

4.3.1. Rola RRM2 w endometriozie

Reduktaza rybonukleotydowa M2 (RRM2) jako enzym katalizujący deoksyredukcję nukleozydów do trifosforanu dezoksorybonukleozydowego (dNTP) została szeroko zbadana i odgrywa kluczową rolę w syntezie DNA i regulacji proliferacji komórek^{67,68(p2)}. Istnieją dwa rodzaje podjednostek reduktazy rybonukleotydowej i stanowią one formę tetrameru (kompleks $\alpha\beta_2$) wywierający działanie katalityczne⁶⁹. Podjednostka M1 reduktazy rybonukleotydowej (RRM1) jest dużą podjednostką, która jest kodowana przez gen RRM1, podczas gdy mała podjednostka ma dwie izoformy- RRM2 i RRM2B. Holoenzym RRM1–RRM2 wspomaga trifosforany dezoksorybonukleozydów (dNTP) w replikacji i naprawie jądrowego DNA fazy S w proliferujących komórkach⁷⁰. Do tej pory pojawiło się tylko kilka doniesień na temat RRM2 w endometriozie. Analiza bioinformatyczna wykazała, że ekspresja RRM2 jest niska w endometriozie i wysoka w raku jajnika, w porównaniu ze zdrową tkanką endometrium w macicy. RRM2 jest pozytywnie wyrażany w tkankach endometrium eutopowego (EU), endometrium

ektopowego (EC) i tkankach nowotworowych pacjentów z rakiem jajnika związany z endometriozą- EAOC. Wysoka ekspresja RRM2 sprzyja nieprawidłowej proliferacji histiocytoz, a sam RRM2 może być stosowany jako potencjalny marker złośliwej transformacji OE⁷¹. Co więcej, w innym doniesieniu wykazano brak aktywnej formy reduktazy rybonukleotydowej w zmianach endometriozy po udanym zahamowaniu ich wzrostu w szczurzym modelu endometriozy. Biorąc pod uwagę znaczenie RRM2 dla proliferacji komórek i wzrostu zmian endometrialnych, stanowi on potencjalnie dobry cel w terapii genowej endometriozy⁷².

4.3.2. Rola VEGF w endometriozie

Rola VEGF w rozwoju i progresji endometriozy została dobrze opisana. Angiogeneza stanowi integralną część patogenezy endometriozy, a różne środki antyangiogenne indukują regresję zmian endometrialnych poprzez ukierunkowanie na ich ukrwienie⁵². Głównym czynnikiem zaangażowanym w neowaskularyzację ektopowej tkanki endometrium w endometriozie jest VEGF, który jest wytwarzany zarówno przez implant endometrium, jak i makrofagi otrzewnowe⁷³. Pacjentki z endometriozą wykazują znacznie wyższe poziomy VEGF w surowicy w porównaniu z grupą kontrolną⁷⁴. Niedawno wykazano, że wstrzyknięcie siVEGF i polipeptydu L1 bezpośrednio do zmian podskórnych przypominających endometriozę zmniejszały poziom ekspresji VEGF i końcową objętość zmian u szczurów⁷⁵. Jest to jedna z nielicznych publikacji, w których wykorzystano nośniki oparte na peptydach, od tego czasu nie było dalszych aktualizacji dotyczących znaczenia klinicznego tych wyników.

4.4. Inwazja komórek endometrialnych zmniejszona po knockdown RRM2 i VEGF

Ze względu na istotną rolę inwazji komórkowej w progresji zarówno raka, jak i endometriozy, oceniono zdolności inwazyjne chorych komórek. Zauważono, po leczeniu PF6/siRRM2 i PF6/siVEGF w przypadku pierwotnych komórek endometriotycznych otrzewnej i jajnika, utrudnioną nawet do 80% inwazję przez macierz zewnątrzkomórkową.

4.5. Jednoczesne leczenie CPP/siRNA NP i Danazolem synergistycznie hamuje proliferację i inwazję komórek endometrialnych

We wcześniejszych badaniach wykazano, że danazol oprócz androgenowego sposobu działania, indukuje apoptozę i cytotoksyczność⁷⁶ oraz hamuje proliferację komórek endometrialnych *in vitro* w sposób zależny od dawki⁷⁷. Dodatkowo jest skuteczny w leczeniu objawów i oznak endometriozy⁵¹. Może również poprawiać zdolności rozrodcze poprzez tłumienie nieprawidłowych poziomów autoprzeciwciał, np. przeciw przeciwno komórkom endometrium i fosfolipidom, histonom i nukleotydom pochodzącym z komórek endometrium⁷⁸. Dodatkowo 6-miesięczna kuracja danazolem redukuje poziom VEGF w surowicy, który jest znacznie podwyższony w porównaniu z grupą kontrolną⁷⁴.

Danazol był historycznie stosowany w leczeniu endometriozy i innych problemów ginekologicznych, w przypadku których wykazał większą skuteczność niż inne terapie medyczne, takie jak progestageny, NLPZ i OCP⁷⁶. W omawianym badaniu postulowano, że łącząc syntetyczny steroid, danazol, ze strategią leczenia NP, możliwe byłoby zmniejszenie ilości stosowanego danazolu i uzyskanie dodatkowej synergicznej supresji komórek endometrialnych.

Po połączeniu terapeutycznego leczenia NF70/siRNA NP z różnymi stężeniami danazolu można było zaobserwować znaczący efekt synergiczny. Efekt był najlepiej widoczny przy stężeniu 20 μM danazolu, gdzie jednoczesne traktowanie NP zmniejszyło liczbę komórek o około 40% w porównaniu z komórkami nietraktowanymi, podczas gdy sam 20 μM danazol zmniejszył ją tylko o 12%.

Zmierzono również zdolność do inwazji komórek endometrialnych przez macierz zewnątrzkomórkową. W rezultacie, przy stężeniu danazolu 15 μM , inwazja komórek została znacząco zahamowana, nawet o 60% w porównaniu z komórkami nietraktowanymi lub bezłączenia danazolu z NP NF70/siRNA. Sam danazol w stężeniu 20 μM pozostawał inwazję komórek na tym samym poziomie, ale po dodaniu terapeutycznych NP NF70/siRNA do danazolu podczas leczenia zaobserwowano dalsze znaczące zahamowanie inwazji. Tylko około 5% komórek było zdolnych do utrzymania swojej inwazyjności w porównaniu ze stanem nieleczonym.

4.6. Efekty

1. Badanie ukazało wysoki potencjał wykorzystania peptydów penetrujących komórki PF6 i NF70 jako wektorów dostarczania siRNA w leczeniu raka i endometriozy. Oba CPP były zdolne do pomyślnej transfekcji dwu- (2D) i trójwymiarowych (3D) hodowli komórkowych.
2. Nanocząstki CPP są zdolne do indukowania specyficznego dla siRNA wyciszenia genów terapeutycznych RRM2 i VEGF co skutkuje zmniejszeniem proliferacji, inwazji i migracji komórek *in vitro*.
3. Wykazano specyficzne dla choroby efekty terapeutyczne poprzez zmniejszenie migracji komórek i synergistyczne zmniejszenie liczby komórek endometrialnych i inwazyjności po terapeutycznym leczeniu nanocząstkami CPP/siRNA (NP) i danazolem.
4. Wyniki ujawniły, że NP PF6 i NF70 są zdolne do wywoływania znaczącego knockdownu genu docelowego w porównaniu z komórkami traktowanymi czystymi siRNA w przypadku endometriozy jajnika i otrzewnej. W rezultacie, oprócz wcześniej pokazanego wyciszenia genów, obydwa nanocząstki CPP/siRNA były zdolne do indukowania spadku białka RRM2 w tych komórkach. NP CPP/siRRM2 wywołują zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1/S.

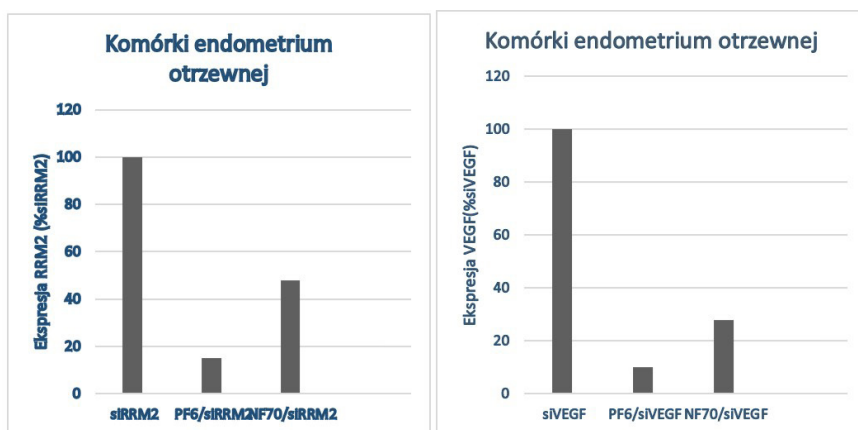


Tabela 3. NP CPP/siRNA indukują obniżenie poziomu genów terapeutycznych, obniżenie poziomu ekspresji RRM2 i VEGF mierzonych w komórkach endometrium otrzewnej³⁹

4.7. Wnioski z badania

W przytoczonym badaniu udowodniono bardzo wysoką skuteczność PF6 i NF70 w jednoczesnej transfekcji pierwotnych i 3D kultur komórkowych z indukcją odpowiednich efektów terapeutycznych, w których pośredniczy siRNA. Wykazano również, że jednoczesne leczenie danazolem i terapeutycznymi nanocząsteczkami NF70/siRNA synergistycznie hamuje proliferację i inwazję komórek endometrialnych, oraz pozwala na zmniejszenie jego dawek terapeutycznych. Podsumowując, badanie to wskazuje na nowoczesny cel terapeutyczny- reduktazę rybonukleotydową, do leczenia endometriozy, oraz sugeruje nowe podejście terapeutyczne za pośrednictwem CPP i siRNA w przypadku raka i endometriozy.

5. Wnioski

Endometrioza jest wysoce heterogenną chorobą dotyczącą głównie młodych kobiet w wieku rozrodczym. Mimo nieustannych badań nad nowoczesnymi formami leczenia, stanowi duży problem kliniczny ze względu na niewystarczającą skuteczność leków oraz przez trudności w jej szybkim diagnozowaniu. Na rynku obecnych jest wiele leków przeciwbólowych, terapii hormonalnych oraz zabiegów chirurgicznych, które często są nieskuteczne i wiążą się z poważnymi skutkami ubocznymi, wysokim odsetkiem nawrotów. Niezbędne jest więc nowatorskie podejście ukierunkowane na mechanizmy komórkowe i molekularne odpowiedzialne za endometriozę. Przytoczona w badaniu praca opierająca się na metodzie podawanie nanocząstek CPP/siRNA oraz CPP/siRNA wraz z danazolem, daje dużą nadzieję na nową i skuteczną metodę leczenia, gdyż charakteryzuje się wysoką skutecznością i nie wiąże się z groźnymi działaniami niepożądanymi. Podobnie wyniki wskazują, że NPSR1/NPS jest genetycznie zwalidowanym, niehormonalnym celem leczenia endometriozy, o prawdopodobnie zwiększonym znaczeniu dla leczenia endometriozy w stadium III/IV, niezbędne są jednak dodatkowe badania potwierdzające skuteczność tych terapii.

6. Dyskusja

Terapia genowa to potężne narzędzie dające możliwości leczenia wielu chorób poprzez transport materiału genetycznego do komórek. Niezbędne do osiągnięcia celów wewnątrzkomórkowych są wysoce wydajne wektory.

Opracowano już kilka nośników dostarczających siRNA, w tym CPP, ale ich użyteczność jest często ograniczona przez uwięzienie po endocytozie⁶⁰. Wyznaleziono więc CPP, które dzięki modyfikacji w ich budowie⁵⁸, promują ucieczkę z endosomów, co poskutkowało pomyślnymi wynikami⁶⁰. Udowodniono skuteczność NickFect70 w dostarczaniu z powodzeniem terapeutycznego miRNA do pierwotnych ludzkich keratynocytów i komórek dendrytycznych^{64,65}. Jednocześnie badania wykorzystujące PepFect6 na modelu mysim pokazały, że jest on odpowiednim nośnikiem transportowym dla siRNA w hodowli komórkowej i ogólnoustrojowo^{59(p6)}. W przytoczonym badaniu skupiono się nad badaniem efektywności tych wektorów w dostarczaniu siRNA w leczeniu raka i endometriozy. Wyniki są obiecujące, gdyż oba były zdolne do pomyślnej transfekcji 2D i 3D hodowli komórkowych, skutkując odpowiednim efektem terapeutycznym poprzez wyciszenie genów terapeutycznych. Dodatkowo wykazują skuteczność zarówno *in vitro* i *in vivo*, są nieszkodliwe dla zdrowej tkanki, łatwe w syntezie i nie wywołują ciężkich reakcji immunologicznych. Oprócz tego odnaleziono nowy terapeutyczny cel wewnątrzkomórkowy oprócz poznanego już VEGF- RRM2, który jako enzym katalizujący deoksyredukcję nukleozydów do trifosforanu dezoksyrybonukleozydowego odgrywa kluczową rolę w syntezie DNA i regulacji proliferacji komórek⁶⁷. Do tej pory pojawiło się tylko kilka doniesień na temat roli reduktazy rybonukleotydu w endometriozie, ale każda z nich miała ograniczenia, nie pozwalające na sformułowanie końcowych wniosków⁷⁹. Wyciszenie ich skutkowało zmniejszeniem proliferacji, inwazji i migracji komórek *in vitro*. Proponowane podejście jednoczesnej terapii- danazolem i terapeutycznymi nanocząsteczkami NF70/siRNA wydaje się być korzystne dzięki ich synergistycznemu działaniu w hamowaniu proliferacji i inwazji komórek endometrialnych. Pozwala to na zmniejszenie dawek terapeutycznych danazolu, którego skuteczność w leczeniu endometriozy została wielokrotnie potwierdzona w badaniach⁷⁶, a którego stosowanie wiązało się również z wysokim odsetkiem uciążliwych dla pacjentek skutki uboczne, takie jak hirsutyzm, trądzik, przyrost masy ciała i obniżone głos⁵¹. Ten sposób stosowania danazolu może skutkować oczekiwanym przez nas efektem zmniejszenia ilości hiperandrogennych skutków ubocznych. Przedstawione wyniki pokazują nowe podejście i możliwości w leczeniu przyczynowym i objawowym endometriozy, ale wymagają dodatkowych badań, aby stosowanie ich weszło do praktyki klinicznej. Opisywane inhibitory NPSR1 są zupełnie nowym i niezbadanym dotąd sposobem w leczeniu endometriozy. NPS i NPSR1 odnaleziono w określonych obszarach mózgu gdzie wpływają na lęk, poruszanie się, pobudzenie, przyjmowanie

pokarmu, pamięć strachu i uzależnienia od narkotyków. Dodatkowo układ ten jest wyrażany w tarczycy, gruczołach ślinowych i sutkach⁴². Zauważono jego powiązanie z chorobami takimi jak: astma⁴⁴, choroby zapalne jelit⁴⁵, reumatoidalne zapalenie stawów⁴⁶. Ostatnie badania, które wykazały bezpośredni wpływ NPS na przyleganie makrofagów, migrację i fagocytozę bakterii, indukcję transkrypcji cytokin prozapalnych (interleukiny 8 i substancji P) po stymulacji NPS komórek nabłonka stabilnie transfekowanych cDNA NPSR oraz podwyższone poziomy mRNA NPSR1 w aktywowanych leukocytach⁴³, pozwoliły zwrócić uwagę na możliwe jego pozytywne działanie w leczeniu endometriozy. Przytoczone badanie połączyło dowody z analiz genetycznych endometriozy u ludzi i makaków rezus, co pozwoliło ujawnić związek wariantów kodowania zmiany sensu o niskiej częstotliwości w NPSR1 z rodziną endometriozą w stadium III/IV, głównie ASRM. Dowiedziono również, że NPSR1 zmniejsza ból i stan zapalny w mysich modelach zapalenia otrzewnej i endometriozy. Niestety nie dostarcza nam ono bezpośredniego celu terapeutycznego, a jedynie zwraca uwagę na wspólne warianty mapujące w pobliżu NPSR1 i jego liganda NPS, które są związane z endometriozą. Jest ono bardzo innowacyjne, niespotykane i zapewne otworzy drogę wielu innym badaniom, które wykorzystają tę wiedzę do stworzenia leczenia bardziej spersonalizowanego, skupiającego się również na różnych stadiach choroby.

Referencje

1. Vercellini P, Viganò P, Somigliana E, Fedele L. Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(5):261-275. doi:10.1038/nrendo.2013.255
2. Wang Y, Nicholes K, Shih IM. The Origin and Pathogenesis of Endometriosis. *Annu Rev Pathol*. 2020;15:71-95. doi:10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032654
3. Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet*. 2004;364(9447):1789-1799. doi:10.1016/S0140-6736(04)17403-5
4. Vercellini P, Trespidi L, De Giorgi O, Cortesi I, Parazzini F, Crosignani PG. Endometriosis and pelvic pain: relation to disease stage and localization. *Fertil Steril*. 1996;65(2):299-304.
5. Andres M, Borrelli G, Kho R, Abrao M. The current management of deep endometriosis. A systematic review. *Minerva ginecologica*.

- 2017;69:587-596. doi:10.23736/S0026-4784.17.04082-5
6. American Society for Reproductive Medicine. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertility and Sterility*. 1997;67(5):817-821. doi:10.1016/S0015-0282(97)81391-X
7. Agarwal N, Subramanian A. Endometriosis – Morphology, Clinical Presentations and Molecular Pathology. *J Lab Physicians*. 2010;2(1):1-9. doi:10.4103/0974-2727.66699
8. Bergqvist A. Different types of extragenital endometriosis: A review. *Gynecological Endocrinology*. 1993;7(3):207-221. doi:10.3109/09513599309152504
9. Anglesio MS, Papadopoulos N, Ayhan A, et al. Cancer-Associated Mutations in Endometriosis without Cancer. *N Engl J Med*. 2017;376(19):1835-1848. doi:10.1056/NEJMoa1614814
10. Wei JJ, William J, Bulun S. Endometriosis and ovarian cancer: a review of clinical, pathologic, and molecular aspects. *Int J Gynecol Pathol*. 2011;30(6):553-568. doi:10.1097/PGP.0b013e31821f4b85
11. Activation of mutated K-ras in donor endometrial epithelium and stroma promotes lesion growth in an intact immunocompetent murine model of endometriosis - Cheng - 2011 - The Journal of Pathology - Wiley Online Library. Accessed February 11, 2022. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/path.2852>
12. Bulun SE, Yilmaz BD, Sison C, et al. Endometriosis. *Endocr Rev*. 2019;40(4):1048-1079. doi:10.1210/er.2018-00242
13. Vassilopoulou L, Matalliotakis M, Zervou MI, et al. Defining the genetic profile of endometriosis. *Exp Ther Med*. 2019;17(5):3267-3281. doi:10.3892/etm.2019.7346
14. Williams C, Long AJ, Noga H, et al. East and South East Asian Ethnicity and Moderate-to-Severe Endometriosis. *J Minim Invasive Gynecol*. 2019;26(3):507-515. doi:10.1016/j.jmig.2018.06.009
15. Missmer SA, Hankinson SE, Spiegelman D, et al. Reproductive history and endometriosis among premenopausal women. *Obstet Gynecol*. 2004;104(5 Pt 1):965-974. doi:10.1097/01.AOG.0000142714.54857.f8

16. Matthews AG, Finkelstein DM, Betensky RA. Analysis of familial aggregation studies with complex ascertainment schemes. *Statistics in Medicine*. 2008;27(24):5076-5092. doi:10.1002/sim.3327
17. Montgomery GW, Nyholt DR, Zhao ZZ, et al. The search for genes contributing to endometriosis risk. *Hum Reprod Update*. 2008;14(5):447-457. doi:10.1093/humupd/dmn016
18. Smolarz B, Szyłło K, Romanowicz H. The Genetic Background of Endometriosis: Can ESR2 and CYP19A1 Genes Be a Potential Risk Factor for Its Development? *Int J Mol Sci*. 2020;21(21):E8235. doi:10.3390/ijms21218235
19. Angioni S, D'Alterio MN, Coiana A, Anni F, Gessa S, Deiana D. Genetic Characterization of Endometriosis Patients: Review of the Literature and a Prospective Cohort Study on a Mediterranean Population. *Int J Mol Sci*. 2020;21(5):E1765. doi:10.3390/ijms21051765
20. Yilmaz BD, Bulun SE. Endometriosis and nuclear receptors. *Hum Reprod Update*. 2019;25(4):473-485. doi:10.1093/humupd/dmz005
21. Dyson MT, Roqueiro D, Monsivais D, et al. Genome-wide DNA methylation analysis predicts an epigenetic switch for GATA factor expression in endometriosis. *PLoS Genet*. 2014;10(3):e1004158. doi:10.1371/journal.pgen.1004158
22. Apoptosis in endometrial glandular and stromal cells in women with and without endometriosis | Human Reproduction | Oxford Academic. Accessed February 11, 2022. <https://academic.oup.com/humrep/article/16/9/1802/2915873>
23. Béliard A, Noël A, Foidart JM. Reduction of apoptosis and proliferation in endometriosis. *Fertil Steril*. 2004;82(1):80-85. doi:10.1016/j.fertnstert.2003.11.048
24. Monsivais D, Dyson MT, Yin P, et al. Estrogen receptor β regulates endometriotic cell survival through serum and glucocorticoid-regulated kinase activation. *Fertil Steril*. 2016;105(5):1266-1273. doi:10.1016/j.fertnstert.2016.01.012

25. Bulun SE, Monsavais D, Pavone ME, et al. Role of Estrogen Receptor- β in Endometriosis. *Semin Reprod Med.* 2012;30(01):39-45. doi:10.1055/s-0031-1299596
26. Taghavipour M, Sadoughi F, Mirzaei H, et al. Apoptotic functions of microRNAs in pathogenesis, diagnosis, and treatment of endometriosis. *Cell & Bioscience.* 2020;10(1):12. doi:10.1186/s13578-020-0381-0
27. Estrogen Receptor (ER) Agonists Differentially Regulate Neuroangiogenesis in Peritoneal Endometriosis via the Repellent Factor SLIT3 | Endocrinology | Oxford Academic. Accessed February 11, 2022. <https://academic.oup.com/endo/article/155/10/4015/2423562>
28. Burney RO, Talbi S, Hamilton AE, et al. Gene expression analysis of endometrium reveals progesterone resistance and candidate susceptibility genes in women with endometriosis. *Endocrinology.* 2007;148(8):3814-3826. doi:10.1210/en.2006-1692
29. Zeitoun K, Takayama K, Sasano H, et al. Deficient 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in endometriosis: failure to metabolize 17 β -estradiol. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(12):4474-4480. doi:10.1210/jcem.83.12.5301
30. Machairiotis N, Vasilakaki S, Thomakos N. Inflammatory Mediators and Pain in Endometriosis: A Systematic Review. *Biomedicines.* 2021;9(1):54. doi:10.3390/biomedicines9010054
31. Yang HL, Mei J, Chang KK, Zhou WJ, Huang LQ, Li MQ. Autophagy in endometriosis. *Am J Transl Res.* 2017;9(11):4707-4725.
32. Chen DB, Yang ZM, Hilsenrath R, Le SP, Harper MJ. Stimulation of prostaglandin (PG) F₂ α and PGE₂ release by tumour necrosis factor- α and interleukin-1 α in cultured human luteal phase endometrial cells. *Hum Reprod.* 1995;10(10):2773-2780. doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a135790
33. Lai ZZ, Yang HL, Ha SY, et al. Cyclooxygenase-2 in Endometriosis. *Int J Biol Sci.* 2019;15(13):2783-2797. doi:10.7150/ijbs.35128
34. Burney RO, Giudice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril.* 2012;98(3):511-519. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.06.029

35. Ota H, Igarashi S, Sasaki M, Tanaka T. Distribution of cyclooxygenase-2 in eutopic and ectopic endometrium in endometriosis and adenomyosis. *Hum Reprod.* 2001;16(3):561-566. doi:10.1093/humrep/16.3.561
36. Bulun SE, Simpson ER. Competitive reverse transcription-polymerase chain reaction analysis indicates that levels of aromatase cytochrome P450 transcripts in adipose tissue of buttocks, thighs, and abdomen of women increase with advancing age. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;78(2):428-432. doi:10.1210/jcem.78.2.8106632
37. Neuropeptide S receptor 1 is a nonhormonal treatment target in endometriosis. Accessed February 10, 2022. <https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.abd6469>
38. Chen FY, Wang X, Tang RY, Guo ZX, Deng YZJ, Yu Q. New therapeutic approaches for endometriosis besides hormonal therapy. *Chinese Medical Journal.* 2019;132(24):2984-2993. doi:10.1097/CM9.0000000000000569
39. Guerrini R, Salvadori S, Rizzi A, Regoli D, Calo' G. Neurobiology, pharmacology, and medicinal chemistry of neuropeptide S and its receptor. *Medicinal Research Reviews.* 2010;30(5):751-777. doi:10.1002/med.20180
40. Neuropeptide S and G protein-coupled receptor 154 modulate macrophage immune responses | Human Molecular Genetics | Oxford Academic. Accessed February 10, 2022. <https://academic.oup.com/hmg/article/15/10/1667/2355905>
41. Neuropeptide S: A transmitter system in the brain regulating fear and anxiety - ScienceDirect. Accessed February 10, 2022. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S00283908090001555>
42. Role of the Neuropeptide S System in Emotionality, Stress Responsiveness and Addiction-Like Behaviours in Rodents: Relevance to Stress-Related Disorders - PubMed. Accessed February 13, 2022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34451877/>
43. Anedda F, Zucchelli M, Schepis D, et al. Multiple Polymorphisms Affect Expression and Function of the Neuropeptide S Receptor (NPSR1). *PLOS ONE.* 2011;6(12):e29523. doi:10.1371/journal.pone.0029523

44. Allen IC, Pace AJ, Jania LA, et al. Expression and function of NPSR1/GPRA in the lung before and after induction of asthma-like disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;291(5):L1005-1017. doi:10.1152/ajplung.00174.2006
45. D'Amato M, Bruce S, Bresso F, et al. Neuropeptide s receptor 1 gene polymorphism is associated with susceptibility to inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2007;133(3):808-817. doi:10.1053/j.gastro.2007.06.012
46. D'Amato M, Zucchelli M, Seddighzadeh M, et al. Analysis of neuropeptide S receptor gene (NPSR1) polymorphism in rheumatoid arthritis. *PLoS One*. 2010;5(2):e9315. doi:10.1371/journal.pone.0009315
47. Camilleri M, Carlson P, Zinsmeister AR, et al. Neuropeptide S receptor induces neuropeptide expression and associates with intermediate phenotypes of functional gastrointestinal disorders. *Gastroenterology*. 2010;138(1):98-107.e4. doi:10.1053/j.gastro.2009.08.051
48. Pulkkinen V, Ezer S, Sundman L, et al. Neuropeptide S receptor 1 (NPSR1) activates cancer-related pathways and is widely expressed in neuroendocrine tumors. *Virchows Arch*. 2014;465(2):173-183. doi:10.1007/s00428-014-1602-x
49. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project | Nature Genetics. Accessed February 10, 2022. <https://www.nature.com/articles/ng.2653?report=reader>
50. Kiisholts K, Kurrikoff K, Arukuusk P, et al. Cell-Penetrating Peptide and siRNA-Mediated Therapeutic Effects on Endometriosis and Cancer In Vitro Models. *Pharmaceutics*. 2021;13(10):1618. doi:10.3390/pharmaceutics13101618
51. Selak V, Farquhar C, Prentice A, Singla A. Danazol for pelvic pain associated with endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007;(4):CD000068. doi:10.1002/14651858.CD000068.pub2
52. Laschke MW, Menger MD. Anti-angiogenic treatment strategies for the therapy of endometriosis. *Human Reproduction Update*. 2012;18(6):682-702. doi:10.1093/humupd/dms026

53. Langel Ü. Introduction. In: Langel Ü, ed. *CPP, Cell-Penetrating Peptides*. Springer; 2019:1-28. doi:10.1007/978-981-13-8747-0_1
54. Alhakamy NA, Kaviratna A, Berkland CJ, Dhar P. Dynamic Measurements of Membrane Insertion Potential of Synthetic Cell Penetrating Peptides. ACS Publications. doi:10.1021/la403370p
55. EL Andaloussi S, Lehto T, Mäger I, et al. Design of a peptide-based vector, PepFect6, for efficient delivery of siRNA in cell culture and systemically in vivo. *Nucleic Acids Research*. 2011;39(9):3972-3987. doi:10.1093/nar/gkq1299
56. Young VJ, Brown JK, Maybin J, Saunders PTK, Duncan WC, Horne AW. Transforming growth factor- β induced Warburg-like metabolic reprogramming may underpin the development of peritoneal endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(9):3450-3459. doi:10.1210/jc.2014-1026
57. Houten SM, Violante S, Ventura FV, Wanders RJA. The Biochemistry and Physiology of Mitochondrial Fatty Acid β -Oxidation and Its Genetic Disorders. *Annual Review of Physiology*. 2016;78(1):23-44. doi:10.1146/annurev-physiol-021115-105045
58. Laanesoo A, Periyasamy K, Pooga M, Rebane A. Development of CPP-Based Methods for Delivery of miRNAs into the Skin and Airways: Lessons from Cell Culture and Mouse Models. In: Langel Ü, ed. *Cell Penetrating Peptides: Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology. Springer US; 2022:515-528. doi:10.1007/978-1-0716-1752-6_32
59. Pre-administration of PepFect6-microRNA-146a nanocomplexes inhibits inflammatory responses in keratinocytes and in a mouse model of irritant contact dermatitis - ScienceDirect. Accessed February 10, 2022. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168365916303716?via%3Dihub>
60. Andaloussi SEL, Lehto T, Mäger I, et al. Design of a peptide-based vector, PepFect6, for efficient delivery of siRNA in cell culture and systemically in vivo. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(9):3972-3987. doi:10.1093/nar/gkq1299
61. Clark KL, Hughes SA, Bulsara P, et al. Pharmacological Characterization of a Novel ENaC α siRNA (GSK2225745) With Potential for

- the Treatment of Cystic Fibrosis. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2013;2:e65. doi:10.1038/mtna.2012.57
62. Suhorutsenko J, Oskolkov N, Arukuusk P, et al. Cell-Penetrating Peptides, PepFects, Show No Evidence of Toxicity and Immunogenicity In Vitro and In Vivo. *Bioconjugate Chem*. 2011;22(11):2255-2262. doi:10.1021/bc200293d
63. Porosk L, Arukuusk P, Põhako K, et al. Enhancement of siRNA transfection by the optimization of fatty acid length and histidine content in the CPP. *Biomater Sci*. 2019;7(10):4363-4374. doi:10.1039/C9BM00688E
64. Tibbitt CA, Stark JM, Martens L, et al. Single-Cell RNA Sequencing of the T Helper Cell Response to House Dust Mites Defines a Distinct Gene Expression Signature in Airway Th2 Cells. *Immunity*. 2019;51(1):169-184.e5. doi:10.1016/j.immuni.2019.05.014
65. Carreras-Badosa G, Maslovskaja J, Periyasamy K, et al. Nick-Fect type of cell-penetrating peptides present enhanced efficiency for microRNA-146a delivery into dendritic cells and during skin inflammation. *Biomaterials*. 2020;262:120316. doi:10.1016/j.biomaterials.2020.120316
66. Jensen C, Teng Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Front Mol Biosci*. 2020;7:33. doi:10.3389/fmolb.2020.00033
67. Zhan Y, Jiang L, Jin X, et al. Inhibiting RRM2 to enhance the anticancer activity of chemotherapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021;133:110996. doi:10.1016/j.biopha.2020.110996
68. Yu H, Tang H, Deng C, et al. RRM2 Improves Cardiomyocyte Proliferation after Myocardial Ischemia Reperfusion Injury through the Hippo-YAP Pathway. *Dis Markers*. 2021;2021:5089872. doi:10.1155/2021/5089872
69. Structure of ribonucleotide reductase protein R1 | Nature. Accessed February 10, 2022. <https://www.nature.com/articles/370533a0>
70. Tanaka H, Arakawa H, Yamaguchi T, et al. A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature*. 2000;404(6773):42-49. doi:10.1038/35003506

71. Yang B, Wang T, Li N, Zhang W, Hu Y. The High Expression of RRM2 Can Predict the Malignant Transformation of Endometriosis. *Adv Ther.* 2021;38(10):5178-5190. doi:10.1007/s12325-021-01888-3
72. Burgova EN, Tkachev NA, Paklina OV, Mikoyan VD, Adamyan LV, Vanin AF. The effect of dinitrosyl iron complexes with glutathione and S-nitrosoglutathione on the development of experimental endometriosis in rats: A comparative studies. *European Journal of Pharmacology.* 2014;741:37-44. doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.017
73. Effect of Vascular Endothelial Growth Factor Inhibition on Endometrial Implant Development in a Murine Model of Endometriosis - Analía Gabriela Ricci, Carla Noemí Olivares, Mariela Andrea Bilotas, Gabriela Fabiana Meresman, Rosa Inés Barañao, 2011. Accessed February 10, 2022. <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/19337191110395406>
74. Matalliotakis IM, Goumenou AG, Koumantakis GE, et al. Serum concentrations of growth factors in women with and without endometriosis: the action of anti-endometriosis medicines. *Int Immunopharmacol.* 2003;3(1):81-89. doi:10.1016/s1567-5769(02)00216-3
75. Egorova A, Petrosyan M, Maretina M, et al. Anti-angiogenic treatment of endometriosis via anti-VEGFA siRNA delivery by means of peptide-based carrier in a rat subcutaneous model. *Gene Ther.* 2018;25(8):548-555. doi:10.1038/s41434-018-0042-7
76. Ashfaq S, Can AS. Danazol. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2022. Accessed February 10, 2022. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564344/>
77. Hsu CY, Hsieh TH, Tsai CF, et al. Synthetic Steroid Hormones Regulated Cell Proliferation Through MicroRNA-34a-5p in Human Ovarian Endometrioma. *Biol Reprod.* 2016;94(3):60. doi:10.1095/biolreprod.115.133330
78. Dmowski WP. Danazol. A synthetic steroid with diverse biologic effects. *J Reprod Med.* 1990;35(1 Suppl):69-74; discussion 74-75.
79. Jiang L, Zhang M, Wang S, Han Y, Fang X. Common and specific gene signatures among three different endometriosis subtypes. *PeerJ.* 2020;8:e8730. doi:10.7717/peerj.8730

IMMUNOTERAPIA W RAKU PĘCHERZA MOCZOWEGO. PRZEGLĄD DOTYCHCZASOWEGO LECZENIA I NOWYCH MOŻLIWOŚCI

**Aneta Rasińska, Paulina Redel, Krzysztof Feret,
Agnieszka Geisler, Marta Gmerek, Magdalena Kałucka-Janik**

Studenckie Koło Naukowe im. Zbigniewa Religi przy Katedrze Biofizyki w Zabrze,
Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Abstrakt:

Rak urotelialny pęcherza moczowego (UC) jest najczęstszym nowotworem złośliwym układu moczowego i przyczyną prawie 170 000 zgonów rocznie na całym świecie. Dotychczas stosowana immunoterapia z dopęcherzowym wlewem *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) jest standardem leczenia nieinwazyjnego raka pęcherza moczowego (NMIBC). Pojawienie się inhibitorów immunologicznych punktów kontrolnych (ICI) całkowicie zmieniło schemat leczenia, zarówno NMIBC, jak i raka pęcherza moczowego naciekającego mięśnie (MIBC), umożliwiając rozszerzenie strategii leczenia. Do pięciu zatwierdzonych przez FDA ICI należą: atezolizumab, durwalumab, awelumab, niwolumab, pembrolizumab. W ciągu ostatnich 10 lat innowacje w technologiach sekwencjonowania doprowadziły do szybkiej charakterystyki genomicznej raka pęcherza moczowego, pogłębiając wiedzę na temat patogenezы i ujawniając potencjalne słabości terapeutyczne. Dodatkowo, powszechnie wyrażane cele molekularne wykorzystano do opracowania terapii celowanych. Najnowsze kierunki rozwoju obejmują leki celujące w białka punktów kontrolnych oraz leki celujące w receptory kostymulujące. Trwają także badania nad zastosowaniem agonistów receptora czynnika martwicy nowotworu indukowanego glukokortykoidami (GITR), agonistów OX-40 i agonistów receptora Toll-podobnego (TLR). Szeroki wachlarz nowych możliwości nie pomija leków nakierowanych na CD47, CEACAM-1 i 6, CD26, kinazę zależną od cyklin (CDK), szlak interleukin. Wśród bardziej innowacyjnych rozwiązań znajdują się: terapia CAR-T, koniugaty leków, fotoimmunoterapia, szczepionki, wykorzystanie wirusów onkolitycznych oraz nowotworowych komórek macierzystych. Celem niniejszej pracy jest przegląd dotychczasowej immunoterapii w UC, z rozważeniem jej skuteczności oraz przegląd nowych punktów uchwytu leków immunologicznych w UC.

Słowa kluczowe: immunoterapia, rak pęcherza moczowego, BCG, inhibitory immunologicznych punktów kontrolnych

Abstract:

Urothelial carcinoma of the urinary bladder (UC) is the most common malignant neoplasm of the urinary system with almost 170,000 deaths annually worldwide. The so far used immunotherapy with intravesical infusion of *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) is the standard treatment for non-invasive bladder cancer (NMIBC). The advent of immune checkpoint inhibitors (ICIs) has completely changed the treatment regimen of both NMIBC and muscle-infiltrating bladder cancer (MIBC), allowing more robust treatment strategies. The five FDA-approved ICIs include: atezolizumab, durvalumab, avelumab, nivolumab, and pembrolizumab. Over the past 10 years, innovations in sequencing technologies have led to the rapid genomic characterization of bladder cancer, deepening the understanding of pathogenesis and revealing potential therapeutic weaknesses. Additionally, commonly expressed molecular targets have been used to develop targeted therapies. Recent developments include drugs targeting checkpoint proteins and drugs targeting costimulatory receptors. Research is also underway on the use of glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor (GITR) agonists, OX-40 agonists and Toll-like receptor (TLR) agonists. The wide range of new possibilities does not overlook drugs targeting CD47, CEACAM-1 and 6, CD26, cyclin dependent kinase (CDK), interleukin pathway. Among the more innovative solutions are CAR-T therapy, drug conjugates, photoimmunotherapy, vaccines, the use of oncolytic viruses and cancer stem cells. The aim of this study is to review the current immunotherapy in UC, considering its effectiveness, and to present new targets of immunobiological drugs in UC.

Keywords: immunotherapy, bladder cancer, BCG, immune checkpoints inhibitors

1. Wprowadzenie

Rak pęcherza moczowego jest siódmym najczęściej występującym nowotworem na świecie i najczęstszym nowotworem złośliwym układu moczowego. Każdego roku na całym świecie rak pęcherza moczowego diagnozuje się u około 430 000 osób, a umiera na niego około 165 000 pacjentów. W momencie rozpoznania 75-80% przypadków raka pęcherza klasyfikuje się jako nienaciekający rak pęcherza moczowego. Ta grupa składa się z patologicznych stadiów: Ta (brodawkowaty), T1 (naciekanie blaszki właściwej) i raka in situ (Tis). Stopnie patologiczne są dalej klasyfikowane jako niskie lub wysokie w oparciu o klasyfikację Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) z 2004 r. oraz jako stopnie 1, 2 lub 3 w oparciu o klasyfikację WHO z 1973 r.^{1,2}. Czynniki ryzyka rozwoju raka pęcherza obejmują płeć męską, rasę białą, palenie tytoniu, osobistą lub rodzinną historię raka pęcherza moczowego, napromieniowanie okolicy miednicy, ekspozycję na niektóre leki, przewlekłe infekcje, podrażnienia dróg moczowych oraz niektóre schorzenia, w tym otyłość i cukrzyca. Niektóre zespoły genetyczne, w szczególności zespół Lynch, również predysponują do raka urotelialnego³⁻⁵. Około 75% nowych przypadków i zgonów dotyczy mężczyzn. Całkowite 5- i 10-letnie przeżycie dla naciekającego mięśniówkę raka pęcherza moczowego po leczeniu wynosi odpowiednio około 50 i 36%⁶. 5-letnie przeżycie w przypadku przerzutowego raka pęcherza moczowego wynosi tylko 15%. Pacjenci z rakiem pęcherza

moczowego z przerzutami są leczeni chemioterapią skojarzoną opartą na platinie w leczeniu pierwszego rzutu, zapewniając medianę przeżycia całkowitego wynoszącą około 15 miesięcy⁷. Chemioterapie drugiego rzutu, takie jak paklitaksel, pemetreksed, docetaksel i winflunina, mają ograniczoną skuteczność, a mediana przeżycia wynosi około 7 miesięcy^{8,9}. Niedawne przełomy w biologii i immunologii nowotworów doprowadziły do lepszego zrozumienia wpływu mikrośrodowiska guza na układ odpornościowy gospodarza¹⁰. PDL-1 wykazywany na powierzchni komórki nowotworowej lub na komórkach odpornościowych gospodarza w mikrośrodowisku nowotworu angażuje receptor PD-1 na aktywowanych cytotoksycznych komórkach T, prowadząc do regulacji w dół odpowiedzi immunologicznej gospodarza przeciwko komórkom nowotworowym. Inhibitory PDL-1 blokują to ujemne sprzężenie zwrotne, a tym samym wzmacniają odpowiedź immunologiczną przeciwko komórkom nowotworowym¹¹. Celem niniejszej pracy jest omówienie roli obecnych środków immunoterapeutycznych dostępnych w leczeniu raka pęcherza moczowego zarówno w monoterapii, jak i w połączeniu z chemioterapią lub innymi lekami immunoterapeutycznymi. Rozważone również zostaną różne nowe środki immunoterapeutyczne, których skuteczność jest obecnie poddawana ocenie, oraz ich możliwa rola w przyszłym paradygmacie leczenia.

2. Immunoterapia *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG)

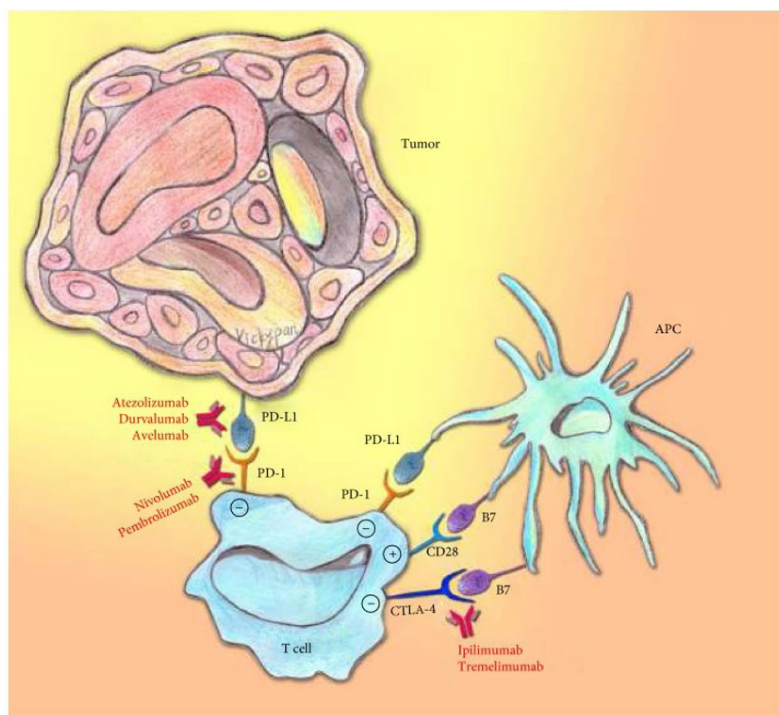
Od kilkudziesięciu lat onkologiczne zastosowanie BCG, czyli żywego, atenuowanego szczepu *Mycobacterium bovis* jest standardem leczenia NMIBC. Mechanizm działania BCG w leczeniu raka pęcherza moczowego wciąż nie jest w pełni poznany. Uważa się, że ekspozycja na BCG hamuje wzrost komórek nowotworowych w sposób zależny od dawki przez miejscową odpowiedź immunologiczną, o czym świadczy naciek pęcherza moczowego komórkami zapalnymi i gwałtowny wzrost poziomu cytokin w moczu¹². Aktualne wytyczne zalecają stosowanie dopęcherzowej immunoterapii BCG z indukcją dopęcherzową u pacjentów z NMIBC średniego lub wysokiego ryzyka (T1, Tis i Ta o wysokim stopniu złośliwości)¹³. W kilku badaniach z randomizacją sugerowano, że immunoterapia BCG ma przewagę nad różnymi dopęcherzowymi środkami chemioterapeutycznymi w zmniejszaniu nawrotów i opóźnianiu progresji choroby¹⁴. Metaanaliza dziewięciu badań z randomizacją wykazała istotnie niższy odsetek miejscowych nawrotów guza u pacjentów, którzy otrzymali BCG do pęcherza moczowego po przebyciu przezcewkowej resekcji guza w porównaniu z pacjentami poddanymi samej

resekcji przełykowej lub resekcji przełykowej z następującą dopęcherzową chemioterapią¹⁵. Najnowsze dane potwierdzają zastosowanie podtrzymującej terapii dopęcherzowej BCG u wybranych pacjentów z NMIBC. Randomizowane badanie wykazało, że w NMIBC wysokiego ryzyka przeżycie bez nawrotów było lepsze, gdy podtrzymujące BCG podawano przez 3 lata, jednak w przypadku NMIBC o pośrednim ryzyku 1 rok leczenia podtrzymującego był wystarczający¹⁶. Działania niepożądane wlewów BCG obejmują miejscowe skutki uboczne wynikające z odpowiedzi zapalnej na podanie dopęcherzowe oraz powikłania ogólnoustrojowe będące wynikiem zakażenia BCG. Miejscowe powikłania BCG są częste, występują u 62,8%-75,2% pacjentów i na ogół nie są poważne. Często pojawiają się one w ciągu kilku godzin od podania BCG i ustępują samoistnie do 48-72 godzin. Obejmują one chemiczne zapalenie pęcherza, bakteryjne zapalenie pęcherza, krwimocz. Ogólnoustrojowe działania niepożądane odpowiadają za mniejszy odsetek reakcji na dopęcherzowe BCG, ale nadal dotyczą ogólnie 30% - 40% pacjentów i rzadko mogą zagrażać życiu. Należą do nich ogólne złe samopoczucie (15,5%-24,8%), wysypka (2,2%-2,7%), gorączka (7,5%-17,1%) oraz zakażenia, w tym posocznica u <1%-9% pacjentów¹⁷. Niestety, prawie 40% pacjentów z NMIBC nie poddaje się terapii BCG. Do możliwych przyczyn niepowodzenia zalicza się: niewystarczające leczenie, utajoną chorobę inwazyjną lub przerzutową, niewystarczającą odpowiedź immunologiczną, stopniowe zanikanie odpowiedzi immunologicznej lub polimorfizm genu makrofagowego białka-1 związanego z naturalną odpornością (NRAMP-1)¹⁸. W ostatnich latach niedobór BCG był wyzwaniem dla onkologów na całym świecie. Wraz z definitywnym zaprzestaniem produkcji głównego szczepu (tj. Immucyst®) z końcem 2018 roku, poszukuje się alternatywnych strategii, w tym stosowania różnych szczepów^{19,20}. W przyszłości zaproponowano, aby ściana komórkowa BCG i szkielet ściany komórkowej BCG (BCG-CWS) zastąpiły żywe BCG w celu wywołania tej samej odpowiedzi immunologicznej, ale bez ryzyka infekcji ogólnoustrojowej. Wykazano, że nanocząsteczka BCG-CWS podawana dopęcherzowo w modelach gryzoni hamuje wzrost guza²¹.

3. Inhibitory Immunologicznych Punktów Kontrolnych (ICI)

Układ odpornościowy chroni organizm przed inwazją obcych czynników etiologicznych. Prezentacja antygenów limfocytom T przez komórki prezentujące antygen (APC) jest procesem krytycznym. CD28 było pierwszym białkiem zidentyfikowanym jako koreceptor, który przekazuje sygnały

stymulujące do komórek T. Po związaniu CD28 ze swoim ligandem, białkiem B7, na powierzchni APC, proliferacja komórek T jest aktywowana w celu zwiększenia odporności. Cytotoksyczny antygen limfocytów T-4 (CTLA-4) i białko zaprogramowanej śmierci komórki-1 (PD-1) przekazują sygnały hamujące po związaniu ich z ligandami, B7-1/B7-2 i PD-L1 (B7-H1)/PD-L2 (B7-DC), odpowiednio, na APC lub nowotworach. Częsteczki białka zaangażowane w regulację odporności są określane jako immunologiczne punkty kontrolne. Zazwyczaj układ odpornościowy jest zdolny do rozpoznawania i niszczenia komórek nowotworowych, jednak komórki nowotworowe mogą wykorzystywać mechanizm hamujący i unikać aktywności przeciwnowotworowej gospodarza poprzez hamowanie proliferacji komórek odpornościowych, a następnie przeżywać i kontynuować proliferację. Opracowano inhibitory immunologicznych punktów kontrolnych (immune checkpoints inhibitors - ICI), aby kontrolować guzy immunologiczne, w tym UC. Najszerzej badanymi ICI w UC są przeciwciała monoklonalne anty-CTLA-4, anty-PD-1 i anty-PD-L1²²⁻²⁴, które celują w szlaki regulacyjne komórek T w celu wzmocnienia przeciwnowotworowych odpowiedzi immunologicznych²⁵. Od maja 2016 r. do maja 2017 r. pięć przeciwciał monoklonalnych anty-PD-1/PD-L1 otrzymało przyspieszoną lub regularną zgodę amerykańskiej Agencji ds. Żywności i Leków (FDA) na leczenie pacjentów z miejscowo zaawansowanym lub przerzutowym UC²⁶.



Rysunek 1. Przedstawia immunoterapię przeciwpunktową ze wskazaniem miejsc uchwytu ICI²⁶. Plusy oznaczają sygnalizację aktywującą, a minusy hamującą.

3.1 Atezolizumab

Atezolizumab jest pierwszym inhibitorem immunologicznych punktów kontrolnych zatwierdzonym przez FDA w dniu 18 maja 2016 r. do leczenia pacjentów z miejscowo zaawansowanym lub przerzutowym rakiem urotelialnym, u których choroba postępowała podczas lub po chemioterapii zawierającej platynę lub w ciągu 12 miesięcy po leczeniu neoadiuwantowym lub uzupełniającym chemioterapią zawierającą platynę. Atezolizumab jest humanizowanym przeciwciałem IgG1 skierowanym przeciwko punktowi kontrolnemu PD-L1. Przyspieszone zatwierdzenie przez FDA w USA uzyskano na podstawie wyników badania IMvigor-210, wielośrodkowego, międzynarodowego, jednoramiennego badania z udziałem 310 pacjentów z miejscowo zaawansowanym lub przerzutowym rakiem urotelialnym, u których doszło do progresji choroby po wcześniejszej chemioterapii zawierającej platynę²⁷⁻²⁹. Wszyscy pacjenci otrzymywali dożylnie 1200 mg atezolizumabu co 3 tygodnie. W badaniu IMvigor-210 podzielono pacjentów na podstawie

poziomów ekspresji PD-L1 w komórkach odpornościowych naciekających nowotwór. Pacjenci z $\geq 5\%$ komórek immunologicznych naciekających nowotwór wybarwionych przez PD-L1 w guzie zostali zaklasyfikowani jako grupa PD-L1-dodatnia. W tym badaniu łącznie 100 (32%) i 210 (68%) pacjentów zostało sklasyfikowanych odpowiednio jako PD-L1 dodatni i PD-L1 ujemny. Z badania wykluczono pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi w wywiadzie lub wymagających ogólnoustrojowych leków immunosupresyjnych. Kluczowymi miarami skuteczności były odsetek obiektywnych odpowiedzi (ORR) oceniany w niezależnym przeglądzie według kryteriów oceny odpowiedzi w guzach litych w wersji 1.1 (RECIST v1.1) oraz czas trwania odpowiedzi (DoR). Przy medianie obserwacji wynoszącej 14,4 miesiąca ORR wyniósł 14,8% u wszystkich leczonych pacjentów^{27, 28}. Mediana DoR wahała się od 2,1 do 13,8 miesiąca. Spośród 46 osób, które odpowiedziały, 37 pacjentów wykazywało ciągłą odpowiedź przez ≥ 6 miesięcy. Ocena stosunku korzyści do ryzyka była korzystna dla poparcia przyspieszonego zatwierdzenia^{27, 29}.

Zjawiskiem odnotowanym później w 2017 roku było lepsze przeżycie całkowite w przypadku kontynuacji leczenia atezolizumabem w momencie progresji w porównaniu z pacjentami, u których odstawiono atezolizumab. Mediana całkowitego przeżycia (OS) dla osób kontynuujących leczenie atezolizumabem po progresji choroby wyniosła 12,8 miesiąca, w porównaniu z 3,6 miesiąca dla osób nieleczonych atezolizumabem po progresji choroby³⁰. Jednak konieczne są dalsze badania, aby potwierdzić jego powtarzalność z innymi inhibitorami punktów kontrolnych. Następnie w 2017 roku atezolizumab został zatwierdzony do leczenia pacjentów z zaawansowanym rakiem pęcherza moczowego, którzy nie kwalifikują się do terapii opartej na platynie jako terapii pierwszego rzutu³⁰.

Badanie IMvigor211, porównujące atezolizumab z chemioterapią drugiego rzutu, niestety nie wykazało jego wyższości pod względem OS³¹.

Badanie IMvigor130 dotyczy atezolizumabu w monoterapii lub w skojarzeniu z chemioterapią opartą na platynie u pacjentów z nieleczonym miejscowo zaawansowanym lub przerzutowym rakiem pęcherza moczowego i wykazuje, że dodanie atezolizumabu do chemioterapii opartej na platynie jako leczenia pierwszego rzutu wydłużyło czas przeżycia bez progresji choroby u pacjentów z przerzutowym rakiem urotelialnym³². Inne badania rozważają jego zastosowanie jako leczenie neoadjuwantowe w MIBC (NCT02662309), w połączeniu z BCG w NMIBC wysokiego ryzyka (NCT02792192)³³

i monoterapię w nawracających NMIBC niereagujących na BCG (NCT02844816)³⁴.

3.2. Durwalumab

Durwalumab jest selektywnym, zmodyfikowanym ludzkim przeciwciałem, które blokuje wiązanie PDL-1 z PD-1 i CD80³⁵ 1 maja 2017r. FDA przyznała przyspieszoną zgodę na zastosowanie durwalumabu w leczeniu pacjentów z zaawansowanym lub przerzutowym UC, który rozwinął się podczas lub po wcześniejszej chemioterapii opartej na platynie. Zatwierdzenie zostało oparte na jednoramiennym badaniu pacjentów z UC, u których chemioterapia pierwszego rzutu oparta na platynie zakończyła się niepowodzeniem³⁵.³⁶ W badaniu tym łącznie 61 pacjentów, z których 40 uznano za pacjentów z dodatnim nowotworem PD-L1 ($\geq 25\%$ komórek nowotworowych lub komórek odpornościowych naciekających nowotwór z ekspresją PD-L1), leczono durwalumabem w dawce 10 mg/kg co 2 tygodnie. Spośród tych pacjentów 93,4% otrzymało jedną lub więcej linii wcześniejszej terapii z powodu zaawansowanej choroby. ORR wyniósł 31% w całej populacji i 46,4% w podgrupie PD-L1 dodatniej w porównaniu do 0% w podgrupie PD-L1 ujemnej³⁵. W niedawnym badaniu I/II fazy (NCT01693562), dotyczącym durwalumabu badano pacjentów z różnymi typami guzów litych pod kątem analizy bezpieczeństwa ekspozycji. Badanie to obejmowało 191 pacjentów, którym podawano durwalumab również w dawce 10 mg/kg dożylnie co 2 tygodnie. Obiektywne odpowiedzi odnotowano u 17,8 % pacjentów. Odpowiedź była wyższa u tych, którzy mieli wyższy wskaźnik ekspresji PD-L1 (28% w porównaniu z 5% w przypadku niskiej lub ujemnej ekspresji PD-L1). Mediana OS wyniosła 18,2 miesiąca dla wszystkich pacjentów i 20,0 miesięcy i 8,1 miesiąca odpowiednio w grupach o wysokiej i niskiej (lub ujemnej) ekspresji PD-L1³⁷.

Trwa badanie III fazy MEDI4736 (NCT02516241) oceniające skojarzenie durwalumabu i tremelimumabu we wcześniej nieleczonym raku pęcherza moczowego, podczas gdy inne badanie ocenia terapię skojarzoną (durwalumab + tremelimumab) w leczeniu pacjentów z naciekającym mięśnie UC wysokiego ryzyka, którego nie można leczyć terapią opartą na cisplatynie przed zabiegiem chirurgicznym (NCT02812420). W tym roku mają być również opublikowane wyniki badania, w którym skojarzono durwalumab z radioterapią (NCT02891161).

3.3. Awelumab

Awelumab to w pełni humanizowane przeciwciało IgG1 skierowane przeciwko punktowi kontrolnemu PD-L1. 9 maja 2017 r. awelumab otrzymał przyspieszoną aprobatę FDA na podstawie wyników otwartego, jednoramiennego, wielośrodkowego badania JAVELIN Solid Tumor (NCT01772004). W badaniu następowało kolejne rozszerzenie grup równoległych dla różnych kohort podtypów raka³⁸. Badano kohorty zarówno wtórnej ekspansji, jak i ekspansji skuteczności u pacjentów z przerzutowym rakiem urotelialnym, u których doszło do progresji po co najmniej jednej wcześniejszej próbie leczenia chemioterapią opartą na platynie³⁹. Pacjentom podawano awelumab w dawce 10 mg/kg dożylnie co 2 tygodnie do progresji choroby, nietolerowanej toksyczności lub wycofania się z badania. Przed podaniem awelumabu wszyscy pacjenci otrzymywali lek przeciwhistaminowy i paracetamol. Łączną analizę obu badań przeprowadzono na 161 pacjentach. ORR wyniósł 17%, przy czym był on znacznie wyższy u pacjentów z dodatnim wynikiem PD-L1, w porównaniu z pacjentami z ujemnym wynikiem PD-L1 i wynosił odpowiednio 24% i 14%^{38,40}. Mediana czasu trwania odpowiedzi wahała się od 1,4 do 17,4 miesięcy³⁸. Co istotne, u 20% pacjentów wystąpiły reakcje związane z infuzją, których wcześniej nie obserwowano w przypadku żadnego innego inhibitora PD-1/PDL-1⁴⁰. Trwa randomizowane badanie 3 fazy z zastosowaniem awelumabu w połączeniu z leczeniem podtrzymującym w porównaniu z samym leczeniem podtrzymującym u pacjentów z rakiem pęcherza moczowego z przerzutami, u których nie doszło do progresji po leczeniu pierwszego rzutu opartym na platynie (NCT02603432).

3.4. Niwolumab

Niwolumab jest ludzkim przeciwciałem IgG4 skierowanym przeciwko punktowi kontrolnemu PD-1. Na podstawie jednoramiennego badania klinicznego CheckMate-275⁴¹, 2 lutego 2017 r. FDA przyznała przyspieszoną zgodę na zastosowanie niwolumabu w leczeniu UC po nieskutecznej chemioterapii pierwszego rzutu opartej na związkach platyny. Niwolumab jest również pierwszym inhibitorem immunologicznych punktów kontrolnych zatwierdzonym w Unii Europejskiej do leczenia UC, 4 czerwca 2017 r. Wpływ niwolumabu na zmniejszenie wielkości guza u pacjentów z przerzutowym lub nieoperacyjnym miejscowo zaawansowanym UC, badano w jednoramiennym, otwartym badaniu fazy II CheckMate-275 (NCT02387996).

W badaniu CheckMate-275 niwolumab podawano 270 pacjentom z UC w dawce 3 mg/kg co 2 tygodnie do czasu wystąpienia progresji choroby, pogorszenia stanu klinicznego lub niedopuszczalnej toksyczności. Ekspresję nowotworu PD-L1 oznaczono ilościowo jako $\geq 5\%$ lub $\geq 1\%$. ORR wyniósł 19,6%, odpowiedzi odnotowano na wszystkich poziomach ekspresji PD-L1, z większą odpowiedzią u pacjentów z wyższą ekspresją PD-L1 (28% dla osób powyżej 5% i 23,8% dla osób między 5 a 1%). Mediana czasu trwania odpowiedzi wyniosła 10,3 miesiąca, a mediana przeżycia całkowitego (OS) wyniosła 8,7 miesiąca^{41,42}. W trwającym badaniu Checkmate-274 (NCT02632409) niwolumab jest testowany w porównaniu z placebo u pacjentów z rakiem pęcherza moczowego lub górnych dróg moczowych, po operacji usunięcia nowotworu. Inne trwające badanie dotyczy niwolumabu w skojarzeniu z kabazytakselem, z ipilimumabem lub bez u pacjentów z przerzutowymi guzami układu moczowego (NCT02496208). W trakcie rekrutacji jest badanie mające na celu porównanie niwolumabu w monoterapii i w skojarzeniu z urelumabem (przeciwciało agonistyczne anty-4-1BB) u pacjentów z UC niekwalifikujących się do stosowania cisplatyny lub odmawiających chemioterapii (NCT02845323).

3.5. Pembrolizumab

Pembrolizumab jest humanizowanym przeciwciałem IgG4 skierowanym przeciwko punktowi kontrolnemu PD-1⁴³. Jest to najnowszy inhibitor immunologicznych punktów kontrolnych zatwierdzony przez FDA w dniu 18 maja 2017 r. do leczenia pacjentów z UC. Oprócz zatwierdzenia w terapii drugiego rzutu, pembrolizumab uzyskał również przyspieszoną zgodę na zatwierdzenie do terapii pierwszego rzutu. Wskazania do leczenia pierwszego i drugiego rzutu zostały zatwierdzone na podstawie odpowiednio badań KEYNOTE-052 i KEYNOTE-045⁴⁴⁻⁴⁶. W badaniu II fazy Keynote-052 oceniano aktywność i bezpieczeństwo 200 mg pembrolizumabu podawanego co 3 tygodnie (przez 24 miesiące) u 370 pacjentów uprzednio nieleczonych, bądź niekwalifikujących się do leczenia cisplatyną z przerzutowym lub miejscowo zaawansowanym rakiem pęcherza⁴⁴. Ze względu na ekspresję PDL-1 w komórkach nowotworowych i odpornościowych pacjentów podzielono na dwie grupy. W pierwszej grupie ekspresja PDL-1 była na poziomie $> 1\%$, w drugiej wynosiła $> 10\%$. W grupach tych odpowiedź na leczenie wynosiła odpowiednio 25,4% i 38%. Badanie wykazało ORR na poziomie 24%. Mediana obserwacji wyniosła 7,8 miesiąca. Mediana czasu trwania odpowiedzi

wahała się od 1,4 do 17,8 miesiąca. 6-miesięczne przeżycie wyniosło 67%⁴⁴. Kluczowe badanie fazy III Keynote-045 zostało zaprojektowane w celu oceny pembrolizumabu w dawce 200 mg podawanej co 3 tygodnie w porównaniu z chemioterapią wybraną przez badacza (paklitaksel, docetaksel lub winflunina) u 542 pacjentów z przerzutowym rakiem pęcherza moczowego, u których doszło do progresji po chemioterapii opartej na platynie⁴⁵. Ekspresja PDL-1 została sklasyfikowana w podobny sposób jak w Keynote-052, ale oceniono tylko odpowiedź na poziomy PDL-1 $\geq 10\%$, co stanowiło około 30% całej kohorty. ORR w grupie pembrolizumabu wyniósł około 20% w porównaniu z 11% w grupie chemioterapii. Mediana OS wyniosła dla obu grup odpowiednio 10,3 miesiący, w porównaniu z 7,4 miesiąca. Przeżycie roczne wyniosło odpowiednio 43,9%, w porównaniu z 30,7%. Biorąc pod uwagę poziom PDL-1 $\geq 10\%$, mediana OS wyniosła 8 miesięcy w grupie pembrolizumabu, natomiast 5,2 miesiąca w grupie chemioterapii^{45, 46}. Takie wyniki wzbudziły wątpliwości, czy PDL-1 jest wiarygodnym markerem w nowotworach nabłonka dróg moczowych. Pembrolizumab uznano za lepiej tolerowany niż chemioterapia. Niestety, jakość życia nie była mierzona we wszystkich grupach pacjentów w tym badaniu^{45, 46}. Pembrolizumab był również badany w połączeniu z różnymi środkami cytotoksycznymi. W badaniu z udziałem 12 pacjentów z przerzutowym rakiem pęcherza, pembrolizumab w skojarzeniu z chemioterapią (docetaksel lub gemcytabina) wykazał dobrą skuteczność z ORR wynoszącym 33%⁴⁷. Badanie to dostarcza wstępnych dowodów na to, że połączenie pembrolizumabu i chemioterapii może być korzystne w raku pęcherza moczowego, jednakże mechanizm śmierci komórek immunogennych poprzez wzajemne oddziaływanie immunoterapii i chemioterapii wymaga dalszego wyjaśnienia. W trakcie III fazy jest badanie Keynote-361, w którym ocenie poddawana jest terapia pembrolizumabem z chemioterapią skojarzoną opartą na platynie lub bez niej w porównaniu z samą chemioterapią u pacjentów z zaawansowanym rakiem pęcherza moczowego (NCT02853305). Inne badania dotyczą różnych nowych zastosowań pembrolizumabu, w tym stosowania monoterapii u pacjentów z NMIBC wysokiego ryzyka (Keynote057 (NCT02625961)), w połączeniu z BCG u pacjentów z nawracającym NMIBC (NCT02808143) oraz w połączeniu z chemioradioterapią w MIBC (PCR-MIB (NCT02662062)). Badane jest również zastosowanie pembrolizumabu w leczeniu neoadiuwantowym w monoterapii (NCT02736266), a także w skojarzeniu z chemioterapią z dubletem platyny (NCT02690558) lub z gemcytabiną w populacji kwalifikującej się/niekwalifikującej się do platyny (NCT02365766). Inne badanie ocenia skuteczność pembrolizumabu

w terapii podtrzymującej po początkowej chemioterapii w chorobie przerzutowej (NCT02500121). Pembrolizumab jest stosowany w połączeniu z radioterapią w trwającym badaniu fazy I w MIBC lub raku pęcherza z przerzutami, w celu poprawy wyników. Rozważana jest także skuteczność pembrolizumabu po zakończeniu radioterapii przez rok lub do progresji choroby (PLUMMB (NCT02560636)).

Tabela 1. Zdarzenia niepożądane związane z leczeniem zatwierdzonych przez FDA inhibitorów PD-1/PI-L1 u pacjentów z rakiem urotelialnym²⁶

Cel	Nazwa inhibitora	Zdarzenia niepożądane związane z leczeniem	Zdarzenia niepożądane o podłożu immunologicznym
PD-L1	Atezolizumab	- zmęczenie - zmniejszony apetyt - nudności - zakażenie dróg moczowych - gorączka - zaparcia	- zapalenie płuc - zapalenie wątroby - zapalenie okrężnicy - endokrynopatie (choroba tarczycy, niewydolność nadnerczy, zapalenie przysadki, cukrzyca typu 1) - zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych/ mózgu - zapalenie trzustki - zapalenie skóry/wysypka
PD-L1	Durwalumab	- zmęczenie - zmniejszony apetyt - nudności - zakażenie dróg moczowych - biegunka - bóle mięśniowo-szkieletowe - zaparcia - obrzęki obwodowe	- zapalenie płuc - zapalenie wątroby - zapalenie okrężnicy, - endokrynopatie (choroba tarczycy, niewydolność nadnerczy, zapalenie przysadki, cukrzyca typu 1) - zapalenie nerek
PD-L1	Awelumab	- zmęczenie - zmniejszony apetyt - nudności - zakażenie dróg moczowych - bóle mięśniowo-szkieletowe	- zapalenie płuc - zapalenie wątroby - zapalenie okrężnicy - endokrynopatie - zapalenie nerek - dysfunkcja nerek
PD-1	Niwolumab	- zmęczenie - zmniejszony apetyt - nudności - bóle mięśniowo-szkieletowe - biegunka - wysypka	- zapalenie płuc - zapalenie wątroby - zapalenie okrężnicy - endokrynopatie, - zapalenie nerek, - dysfunkcja nerek, - zapalenie mózgu - wysypka

PD-1	Pembrolizumab	- zmęczenie - zmniejszony apetyt - nudności - bóle mięśniowo-szkieletowe - biegunka - wysypka - świąd - zaparcia	- zapalenie płuc - zapalenie wątroby - zapalenie okrężnicy - endokrynopatie - zapalenie nerek - dysfunkcja nerek
------	---------------	---	---

3.6. Ipilimumab

Ipilimumab jest przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko cytotoksycznemu antygenowi związanemu z limfocytami T (CTLA-4) i obecnie zatwierdzonym do leczenia przerzutowego czerniaka⁴⁸. Ostatnie dane sugerują, że niektóre leki stosowane w chemioterapii (np. standardowa dawka gemcytabiny) pośredniczą w przeciwnowotworowym działaniu ICI poprzez wywoływanie immunogennej śmierci komórek⁴⁹. Wiadomo również, że inne leki, takie jak cisplatyna, modulują odporność nowotworu⁵⁰. Zbadane zostały terapie skojarzone obejmujące antagonistę CTLA-4, antagonistę immunologicznego punktu kontrolnego i chemioterapię w przypadku raka pęcherza moczowego. W badaniu II fazy oceniano ipilimumab w skojarzeniu z chemioterapią cisplatyną i gemcytabiną w przerzutowym raku pęcherza moczowego⁵¹. W badaniu tym uczestniczyło 36 pacjentów wcześniej nieleczonych (w większości z przerzutami do narządów trzewnych), którzy byli leczeni sześcioma cyklami powyższej kombinacji. ORR wyniósł 23%, mediana przeżycia wolnego od progresji (PFS) 8 miesięcy, Mediana OS 14,6 miesięcy, a roczny wskaźnik przeżycia 59%. Najczęstszymi zdarzeniami niepożądanymi stopnia 3./4. były neutropenia (36%), hiponatremia (31%) i niedokrwistość (25%), natomiast najczęstszymi zdarzeniami niepożądanymi stopnia 3./4. pochodzenia immunologicznego było zapalenie okrężnicy (6 %) i przysadki (3%). Choć badanie to nie osiągnęło pierwszorzędnego punktu końcowego 80% przeżywalności w ciągu roku⁵¹, jednak wyznaczyło nowy punkt odniesienia dla przyszłych badań i potwierdziło, że rak pęcherza moczowego jest immunogenny. Badanie wykazało, że powyższa kombinacja jest wykonalna i wykazuje skuteczność. Obecnie trwają starania na rzecz wzmocnienia aktywacji immunologicznej poprzez połączenie środków anti-CTLA-4 i anti-PD-1. W otwartym badaniu fazy 1/2 Checkmate032, oceniano bezpieczeństwo i skuteczność niwolumabu w połączeniu z ipilimumabem w przerzutowych

guzach litych. Badano dwie różne kombinacje, ipilimumab w dawce 3 mg/kg z niwolumabem w dawce 1 mg/kg lub ipilimumab w dawce 1 mg/kg z niwolumabem w dawce 3 mg/kg podawane co 3 tygodnie przez 4 cykle, a następnie niwolumab w monoterapii podawany co 2 tygodnie u pacjentów z wcześniej leczonym przerzutowym rakiem pęcherza moczowego⁵². Obserwowano obiecujący ORR wynoszący 38,5% (ipilimumab w dawce 3 mg/kg) w porównaniu z 26% (ipilimumab w dawce 1 mg/kg). Mediana PFS wyniosła 4,3 miesiąca w porównaniu do 2,6 miesiąca, natomiast mediana OS wyniosła 10,2 miesiąca w porównaniu do 7,3 miesiąca⁵³. Wskaźniki te były niezależne od poziomu ekspresji PDL-1. Najczęstszymi zdarzeniami niepożądanymi stopnia 3./4. w pierwszej kombinacji były biegunka (7,7%) i zapalenie płuc (3,8%), podczas gdy podwyższoną aktywność enzymów wątrobowych (5,8%) i biegunkę (4,8%) zaobserwowano w drugiej kombinacji leczenia⁵³. Konieczna wydaje się dalsza ocena tego połączenia w dużych, długoterminowych badaniach w celu potwierdzenia powyższych wyników.

4. Nowe cele i nadchodzące środki immunoterapeutyczne w leczeniu raka pęcherza

4.1. Leki celujące w białka punktów kontrolnych

4.1.1. Aktywacja limfocytów Gen-3 (LAG-3)

LAG-3 ulega ekspresji na powierzchni komórek limfocytów i został niedawno uznany za ważny, nowy cel w immunologii raka⁵⁴. Leki anty-LAG-3 wykazywały zwiększoną aktywację komórek T specyficznych wobec antygenów w miejscu guza, co skutkuje zmniejszonym wzrostem guza. Badania przedkliniczne ujawniły powszechną współekspresję PD-1 i LAG-3 na naciekających nowotwór limfocytach T w kilku nowotworach, a podwójna blokada (anty-LAG-3/anty-PD-1) wykazała dobre wyniki synergiczne w nowotworach na modelach zwierzęcych⁵⁵. Na tej podstawie powstało badanie (NCT04140500), będące w fazie rekrutacji, mające na celu ocenę eskalacji dawki dwuswoistego przeciwciała przeciw PD1-LAG3 u pacjentów z zaawansowanymi i/lub przerzutowymi guzami litymi. Dalsza ocena kliniczna tego typu celu terapeutycznego może wykazać pozytywne rezultaty w raku pęcherza moczowego.

4.1.2. Receptory Ig-podobne do komórek zabójczych (KIR)

Receptory KIR są obecne na dojrzałych komórkach NK, a ich ligandami są cząsteczki HLA. Wiązanie cząsteczek HLA z KIR skutkuje hamującą sygnalizacją, która zmniejsza niszczenie guza za pośrednictwem komórek NK. Lirilumab (anty-KIR) był testowany w badaniu zwiększania dawki i został uznany za dobrze tolerowany⁵⁶. Jest oceniany w nowotworach narządów mięszowych w połączeniu z niwolumabem i ipilimumabem. Badanie I fazy wykazało ostatnio istotną aktywność kliniczną lirilumabu (w skojarzeniu z niwolumabem) u pacjentów z zaawansowanym rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi opornym na platynę⁵⁷. Dalsze dane z innych kohort ekspansyjnych tego badania mogą zatem dostarczyć ważnych informacji na temat przyszłego rozwoju tych leków w innych nowotworach złośliwych, w tym w UC.

4.2. Leki celujące w receptory kostymulujące

4.2.1. CD-137 (4-1BB)

CD-137 jest receptorem kostymulującym obecnym na cytotoksycznych i regulatorowych komórkach T (Treg) oraz komórkach NK. Jego funkcje obejmują aktywację cytotoksycznych komórek T i hamowanie supresyjnych funkcji Treg. Jest to potencjalnie odpowiedni cel terapeutyczny w raku pęcherza moczowego⁵⁸. Po raz pierwszy skuteczność urelumabu - przeciwciała monoklonalnego, będącego agonistą CD-137 zbadano w 2008 roku u pacjentów z zaawansowanym rakiem. Wówczas dane dotyczące skuteczności okazały się obiecujące, natomiast równocześnie stwierdzono znaczącą toksyczność wątrobową, najprawdopodobniej zależną od dawki. Badania wznowiono 2012 roku, tym razem z w połączeniu z rytuksymabem, cetuksymabem, elotuzumabem i niwolumabem. Zdabano urelumab również w monoterapii. Ponownie toksyczność wątrobową była znacząca. Ostatnie dane dotyczące urelumabu u pacjentów z przerzutowym czerniakiem wykazały podobne wskaźniki odpowiedzi między pacjentami z guzami PD-L1 dodatnimi i PD-L1 ujemnymi, co sugeruje, że urelumab może poszerzać pulę pacjentów, którzy odpowiadają na przeciwciała monoklonalne anti-PD-1⁵⁹. Z tego powodu, pomimo ograniczonej aktywności klinicznej urelumabu w tolerowanej dawce, należy pozostać obiecująco nastawionym do rozwoju agonistów CD-137.

4.2.2. CD27

CD27 jest receptorem kostymulującym, który należy do nadrodziny receptorów czynnika martwicy nowotworu i ulega ekspresji zarówno na komórkach T, komórkach B, jak i komórkach NK⁶⁰. Warlilumab, przeciwciało będące agonistą CD27, wykazał obiecującą aktywność przeciwnowotworową w badaniu fazy 1 u pacjentów z nowotworami hematologicznymi⁶¹. Badanie skojarzenia warlilumabu i atezolizumabu u pacjentów z zaawansowanym rakiem pęcherza moczowego zostało zakończone, jednak należy oczekiwać jego wznowienia i publikacji wyników (NCT02543645).

4.2.3. CD40

CD40 jest w dużej mierze wyrażany na APC, pośredniczy w ich dojrzewaniu i wzmocnieniu odporności, co skutkuje aktywacją komórek T specyficzną dla nowotworu⁶². CP-870,893, anty-CD40, w badaniu fazy 1 u pacjentów z zaawansowanymi guzami litymi wykazał zachęcającą aktywność⁶³.

4.3. Agoniści receptora czynnika martwicy nowotworu indukowanego glukokortykoidami (GITR) i agoniści OX-40

4.3.1. GITR

GITR - białko związane z receptorem czynnika martwicy nowotworu indukowane glukokortykoidami jest atrakcyjnym celem immunoterapii, ze względu na jego zdolność do promowania funkcji efektorowych komórek T i hamowania tłumienia regulatorowych limfocytów Treg⁶⁴. Badania przedkliniczne przeciwciał agonistycznych GITR (w tym w połączeniu z ICI) wykazały wstępny sygnał aktywności⁶⁵. W badaniu MK-4166 (NCT02132754) odpowiedzi obserwowano w przypadku terapii skojarzonej z pembrolizumabem, głównie u pacjentów z czerniakiem nieleczonych wcześniej ICI⁶⁶.

4.3.2. OX-40

OX-40 ulega ekspresji na komórkach CD4+, CD8+, NK i wzmacnia sygnalizację receptora komórek T na powierzchni limfocytów T, prowadząc do ich aktywacji i wzmocnienia aktywności Treg⁶⁷. W badaniu fazy 1 z agonistą OX-40, 9B12/MEDI0562 wykazywał ograniczone działanie

przeciwnowotworowe przy akceptowalnym profilu bezpieczeństwa u pacjentów z przerzutowymi nowotworami litymi opornymi na terapię konwencjonalną⁶⁸. Humanizowana wersja tego samego leku (MEDI0562) była testowana na pacjentach z nowotworami narządów mięszkowych w badaniu fazy 1 (NCT02318394). Powstało również inne badanie z zastosowaniem RG7888/MOXR0916 w połączeniu z atezolizumabem z bewacyzumabem lub bez bewacyzumabu u pacjentów z rakiem przerzutowym (NCT02410512). Wyniki obu powyższych badań nie zostały dotychczas opublikowane.

4.4. Leki nakierowane na CD47 oraz CEACAM-1 i 6

4.4.1. CD47

CD47 jest hamującym białkiem sygnałowym obecnym na komórkach nowotworowych w celu uniknięcia fagocytozy. Wstępne dane sugerują również, że CD47 jest podwyższony w różnych nowotworach. Tak więc białko to ma wszystkie cechy dobrego celu molekularnego. Opracowywane są przeciwciała monoklonalne ukierunkowane na ten antygen powierzchniowy komórki. Dwie molekuly CC-90002 (NCT02367196) i Hu5F9-G4 (NCT02216409) są obecnie oceniane w nowotworach litych i hematologicznych, w przyszłości należy oczekiwać wyników. Rak pęcherza jest uważany za bardzo immunogenny, zatem przyszłe wysiłki powinny koncentrować się na stymulowaniu fagocytozy w tym nowotworze⁶⁹.

4.4.2. CEACAM-1 i CEACAM-6

CEACAM należą do rodziny antygenów rakowo-płodowych (CEA) immunoglobulin glikoproteinowych cząsteczek adhezyjnych (CAM) i są coraz częściej uznawane za odgrywające kluczową rolę w modulowaniu czerniaka, raka płuc, raka pęcherza moczowego i innych nowotworów⁷⁰. CEACAM-1 odgrywa rolę w progresji raka, inwazji i angiogenezie guza. Jest obecny zarówno na komórkach nowotworowych, jak i limfocytach T, a po aktywacji ulega transoligomeryzacji i zapobiega aktywacji immunologicznej, zapobiegając zniszczeniu komórek nowotworowych przez limfocyty T i komórki NK⁷¹. Oczekuje się, że blokowanie CEACAM-1 lekiem CM-24 spowoduje bardziej specyficzną dla raka aktywację niż ogólną aktywację immunologiczną i jest oceniane (z pembrolizumabem) w badaniu fazy 1 (NCT02346955). CEACAM-6 jest cząsteczką adhezyjną, która wiąże cytotoksyczne komórki T,

hamując ich aktywację i prowadząc do oszczędzania guza⁷¹. L-DOS47 działa na CEACAM-6 i jest oceniany w raku płuc (NCT02340208). Wyniki obu powyższych badań nie zostały dotychczas opublikowane.

4.5. Katabolizm tryptofanu ukierunkowany na leki

2,3-dioksygenaza indoloaminy-1 (IDO1) jest enzymem katabolizującym tryptofan stwierdzanym w wielu nowotworach, który indukuje tolerancję immunologiczną poprzez tłumienie aktywności komórek T. IDO1 powiązано z progresją raka pęcherza moczowego, co ma znaczenie prognostyczne i może być przyszłym celem w leczeniu raka pęcherza moczowego⁷². Epakadostat jest skutecznym inhibitorem IDO1 i znajduje się obecnie we wczesnej fazie rozwoju klinicznego. Jest badany zarówno w monoterapii, jak i w połączeniu w kilku nowotworach złośliwych. Oceniono go w skojarzeniu z pembrolizumabem w badaniu I/II fazy z udziałem 54 pacjentów z rakiem przerzutowym. U siedmiu kwalifikujących się pacjentów z czerniakiem ORR wyniósł 57%. U pięciu ocenianych pacjentów z rakiem nerkowokomórkowym ORR wyniósł 40%⁷³. W innym badaniu epakadostat podawany z ipilimumabem pacjentom z czerniakiem z przerzutami dał ORR rzędu 30%⁷⁴. Założenie, że inhibitory IDO1 mogą nasilać działanie przeciwnowotworowe poprzez poprawę odpowiedzi na konwencjonalną chemioterapię, doprowadziło do badań skojarzonych⁷⁵. Indoksymod, inny inhibitor IDO1 oceniano w skojarzeniu z docetakselem w badaniu zwiększania dawki u 27 pacjentów z rakiem przerzutowym. Badacze odnotowali odsetek odpowiedzi częściowych wynoszący 18%, stabilizację choroby trwającą krócej niż 6 miesięcy u 36% i stabilną chorobę trwającą ponad 6 miesięcy u 4% pacjentów⁷⁵.

4.6. Sygnalizacja chemokinowa nakierowana na lek

Obecność komórek odpornościowych w mikrośrodowisku guza w dużej mierze zależy od ligandów chemokin na tych komórkach i ich receptorów na komórkach nowotworowych⁷⁷. Chemokiny są strukturalnie podzielone na cztery podgrupy, a mianowicie CXC, CC, CX3C i C⁷⁸. Ukierunkowanie na szlak chemokin może okazać się przełomem w leczeniu UC.

4.6.1. CXCR1, CXCR2

Oś CXCR1/2-CXCL8 aktywuje wiele wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych, które regulują różnicowanie i proliferację komórek odpornościowych. Oś ta pośredniczy również w progresji wielu nowotworów, co wiąże się ze złym rokowaniem⁷⁹. Dane przedkliniczne sugerują, że oś CXCR1/2 bierze udział w progresji raka pęcherza moczowego i powstawaniu przerzutów, co wymaga dalszych badań nad rolą inhibitorów CXCR1/2⁸⁰. Reparixin, inhibitor CXCR1/2, wykazał już aktywność w połączeniu z paklitakselem zarówno w raku piersi z dodatnim, jak i potrójnie ujemnym receptorem hormonalnym. Jednak jego wpływ na mikrośrodowisko immunologiczne raka pęcherza wymaga badań⁸¹. Badanie NCT02499328 ocenia AZD5069, inhibitor CXCR2 w skojarzeniu z durwalumabem pod kątem nowotworów litych, w tym raka pęcherza moczowego. Wyniki pośrednie sugerują korzyści kliniczne z możliwym do kontrolowania profilem bezpieczeństwa⁸².

4.6.2. CXCR4

Aktywacja osi CXCR4-CXCL12 aktywuje wewnątrzkomórkowe szlaki związane z progresją nowotworu i rozwojem przerzutów⁸³. Ostatnie dowody sugerują, że komórki raka pęcherza wykazują ekspresję CXCR4, która jest podwyższona w chorobie przerzutowej⁸⁴. Potrzebne są badania kliniczne ukierunkowane na ten szlak zarówno w monoterapii, jak i w połączeniu z ICI w celu modulowania odpowiedzi immunologicznej.

4.7. Receptor czynnika stymulującego tworzenie kolonii 1 (CSF1R)

Receptory czynnika stymulującego tworzenie kolonii makrofagów ulegają ekspresji na powierzchni komórek raka pęcherza moczowego. Czynniki stymulujące tworzenie kolonii 1 (CSF1) wyrażany na powierzchni guza jest odpowiedzialny za aktywację makrofagów związanych z nowotworem i komórek supresorowych pochodzenia szpikowego, co skutkuje brakiem równowagi między populacją limfocytów T w ich mikrośrodowisku, i opornością na chemioterapię⁸⁵. Obecnie nie ma jeszcze badań nad wykorzystaniem antagonistów CSF1R/CSF1.

4.8. Agoniści receptora Toll-podobnego (TLR)

TLR wzmacniają odporność poprzez rozpoznawanie wzorców molekularnych związanych z patogenami drobnoustrojów (PAMP) i endogennych sygnałów zagrożenia (DAMP) uwalnianych z umierających komórek. Doniesiono, że ekspresja TLR jest zmniejszona w raku pęcherza moczowego. W badaniach przedklinicznych wykazano, że agoniści TLR są w stanie aktywować odpowiedź immunologiczną przeciwko rakowi pęcherza moczowego⁸⁶. Obecnie TLR i związane z nimi ligandy lub regulatory są uważane za uderzających kandydatów do badań nad nowymi metodami leczenia nowotworów, w tym NMIBC. Niestety agoniści TLR jako pojedynczy środek cechują się słabą skutecznością we wcześniejszych próbach, stąd konieczność dalszej oceny w połączeniu z innymi środkami w celu wzmocnienia ich działania immunostymulującego⁸⁷.

4.9. Leki skierowane na szlak interleukin

4.9.1. ALT-801

Rekombinowana ludzka interleukina-2 (IL-2) jest zdolna do indukowania trwałych, całkowitych odpowiedzi u niewielkiej liczby pacjentów z przerzutowym czerniakiem i rakiem nerki, wiąże się jednak ze znaczną toksycznością, taką jak niedociśnienie, zespół przesiąkania włosniczek i skąpomocz⁸⁸. ALT-801 to innowacyjne immunoterapeutyczne białko fuzyjne składające się z IL-2, połączonej z jednołańcuchową domeną receptora komórek T, która rozpoznaje epitop peptydowy (aa264-272) ludzkiego antygenu p53 ekspozowany na komórkach nowotworowych. ALT-801 jest bardziej immunostymulujący niż sama IL-2 i silniej zwalcza lite nowotwory złośliwe u pacjentów z guzami z dodatnim wynikiem p53⁸⁹. Badanie I/II fazy dotyczące zaawansowanego/przerzutowego raka pęcherza moczowego u 62 pacjentów, z których większość była oporna na chemioterapię, wykazało skuteczność i bezpieczeństwo ALT-801 w połączeniu z gemcytabiną i cisplatyną. ORR zaobserwowano u 35% pacjentów⁹⁰. W badaniu fazy 1 oceniano dwa cykle indukcji dożylnym ALT-801 (4 dawki, dni 3, 5, 8, 15) i gemcytabiną (2 dawki, dni 1, 8) w odstępie 13 dni w NMIBC wysokiego ryzyka opornego na BCG. Pacjenci, u których uzyskano całkowitą odpowiedź potwierdzoną biopsją otrzymali jeden cykl podtrzymujący i przeszli ocenę odpowiedzi. Spośród sześciu pacjentów, którzy otrzymali leczenie indukcyjne i podtrzymujące, odpowiedź

trwałą ≥ 18 miesięcy zaobserwowano u dwóch pacjentów⁹¹. Stwarza to potencjał terapeutyczny połączenia ALT-801 z chemioterapią lub innymi środkami immunoterapeutycznymi.

4.9.2. ALT-803

Interleukina-15 (IL-15) jest kluczowym czynnikiem rozwoju, proliferacji i aktywacji komórek NK i komórek pamięci T CD8+⁹². ALT-803 jest nowym agonistą IL-15 o zwiększonej aktywności biologicznej IL-15 i do tej pory był badany tylko na modelach zwierzęcych, wykazując trwałą aktywność przeciwnowotworową w mysich modelach piersi i okrężnicy⁹³. W modelach szczurzych wykazano, że podanie dopęcherzowe ALT-803 wraz z leczeniem BCG zmniejsza masę guza w raku pęcherza moczowego⁹⁴. Uzasadnione są dalsze badania kliniczne w połączeniu z innymi środkami immunoterapeutycznymi w raku pęcherza moczowego naciekającym mięśnie i raku pęcherza z przerzutami.

4.10. Leki celowane w CD26 i kinazę zależną od cyklin (CDK)

4.10.1 CD26

Ekspresja CD26 na komórkach pomocniczych T koreluje z aktywnością przeciwnowotworową⁹⁵. YS110 to przeciwciało monoklonalne o wysokim powinowactwie do antygenu CD26. W pierwszym badaniu na ludziach oceniono YS110 u 33 pacjentów z zaawansowanymi nowotworami. Większość badanych pacjentów miała opornego na leczenie międzybłoniaka opłucnej, z co najmniej trzema wcześniejszymi liniami terapii. Chociaż nie odnotowano pełnej, ani częściowej odpowiedzi, długotrwałą stabilizację choroby obserwowano u połowy badanej populacji. Częstymi zgłaszanymi zdarzeniami niepożądanymi były gorączka i osłabienie o niskim stopniu nasilenia⁹⁶.

4.10.2. Inhibitory kinaz cyklino-zależnych (CDK – Cyclin-Dependent Kinase)

Flavopiridol, inhibitor CDK, jest silnym środkiem apoptotycznym ze względu na jego zdolność do wywoływania śmierci komórkowej w cyklicznych, jak i niecyklicznych szlakach komórek nowotworowych⁹⁷. W badaniu I fazy podawano FOLFIRI (schemat chemioterapii w leczeniu raka jelita

grubego) + flawopirydol u pacjentów z zaawansowanymi guzami litymi. Wykazano, że powyższe połączenie jest schematem bezpiecznym i skutecznym. Można osiągnąć stężenia flawopirydolu, które wzmacniają działanie FOLFIRI. Aktywność kliniczna jest zachęcająca i obejmuje przedłużoną stabilną chorobę u pacjentów z rakiem jelita grubego opornym na irynotekan⁹⁸. Trwa analiza danych z badania innego inhibitora CDK4-6 - palbocyklibu, zastosowanego w leczeniu opornego na leczenie przerzutowego raka pęcherza moczowego (NCT02334527).

4.11. Koniugaty leków

Koniugaty przeciwciało-lek (ADC – Antibody Drug Conjugates) to nowy sposób wykorzystania układu odpornościowego do współdziałania z chemioterapią w celu poprawy wyników. ADC są złożonymi środkami terapeutycznymi wytworzonymi metodami inżynierii, składającymi się z przeciwciał monoklonalnych, skierowanych przeciwko antygenom związanym z nowotworem, do których przy użyciu łączników chemicznych przyłączone są bardzo silne środki cytotoksyczne. Jest to strategia ukierunkowanego dostarczania leku, łącząca precyzję ugrupowania ukierunkowującego przeciwciało z aktywnością cytobójczą ładunku, który sam w sobie jest na ogół zbyt toksyczny, aby można go było podawać ogólnoustrojowo⁹⁹. ADC zapewniają wyjątkową możliwość dostarczania leków do komórek nowotworowych przy jednoczesnym minimalizowaniu toksyczności dla zdrowej tkanki, osiąganiu szerszych okien terapeutycznych i ulepszonych właściwości farmakokinetycznych/ farmakodynamicznych¹⁰⁰. Sacituzumab govitecan (IMMU-132) to ADC składający się z humanizowanego przeciwciała monoklonalnego anty-Trop-2 (hRS7) sprzężonego z aktywnym metabolitem irynotekanu, SN-38. W tym przypadku celem ADC jest Trop-2, receptor szeroko wyrażany w różnych nowotworach, zapewniający ukierunkowane dostarczanie chemioterapii do komórek rakowych. W małym badaniu z udziałem 32 pacjentów z przerzutowym rakiem pęcherza wcześniej leczonych platyną monoterapią sacituzumabem była dobrze tolerowana i wiązała się z ORR wynoszącym 36% i medianą PFS wynoszącą 7,2 miesiąca¹⁰¹. Opracowano także inne ADC przeciwko różnym markerom powierzchniowym UC. ADC w najbardziej zaawansowanych stadiach rozwoju, poza sacituzumabem obejmują, enfortumab vedotin (ASG-22CE/ASG-22ME), ASG-15ME dla zaawansowanego UC oraz oportuzumab monatox (VB4-845) dla wczesnego UC. Zidentyfikowano kilka nowych celów i wykorzystano je do nowych lub istniejących testów

ADC. Do najbardziej obiecujących należą receptor 2 ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (HER2) oraz elementy osi receptora czynnika wzrostu fibroblastów (FGF/FGFR)¹⁰².

4.12. Zmodyfikowane limfocyty T o wrodzonej aktywności przeciwnowotworowej z chimerycznym receptorem antygenowym (CAR) - CAR-T

Koncepcja rozwoju genetycznie zmodyfikowanych limfocytów T z wrodzoną aktywnością przeciwnowotworową przy użyciu chimerycznych receptorów antygenowych (CAR) jest nadal eksperymentalna w nowotworach nabłonkowych¹⁰³. Została natomiast z powodzeniem przetestowana u pacjentów z nawrotową ostrą białaczką limfoblastyczną, skutkując wysokim odsetkiem remisji.¹⁰⁴ Terapia komórkami CAR-T była testowana w kilku badaniach klinicznych w leczeniu nowotworów urologicznych¹⁰⁴. Niestety terapia komórkami CAR-T w nowotworach litych wykazała pewne trudności i nie uzyskano jeszcze takich samych, pomyślnych wyników. Aby celować w komórki nowotworowe, komórki CAR-T powinny migrować do tkanki nowotworowej, która jest zwykle wysoce nieprzepuszczalna ze względu na architekturę zębca otaczającego nowotwór. Ponadto mikrośrodowisko guza oddziałuje immunosupresyjnie na komórki CAR-T, zmniejszając ich działanie na komórki nowotworowe. Komórki CAR-T muszą utrzymywać się i przetrwać w nieprzyjajnych warunkach, co może wymagać zastosowania wysokich dawek CAR-T. Jednak zwiększenie dawek komórek CAR-T w celu osiągnięcia skuteczności może wywołać toksyczność z powodu efektów poza celem, ponieważ idealny antygen wyrażany wyłącznie w komórkach rakowych nie został jeszcze zidentyfikowany dla guzów litych¹⁰⁵. Badanie fazy I/II z wykorzystaniem terapii komórkami CAR-T (4SCAR-T) czwartej generacji u pacjentów z zaawansowanym lub przerzutowym UC, u których nie było dostępnego dalszego leczenia, jest obecnie na etapie rekrutacji (NCT03185468). Rozpoczęto również aktywne badanie kliniczne w celu oceny terapii komórkami CCT301-59 CAR-T u pacjentów z nawrotowymi lub opornymi na leczenie guzami litymi, w tym UC, pod kątem bezpieczeństwa, tolerancji i działania przeciwnowotworowego (NCT03960060).

4.13. Wirusy onkolityczne

Wirusy onkolityczne są środkami przeciwnowotworowymi, które selektywnie celują w komórki rakowe i zabijają je przez bezpośrednią lizę,

jednocześnie stymulując adaptacyjną odpowiedź immunologiczną swoistą dla antygeny nowotworu. Wirus Coxsackie A21 (CVA21) jest biologicznie wyselekcjonowanym onkolitycznym i immunoterapeutycznym szczepem z rodziny Coxsackie, ukierunkowanym na cząsteczkę adhezji międzykomórkowej-1 (ICAM-1) i podawanym do guza w celu wywołania odpowiedzi immunologicznej^{106, 107}. Ekspresję ICAM-1 na liniach komórkowych raka pęcherza moczowego zwiększa promieniowanie oraz niskie dawki Mitomycyny-C (do 0,5 µg/ml)¹⁰⁷. Celem badania NCT02043665 była ocena zdolności CVA21, samego (część A) lub w połączeniu z pembrolizumabem (część B), osiągnięcia i replikacji w istniejących nowotworach (przy oszczędzaniu zdrowych komórek) oraz ustalenie bezpiecznego schematu dawkowania wirusa do leczenia guzów litych, w których występuje zwiększona ekspresja receptora ICAM-1 i/ lub DAF. Wyniki nie zostały jeszcze opublikowane. Podobna sytuacja dotyczy kolejnego badania klinicznego NCT02636036, w którym połączono onkolitycznego, chimerowego adenowirusa grupy B Ad11/Ad3 z niwolumabem, w terapii nowotworów przerzutowych. Obiecujące wyniki obu powyższych badań mogą wyznaczyć nową ścieżkę w immunoterapii UC.

4.14. Fotoimmunoterapia

Fotoimmunoterapia jest nowatorską, wysoce selektywną metodą dostarczania terapii światłem. Koniugat przeciwciała monoklonalnego z fotoabsorberem wywołuje dobrą odpowiedź immunologiczną w raku pęcherza moczowego. Jak wcześniej zaznaczono, Treg tłumią odpowiedź immunologiczną przeciwko nowotworom i powodują ucieczkę immunologiczną guza. Fotoimmunoterapia może generować dobrą odpowiedź immunologiczną poprzez ogólnoustrojową eliminację Treg w mikrośrodowisku guza. Bezpośredni cytotoksyczny efekt fotoimmunoterapii wynika z uwolnienia wolnych rodników. Do uzyskania takiego efektu konieczne są trzy składniki: światłoczuła cząsteczka, światło o określonej długości fali i tlen¹⁰⁸. Wyniki badania przeprowadzonego w 2013 roku wykazały skuteczność i bezpieczeństwo Radachlorinu, leku światłoczułego, u pacjentów z oporną na BCG postacią NMIBC o wysokim stopniu złośliwości. Średni czas obserwacji wyniósł $26,74 \pm 6,34$ miesiąca (mediana 28,12). Odsetek przeżycia bez nawrotów wyniósł 90,9% po 12 miesiącach, 64,4% po 24 miesiącach i 60,1% po 30 miesiącach. Nie stwierdzono statystycznej różnicy w wielkości masy guza. Nie odnotowano żadnych poważnych działań niepożądanych po terapii fotodynamicznej^{109,110}. Ukierunkowana fotoimmunoterapia została także przetestowana na modelach

eksperymentalnych w NMIBC, z ekspresją receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR). Fotoabsorbent połączono z przeciwciałem anti-EGFR panitumumabem. Stwierdzono, że fotoimmunoterapia selektywnie zabija komórki raka pęcherza moczowego z ekspresją EGFR *in vitro* i *in vivo*¹¹¹, a zatem uzasadnione są dalsze badania w modelach na pacjentach.

4.15. Nowotworowe komórki macierzyste

W 2012 roku postawiono hipotezę, że populacja niezróżnicowanych komórek wykazujących właściwości podobne do macierzystych, tak zwanych rakowych komórek macierzystych (CSC – Cancer Stem Cells), jest głównym winowajcą wysokiej częstotliwości nawrotów w powierzchniowym raku brodawkowatym pęcherza moczowego¹¹². U myszy z obniżoną odpornością CSC można zdefiniować jako subpopulację guza o wysokim potencjale rakotwórczym, która może odtworzyć heterogeniczność guza pierwotnego¹¹³. Doniesiono, że CSC są odporne na konwencjonalne terapie, takie jak chemioterapia, radioterapia i immunoterapia¹¹⁴. Wymienione terapie mogą przynieść efekt przeciwny do zamierzonego, wywierając presję selekcyjną na populację komórek nowotworowych. Doprowadziłoby to do przeżycia i przerostu opornych komórek, głównie poprzez przeżywanie CSC¹¹⁴. Z tego względu komórki te są idealnym przeznaczeniem do celowanej terapii przeciwnowotworowej.

4.16. Szczepionki

Szczepionki przeciwnowotworowe są rozszerzającym się obszarem immunoterapii. NEO-PV-01 to unikalna szczepionka wykorzystująca koncepcję neoantygenów. Neoantygeny powstają w wyniku mutacji w komórkach nowotworowych i są ważnymi celami odporności przeciwnowotworowej za pośrednictwem limfocytów T^{108, 114}. Neoantygeny powierzchni komórek nowotworowych są niepowtarzalne, po ich zidentyfikowaniu są syntetyzowane w laboratorium i mieszane z adiuwantowym wzmacniaczem odporności. Zazwyczaj około 5% zmutowanych genów to potencjalne neoantygeny¹⁰⁸. Badanie fazy Ib spersonalizowanej terapii neoantygenowej plus anti-PD-1 u pacjentów z rakiem pęcherza moczowego wykazało, że spersonalizowana szczepionka neoantygenowa Neo-PV-01 plus niwolumab jest wykonalna i bezpieczna. NEO-PV-01 plus niwolumab stymuluje trwałą reaktywność limfocytów T specyficzną dla neoantygeny. Komórki T specyficzne dla NEO-PV-01 mają potencjał cytotoksyczny i mogą przemieszczać się do guza¹¹⁴.

Vesigenurtacel-L (HS-410) to inna szczepionka, która składa się z allogenicznej linii komórkowej, wyselekcjonowanej pod kątem wysokiej ekspresji szeregu antygenów nowotworu pęcherza. Antygeny te transportowane są do APC, aktywując w ten sposób cytotoksyczne komórki T CD8+¹⁰⁸. W badaniu fazy 2 obejmującym 78 pacjentów, z NMIBC o średnim lub wysokim ryzyku, którzy nie byli wcześniej leczeni BCG lub mieli nawrót, zostało losowo przydzielonych do placebo w połączeniu z 6 tygodniami indukcyjnego BCG, następnie 6 tygodniami HS-410. Leczenie podtrzymujące składało się z 3 cotygodniowych podaniach leku w 3, 6 i 12 miesiącu¹¹⁶. Połączenie było dobrze tolerowane. Aktywność immunologiczną mierzono za pomocą limfocytów naciekających nowotwór (TIL – Tumor Infiltrating Lymphocytes), które były w 60% przed leczeniem nieodpowiadające cytotoksycznie na nowotwór, w porównaniu z 15% po leczeniu¹¹⁶. Inną strategią związaną z użyciem szczepionki jest wykorzystanie zmodyfikowanej szczepionki przeciwko wirusowi krowianki Ankara z ekspresją p53 (p53MVA)^{108, 117}. Szczepionka ta może pomóc organizmowi zbudować silną odpowiedź immunologiczną w celu zabicia komórek nowotworowych. Badanie NCT02432963 ma na celu ocenę skuteczności połączenia szczepionki przeciwko wirusowi krowianki Ankara z ekspresją p53 z pembrolizumabem w leczeniu pacjentów z guzami litymi, u których nie powiodła się wcześniejsza terapia.

5. Podsumowanie

Liczba diagnozowanych przypadków urotelialnego raka pęcherza moczowego systematycznie wzrasta. Największe obciążenie ryzykiem zachorowania na raka pęcherza moczowego przypada na większość rozwiniętych społeczności na całym świecie. Związane jest to głównie ze starzejącym się profilem demograficznym społeczności oraz rozpowszechnionym narażeniem na czynniki ryzyka¹⁻³. Rola immunoterapii w paradygmacie leczenia różnych nowotworów szybko rośnie. Rak pęcherza, który jest wybitnie immunogeny, jest kolejnym doskonałym celem dalszej oceny zatwierdzonych dotychczas przez FDA ICI. Te środki immunoterapeutyczne wykazały dotychczas obiecującą aktywność i prawdopodobnie będą odgrywać dominującą rolę w zmianie przyszłego schematu leczenia raka pęcherza moczowego. Pomimo, znaczącej poprawy rokowania oraz wykazania obiecującego ORR, wśród pacjentów, u których wcześniejsze linie terapii zawiodły, wciąż wiele z chorych na UC nie poddaje się leczeniu ICI. W związku z powyższym, najnowsze kierunki rozwoju w tym przypadku powinny skupiać się na poszukiwaniu

najskuteczniejszych połączeń różnych ICI. Jak omówiono w niniejszej pracy, trwa kilka badań mających na celu znalezienie najlepiej tolerowanej dawki nowych środków w monoterapii lub w skojarzeniu z innymi środkami chemioterapeutycznymi i uznanymi środkami immunoterapeutycznymi. Warty uwagi jest fakt, że warunkowe zatwierdzenie przez organy regulacyjne środków immunoterapeutycznych w raku pęcherza moczowego zostało oparte wyłącznie na ORR i obecnie brakuje danych dotyczących przeżycia. Przyszła użyteczność tych środków będzie zatem zależeć od wyników przeżywalności w trwających badaniach. Drugi kierunek rozwoju koncentruje się na szerokim poszukiwaniu nowych immunologicznych celów terapeutycznych, które w przyszłości mogą wykazać się jeszcze większą skutecznością od ICI. Przyszły pomyślny rozwój immunoterapii w raku pęcherza obejmowałby pokonanie wielu przeszkód, w tym lepsze zrozumienie heterogeniczności guza, ustalenie mechanizmu pierwotnej i wtórnej oporności na leczenie, opracowanie skutecznych schematów leczenia bez zwiększonego poziomu toksyczności oraz stawienie czoła wysokim kosztom nowych terapii. Pomimo wciąż jeszcze ograniczonych efektów leczenia, immunologiczny postęp jaki osiągnięto w leczeniu raka pęcherza moczowego jest godny odnotowania.

Piśmiennictwo

1. O'Donnell M, Brooks N. Treatment options in non-muscle-invasive bladder cancer after BCG failure. *Indian J Urol.* 2015;31(4):312. doi:10.4103/0970-1591.166475
2. Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, Znaor A, Jemal A, Bray F. Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. *European Urology.* 2017;71(1):96-108. doi:10.1016/j.eururo.2016.06.010
3. DeGeorge KC, Holt HR, Hodges SC. Bladder Cancer: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician.* 2017;96(8):507-514.
4. Xu Y, Huo R, Chen X, Yu X. Diabetes mellitus and the risk of bladder cancer. *Medicine.* 2017;96(46):e8588. doi:10.1097/md.00000000000008588
5. Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, Znaor A, Jemal A, Bray F. Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. *European Urology.* 2017;71(1):96-108. doi:10.1016/j.eururo.2016.06.010

6. International Phase III Trial Assessing Neoadjuvant Cisplatin, Methotrexate, and Vinblastine Chemotherapy for Muscle-Invasive Bladder Cancer: Long-Term Results of the BA06 30894 Trial. *JCO*. 2011;29(16):2171-2177. doi:10.1200/jco.2010.32.3139
7. von der Maase H, Hansen SW, Roberts JT, et al. Gemcitabine and Cisplatin Versus Methotrexate, Vinblastine, Doxorubicin, and Cisplatin in Advanced or Metastatic Bladder Cancer: Results of a Large, Randomized, Multinational, Multicenter, Phase III Study. *JCO*. 2000;18(17):3068-3077. doi:10.1200/jco.2000.18.17.3068
8. Bellmunt J, de Wit R, Vaughn DJ, et al. Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med*. 2017;376(11):1015-1026. doi:10.1056/nejmoa1613683
9. Bellmunt J, Théodore C, Demkov T, et al. Phase III Trial of Vinflunine Plus Best Supportive Care Compared With Best Supportive Care Alone After a Platinum-Containing Regimen in Patients With Advanced Transitional Cell Carcinoma of the Urothelial Tract. *JCO*. 2009;27(27):4454-4461. doi:10.1200/jco.2008.20.5534
10. Crispen PL, Kusmartsev S. Mechanisms of immune evasion in bladder cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2019;69(1):3-14. doi:10.1007/s00262-019-02443-4
11. Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *JCO*. 2015;33(17):1974-1982. doi:10.1200/jco.2014.59.4358
12. Han J, Gu X, Li Y, Wu Q. Mechanisms of BCG in the treatment of bladder cancer-current understanding and the prospect. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020;129:110393. doi:10.1016/j.biopha.2020.110393 mechanizm nie został poznany
13. Kamat AM, Flaig TW, Grossman HB, et al. Consensus statement on best practice management regarding the use of intravesical immunotherapy with BCG for bladder cancer. *Nat Rev Urol*. 2015;12(4):225-235. doi:10.1038/nrurol.2015.58
14. Malmström PU, Sylvester RJ, Crawford DE, et al. An Individual Patient Data Meta-Analysis of the Long-Term Outcome of Randomised Studies Comparing Intravesical Mitomycin C versus Bacillus Calmette-Guérin for Non-Muscle-Invasive Bladder

- Cancer. *European Urology*. 2009;56(2):247-256. doi:10.1016/j.eururo.2009.04.038
15. SYLVESTER RJ, Van Der MEIJDEN APM, WITJES JA, KURTH K. BACILLUS CALMETTE-GUERIN VERSUS CHEMOTHERAPY FOR THE INTRAVESICAL TREATMENT OF PATIENTS WITH CARCINOMA IN SITU OF THE BLADDER: A META-ANALYSIS OF THE PUBLISHED RESULTS OF RANDOMIZED CLINICAL TRIALS. *Journal Of Urology*. 2005;174(1):86-91. Doi:10.1097/01.Ju.0000162059.64886.1c
 16. Brausi M, Oddens J, Sylvester R, et al. Side Effects of Bacillus Calmette-Guérin (BCG) in the Treatment of Intermediate- and High-risk Ta, T1 Papillary Carcinoma of the Bladder: Results of the EORTC Genito-Urinary Cancers Group Randomised Phase 3 Study Comparing One-third Dose with Full Dose and 1 Year with 3 Years of Maintenance BCG. *European Urology*. 2014;65(1):69-76. doi:10.1016/j.eururo.2013.07.021
 17. Koch GE, Smelser WW, Chang SS. Side Effects of Intravesical BCG and Chemotherapy for Bladder Cancer: What They Are and How to Manage Them. *Urology*. 2021;149:11-20. doi:10.1016/j.urology.2020.10.039
 18. Alhunaidi O, Zlotta AR. The use of intravesical BCG in urothelial carcinoma of the bladder. *ecancer*. 2019;13. doi:10.3332/ecancer.2019.905
 19. Sengiku A, Ito M, Miyazaki Y, Sawazaki H, Takahashi T, Ogura K. A Prospective Comparative Study of Intravesical Bacillus Calmette-Guérin Therapy with the Tokyo or Connaught Strain for Nonmuscle Invasive Bladder Cancer. *Journal of Urology*. 2013;190(1):50-54. doi:10.1016/j.juro.2013.01.084
 19. Nakamura T, Fukiage M, Higuchi M, et al. Nanoparticulation of BCG-CWS for application to bladder cancer therapy. *Journal of Controlled Release*. 2014;176:44-53. doi:10.1016/j.jconrel.2013.12.027
 20. Chade DC, Machado A, Waksman R, et al. Effectiveness of the Moreau strain of Bacillus Calmette-Guerin (BCG) for nonmuscle invasive bladder cancer. *JCO*. 2017;35(15_suppl):4539-4539. doi:10.1200/jco.2017.35.15_suppl.4539

21. Nakamura T, Fukiage M, Higuchi M, et al. Nanoparticulation of BCG-CWS for application to bladder cancer therapy. *Journal of Controlled Release*. 2014;176:44-53. doi:10.1016/j.jconrel.2013.12.027
22. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways. *American Journal of Clinical Oncology*. 2016;39(1):98-106. doi:10.1097/coc.0000000000000239
23. Wang J, Yuan R, Song W, Sun J, Liu D, Li Z. PD-1, PD-L1 (B7-H1) and Tumor-Site Immune Modulation Therapy: The Historical Perspective. *J Hematol Oncol*. 2017;10(1). doi:10.1186/s13045-017-0403-5
24. Ma W, Gilligan BM, Yuan J, Li T. Current status and perspectives in translational biomarker research for PD-1/PD-L1 immune checkpoint blockade therapy. *J Hematol Oncol*. 2016;9(1). doi:10.1186/s13045-016-0277-y
25. Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. *Science*. 2015;348(6230):56-61. doi:10.1126/science.aaa8172
26. Hsu FS, Su CH, Huang KH. A Comprehensive Review of US FDA-Approved Immune Checkpoint Inhibitors in Urothelial Carcinoma. *Journal of Immunology Research*. 2017;2017:1-9. doi:10.1155/2017/6940546
27. Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, et al. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *The Lancet*. 2016;387(10031):1909-1920. doi:10.1016/s0140-6736(16)00561-4
28. Ning YM, Suzman D, Maher VE, et al. FDA Approval Summary: Atezolizumab for the Treatment of Patients with Progressive Advanced Urothelial Carcinoma after Platinum-Containing Chemotherapy. *The Oncologist*. 2017;22(6):743-749. doi:10.1634/theoncologist.2017-0087
29. Markham A. Atezolizumab: First Global Approval. *Drugs*. 2016;76(12):1227-1232. doi:10.1007/s40265-016-0618-8

30. Necchi A, Joseph RW, Loriot Y, et al. Atezolizumab in platinum-treated locally advanced or metastatic urothelial carcinoma: post-progression outcomes from the phase II IMvigor210 study. *Annals of Oncology*. 2017;28(12):3044-3050. doi:10.1093/annonc/mdx518
31. Powles T, Durán I, van der Heijden MS, et al. Atezolizumab versus chemotherapy in patients with platinum-treated locally advanced or metastatic urothelial carcinoma (IMvigor211): a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *The Lancet*. 2018;391(10122):748-757. doi:10.1016/s0140-6736(17)33297-x
32. Galsky MD, Arija JÁA, Bamias A, et al. Atezolizumab with or without chemotherapy in metastatic urothelial cancer (IMvigor130): a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *The Lancet*. 2020;395(10236):1547-1557. doi:10.1016/s0140-6736(20)30230-0
33. Powles T, Kockx M, Rodriguez-Vida A, et al. Clinical efficacy and biomarker analysis of neoadjuvant atezolizumab in operable urothelial carcinoma in the ABACUS trial. *Nat Med*. 2019;25(11):1706-1714. doi:10.1038/s41591-019-0628-7
34. García-Perdomo HA, Sánchez AL, Spiess PE. Immune checkpoints inhibitors in the management of high-risk non-muscle-invasive bladder cancer. A scoping review. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. Published online February 2022. doi:10.1016/j.urolonc.2022.02.003
35. Massard C, Gordon MS, Sharma S, et al. Safety and Efficacy of Durvalumab (MEDI4736), an Anti-Programmed Cell Death Ligand-1 Immune Checkpoint Inhibitor, in Patients With Advanced Urothelial Bladder Cancer. *JCO*. 2016;34(26):3119-3125. doi:10.1200/jco.2016.67.9761
36. Brower V. Anti-PD-L1 inhibitor durvalumab in bladder cancer. *The Lancet Oncology*. 2016;17(7):e275. doi:10.1016/s1470-2045(16)30242-x
37. Powles T, O'Donnell PH, Massard C, et al. Efficacy and Safety of Durvalumab in Locally Advanced or Metastatic Urothelial Carcinoma. *JAMA Oncol*. 2017;3(9):e172411. doi:10.1001/jamaoncol.2017.2411

38. Heery CR, O'Sullivan-Coyne G, Madan RA, et al. Avelumab for metastatic or locally advanced previously treated solid tumours (JAVELIN Solid Tumor): a phase 1a, multicohort, dose-escalation trial. *The Lancet Oncology*. 2017;18(5):587-598. doi:10.1016/s1470-2045(17)30239-5
39. Apolo AB, Infante JR, Balmanoukian A, et al. Avelumab, an Anti-Programmed Death-Ligand 1 Antibody, In Patients With Refractory Metastatic Urothelial Carcinoma: Results From a Multicenter, Phase Ib Study. *JCO*. 2017;35(19):2117-2124. doi:10.1200/jco.2016.71.6795
40. Patel MR, Ellerton J, Infante JR, et al. Avelumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum failure (JAVELIN Solid Tumor): pooled results from two expansion cohorts of an open-label, phase 1 trial. *The Lancet Oncology*. 2018;19(1):51-64. doi:10.1016/s1470-2045(17)30900-2
41. Sharma P, Retz M, Siefker-Radtke A, et al. Nivolumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum therapy (CheckMate 275): a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*. 2017;18(3):312-322. doi:10.1016/s1470-2045(17)30065-7
42. Rhea LP, Mendez-Marti S, Kim D, Aragon-Ching JB. Role of immunotherapy in bladder cancer. *Cancer Treatment and Research Communications*. 2021;26:100296. doi:10.1016/j.ctarc.2020.100296
43. Kwok G, Yau TCC, Chiu JW, Tse E, Kwong YL. Pembrolizumab (Keytruda). *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2016;12(11):2777-2789. doi:10.1080/21645515.2016.1199310
44. Balar A, Bellmunt J, O'Donnell PH, et al. Pembrolizumab (pembro) as first-line therapy for advanced/unresectable or metastatic urothelial cancer: Preliminary results from the phase 2 KEYNOTE-052 study. *Annals of Oncology*. 2016;27:vi567. doi:10.1093/annonc/mdw435.25
45. Bellmunt J, de Wit R, Vaughn DJ, et al. Pembrolizumab jako terapia drugiej linii w zaawansowanym raku urotelialnym. *N Engl J Med*. 2017;376(11):1015-1026. doi:10.1056/nejmoa1613683

46. Lavoie JM, Bidnur S, Black PC, Eigl BJ. Expanding Immunotherapy Options for Bladder Cancer. *Urology*. 2017;106:1-2. doi:10.1016/j.urology.2017.04.001
47. Lara P, Beckett L, Li Y, et al. Combination checkpoint immunotherapy and cytotoxic chemotherapy: Pembrolizumab (Pembro) plus either docetaxel or gemcitabine in patients with advanced or metastatic urothelial cancer. *JCO*. 2017;35(6_suppl):398-398. doi:10.1200/jco.2017.35.6_suppl.398
48. Specenier P. Ipilimumab in melanoma. *Expert Review of Anticancer Therapy*. 2016;16(8):811-826. doi:10.1080/14737140.2016.1211936
49. Emens LA, Middleton G. The Interplay of Immunotherapy and Chemotherapy: Harnessing Potential Synergies. *Cancer Immunol Res*. 2015;3(5):436-443. doi:10.1158/2326-6066.cir-15-0064
50. Ghosh S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic Chemistry*. 2019;88:102925. doi:10.1016/j.bioorg.2019.102925
51. Galsky MD, Hahn NM, Albany C, et al. Phase II trial of gemcitabine + cisplatin + ipilimumab in patients with metastatic urothelial cancer. *JCO*. 2016;34(2_suppl):357-357. doi:10.1200/jco.2016.34.2_suppl.357
52. Sharma P, Callahan MK, Bono P, et al. Nivolumab monotherapy in recurrent metastatic urothelial carcinoma (CheckMate 032): a multicentre, open-label, two-stage, multi-arm, phase 1/2 trial. *The Lancet Oncology*. 2016;17(11):1590-1598. doi:10.1016/s1470-2045(16)30496-x
53. Sharma P, Siefker-Radtke A, de Braud F, et al. Nivolumab Alone and With Ipilimumab in Previously Treated Metastatic Urothelial Carcinoma: CheckMate 032 Nivolumab 1 mg/kg Plus Ipilimumab 3 mg/kg Expansion Cohort Results. *JCO*. 2019;37(19):1608-1616. doi:10.1200/jco.19.00538
54. Andrews LP, Marciscano AE, Drake CG, Vignali DAA. LAG3 (CD223) as a cancer immunotherapy target. *Immunol Rev*. 2017;276(1):80-96. doi:10.1111/imr.12519

55. Goding SR, Wilson KA, Xie Y, et al. Restoring Immune Function of Tumor-Specific CD4+ T Cells during Recurrence of Melanoma. *JL*. 2013;190(9):4899-4909. doi:10.4049/jimmunol.1300271
56. Vey N, Goncalves A, Karlin L, et al. A phase 1 dose-escalation study of IPH2102 (lirilumab, BMS-986015, LIRI), a fully human anti KIR monoclonal antibody (mAb) in patients (pts) with various hematologic (HEM) or solid malignancies (SOL). *JCO*. 2015;33(15_suppl):3065-3065. doi:10.1200/jco.2015.33.15_suppl.3065
57. Hanna GJ, O'Neill A, Shin KY, et al. Neoadjuvant and Adjuvant Nivolumab and Lirilumab in Patients with Recurrent, Resectable Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Clin Cancer Res*. 2021;28(3):468-478. doi:10.1158/1078-0432.ccr-21-2635
58. Cheuk ATC, Mufti GJ, Guinn B ann. Role of 4-1BB:4-1BB ligand in cancer immunotherapy. *Cancer Gene Ther*. 2003;11(3):215-226. doi:10.1038/sj.cgt.7700670
59. Chester C, Sanmamed MF, Wang J, Melero I. Immunotherapy targeting 4-1BB: mechanistic rationale, clinical results, and future strategies. *Blood*. 2018;131(1):49-57. doi:10.1182/blood-2017-06-741041
60. Starzer AM, Berghoff AS. New emerging targets in cancer immunotherapy: CD27 (TNFRSF7). *ESMO Open*. 2019;4:e000629. doi:10.1136/esmoopen-2019-000629
61. Ansell SM, Northfelt DW, Flinn I, et al. Phase I evaluation of an agonist anti-CD27 human antibody (CDX-1127) in patients with advanced hematologic malignancies. *JCO*. 2014;32(15_suppl):3024-3024. doi:10.1200/jco.2014.32.15_suppl.3024
62. Georgopoulos NT, Steele LP, Thomson MJ, Selby PJ, Southgate J, Trejdosiewicz LK. A novel mechanism of CD40-induced apoptosis of carcinoma cells involving TRAF3 and JNK/AP-1 activation. *Cell Death Differ*. 2006;13(10):1789-1801. doi:10.1038/sj.cdd.4401859
63. Bajor DL, Mick R, Riese MJ, et al. Abstract CT137: Combination of agonistic CD40 monoclonal antibody CP-870,893 and anti-CTLA-4 antibody tremelimumab in patients with metastatic

- melanoma. *Clinical Trials*. Published online August 1, 2015. doi:10.1158/1538-7445.am2015-ct137
64. Zappasodi R, Sirard C, Li Y, et al. Rational design of anti-GITR-based combination immunotherapy. *Nat Med*. 2019;25(5):759-766. doi:10.1038/s41591-019-0420-8
65. Lu L, Xu X, Zhang B, Zhang R, Ji H, Wang X. Combined PD-1 blockade and GITR triggering induce a potent antitumor immunity in murine cancer models and synergizes with chemotherapeutic drugs. *J Transl Med*. 2014;12(1). doi:10.1186/1479-5876-12-36
66. Papadopoulos KP, Autio K, Golan T, et al. Phase I Study of MK-4166, an Anti-human Glucocorticoid-Induced TNF Receptor Antibody, Alone or with Pembrolizumab in Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res*. 2020;27(7):1904-1911. doi:10.1158/1078-0432.ccr-20-2886
67. Weinberg AD, Rivera MM, Prell R, et al. Engagement of the OX-40 Receptor In Vivo Enhances Antitumor Immunity. *J Immunol*. 2000;164(4):2160-2169. doi:10.4049/jimmunol.164.4.2160
68. Curti BD, Kovacsovics-Bankowski M, Morris N, et al. OX40 Is a Potent Immune-Stimulating Target in Late-Stage Cancer Patients. *Cancer Res*. 2013;73(24):7189-7198. doi:10.1158/0008-5472.can-12-4174
69. Willingham SB, Volkmer JP, Gentles AJ, et al. The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPα) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(17):6662-6667. doi:10.1073/pnas.1121623109
70. Beauchemin N, Arabzadeh A. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAMs) in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2013;32(3-4):643-671. doi:10.1007/s10555-013-9444-6
71. Blumenthal RD, Hansen HJ, Goldenberg DM. Inhibition of Adhesion, Invasion, and Metastasis by Antibodies Targeting CEACAM6 (NCA-90) and CEACAM5 (Carcinoembryonic Antigen). *Cancer Res*. 2005;65(19):8809-8817. doi:10.1158/0008-5472.can-05-0420

72. Santos HJSP, Matheus LHG, Silva A, et al. Indoleamine 2,3-Dioxygenase-1 Expression is Changed During Bladder Cancer Cell Invasion. *Int J Tryptophan Res.* 2022;15:117864692110656. doi:10.1177/11786469211065612
73. Gangadhar TC, Hamid O, Smith DC, et al. Preliminary results from a Phase I/II study of epacadostat (incb024360) in combination with pembrolizumab in patients with selected advanced cancers. *J Immunotherapy Cancer.* 2015;3(S2). doi:10.1186/2051-1426-3-s2-o7
74. Gibney G, Hamid O, Lutzky J, et al. 511 Updated results from a phase 1/2 study of epacadostat (INCB024360) in combination with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *European Journal of Cancer.* 2015;51:S106-S107. doi:10.1016/s0959-8049(16)30312-4
75. Soliman HH, Jackson E, Neuger T, et al. A first in man phase I trial of the oral immunomodulator, indoximod, combined with docetaxel in patients with metastatic solid tumors. *Oncotarget.* 2014;5(18):8136-8146. doi:10.18632/oncotarget.2357
76. Zakharia Y, Drabick JJ, Khleif S, et al. Updates on phase 1b/2 trial of the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway (IDO) inhibitor indoximod plus checkpoint inhibitors for the treatment of unresectable stage 3 or 4 melanoma. *JCO.* 2016;34(15_suppl):3075-3075. doi:10.1200/jco.2016.34.15_suppl.3075
77. Mukaida N, Sasaki S, Ichiro, Baba T. Chemokines in Cancer Development and Progression and Their Potential as Targeting Molecules for Cancer Treatment. *Mediators of Inflammation.* 2014;2014:1-15. doi:10.1155/2014/170381
78. Hughes CE, Nibbs RJB. A guide to chemokines and their receptors. *FEBS J.* 2018;285(16):2944-2971. doi:10.1111/febs.14466
79. Liu Q, Li A, Tian Y, et al. The CXCL8-CXCR1/2 pathways in cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews.* 2016;31:61-71. doi:10.1016/j.cytogfr.2016.08.002
80. Escudero-Lourdes C, Wu T, Camarillo JM, Gandolfi AJ. Interleukin-8 (IL-8) over-production and autocrine cell activation are key factors in monomethylarsonous acid [MMA(III)]-induced malignant

- transformation of urothelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2012;258(1):10-18. doi:10.1016/j.taap.2011.10.002
81. Schott AF, Wicha MS, Perez RP, et al. Abstract P6-03-01: A phase Ib study of the CXCR1/2 inhibitor reparixin in combination with weekly paclitaxel in metastatic HER2 negative breast cancer – First analysis. Poster Session Abstracts. Published online April 30, 2015. doi:10.1158/1538-7445.sabcs14-p6-03-0
 82. Hong D, Falchook G, Cook CE, et al. A phase 1b study (SCORES) assessing safety, tolerability, pharmacokinetics, and preliminary anti-tumor activity of durvalumab combined with AZD9150 or AZD5069 in patients with advanced solid malignancies and SCCHN. *Annals of Oncology*. 2016;27:vi360. doi:10.1093/annonc/mdw378.04
 83. Sakai N, Yoshidome H, Shida T, et al. CXCR4/CXCL12 expression profile is associated with tumor microenvironment and clinical outcome of liver metastases of colorectal cancer. *Clin Exp Metastasis*. 2011;29(2):101-110. doi:10.1007/s10585-011-9433-5
 84. Nazari A, Khorramdelazad H, Hassanshahi G. Biological/pathological functions of the CXCL12/CXCR4/CXCR7 axes in the pathogenesis of bladder cancer. *Int J Clin Oncol*. 2017;22(6):991-1000. doi:10.1007/s10147-017-1187-x
 84. Retz MM, Sidhu SS, Blaveri E, et al. CXCR4 expression reflects tumor progression and regulates motility of bladder cancer cells. *Int J Cancer*. 2004;114(2):182-189. doi:10.1002/ijc.20729
 85. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2008;9(4):239-252. doi:10.1038/nrc2618
 86. LaRue H, Ayari C, Bergeron A, Fradet Y. Toll-like receptors in urothelial cells—targets for cancer immunotherapy. *Nat Rev Urol*. 2013;10(9):537-545. doi:10.1038/nrurol.2013.153
 87. Garcia PV, Seiva FRF, Carniato AP, et al. Increased toll-like receptors and p53 levels regulate apoptosis and angiogenesis in non-muscle invasive bladder cancer: mechanism of action of P-MAPA biological response modifier. *BMC Cancer*. 2016;16(1). doi:10.1186/s12885-016-2474-z

88. Rosenberg SA. IL-2: The First Effective Immunotherapy for Human Cancer. *J. Immunol.* 2014;192(12):5451-5458. doi:10.4049/jimmunol.1490019
89. Fishman MN, Thompson JA, Pennock GK, et al. Phase I Trial of ALT-801, an Interleukin-2/T-Cell Receptor Fusion Protein Targeting p53 (aa264–272)/HLA-A*0201 Complex, in Patients with Advanced Malignancies. *Clin Cancer Res.* 2011;17(24):7765-7775. doi:10.1158/1078-0432.ccr-11-1817
90. Fishman MN, Vaena DA, Singh P, et al. Phase Ib/II study of an IL-2/T-cell receptor fusion protein in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced or metastatic chemo-refractory urothelial cancer (UC). *JCO.* 2015;33(15_suppl):4515-4515. doi:10.1200/jco.2015.33.15_suppl.4515
91. Sonpavde G, Rosser CJ, Pan C xian, et al. Phase I trial of ALT-801, a first-in-class T-cell receptor (TCR)-interleukin (IL)-2 fusion molecule, plus gemcitabine (G) for Bacillus Calmette Guerin (BCG)-resistant non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC). *JCO.* 2016;34(2_suppl):451-451. doi:10.1200/jco.2016.34.2_suppl.451
92. Zhang S, Zhao J, Bai X, Handley M, Shan F. Biological effects of IL-15 on immune cells and its potential for the treatment of cancer. *International Immunopharmacology.* 2021;91:107318. doi:10.1016/j.intimp.2020.107318
93. Kim PS, Kwilas AR, Xu W, et al. IL-15 superagonist/IL-15R α Sushi-Fc fusion complex (IL-15SA/IL-15R α Su-Fc; ALT-803) markedly enhances specific subpopulations of NK and memory CD8⁺ T cells, and mediates potent anti-tumor activity against murine breast and colon carcinomas. *Oncotarget.* 2016;7(13):16130-16145. doi:10.18632/oncotarget.7470
94. Gomes-Giacoaia E, Miyake M, Goodison S, et al. Intravesical ALT-803 and BCG Treatment Reduces Tumor Burden in a Carcinogen Induced Bladder Cancer Rat Model; a Role for Cytokine Production and NK Cell Expansion. *Hurst R, ed. PLoS ONE.* 2014;9(6):e96705. doi:10.1371/journal.pone.0096705

95. Enz N, Vliegen G, De Meester I, Jungraithmayr W. CD26/DPP4 - a potential biomarker and target for cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics*. 2019;198:135-159. doi:10.1016/j.pharmthera.2019.02.015
96. Angevin E, Isambert N, Trillet-Lenoir V, et al. First-in-human phase 1 of YS110, a monoclonal antibody directed against CD26 in advanced CD26-expressing cancers. *Br J Cancer*. 2017;116(9):1126-1134. doi:10.1038/bjc.2017.62
97. Chien M, Astumian M, Liebowitz D, Rinker-Schaeffer C, Stadler WM. In vitro evaluation of flavopiridol, a novel cell cycle inhibitor, in bladder cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 1999;44(1):81-87. doi:10.1007/s002800050948
98. Dickson MA, Shah MA, Rathkopf D, et al. A phase I clinical trial of FOLFIRI in combination with the pan-cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor flavopiridol. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010;66(6):1113-1121. doi:10.1007/s00280-010-1269-1
99. Birrer MJ, Moore KN, Betella I, Bates RC. Antibody-Drug Conjugate-Based Therapeutics: State of the Science. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2019;111(6):538-549. doi:10.1093/jnci/djz035
100. Hafeez U, Parakh S, Gan HK, Scott AM. Antibody-Drug Conjugates for Cancer Therapy. *Molecules*. 2020;25(20):4764. doi:10.3390/molecules25204764
101. Tagawa ST, Ocean AJ, Lam ET, et al. Therapy for chemopretreated metastatic urothelial cancer (mUC) with the antibody-drug conjugate (ADC) sacituzumab govitecan (IMMU-132). *JCO*. 2017;35(6_suppl):327-327. doi:10.1200/jco.2017.35.6_suppl.327
102. Vlachostergios PJ, Jakubowski CD, Niaz MJ, et al. Antibody-Drug Conjugates in Bladder Cancer. *BLC*. 2018;4(3):247-259. doi:10.3233/blc-180169
103. Morales L, Paramio JM. Cell Therapies in Bladder Cancer Management. *IJMS*. 2021;22(6):2818. doi:10.3390/ijms22062818
104. Feins S, Kong W, Williams EF, Milone MC, Fraietta JA. An introduction to chimeric antigen receptor (CAR) T-cell immunotherapy

- for human cancer. *Am J Hematol.* 2019;94(S1):S3-S9. doi:10.1002/ajh.25418 do białaczki
105. Pantuck M, Palaskas N, Drakaki A. Next generation T-cell therapy for genitourinary malignancies, part A: Introduction and current state of the art. *Cancer Treatment and Research Communications.* 2018;17:8-12. doi:10.1016/j.ctarc.2018.08.001
106. Relph K, Annels N, Smith C, Kostalas M, Pandha H. Oncolytic Immunotherapy for Bladder Cancer Using Coxsackie A21 Virus: Using a Bladder Tumor Precision-Cut Slice Model System to Assess Viral Efficacy. *Methods in Molecular Biology.* Published online September 5, 2019:249-259. doi:10.1007/978-1-4939-9794-7_16
107. Annels NE, Arif M, Simpson GR, et al. Oncolytic Immunotherapy for Bladder Cancer Using Coxsackie A21 Virus. *Molecular Therapy - Oncolytics.* 2018;9:1-12. doi:10.1016/j.omto.2018.02.001
108. Butt S ur R, Malik L. Role of immunotherapy in bladder cancer: past, present and future. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2018;81(4):629-645. doi:10.1007/s00280-018-3518-7
109. Lee JY, Diaz RR, Cho KS, et al. Efficacy and Safety of Photodynamic Therapy for Recurrent, High Grade Nonmuscle Invasive Bladder Cancer Refractory or Intolerant to Bacille Calmette-Guérin Immunotherapy. *Journal of Urology.* 2013;190(4):1192-1199. doi:10.1016/j.juro.2013.04.077
110. Lee JY, Diaz RR, Cho KS, et al. Efficacy and Safety of Photodynamic Therapy for Recurrent, High Grade Nonmuscle Invasive Bladder Cancer Refractory or Intolerant to Bacille Calmette-Guérin Immunotherapy. *Journal of Urology.* 2013;190(4):1192-1199. doi:10.1016/j.juro.2013.04.077
111. Railkar R, Krane S, Li QQ, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) targeted photoimmunotherapy (PIT) for the treatment of EGFR expressing bladder cancer. *JCO.* 2017;35(6_suppl):291-291. doi:10.1200/jco.2017.35.6_suppl.291
112. van der Horst G, Bos L, van der Pluijm G. Epithelial Plasticity, Cancer Stem Cells, and the Tumor-Supportive Stroma in Bladder Carcinoma. *Mol Cancer Res.* 2012;10(8):995-1009. doi:10.1158/1541-7786.mcr-12-0274

113. Chan FP. MR and CT Imaging of the Pediatric Patient with Structural Heart Disease. *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2008;20(4):393-399. doi:10.1053/j.semtcvs.2008.11.006
114. Aghaalkhani N, Rashtchizadeh N, Shadpour P, Allameh A, Mahmoodi M. Cancer stem cells as a therapeutic target in bladder cancer. *J Cell Physiol*. 2018;234(4):3197-3206. doi:10.1002/jcp.26916
115. Ott PA, Hu-Lieskovan S, Chmielowski B, et al. A Phase Ib Trial of Personalized Neoantigen Therapy Plus Anti-PD-1 in Patients with Advanced Melanoma, Non-small Cell Lung Cancer, or Bladder Cancer. *Cell*. 2020;183(2):347-362.e24. doi:10.1016/j.cell.2020.08.053
116. Steinberg GD, Shore ND, Karsh LI, et al. Immune response results of vesigenurtacel-l (HS-410) in combination with BCG from a randomized phase II trial in patients with non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC). *JCO*. 2017;35(6_suppl):319-319. doi:10.1200/jco.2017.35.6_suppl.319
117. Zhao J, Xu W, Zhang Z, et al. Prognostic role of HER2 expression in bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int Urol Nephrol*. 2014;47(1):87-94. doi:10.1007/s11255-014-0866-z

USTEKINUMAB – PRZEŁOM W LECZENIU ŁUSZCZYCY, CHOROBY LEŚNIEWSKIEGO-CROHNA I WRZODZIEJĄCEGO ZAPALENIA JELITA GRUBEGO

**Konrad Kulka, Wiktoria Król, Donata Kowalczyk,
Patrik Kubiak, Julia Koroncok**

Studenckie Koło Naukowe im. Zbigniewa Religii przy Katedrze Biofizyki w Zabrze,
Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Abstrakt

Choroby autoimmunizacyjne stanowią coraz powszechniejszy problem i stanowią wyzwanie dla współczesnej medycyny, zatem poszukiwane są możliwości jak najskuteczniejszego ich wyeliminowania. Szacuje się, że zapadalność na te choroby będzie wzrastać, w związku z tym prowadzonych jest wiele badań w poszukiwaniu leków, które mogłyby zostać zastosowane w ich leczeniu. Jednym z interesujących odkryć XXI wieku jest ustekinumab, który jest przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko IL-12 i IL-23. Jego wyjątkowość polega na niemożliwości przyłączenia się do już uprzednio związanych z receptorem IL-12 oraz IL-23. Jest zatem mało prawdopodobne, aby przyczyniał się on do cytotoksyczności zależnej od dopełniacza lub przeciwciała. Obecnie stosowany jest on w leczeniu łuszczycy, choroby Leśniowskiego-Crohna oraz wrzodziejącego zapalenia jelita grubego. Niniejsza praca ma na celu przedstawienie aktualnego stanu wiedzy na temat wpływu i działania oraz dalszego wykorzystywania w medycynie ustekinumabu.

Słowa kluczowe: przeciwciało monoklonalne, łuszczyca, choroba Leśniowskiego-Crohna, wrzodziejące zapalenie jelita grubego

Abstract

Autoimmune diseases are becoming more common and are a challenge for modern medicine, where solutions of silencing them are being searched for. It is estimated that morbidity will rise, which results in research of many drugs, which could possibly be used in treatment. One of the interesting discoveries of the 21st century is ustekinumab, a monoclonal antibody, directed against IL-12 and IL-23. Its uniqueness is based on impossibility to combine with IL-12 and IL-23 previously connected with their receptors. It makes it very unlikely that it contributes to antibody or complement dependent cytotoxicity. It is currently used in treatment of psoriasis, Crohn's disease and ulcerative colitis. This chapter presents the current state of knowledge about induction, action, and further use of ustekinumab in medicine.

Keywords: monoclonal antibody, psoriasis, Crohn's disease, ulcerative colitis

1. Wstęp

Łuszczyca, choroba Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejące zapalenie jelita grubego należą do grupy chorób autoimmunologicznych. Współczesna medycyna nie jest w stanie doprowadzić do ich wyleczenia i skupia się jedynie na łagodzeniu objawów. Przez postęp cywilizacyjny, który doprowadził do wzrostu poziomu zanieczyszczeń środowiska, zmian nawyków żywieniowych oraz większą dostępność używek, coraz częstszym zjawiskiem jest występowanie wymienionych chorób w społeczeństwie. Powoduje to wzrost liczby pacjentów, u których występują objawy chorób o stopniu ciężkości utrudniającym codzienne funkcjonowanie, a także liczby pacjentów, u których standardowa terapia nie przynosi pożądanych efektów leczniczych lub powoduje zbyt nasilone objawy niepożądane. W związku z tym w ostatnich latach nastąpił rozwój w dziedzinie badań leków biologicznych, które mogą być stosowane u wyżej wymienionych chorych i stanowią dla nich nadzieję na poprawę komfortu życia. Jednym z odkryć XXI wieku jest ustekinumab, znany również pod nazwą handlową Stelara®. Jest on skierowany przeciwko wspólnej dla IL-12 i IL-23 podjednostce białkowej p40.¹ Obie cytokiny biorą udział w procesach prozapalnych w organizmie, więc możliwość ich wyciszenia stanowi ważny punkt uchwytu dla nowoczesnych terapii biologicznych, głównie chorób analizowanych w tym rozdziale.

2. Metodologia

Poniższy rozdział monografii został opracowany na podstawie dostępnych publikacji naukowych udostępnionych w medycznych bazach naukowych, takich jak Google Scholar, PubMed oraz medycznych podręczników akademickich. Zostały wykonane tabele na podstawie danych przedstawionych w analizowanych artykułach. Dokonano również ponownej analizy statystycznej niektórych danych, które przedstawiono w postaci nowych wyników.

3. Charakterystyka chorób

3.1. Łuszczyca

3.1.1. Charakterystyka choroby

Łuszczyca jest przewlekłą, zapalną chorobą skóry. Charakteryzuje się najczęściej tworzeniem na powierzchni skóry czerwonych i różowych grudek pokrytych łuskami powstałymi przez zrogowacenie ognisk chorobowych. Częstość występowania na świecie wynosi około 2%.² Uważa się, że łuszczyca jest chorobą wieloczynnikową, powodować ją mogą czynniki genetyczne, zaburzenia autoimmunologiczne oraz wpływ środowiska tj.: zakażenia bakteryjne i wirusowe, urazy, stres psychiczny, alkohol i nikotyna.³ Wyróżnia się dwa typy łuszczycy: typ 1 dotyczący osób poniżej 30. Roku życia, związany z czynnikami genetycznymi i cięższym przebiegiem choroby oraz typ 2 dotyczący osób powyżej 55. roku życia, związany z czynnikami środowiskowymi i łagodniejszym przebiegiem choroby. W leczeniu łuszczycy stosuje się m.in. leki złuszczające, kortykosteroidy, pochodne witaminy D₃, retinoidy, cyklosporynę, metotreksat, leczenie metodą PUVA czy leki biologiczne.

3.1.2. Patogeneza łuszczycy

Wiele obserwacji sugeruje, że łuszczyca jest chorobą, w której pośredniczą limfocyty T, napędzaną przynajmniej częściowo dodatnim sprzężeniem zwrotnym z aktywowanych limfocytów T do komórek prezentujących antygen (APC), w których pośredniczą IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 i czynnik martwicy nowotworu- α (TNF- α). Ponadto istnieje istotny wkład wrodzonych mechanizmów odpornościowych obejmujących naskórek i makrofagi.⁴ Różnicowanie komórek Th1 i Th17 jest stymulowane przez komórki dendrytyczne poprzez IL-23. Komórki chorobotwórcze nabytego (limfocyty T) i wrodzonego układu odpornościowego (makrofagi, komórki tuczne, granulocyty) wytwarzają szereg mediatorów, które indukują i utrzymują charakterystyczne cechy łuszczycy zarówno w skórze właściwej (np. komórki śródbłonna), jak i naskórku (keratynocyty). Z kolei te ostatnie typy komórek ułatwiają odpowiedź zapalną poprzez odpowiednie mediatory.⁵

3.2. Choroba Leśniowskiego-Crohna

3.2.1. Charakterystyka choroby

Choroba Leśniowskiego-Crohna (CD, ang. *Crohn's disease*) jest przewlekłą, autoimmunologiczną chorobą zapalną przewodu pokarmowego zaliczaną do grupy nieswoistych zapaleń jelit (IBD, ang. *inflammatory bowel disease*). Uważa się, że choroba ta jest wynikiem wzajemnej zależności między podatnością genetyczną, czynnikami środowiskowymi i mikroflorą jelitową, co skutkuje nieprawidłową odpowiedzią immunologiczną śluzówki i upośledzeniem funkcji bariery nabłonkowej.⁶ Dotyczyć może każdego odcinka przewodu pokarmowego, jednak najczęstszą jej lokalizacją jest końcowy odcinek jelita cienkiego oraz początkowy odcinek jelita grubego. Najwyższa roczna zapadalność w Europie wynosi 10,6/100 000 osób.⁷ Choroba ta najczęściej ujawnia się u pacjentów w dwóch przedziałach wiekowych: pomiędzy 20-30. rokiem życia oraz 50-70. rokiem życia. Oprócz ogólnego zmęczenia, gorączki, utraty masy ciała, bólu brzucha czy objawów przypominających zapalenie wyrostka robaczkowego objawy CD w głównej mierze zależą od lokalizacji ognisk zapalnych. W leczeniu CD stosuje się m.in. aminosalicylany, kortykosteroidy, leki immunosupresyjne i biologiczne czy leczenie chirurgiczne.

3.2.2. Patogeneza

Dokładna przyczyna choroby Leśniowskiego-Crohna nie jest poznana. Uważa się, iż związek z większym ryzykiem choroby ma mutacja genu NOD2/CARD15, który zlokalizowany jest na chromosomie 16. Został on jako pierwszy gen silnie powiązany z podatnością na CD w populacjach Ameryki Północnej i Europy. Zebrane dane pozwoliły ustalić, że inaktywacja NOD2 zwiększa wydzielanie IL-12 w makrofagach, ponieważ NOD2 normalnie ogranicza stymulowaną przez agonistę TLR2 ekspresję tej cytokiny. W tym scenariuszu warianty NOD2 nie mają funkcji hamującej, co prowadzi do ogólnego wzrostu produkcji IL-12. Po wydzieleniu IL-12 promuje wytwarzanie IFN- γ przez komórki T i NK oraz wzrost i różnicowanie komórek T typu Th1, które uważa się za ważne w patogenezie CD.⁸ Zgodnie z tym, leczenie pacjentów z CD przeciwciałami przeciwko IL-12 okazało się ostatnio skuteczne.

3.3. Wrzodziejące zapalenie jelita grubego

3.3.1. Charakterystyka choroby

Wrzodziejące zapalenia jelita grubego (WZJG, UC, ang. *colitis ulcerosa*) jest przewlekłym procesem zapalnym błony śluzowej odbytu lub jelita grubego należącym wraz z chorobą Leśniowskiego-Crohna do grupy IBD. Najczęściej dotyczy błony śluzowej odbytnicy, jednak może zajmować również całe jelito grube. Etiologia choroby nie została do końca poznana, występuje ona u osób podatnych genetycznie z nieprawidłową odpowiedzią zapalną na drobnoustroje jelitowe. Szczyt zachorowań na tę chorobę przypada w wieku 15-30 lat.⁹ W Europie WZJG dotyczy 505/100 000 osób.¹⁰ Charakterystycznym objawem choroby są biegunki z domieszką krwi, co może doprowadzić do niedokrwistości. Oprócz nich może występować gorączka, ból i tkliwość brzucha oraz utrata masy ciała. We wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego w większości stosuje się te same leki co w CD ze względu na to, że obydwie jednostki należą do IBD.

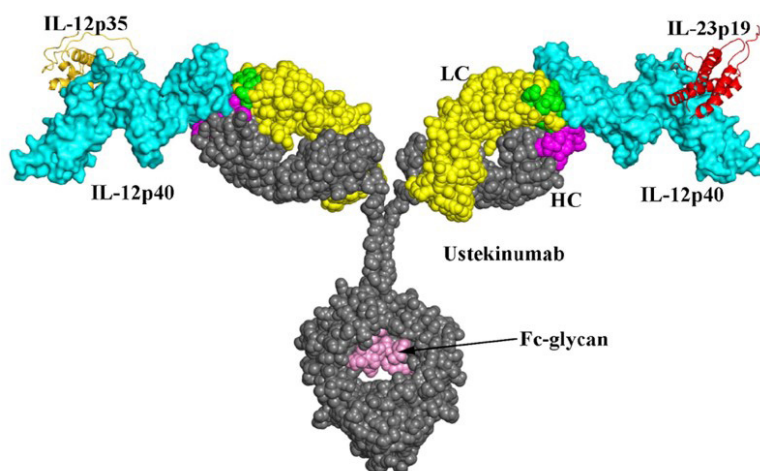
3.3.2. Patogeneza

Rozerwanie ścisłych połączeń i błony śluzowej pokrywającej warstwę nabłonka jelita doprowadza do zwiększonej przepuszczalności nabłonka jelitowego, co skutkuje zwiększonym wychwytem antygenów ze światła. Makrofagi i komórki dendrytyczne po rozpoznaniu niepatogennych bakterii (mikrobiota komensalna) przez receptory rozpoznawania wzorców molekularnych (TLR) zmieniają swój status funkcjonalny z tolerogenicznego na fenotyp aktywowany. Aktywacja szlaków NF- κ B stymuluje transkrypcję genów prozapalnych, co skutkuje zwiększoną produkcją cytokin prozapalnych (TNF- α , interleukiny 12, 23, 6 i 1 β). Po przetworzeniu antygenów makrofagi i komórki dendrytyczne prezentują je naiwnym limfocytom T CD4, promując różnicowanie do komórek efektorowych Th2, charakteryzujących się produkcją interleukiny 4. Limfocyty T NK są głównym źródłem interleukiny 13, która została powiązana z przerwaniem bariery komórek nabłonka.¹¹

4. Ustekinumab

4.1. Mechanizm działania

Ustekinumab to w pełni ludzkie przeciwciało monoklonalne klasy IgG1 kappa (κ), które zostało wytworzone przy użyciu myszy transgeniczných.¹² Jest skierowany przeciwko cytokinom IL-12 i IL-23. IL-12 jest heterodimerem składającym się z podjednostek białkowych p40 i p35, natomiast IL-23 jest zbudowana z podjednostek białkowych p40 i p19.^{13,14} Podjednostki p19 i p35 są odpowiedzialne za sygnalizację wewnątrzkomórkową oraz wywołanie przez wyżej wspomniane interleukiny odpowiedzi komórkowej na ich działanie, natomiast podjednostka p40 łączy się z receptorem IL-12R β 1 obecnym na powierzchni limfocytów T i komórek NK.^{12, 13,15} Podjednostka p40 składa się z trzech domen (D), D1-D3. D2 i D3 biorą udział w wiązaniu podjednostek p35 i p19, natomiast D1 stanowi miejsce uchwytu ustekinumabu (rycina 1.).^{1, 16, 17} Łącząc się z domeną D1 ustekinumab zapobiega wiązaniu wolnych IL-12 i IL-23 do receptora IL-12R β 1, przez co uniemożliwia on ich oddziaływanie na komórki docelowe. Wykazano, że ustekinumab nie jest w stanie łączyć się z IL-12 i IL-23 gryzoni oraz ludzkimi IL-12 i IL-23 już połączonymi z receptorem IL-12R β 1, przez co jest mało prawdopodobne, aby przyczyniał się on do cytotoksyczności zależnej od dopełniacza lub przeciwciał.¹² Poprzez opisany powyżej mechanizm ustekinumab inaktywuje ludzkie IL-12 i IL-23 w wyniku ich związania.



Rycina 1. Hipotetyczny model podwójnego wiązania IL-12 i IL-23. Oba fragmenty Fab ustekinumabu są połączone z cytokiną (IL-12 lub IL-23) ¹

4.2. Właściwości farmakologiczne

Ustekinumab jest podawany wyłącznie w wlewie dożylnym lub jako roztwór do iniekcji podskórnych. Jego czas połowicznego rozpadu wynosi około 3 tygodni, dokładny metabolizm leku w organizmie nie został poznany. Masa ciała pacjenta jest najbardziej znaczącym czynnikiem wpływającym na klirens ustekinumabu. Brak jest wystarczających danych na temat bezpieczeństwa stosowania leku przez kobiety w ciąży, dlatego nie jest zalecane jego stosowanie w tej grupie. Przeciwwskazaniem do jego stosowania oprócz reakcji nadwrażliwości są też m.in.:

- zakażenia: ustekinumab może zwiększać ryzyko wystąpienia nowych zakażeń bądź reaktywację zakażeń utajonych,
- gruźlica,
- nowotwory złośliwe: ustekinumab jako lek immunosupresyjny może zwiększać ryzyko wystąpienia nowotworów złośliwych,
- zaburzenia czynności wątroby i nerek.

Nie zaleca się podawania równocześnie ustekinumabu wraz z szczepionkami żywymi wirusowymi lub bakteryjnymi, jednak można równocześnie stosować szczepionki inaktywowane lub zawierające zabite drobnoustroje. Należy zachować ostrożność w skojarzonym podawaniu ustekinumabu z innymi lekami immunosupresyjnymi ze względu na brak przeprowadzonych badań w tym kierunku. Badania *in vitro* nie wskazują na konieczność zmiany dawki ustekinumabu w przypadku równoległego stosowania substratów CYP450.¹⁸ Poniżej (tabela 1.) zostały przedstawione skutki uboczne stosowania ustekinumabu.

Tabela 1. Działania niepożądane ustekinumabu [opracowanie własne]¹⁸

Częstość występowania działań niepożądanych	Rodzaj działań niepożądanych
Często	zakażenie górnych dróg oddechowych, zapalenie jamy nosowo-gardłowej, zapalenie zatok, bóle i zawroty głowy, ból jamy ustnej i gardła, biegunka, nudności, wymioty, świąd, ból pleców, ból mięśni, ból stawów, uczucie zmęczenia, rumień i ból w miejscu wstrzyknięcia
Niezbyt często	zapalenie tkanki łącznej, zakażenia zębów, półpasiec, zakażenia dolnych dróg oddechowych, wirusowe zakażenie górnych dróg oddechowych, grzybicze zakażenie sromu i pochwy, reakcje nadwrażliwości (w tym wysypka, pokrzywka), depresja, porażenie nerwu twarzowego, przekrwienie jamy nosowej, łuszczyca krostkowa, złuszczenie skóry, trądzik, odczyny w miejscu wstrzyknięcia (m.in. krwiak, obrzęk, świąd, stwardnienie, krwawienie), astenia

Rzadko	ciężkie reakcje nadwrażliwości (w tym reakcja anafilaktyczna, obrzęk naczynioruchowy), alergiczne zapalenie pęcherzyków płucnych, eozynofilowe zapalenie płuc, złuszczone zapalenie skóry
Bardzo rzadko	organizujące się zapalenie płuc

5. Badania kliniczne dotyczące ustekinumabu

Wspólną cechą łuszczycy, wrzodziejącego zapalenia jelita grubego i choroby Leśniowskiego-Crohna jest patogenezą związaną z nieprawidłową regulacją IL-12 i IL-23. IL-12 stymuluje komórki NK i pobudza różnicowanie limfocytów T CD4+ w kierunku podtypu Th1, natomiast IL-23 indukuje powstawanie podtypu Th17. Ustekinumab przez blokowanie oddziaływania tych interleukin w wolnej postaci na komórki docelowe wydaje się mieć potencjał jako lek wykorzystywany w terapii wymienionych schorzeń. Poniżej przedstawiono zebrane wyniki z różnych badań dotyczących skuteczności ustekinumabu w chorobach wcześniej opisanych w tym rozdziale.

5.1. Łuszczyca

Zostały przeprowadzone randomizowane badania III fazy z podwójnie ślepą próbą PHOENIX 1 i PHOENIX 2. Brało w nich udział 1996 pacjentów z umiarkowaną do ciężkiej postaci choroby, którą określa się na podstawie kwestionariusza PASI. Pacjentów podzielono na trzy grupy. Pierwsza otrzymywała placebo, druga 45 mg ustekinumabu, a trzecia 90 mg ustekinumabu w 0, 4 i co 12 kolejnych tygodni. Ponad 75% badanych leczonych podskórnymi zastrzykami ustekinumabu uzyskało PASI 75 (zmniejszenie liczby punktów w kwestionariuszu PASI o co najmniej 75%), niezależnie od podawanej dawki. W porównaniu do pacjentów, u których uzyskano odpowiedź na zastosowane leczenie, osoby z częściową odpowiedzią charakteryzowały się większą masą ciała, dłuższym okresem trwania choroby, epizodami łuszczycy stawowej oraz słabą odpowiedzią na czynniki biologiczne i stanowiły 20% ogółu badanej populacji.^{19, 20} W innym badaniu randomizowanym III fazy CADMUS, 110 pacjentów zostało losowo przydzielonych do grup, w których otrzymywali standardową dawkę (SD; 0.75 mg/kg [≤ 60 kg], 45 mg [$>60 \leq 100$ kg], oraz 90 mg [>100 kg]), połowę standardowej dawki (HSD) lub placebo. Dawki były przyjmowane w 0. i 4. tygodniu i co kolejne 12 tygodni w przypadku ustekinumabu. Placebo natomiast było podane

w 0. i 4. tygodniu, a następnie następowało przejście na ustekinumab w 12. i 16. tygodniu oraz co każde kolejne 12 tygodni. Wyniki uzyskane w 12. tygodniu badań przedstawiono w tabeli poniżej (tabela 2.) W tygodniach 12-52 został utrzymany odsetek pacjentów z PASI 75 i PASI 90 wśród osób, które od początku przyjmowały ustekinumab. W grupie, która początkowo przyjmowała placebo, do 16. tygodnia zwiększyły się wskaźniki PASI 75, a odsetek osób uzyskujących PASI 75 i PASI 90 po przejściu na stosowanie ustekinumabu był podobny do wyników obserwowanych w grupie, w której był on stosowany od początku badania.²¹ Wyniki powyższych badań wskazują na znaczną poprawę stanu zdrowia chorych na łuszczycę przy stosowaniu terapii ustekinumabem, aczkolwiek istnieją również badania wskazujące na bardziej efektywne przeciwciała monoklonalne w terapii łuszczycy, takie jak bimekizumab czy risankizumab.^{22, 23}

Tabela 2. Odsetek pacjentów w poszczególnych grupach, którzy uzyskali w 12. tygodniu badania CADMUS wskaźniki PASI 75, PASI 90 lub 0 punktów w skali PASI [opracowanie własne]²¹

	HSD	SD	Placebo
PASI 75	78.4%	80.6%	10.8%
PASI 90	54.1%	61.1%	5.4%
0 punktów PASI	21.6%	38.9%	2.7%

5.2. Choroba Leśniowskiego-Crohna

W badaniach klinicznych UNITI-1 i UNITI-2 losowo przydzielono pacjentów do dwóch grup. W pierwszej grupie podawano dożylnie ustekinumab w ramach terapii wstępnej w dawce 130 mg lub 6 mg na kilogram masy ciała (kg m.c.). Badani w grupie drugiej otrzymywali placebo. W badaniu UNITI-1 brało udział 741 pacjentów spełniających kryteria pierwotnego lub wtórnego braku odpowiedzi na leczenie antagonistami czynnika martwicy nowotworów (TNF- α) oraz pacjenci, u których obserwowano zbyt uciążliwe skutki uboczne terapii. W badaniu UNITI-2 brało udział 628 pacjentów, u których zawiodła terapia konwencjonalna lub pojawiły się nieakceptowalne skutki uboczne. Porównanie wyników obu badań uzyskanych w 6. tygodniu trwania leczenia zostało przedstawione w tabeli (tabela 3.).

Kontynuacją tych badań jest IM-UNITI wykorzystujące zastosowanie próby podwójnie ślepej i skupiające się na ocenie efektywności terapii

podtrzymującej z zastosowaniem ustekinumabu. W 8. tygodniu badań 397 osób, u których obserwowano odpowiedź na dożylne podawanie ustekinumabu losowo przydzielono do grup przyjmujących podskórnie 90 mg ustekinumabu, bądź placebo w odstępach co 8 lub 12 tygodni. W czasie trwania badania pacjenci, u których stwierdzono spadek responsywności na leczenie zostali poddani dopasowaniu dawek. Dotyczyło to osób przyjmujących placebo lub ustekinumab co 12 tygodni. Zmiana polegała na rozpoczęciu stosowania dawek co 8 tygodni. Pacjenci z pogorszoną odpowiedzią na leczenie, u których stosowano dawki co 8 tygodni nie podlegali zmianie trybu leczenia.²⁴ Wyniki badań w poszczególnych tygodniach z uwzględnieniem zmniejszającej się liczby badanych zostały przedstawione w tabeli (tabela 4.).^{25, 26, 27} Powyższe dane pokazują skuteczność stosowania terapii podtrzymującej z zastosowaniem ustekinumabu w utrzymaniu remisji choroby Leśniowskiego-Crohna, a także znaczną poprawę przy stosowaniu terapii pierwotnej. Ponadto przeprowadzone badania porównujące skuteczność standardowo stosowanego w tym schorzeniu wedolizumabu ze skutecznością ustekinumabu wskazują na zdecydowanie większy stopień remisji wśród pacjentów stosujących ustekinumab w 52. tygodniu terapii wynoszący 35% w stosunku do 19% w przypadku wedolizumabu.^{28, 29}

Tabela 3. Porównanie uzyskanych odsetków remisji w 6. tygodniu trwania badań w poszczególnych grupach pacjentów w badaniach UNITI-1 i UNITI-2 [opracowanie własne]²⁴

	UNITI-1			UNITI-2		
	Dawka 130 mg	Dawka 6 mg na kg m.c.	Placebo	Dawka 130 mg	Dawka 6 mg na kg m.c.	Placebo
Odsetek remisji w 6. tygodniu badania	34.3%	33.7%	21.5%	51.7%	55.5%	28.7%

Tabela 4. Wskaźnik procentowy remisji w poszczególnych grupach otrzymujących ustekinumab od 44. do 252. tygodnia w badaniu IM-UNITI. Dane są skorygowane o zmniejszanie się liczby uczestników na poszczególnych etapach i odzwierciedlają odsetek remisji w poszczególnych tygodniach wśród chorych, którzy kontynuowali badanie do 252. tygodnia [opracowanie własne]^{24, 25, 26, 27}

	Grupa q8w	Grupa q12w
44. tydzień	84.1%%	77.4%
92. tydzień	87.1%	79.2%
152. tydzień	89.1%	85.2%
252. tydzień	93.7%	84.4%

5.3. Wrzodziejące zapalenie jelita grubego

Randomizowane badania sponsorowane przez Janssen Research and Development, w których brało udział 961 chorych dotyczyły stosowania ustekinumabu w terapii pierwotnej leczenia wrzodziejącego zapalenia jelita grubego. Pacjenci zostali podzieleni na trzy grupy, z których każda otrzymywała jedną z 3 substancji dożylnie: placebo, 130 mg ustekinumabu lub 6 mg ustekinumabu na kg m.c. Wskaźnik remisji choroby przy zastosowaniu terapii pierwotnej oceniono w 8. tygodniu. Kolejnym etapem było sprawdzenie podtrzymywania remisji przez ustekinumab. Wzięły w nim udział osoby, u których zaobserwowano odpowiedź kliniczną w 8. tygodniu trwania testu oraz chorzy, którym podano w 8. tygodniu dawkę indukcyjną i wystąpiła u nich opóźniona odpowiedź w 16. tygodniu. Pacjenci zostali losowo przydzieleni do trzech grup, w których otrzymywali podskórnie 90 mg ustekinumabu co 12 tygodni (q12w), co 8 tygodni (q8w) lub otrzymywali placebo. Wskaźniki remisji choroby w poszczególnych grupach w 8. i 52. tygodniu ukazuje tabela (tabela 5.).³⁰ W dalszej fazie badań od 56. tygodnia możliwe było dostosowanie dawek przy obniżonej odpowiedzi, a ich wyniki obrazujące procentowy wskaźnik utrzymania remisji wśród badanych przedstawiono w tabeli (tabela 6.).³¹ W innym badaniu zastosowano ustekinumab u 19 osób, u których długotrwałe leczenie nie przynosiło pożądanych efektów lub powodowało zbyt wiele skutków ubocznych. Wszyscy otrzymywali ustekinumab w postaci dożylnej w dawce 6 mg na kg m.c. oraz 90 mg podskórnie. Na początku badania remisję obserwowano u 3/19 pacjentów, po 12 miesiącach u 10/19 pacjentów.³² Przedstawione wyniki wskazują na skuteczność ustekinumabu zarówno w terapii pierwotnej jak i podtrzymującej w leczeniu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego.

Tabela 5. Wskaźnik procentowy remisji w poszczególnych grupach chorych w 8. i 52. tygodniu trwania badania [opracowanie własne]³⁰

	Dawka 130 mg	Dawka 6 mg na kg m.c.	Placebo
8. tydzień badań	15.6%	15.5%	5.3%
	Grupa q12w	Grupa q8w	Placebo
52. tydzień badań	38.4%	43.8%	24.0%

Tabela 6. Procentowy wskaźnik utrzymania remisji symptomów od 44. do 92. tygodnia trwania badań [opracowanie własne]³¹

	Grupa q12w	Grupa q8w
44. tydzień badań	62.2%	67.6%
92. tydzień badań	64.5%	67.6%

6. Stosowanie ustekinumabu na świecie i w Polsce

6.1. Łuszczyca

Po raz pierwszy wnioski o wprowadzenie do obrotu ustekinumabu w leczeniu przewlekłej łuszczycy plackowatej zostały złożone zarówno w amerykańskiej Agencji ds. Żywności i Leków (FDA), jak i Europejskiej Agencji Leków (EMA) pod koniec 2007 r. W czerwcu 2008 r. komitet doradczy FDA jednogłośnie zalecił w tym celu wskazanie ustekinumabu. Jednak pismo z odpowiedzią wydane przez FDA w grudniu 2008 r. wymagało dodatkowych informacji, w tym Strategii Oceny i Łagodzenia Ryzyka (REMS). FDA wydał kolejną decyzję dotyczącą tego, czy ustekinumab może wejść na rynek amerykański w 2009 roku. Produkt został dopuszczony do obrotu w 27 krajach Unii Europejskiej w styczniu 2009 roku.³³ W Polsce produkt Stelara® został włączony do wykazu refundowanych leków do programu lekowego B.47., który dotyczy leczenia umiarkowanej i ciężkiej postaci łuszczycy plackowatej od 01.01.2013 r. zgodnie z obwieszczeniem Ministra Zdrowia z dn. 21.12.2012 r.³⁴ Ustekinumab w Polsce w leczeniu ciężkiej postaci łuszczycy plackowatej przeznaczony jest dla osób powyżej 18 roku życia u których w okresie poprzedzającym nie uzyskano poprawy po leczeniu z zastosowaniem co najmniej 2 różnych metod klasycznych terapii ogólnej (metotreksat, retinoidy, cyklosporyna, metoda PUVA).³⁵

6.2. Choroba Leśniowskiego-Crohna

23 sierpnia 2016 r. FDA wydała pozytywną rekomendację dotyczącą zastosowania ustekinumabu w leczeniu choroby Leśniowskiego-Crohna dla pacjentów dorosłych, którzy nie odpowiadali na inne formy leczenia wykorzystujące kortykosteroidy, immunosupresanty czy inhibitory TNF- α .³⁶ Produkt Stelara® został włączony w Polsce do wykazu refundowanych leków do programu lekowego B.32. dotyczącego leczenia pacjentów z rozpoznaną

ciężką postacią choroby Leśniowskiego-Crohna od 01.09.2019 r. zgodnie z obwieszczeniem Ministra Zdrowia z dn. 30.08.2019 r.^{35, 37} Ustekinumab w leczeniu CD w Polsce stosowany jest u osób powyżej 18 roku życia z ciężką i czynną postacią CD przy braku odpowiedzi na leczenie więcej niż 1 inhibitorem TNF- α lub występowaniem przeciwwskazań lub objawów nietolerancji takiego leczenia.³⁵

6.3. Wrzodziejące zapalenie jelita grubego

25 lipca 2019 roku Komitet CHMP działający przy Europejskiej Agencji Oceny Leków (EMA) wydał pozytywną rekomendację odnośnie rozszerzenia zakresu wskazań rejestracyjnych dla produktu leczniczego Stelara® o leczenie dorosłych chorych z umiarkowaną do ciężkiej postacią WZJG, po niepowodzeniu lub w przypadku przeciwwskazań do zastosowania terapii konwencjonalnej lub biologicznej.³⁸ Produkt Stelara® został włączony w Polsce do wykazu refundowanych leków do programu lekowego B.55. dotyczącego leczenia pacjentów z rozpoznaną umiarkowaną lub ciężką postacią wrzodziejącego zapalenia jelita grubego od 01.01.2022 roku zgodnie z obwieszczeniem Ministra Zdrowia z dn. 20.12.2021 r.³⁹

7. Refundacja w Polsce

Zgodnie z wykazem obowiązującym od 1 stycznia 2022 roku w Polsce refundowane są 3 postacie leku Stelara® :

Tabela 7. Refundowane postacie leku Stelara® dostępne w Polsce ⁴⁰

Rodzaj leku Stelara®	Koncentrat do sporządzania roztworu do infuzji, 130 mg	Roztwór do wstrzykiwań , 45 mg	Roztwór do wstrzykiwań, 90 mg
Zawartość opakowania	1 fiolka (30ml)	1 ampułko-strzykawka	1 ampułko-strzykawka
Choroba objęta refundacją	CD, WZJG	łuszczyca	CD, WZJG
Cena z refundacją	0 zł	0 zł	0 zł
Cena bez refundacji	ok. 19983,60 zł*	ok. 10465,84 zł*	ok. 13834,80 zł*

*stan na 01.01.2022 r.

8. Podsumowanie

Analizowane w tym rozdziale badania wskazują na zdecydowanie większy odsetek remisji choroby u pacjentów przyjmujących ustekinumab w stosunku do osób, którym podawane było placebo. Lepsze prognozy obserwuje się zarówno w przypadku terapii krótkotrwałej jak i długotrwałej terapii podtrzymującej. Badania były przeprowadzane w większości przypadków na dużych grupach i przez odpowiednio długi okres, aby były uznane za wiarygodne. Wszystkie wyżej wymienione czynniki sprawiły, że ustekinumab został dopuszczony jako produkt leczniczy. Należy podkreślić, że ustekinumab stanowi stosunkowo nową opcję terapeutyczną na rynku i tak jak inne leki biologiczne w dalszym ciągu jest stosowany jedynie w przypadku braku skuteczności, niemożliwości podjęcia lub zbyt nasilonych efektów ubocznych terapii konwencjonalnych i stanowi nadzieję dla wielu ciężko chorych pacjentów na poprawę jakości ich życia. Wprowadzenie ustekinumabu do szerszego stosowania w schematach klinicznych w celu łagodzenia objawów łuszczycy, CD i WZJG u pacjentów w mniej zaawansowanych stadiach choroby wymaga dalszych badań na poszerzonych grupach klinicznych i monitorowania wpływu długoterminowego stosowania przez nich tego preparatu. Dostępne są informacje o pracach nad biosymilarami dla ustekinumabu.⁴¹

Referencje

1. Luo, J., Wu, S.-J., Lacy, E. R., Orlovsky, Y., Baker, A., Teplyakov, A., Obmolova, G., Heavner, G. A., Richter, H.-T., & Benson, J. (2010). Structural Basis for the Dual Recognition of IL-12 and IL-23 by Ustekinumab. *Journal of Molecular Biology*, 402(5), 797–812. doi:10.1016/j.jmb.2010.07.046
2. Christophers, E. (2001). Psoriasis – epidemiology and clinical spectrum. *Clinical and Experimental Dermatology*, 26(4), 314–320. doi:10.1046/j.1365-2230.2001.00832.x
3. Jahnz-Różyk, K., Owczarek, W., Paluchowska, E. (2013). Leczenie biologiczne łuszczycy w Polsce.. *Zeszyty Naukowe Ochrony Zdrowia Zdrowie Publiczne i Zarządzanie*, 1, 69-78. doi: 10.4467/20842627oz.14.007.1617
4. Elder, J. T., Bruce, A. T., Gudjonsson, J. E., Johnston, A., Stuart, P. E., Tejasvi, T., Voorhees, J. J., Abecasis, G. R., & Nair, R. P.

- (2010). Molecular Dissection of Psoriasis: Integrating Genetics and Biology. *Journal of Investigative Dermatology*, 130(5), 1213–1226. doi:10.1038/jid.2009.319
5. Boehncke, W.-H., & Schön, M. P. (2015). Psoriasis. *The Lancet*, 386(9997), 983–994. doi:10.1016/s0140-6736(14)61909-7
 6. Torres J, Mehandru S, Colombel JF, Peyrin-Biroulet L. Crohn's disease. *Lancet*. 2017;389(10080):1741-1755. doi:10.1016/S0140-6736(16)31711-1
 7. Molodecky, N. A., Soon, I. S., Rabi, D. M., Ghali, W. A., Ferris, M., Chernoff, G., Benchimol, E. I., Panaccione, R., Ghosh, S., Barkema, H. W., & Kaplan, G. G. (2012). Increasing Incidence and Prevalence of the Inflammatory Bowel Diseases With Time, Based on Systematic Review. *Gastroenterology*, 142(1), 46–54.e42. doi:10.1053/j.gastro.2011.10.001
 8. Kumar V, Abbas AK, Aster J. - *Patologia Robbinsa*, wyd.10, rozdział 15, strony 733-734. Wrocław, Polska: Edra Urban & Partner; 2019
 9. Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 2009;361(21):2066-2078. doi:10.1056/NEJMra0804647
 10. Molodecky, N. A., Soon, I. S., Rabi, D. M., Ghali, W. A., Ferris, M., Chernoff, G., Benchimol, E. I., Panaccione, R., Ghosh, S., Barkema, H. W., & Kaplan, G. G. (2012). Increasing Incidence and Prevalence of the Inflammatory Bowel Diseases With Time, Based on Systematic Review. *Gastroenterology*, 142(1), 46–54.e42. doi:10.1053/j.gastro.2011.10.001
 11. Ordás I, Eckmann L, Talamini M, Baumgart DC, Sandborn WJ. Ulcerative colitis. *Lancet*. 2012;380(9853):1606-1619. doi:10.1016/S0140-6736(12)60150-0
 12. Benson, J. M., Peritt, D., Scallan, B. J., Heavner, G. A., Shealy, D. J., Giles-Komar, J. M., & Mascelli, M. A. (2011). Discovery and mechanism of ustekinumab. *mAbs*, 3(6), 535–545. doi:10.4161/mabs.3.6.17815
 13. Presky DH, Yang H, Minetti LJ, et al. A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(24):14002-14007.

doi:10.1073/pnas.93.24.14002

14. Oppmann B, Lesley R, Blom B, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*. 2000;13(5):715-725. doi:10.1016/s1074-7613(00)00070-4
15. Parham C, Chirica M, Timans J, et al. A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J Immunol*. 2002;168(11):5699-5708. doi:10.4049/jimmunol.168.11.5699
16. Yoon C, Johnston SC, Tang J, Stahl M, Tobin JF, Somers WS. Charged residues dominate a unique interlocking topography in the heterodimeric cytokine interleukin-12. *EMBO J*. 2000;19(14):3530-3541. doi:10.1093/emboj/19.14.3530
17. Lupardus PJ, Garcia KC. The structure of interleukin-23 reveals the molecular basis of p40 subunit sharing with interleukin-12. *J Mol Biol*. 2008;382(4):931-941. doi:10.1016/j.jmb.2008.07.051
18. Ustekinumab (opis profesjonalny) - *Medycyna Praktyczna*. (b. d.). Medycyna Praktyczna. <https://www.mp.pl/pacjent/leki/subst.html?id=4716>
19. Leonardi CL, Kimball AB, Papp KA, et al. Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 76-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 1) [published correction appears in *Lancet*. 2008 May 31;371(9627):1838]. *Lancet*. 2008;371(9625):1665-1674. doi:10.1016/S0140-6736(08)60725-4
20. Papp KA, Langley RG, Lebwohl M, et al. Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 52-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 2). *Lancet*. 2008;371(9625):1675-1684. doi:10.1016/S0140-6736(08)60726-6
21. Landells I, Marano C, Hsu MC, et al. Ustekinumab in adolescent patients age 12 to 17 years with moderate-to-severe plaque psoriasis: results of the randomized phase 3 CADMUS study. *J Am Acad Dermatol*. 2015;73(4):594-603. doi:10.1016/j.jaad.2015.07.002

22. Reich K, Papp KA, Blauvelt A, et al. Bimekizumab versus ustekinumab for the treatment of moderate to severe plaque psoriasis (BE VI-VID): efficacy and safety from a 52-week, multicentre, double-blind, active comparator and placebo controlled phase 3 trial [published correction appears in *Lancet*. 2021 Feb 20;397(10275):670]. *Lancet*. 2021;397(10273):487-498. doi:10.1016/S0140-6736(21)00125-2
23. Papp KA, Blauvelt A, Bukhalo M, et al. Risankizumab versus Ustekinumab for Moderate-to-Severe Plaque Psoriasis. *N Engl J Med*. 2017;376(16):1551-1560. doi:10.1056/NEJMoa1607017
24. Feagan BG, Sandborn WJ, Gasink C, et al. Ustekinumab as Induction and Maintenance Therapy for Crohn's Disease. *N Engl J Med*. 2016;375(20):1946-1960. doi:10.1056/NEJMoa1602773
25. Sandborn WJ, Rutgeerts P, Gasink C, et al. Long-term efficacy and safety of ustekinumab for Crohn's disease through the second year of therapy. *Aliment Pharmacol Ther*. 2018;48(1):65-77. doi:10.1111/apt.14794
26. Hanauer SB, Sandborn WJ, Feagan BG, et al. IM-UNITI: Three-year Efficacy, Safety, and Immunogenicity of Ustekinumab Treatment of Crohn's Disease. *J Crohns Colitis*. 2020;14(1):23-32. doi:10.1093/ecco-jcc/jjz110
27. Sandborn WJ, Rebusk R, Wang Y, et al. Five-Year Efficacy and Safety of Ustekinumab Treatment in Crohn's Disease: The IM-UNITI Trial [published online ahead of print, 2021 Feb 19]. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2021;S1542-3565(21)00203-2. doi:10.1016/j.cgh.2021.02.025
28. Sulz MC, Burri E, Michetti P, et al. Treatment Algorithms for Crohn's Disease. *Digestion*. 2020;101 Suppl 1:43-57. doi:10.1159/000506364
29. Biemans VBC, van der Woude CJ, Dijkstra G, et al. Ustekinumab is associated with superior effectiveness outcomes compared to vedolizumab in Crohn's disease patients with prior failure to anti-TNF treatment. *Aliment Pharmacol Ther*. 2020;52(1):123-134. doi:10.1111/apt.15745

30. Sands BE, Sandborn WJ, Panaccione R, et al. Ustekinumab as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. *N Engl J Med*. 2019;381(13):1201-1214. doi:10.1056/NEJMoa1900750
31. Panaccione R, Danese S, Sandborn WJ, et al. Ustekinumab is effective and safe for ulcerative colitis through 2 years of maintenance therapy [published correction appears in *Aliment Pharmacol Ther*. 2021 May;53(9):1057-1060] [published correction appears in *Aliment Pharmacol Ther*. 2021 Nov;54(9):1221-1222]. *Aliment Pharmacol Ther*. 2020;52(11-12):1658-1675. doi:10.1111/apt.16119
32. Ochsenkühn T, Tillack C, Szokodi D, Janelidze S, Schnitzler F. Clinical outcomes with ustekinumab as rescue treatment in therapy-refractory or therapy-intolerant ulcerative colitis. *United European Gastroenterol J*. 2020;8(1):91-98. doi:10.1177/2050640619895361
33. Cingoz O. Ustekinumab. *mAb*, Volume 1, 2009, Issue 3, pages 216-221 doi:10.4161/mabs.1.3.8593
34. Barszczewska O, Łabanowska K, Łuszczynska A. Leczenie łuszczycy w programie B.47 – analiza zmian wysokości limitu finansowania refundowanych substancji czynnych. *Agencja Oceny Technologii Medycznych i Taryfikacji*. Warszawa, Polska; 2019
35. Obwieszczenie Ministra Zdrowia z dnia 30 sierpnia 2019 r. w sprawie wykazu refundowanych leków, środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego oraz wyrobów medycznych na 1 września 2019 r.
36. STELARA (ustekinumab) Injection – *FDA*, USA, 09/23/2016
37. Rydzewska G, Władysiuk M, Nieszczyński G. Analiza wpływu na budżet leczenia nieswoistych chorób zapalnych jelit. Proponowane zmiany w zapisach programów lekowych B.32 i B.55 oraz ich wpływ na budżet płatnika publicznego. *Central and Eastern European Society of Technology Assessment in Health Care*. Kraków, Polska; 2021.
38. Stelara® (ustekinumab) w leczeniu dorosłych chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego - MAHTA Sp. z o.o. dla Janssen-Cilag Polska sp. z o.o., Warszawa, Polska; 17.11.2020 r. [https://bipold.aotm.gov.pl/assets/files/zlecenia_mz/2020/236/AW/Stelara_\(ustekinumab\)_APD_wersja%201.1.pdf](https://bipold.aotm.gov.pl/assets/files/zlecenia_mz/2020/236/AW/Stelara_(ustekinumab)_APD_wersja%201.1.pdf)

39. Projekt obwieszczenia Ministra Zdrowia w sprawie wykazu refundowanych leków, środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego oraz wyrobów medycznych, który wejdzie w życie 1 stycznia 2022 r.
40. https://www.sluzbazdrowia.com.pl/leki_mobilna.php?lek=stelara
41. Wyrzucki A., Faust H., Wuttke R., et al., Assessment of a Novel Biosimilar to Stelara (Ustekinumab), a First Line Anti-Psoriatic Drug, *Celerion Switzerland AG*, 2018

MEZENCHYMALNE KOMÓRKI MACIERZYTE SZANSĄ DLA CHORYCH Z COVID-19? PRZEGLĄD DOTYCHCZASOWYCH OSIĄGNIĘĆ I PERSPEKTYWY ZASTOSOWANIA W PRAKTYCE KLINICZNEJ

Julia Cieśla, Maciej Smreczak, Kinga Dworak, Natalia Trędota

Studenckie Koło Naukowe im. Zbigniewa Religi przy Katedrze Biofizyki w Zabrze,
Wydział Nauk Medycznych w Zabrzu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Abstrakt:

Pandemia COVID-19 skupiła uwagę badaczy na całym świecie na poszukiwaniu skutecznej terapii u pacjentów z ciężkim przebiegiem choroby. Jedną z rozważanych metod leczenia jest użycie komórek macierzystych, które od wielu lat znajdują zastosowanie w różnych dziedzinach medycyny. W terapii COVID-19 szczególną rolę przypisuje się mezenchymalnym komórkom macierzystym (mesenchymal stem cells- MSCs), które oprócz zdolności regeneracyjnych mają właściwości immunomodulujące, szczególnie pożądane w leczeniu COVID-19. Badania pokazują, że dzięki przeszczepowi MSCs możliwe jest poprawienie parametrów oddechowych, zatrzymanie burzy cytokinowej, a także zmian wysiękowych w płucach bez istotnych działań niepożądanych. Podobne efekty można uzyskać dzięki podaniu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez MSCs. W przeglądzie zaprezentowano obecne postępy i próby kliniczne wykorzystania MSCs u chorych na COVID-19. Ponadto omówiono oraz porównano źródła, z których można pozyskiwać MSCs do tego celu, a także wskazano ograniczenia i perspektywy w zakresie przeszczepiania MSCs chorym na COVID-19.

Słowa kluczowe: COVID-19, SARS-COV-2, komórki macierzyste, mezenchymalne komórki macierzyste

Abstract:

The COVID-19 pandemic has gathered the attention of researchers around the world on the search for effective therapy in patients with severe cases. One of the considered methods of treatment is the use of stem cells (SCs). SCs have been used in various fields of medicine for many years. In COVID-19 therapy, a special role is assigned to mesenchymal stem cells (MSCs), which, apart from regenerative abilities, have immunomodulatory properties, particularly desirable in the treatment of COVID-19. Research shows that, thanks to MSCs transplant, it is possible to improve respiratory parameters, stop a cytokine storm, as well as exudate changes

in the lungs without significant side effects. Similar effects can be obtained by administering extracellular vesicles secreted by MSCs. The review presents the current advances and clinical trials of the use of MSCs in patients with COVID-19. In addition, the sources from which MSCs can be obtained for this purpose were discussed and compared, as well as the limitations and prospects of MSC transplantation in patients with COVID-19 were indicated.

Keywords: COVID-19, SARS-COV-2, stem cells, mesenchymal stem cells

1. Wstęp

Choroba COVID-19 (ang. *coronavirus disease 2019*) od prawie dwóch lat stanowi główny przedmiot zainteresowania badaczy z różnych dziedzin nauki: biologów, biotechnologów, wirusologów, medyków i wielu innych. Interdyscyplinarne podejście i wiedza uzyskana na drodze licznych badań okazuje się być kluczowa dla rozwoju skutecznych metod leczenia¹. Liczba publikowanych opisów prób klinicznych dotyczących terapii COVID-19 wciąż się zwiększa, jednakże nadal niektóre aspekty działania i funkcjonowania wirusa SARS-CoV-2 (koronawirusa ciężkiego ostrego zespołu oddechowego 2, ang. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*) oraz choroby, którą wywołuje pozostają nieodkryte². Czas odgrywa znaczącą rolę w poszukiwaniu metod terapeutycznych, ponieważ SARS-CoV-2 stanowi zagrożenie dla milionów ludzi na całym świecie. Zdolność wirusa do unikania odpowiedzi immunologicznej gospodarza, wywoływanie burzy cytokinowej i hiperzapalenia, a przede wszystkim ciężkie powikłania pochorobowe są czynnikami, które wpływają znacząco na konieczność jak najszybszego znalezienia skutecznych metod leczenia i zmniejszenia ryzyka powikłań³.

Jednocześnie, w ostatnich latach szczególną uwagę poświęcono badaniu komórek macierzystych (ang. *stem cells*, SCs). Z jednej strony dostrzega się ogromne korzyści płynące z ich wykorzystania w praktyce klinicznej, natomiast z drugiej strony, ich użycie wciąż wzbudza kontrowersje moralne i etyczne (szczególnie w przypadku SCs pochodzenia embrionalnego)⁴. W przypadku COVID-19 szczególną rolę upatruje się w komórkach macierzystych, ponieważ mogą one stanowić narzędzie użyteczne w regeneracji zniszczonych przez chorobę płuc. Mimo szerokiej dostępności szczepionki, ciężkie dysfunkcje płuc wciąż stanowią częste powikłanie po przebytych COVID-19. Sugeruje się, że to właściwości immunomodulacyjne mezenchymalnych komórek macierzystych (ang. *mesenchymal stem cells*, MSCs) takie jak m.in. zmniejszenie wydzielania cytokin prozapalnych w przebiegu ostrego stanu zapalnego (jaki ma miejsce w COVID-19) mogą stanowić czynnik ograniczający ryzyko powikłań dysfunkcyjnych tkanki płucnej⁵.

W przeglądzie zaprezentowano obecne postępy w zrozumieniu mechanizmu działania który charakteryzuje MSCs jako narzędzie terapeutyczne w terapii COVID-19, a także wydzielanego przez nie sekretomu i pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Przedstawiono próby kliniczne wykorzystania ich w grupie chorych na COVID-19, szczególnie u pacjentów z ciężkim przebiegiem tej choroby. Ponadto omówiono oraz porównano źródła, z których można pozyskiwać MSCs do tego celu, a także podstawy biologiczne ich działania, które sprawiły, że już na początku pandemii zostały one zaprezentowane jako jedno z potencjalnych metod leczenia. Dodatkowo, podsumowano perspektywy w zakresie przeszczepiania MSCs u chorych na COVID-19 oraz ograniczenia, z którymi muszą zmierzyć się badacze, aby terapia z udziałem tego rodzaju komórek macierzystych weszła do praktyki klinicznej leczenia COVID-19.

2. Patogenność wirusa SARS-COV-2

Pandemia COVID-19 spowodowana jest przez koronawirusa SARS-CoV 2. Początków rozprzestrzeniania się tego wirusa można doszukać się w grudniu 2019 roku, kiedy to w chińskiej prowincji Wuhan zgłoszone zostały liczne przypadki ciężkiego zespołu ostrej niewydolności oddechowej⁶. Już 11 marca następnego roku WHO (ang. *World Health Organisation*) ogłosiło globalną pandemię.

Proces zakażenia i wywoływania objawów chorobowych przez wirusa SARS-CoV-2 został szeroko opisany w literaturze. Przedostanie się patogenu do wnętrza komórki następuje poprzez interakcję wirusowego białka S z typem I receptora enzymu konwertującego angiotensynę 2 (ACE2)⁷⁻⁹. Do komórek posiadających ten receptor zaliczyć można komórki śródbłonna tętniczego oraz żylnego, komórki pęcherzyków płucnych typu II, enterocyty jelita cienkiego i komórki mięśni gładkich tętnic większości narządów, w tym kory mózgowej i pnia mózgu. Naturalna ekspresja receptora dla ACE2 w dolnych drogach oddechowych oraz łatwość transmisji wirusa do tych miejsc spowodowała tropizm zakażeń SARS-CoV-2 względem tego obszaru¹⁰. Po przedostaniu się do wnętrza komórki wirus rozpoczyna swoją replikację, podczas której powielanych jest 9 subgenomowych RNA transkrybowanych z genomowego RNA, które kodują konserwowane białka strukturalne: białko kolca (S), białko otoczki (E), białko błonowe (M) i białko nukleokapsydu (N), które syntetyzują cząstkę wirusa⁷.

Po wejściu wirusa do komórek nabłonka oddechowego prowokowana jest immunologiczna odpowiedź cytokin zapalnych oraz słabsza interferonu. W prozapalnych odpowiedziach immunologicznych patogennych limfocytów Th1 i pośrednich monocytów CD14+CD16+ pośredniczą związane z błoną receptory odpornościowe i dalsze szlaki sygnałowe. Po zadziałaniu chemokin następuje infiltracja makrofagów i neutrofilów do tkanki płucnej, co powoduje burzę cytokin⁹. Wirus SARS-CoV 2 powoduje, że komórki Th1 wydzielają cytokiny takie jak: czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF) i interleukinę-6 (IL-6). GM-CSF dalej pobudza monocyty CD14+CD16+ do wydzielania dużych ilości IL-6, TNF- α i innych cytokin⁹. Główną przyczyną powstania burzy cytokinowej jest silne wydzielanie IL-6 w odpowiedzi na wirusa¹⁰, która powoduje chemotaksję neutrofilów oraz martwicę limfocytów¹¹. Receptory odpornościowe związane z błoną komórek są także odpowiedzialne za niezbalansowaną odpowiedź immunologiczną organizmu, a małe stężenia INF-y mogą dodatkowo nasilać wytwarzanie cytokin⁹.

3. Mezenchymalne komórki macierzyste

Uwagę na fakt istnienia komórek macierzystych po raz pierwszy zwrócono pod koniec XIX w. w celu wyjaśnienia zdolności dojrzałych tkanek do procesów odbudowy i regeneracji¹². W warunkach fizjologicznych biorą one udział w homeostazie tkankowej, jednakże w przypadku rozległych urazów, ich liczba nie jest wystarczająca do pełnej regeneracji uszkodzonego narządu. Dlatego też pozyskiwanie i wykorzystywanie komórek macierzystych w leczeniu ciężko chorych pacjentów wydaje się być bardzo obiecujące¹³. Od wielu lat są one obiektem zainteresowania badaczy na całym świecie. Sugeruje się, że terapia komórkami macierzystymi może być punktem zwrotnym w procesie poszukiwania metod terapeutycznych dla chorób uważanych dotąd za nieuleczalne. Podziału komórek macierzystych dokonuje się najczęściej według ich zdolności do różnicowania. Totipotencjalne komórki macierzyste są zdolne do różnicowania w kierunku wszystkich komórek organizmu. Pluripotencjalne komórki macierzyste - w kierunku komórek wszystkich warstw zarodkowych (ale nie komórek pozazarodkowych), natomiast multipotencjalne komórki macierzyste w kierunku konkretnych linii komórkowych. Wyróżnia się ponadto oligopotencjalne i unipotencjalne komórki macierzyste o największym spektrum różnicowania¹⁴.

Komórkami o zdolności do multipotencjalnego różnicowania są m.in. mezenchymalne komórki macierzyste, które zostały po raz pierwszy nazwane i opisane przez Caplana w 1991r.¹⁵. Zgodnie ze stanowiskiem Międzynarodowego Towarzystwa Terapii Komórkowych (ang. *International Society for Cellular Therapy*, ISCT) minimalne kryteria dla zdefiniowania komórki jako MSCs obejmują: zdolność przylegania do plastiku w standardowych warunkach hodowli, wyrażanie markerów powierzchniowych: CD105 CD73 i CD90 oraz brak ekspresji: CDa45, CD34, CD14 lub CD11b, CD79a lub CD19 i HLA-DR, a także zdolność do różnicowania w kierunku linii adipogennej, chondrogennej i osteogennej *in vitro*¹⁶. Fakt ich różnicowania zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo* wykorzystywany jest w medycynie regeneracyjnej. Szczególnego znaczenia nabiera wykorzystanie MSCs w chorobach i urazach chrząstki, ponieważ tkanka ta charakteryzuje się niskim potencjałem autoregeneracyjnym, a schorzenia takie często są trudne do leczenia. Jako metoda leczenia wykorzystane mogą być m.in. dostawowe wstrzyknięcia MSCs. Metoda ta określana jest jako skuteczna i bezpieczna¹⁷. W inżynierii tkankowej chrząstki testuje się również różnego rodzaju rusztowania, które stanowią środowisko dla przeszczepionych komórek i promują ich różnicowanie do dojrzałych chondrocytów¹⁸. Podobnie, MSCs są obiecującym źródłem komórek do naprawy i regeneracji kości¹⁹ oraz mięśni gładkich naczyń²⁰. Oprócz zdolności regeneracyjnych sugeruje się, że komórki te mogą znaleźć zastosowanie w medycynie jako transportery leków lub genów do zmienionych chorobowo tkanek, a także jako czynniki hamujące postęp choroby przeszczep przeciw gospodarzowi (ang. *graft-versus-host disease*, GVHD). Dodatkowo trwają badania nad wykorzystaniem MSCs w terapii chorób autoimmunizacyjnych ze względu na szerokie właściwości immunomodulacyjne tych komórek²¹. Wykazano, że właściwości te wynikają z profilu cytokinowego w miejscu zapalenia, dlatego dobór źródeł MSCs do wywołania efektu terapeutycznego powinien zależeć m.in. od dominujących cytokin prozapalnych i konkretnego przypadku klinicznego²². Z tego względu terapię z użyciem komórek macierzystych mogą stać się domeną rozwijającej się medycyny zindywidualizowanej.

Dziedziny medycyny, w których MSCs cieszą się szczególnym zainteresowaniem to medycyna regeneracyjna i onkologia. Jednakże pomimo tysięcy prób klinicznych wykorzystania MSCs, wciąż brakuje jednoznacznych badań, które mogłyby zapoczątkować rutynową praktykę przeszczepiania MSCs jako standardu leczniczego²³. Jako jedyne istotne działanie niepożądane takiego rodzaju terapii wskazuje się gorączkę²⁴. Pomimo potwierdzonego bezpieczeństwa

użycia MSCs, wysokiej zdolności różnicowania do szeregu typów komórek oraz wyjątkowych zdolności parakrynnych wciąż trwa dyskusja na temat protokołów pozyskiwania i hodowli MSCs oraz ich normalizacji²⁵. Istotną kwestią wydają się być przypadki odrzucania przeszczepów MSCs. Dodatkowo, potrzebne są badania na większych kohortach a także ocena stanu chorych nie tylko krótko po zabiegu, ale i po dłuższym czasie po przeszczepie²⁶.

4. Immunomodulacyjne właściwości MSCs

Wyjątkowość mezenchymalnych komórek macierzystych wynika m.in. z ich właściwości modulowania odpowiedzi immunologicznej gospodarza. MSCs pochodzące z różnych źródeł m.in. ze szpiku kostnego, galarety Whartona czy tkanki tłuszczowej mają zdolność do hamowania proliferacji limfocytów T indukowanej mitogenami. Jednocześnie zmniejszają ilość cytokin wydzielanych przez te limfocyty- interferonu gamma (INF- γ) i czynnika martwicy nowotworu alfa (ang. *tumor necrosis factor*, TNF- α)²⁷. Hipoteza działania immunomodulującego MSCs na limfocyty T obejmuje również założenie, że supresja ta nie zależy od kontaktu komórka-komórka, ale od INF- γ (wydzielanego przez komórki NK i aktywowane limfocyty T), który zwrotnie stymuluje MSCs do hamowania aktywności limfocytów T. Przewidywany mechanizm tej supresji to pobudzenie przez INF- γ MSCs do wydzielania 2,3-dioksygenazy indoloaminy, hamującej proliferację limfocytów T²⁸. Dzięki tym właściwościom przeszczep MSCs możliwy jest bez użycia dużych dawek leków immunosupresyjnych lub z całkowitym ich wyłączeniem²⁹. Dodatkowo, właściwość aktywacji MSCs przez INF- γ jest nadal szeroko badana m.in. w celu zmniejszania stanu zapalnego i progresji w przebiegu włóknienia nerek³⁰. Ponadto, dzięki potencjalnym możliwościom immunoregulacyjnym MSCs w zakresie kontrolowania limfocytów T i ich roli w procesach autoagresji i indukowania odrzucania przeszczepu allogenicznego, mogą stać się one nowym narzędziem m.in. w transplantologii narządowej³¹. Oprócz szeroko znanej supresji limfocytów T, obecność MSCs powoduje również hamowanie dojrzewania i migracji komórek dendrytycznych, które odgrywają kluczową rolę w inicjowaniu odpowiedzi immunologicznej, a także osłabienie ich zdolności do pobudzania limfocytów CD4+ specyficznych dla danego antygeny³².

Oprócz cytokin i chemokin działalność parakrynną MSCs obejmuje także wydzielanie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (ang. *extracellular vesicles*, EVs), które dzięki zdolności do zwiększania żywotności i proliferacji komórek docelowych i modulacji środowiska immunologicznego komórek mogą stać

się alternatywą dla standardowo proponowanych metod terapii komórkowych z użyciem MSCs. Sugeruje się, że ich użycie jest procedurą jeszcze bardziej bezpieczną, niż przeszczep MSCs, a także łatwiejszą w użyciu³³. Najnowsze badania wskazują na możliwość izolacji EVs ze szpiku kostnego i wszczepienia ich w miejsce złamań kości. EVs poprzez mikroRNA-335 i aktywację szlaku Wnt/ β -katenina mogą wspomagać regenerację uszkodzonej tkanki kostnej³⁴. Dodatkowo, szereg innych badań wskazuje na potencjalną rolę EVs w leczeniu ostrego uszkodzenia nerek zarówno u zwierząt, jak i u ludzi³⁵. Ostatnie badania wskazują również na możliwość donosowego wstrzykiwania EVs z odpowiednio zmodyfikowaną zawartością w celu podawania tą drogą leków, a także innych substancji wpływających na układ nerwowy. Terapia ta, dzięki indukcji procesu immunomodulacji czy neuroprotekcji ma szansę na znalezienie zastosowania w terapii chorób neurologicznych³⁶.

Dodatkowo sugeruje się, że możliwe jest modyfikowanie genetyczne samych MSCs w celu wzbudzenia w nich zdolności do dostarczania pożądanych substancji w miejsce zapalenia. Levy i in. wykazali, że dzięki celowanej transfekcji mRNA komórek, MSCs są zdolne do wydzielania wstrzykniętej interleukiny-10 (Il-10) dokładnie w miejscu zapalenia- w tym przypadku w uchu środkowym, mimo, że w warunkach normalnych Il-10 nie wchodzi w skład ich sekretomu³⁷.

5. Źródła MSCs

Komórki zdefiniowane jako MSCs wyizolowane z różnych źródeł różnią się m.in. zdolnością do różnicowania w konkretne linie komórkowe, ilością podziałów, zastosowaniem w leczeniu w różnych dziedzinach medycyny³⁸. MSCs można otrzymać m.in. w wyniku różnicowania pluripotencjalnych komórek macierzystych. W porównaniu do somatycznych MSCs są one mniej dojrzałe, ale wykazują większy potencjał proliferacyjny. Ponadto są zdolne do dalszego różnicowania, działania immunomodulacyjnego i parakrynnego³⁹. Dodatkowo wydzielane przez takiego rodzaju MSCs egzosomy mogą promować proliferację i różnicowanie keratynocytów oraz fibroblastów skóry, stanowiąc potencjalne narzędzie w dermatologii⁴⁰. Wykazano, że PSCs-MSCs po przeszczepieniu do ciała szklatego oka są zdolne do przekazywania mitochondriów komórkom zwojowym siatkówki, pełniąc funkcję ochronną i regeneracyjną⁴¹. Rolę PSCs-MSCs zauważa się również w przypadku chorób płuc przebiegających ze stresem oksydacyjnym- takich jak przewlekła obturacyjna choroba płuc (POChP). Dzięki wyżej wspomnianemu transferowi

mitochondriów zmniejsza się stan zapalny i nadreaktywność dróg oddechowych w przebiegu tej choroby⁴².

Często wykorzystywanym do badań źródłem MSCs jest szpik kostny (ang. *bone marrow delivered mesenchymal stem cells*, BM-MSCs). Komórki pochodzenia szpikowego mają unikalną zdolność różnicowania w komórki przynajmniej dwóch listków zarodkowych- mezodermy i ektodermy⁴³. Wiele badań sugeruje użycie tego rodzaju komórek w celu naprawy i regeneracji tkanki kostnej⁴⁴, a także pozyskiwania komórek tkanki tłuszczowej⁴⁵. Karaoz i in. na modelu szczura wykazali, że komórki te wykazują ekspresję nie tylko markerów linii osteogennej, ale także neurogennej i miogennej, co potwierdza szerokie spektrum ich różnicowania. Komórki te posiadają ponadto wysoki potencjał proliferacyjny⁴⁶ i są stabilne pod względem składu genetycznego⁴³. BM-MSCs mogą znaleźć zastosowanie również w zapalnych chorobach płuc takich jak sarkoidoza, ponieważ mają zdolność indukowania przeprogramowywania makrofagów pęcherzykowych w kierunku fenotypów przeciwzapalnych, co może pomóc łagodzić zapalenia płuc i zmniejszać zapotrzebowanie na leki steroidowe w przebiegu sarkoidozy⁴⁷. Ostatnie badania wskazują na istotną rolę BM-MSCs we wzmacnianiu proliferacji raka jajnika poprzez sygnalizację zależną od miR-1180 (mikroRNA- 1180). Stawia to BM-MSCs i miR-1180 pochodzące z BM-MSCs jako nowy potencjalny cel terapii tego rodzaju nowotworu⁴⁸. Podobne do BM-MSCs właściwości oraz profil markerów posiadają MSCs pochodzące z krwi obwodowej. Mają one niższy potencjał różnicowania do linii osteogennej i chondrogennej, ale wyższy w przypadku pozyskiwania komórek tkanki tłuszczowej. Dodatkowo, są łatwiejsze do wyizolowania, co czyni je obiecującym źródłem MSCs do zastosowania terapeutycznego⁴⁹.

Możliwe jest także pobieranie mezenchymalnych komórek macierzystych z innych źródeł. Szeroko sugeruje się użycie MSCs z tkanek związanych z życiem płodowym- z płynu owodniowego⁵⁰ czy krwi pępowinowej⁵¹. Pępowina może być ponadto łatwo dostępnym źródłem mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z pępowinowej galarety Whartona. Izolacja i badania prowadzone na tym rodzaju komórek są pozbawione kontrowersji etycznych, ponieważ pępowina jest traktowana jako odpad⁵². Jako kolejne źródło MSCs podaje się często błonę maziową. Jest to szczególnie istotne źródło z punktu widzenia regeneracji chrząstki, ponieważ komórki macierzyste pochodzenia maziowego wykazują szczególnie wysoki potencjał chondrogenny⁵³.

Coraz większe zainteresowanie wzbudzają mezenchymalne komórki macierzyste pobierane ze zwłok (ang. *cadaveric mesenchymal stem cells*, CMSCs).

Ostatnie badania wskazują na ich unikatową odporność na czynniki takie jak: niedokrwienie, niedotlenienie, zamrożenie czy odwodnienie, przy zachowaniu swojego potencjału do proliferacji i różnicowania⁵⁴.

6. Terapie z użyciem MSCs w chorobach płuc

Terapie uszkodzeń układu oddechowego i płuc z użyciem MSCs były szeroko testowane jeszcze przed wybuchem pandemii COVID-19. Felix i in. zaproponowali użycie MSCs pochodzących z tkanki tłuszczowej jako metoda leczenia idiopatycznego zwłóknienia płuc, które cechuje się złym rokowaniem, a dostępne metody okazywały się nieskuteczne. Na modelu szczurzym wywołano zwłóknienie płuc za pomocą bleomycyny, a następnie wkropiono MSCs. Terapia ta spowodowała zmniejszenie syntezy kolagenu- czynnika powodującego zwłóknienie. Zauważono, że MSCs mogą regulować i kontrolować odkładanie kolagenu w miofibroblastach płuc⁵⁵. Co więcej, Averyanov i in. udowodnili, że MSCs są skuteczne nie tylko w łagodnej i umiarkowanej postaci idiopatycznego zwłóknienia płuc, ale także w terapii ciężkiego lub szybko postępującego przebiegu tej choroby. Co ważne, nie zauważono znaczących działań niepożądanych związanych z opisaną terapią⁵⁶.

Chan i in. z użyciem modelu mysiego wykazali, że MSCs mogą być skuteczne w zapobieganiu lub osłabianiu ciężkiego uszkodzenia płuc związanego z zakażeniem wirusem grypy A/H5N1. Dodatkowo, w przypadku tego schorzenia MSCs zmniejszają upośledzenie transportu płynu pęcherzykowego w płucach⁵⁷. Zdolność MSCs do przyjmowania ksenobiotyków i transportu ich w pożądane miejsce jest testowana m.in. w przypadku raka płuc. Wang i in. wykazali, że MSCs załadowane nanocząsteczkami leków przeciwnowotworowych skutecznie hamują rozwój guza na drodze transportu międzykomórkowego między MSCs a komórką raka. Próba ta pozwala na spekulowanie o kolejnym potencjalnym zastosowaniu MSCs w chorobach płuc⁵⁸. Jednakże kwestia ta powinna być szerzej zbadana, ponieważ zgodnie z Eggenhoferem i in. dożylna infuzja MSCs powoduje jedynie krótkotrwałą obecność MSCs w płucach, a do długotrwałego działania immunomodulującego i regeneracyjnego potrzebne jest pośredniczenie innych komórek⁵⁹. Dodatkowo, w przypadku raka płuc podkreśla się rolę samych MSCs i ich rozpuszczalnego sekretu, który powoduje hamowanie proliferacji i angiogenezy, a także indukowanie apoptozy komórek raka płuc *in vitro*⁶⁰. Terapie wykorzystujące MSCs w leczeniu raka płuc są ograniczone ze względu na liczne kontrowersje, które pojawiły się ciągu ostatnich lat. Sugeruje się, że mimo powinowactwa

i właściwości celowanego ataku komórek nowotworowych, komórki te mogą mieć działanie proonkogenne. Potrzebne jest zatem dogłębnierze zrozumienie biologii i mechanizmu działania MSCs w kontekście onkologicznym⁶¹.

Rola przeciwdrobnustrojowa MSCs została zauważona już wcześniej w kontekście innych chorób zakaźnych. Komórki za pośrednictwem wydzielanych substancji (m.in. peptydu przeciwdrobnustrojowego LL-37) powodują spadek tempa wzrostu takich bakterii jak: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus pneumoniae*⁶². Sugeruje się ponadto sprawdzenie działania MSCs w innych chorobach zakaźnych o wysokiej śmiertelności, będących na liście priorytetowej Światowej Organizacji Zdrowia np. infekcji wirusem MERS⁶³. Na podstawie szeregu badań zaczęto domniemywać o potencjalnej roli MSCs w terapii chorób przebiegających z uszkodzeniem płuc (jak idiopatyczne zwłóknienie płuc) wywołanych przez wirusy⁶⁴. Chena i in. przeprowadzili badanie w wykorzystaniu MSCs pozyskanych z krwi menstruacyjnej. W grupie 44 pacjentów z ARDS w przebiegu zakażenia wirusem grypy A (H7N9) wykazano znaczne zmniejszenie śmiertelności w grupie badanej w porównaniu z liczącą 17 grupą kontrolną (17,6% śmiertelności w grupie badanej, 54,5% w grupie kontrolnej). Biorąc pod uwagę podobieństwo powikłań po ciężkim przebiegu zakażenia wirusem SARS-COV-2 i H7N9 zaczęto zwracać szczególną uwagę na możliwość testowania terapii z użyciem MSCs również w przebiegu COVID-19⁶⁵.

7. Próby kliniczne wykorzystania MSCs w terapii COVID-19

Odkąd odkryto potencjalną rolę MSCs w terapii COVID-19 szereg ośrodków naukowych na całym świecie przeprowadzało próby kliniczne mające na celu sprawdzenie skuteczności i działania MSCs szczególnie w przypadku ciężkiego przebiegu COVID-19. Ciężki przebieg łączy się często z wystąpieniem zespołu ostrej niewydolności oddechowej (ang. *acute respiratory distress syndrome*, ARDS), który charakteryzuje się wysoką śmiertelnością⁶⁶. Bezpieczeństwo terapii ARDS za pomocą MSCs było badane jeszcze przed wybuchem pandemii COVID-19. Wilson i in. przeprowadzając próbę na dziewięciu pacjentach dowiedli, że działania niepożądane i śmierć 3 badanych nie były związane z infuzją MSCs, a swoje źródło miały jeszcze przed przeprowadzeniem terapii⁶⁷. Dodatkowym czynnikiem sugerującym, że komórki macierzyste mogą obiecującym podejściem było zauważenie potencjalnej roli krążących komórek macierzystych płodu u ciężarnych, które zgodnie z obserwacjami przechodziły COVID-19 łagodnie lub bezobjawowo. Samara i in.

wyciągnęli wniosek, że to właśnie płodowe komórki macierzyste mogą działać immunoprotekcyjnie na organizm matki⁶⁸. Ponadto, ze względu na charakter choroby, jej obraz kliniczny, patogenezę objawów i przebieg, z punktu widzenia immunologii kluczem do zmniejszenia liczby zgonów, oprócz szczepionki, może okazać się terapia skierowana na gospodarza, a nie patogen (taka jak z użyciem MSCs)⁶⁹.

Rola płodowych komórek macierzystych jest znana od lat. W przypadku wykorzystania ich potencjału w opracowaniu terapii leczenia COVID-19 rodzajem komórek o największym potencjale wydają się być te, pochodzące z krwi pępowinowej. Liang i in. wykorzystali MSCs z tego źródła w leczeniu 65-letniej kobiety z zapaleniem płuc wywołanego infekcją wirusem SARS-CoV-2. Mimo dwunastu dni standardowego leczenia stan zapalny nie ulegał znaczącej poprawie. Wykonano trzykrotnie wlew MSCs z połączeniu tymozyną $\alpha 1$ i antybiotykami, uzyskując poprawę stanu ogólnego, remisję objawów potwierdzoną wynikami badań laboratoryjnych i obrazowych oraz ujemny wynik testu COVID-19⁷⁰. Tao i in. dowiedli na przykładzie z 72-letniego mężczyzny z licznymi chorobami towarzyszącymi (cukrzyca, nefropatia cukrzycowa, niewydolność nerek, nadciśnienie tętnicze), że przeszczep MSCs może w grupie chorych z wielochorobowością opóźniać postęp choroby oraz poprawiać parametry nerkowe i oddechowe⁷¹. Podobnie, badania Zhu i in. wykazały, że stan kliniczny 48-letniego mężczyzny w ciężkim stanie po infuzji MSCs uległ znacznej poprawie. Saturacja pacjenta wróciła do normy w 2 dni po zabiegu, po 5 dniach ustała duszność a 6 dni po zabiegu-męczący kaszel. Dodatkowo po 7 dniach w badaniu tomograficznym uwidoczniono zmniejszenie nacieku zapalnego spowodowanego przez towarzyszące zapalenie płuc⁷². Badania te miały jednak postać opisów przypadków (ang. *case report*), a dla pełnego udowodnienia efektów terapeutycznych, skuteczności i bezpieczeństwa wlewów MSCs potrzebne były badania w szerszej kohorcie. Lanzoni i in. przeprowadzili badania na większej grupie pacjentów. Wykonując wlewy dożylnie MSCs pochodzących z krwi pępowinowej dwunastu pacjentom z ADRS w przebiegu COVID-19 i porównując wyniki z dwunastoosobową grupą kontrolną stwierdzili, że metoda ta pozwala na znaczące obniżenie poziomu cytokin prozapalnych, wzrost szans na przeżycie pacjentów oraz skrócenie czasu powrotu do zdrowia. Ważną kwestią był brak poważnych efektów niepożądanych, z czego można wnioskować o bezpieczeństwie tego rodzaju terapii⁷³.

Bezpieczeństwo i skuteczność wlewów MSCs była mierzona w wielu próbach klinicznych m.in. poprzez wzgląd na stan ogólny pacjenta i poprawę

wyników badań laboratoryjnych, szczególnie tych związanych z parametrami odpowiedzi immunologicznej. Zhang i in. wykonując infuzję MSCs pochodzących z galarety Whartona krwi pępowinowej do krwi żyłnej pacjenta z ciężkim przebiegiem COVID-19 i towarzyszącemu zapaleniu płuc już w dwa dni po zabiegu stwierdzili znaczną poprawę stanu płuc pacjenta i znaczące zmniejszenie wskaźników stanu zapalnego we krwi: limfocytów CD3+, CD4+ i CD8+, IL-6, TNF- α i białka C-reaktywnego (CRP)⁷⁴. Badania przeprowadzone przez Leng i in. w grupie siedmiu pacjentów również z zapaleniem płuc spowodowanym infekcją SARS-COV-2 wykazało, że w ciągu 3-6 dni po przeszczepie MSCs poziom nadreaktywnych komórek zapalnych wydzielających cytokiny: limfocyty T CXCR3+CD4+, limfocyty T CXCR3+CD8+ i komórki CXCR3+ NK spadł do zera, przy jednoczesnym wzroście komórek: CD14+CD11c+CD11bm^{id} o funkcjach regulatorowych. Odnotowano spadek TNF- α i wzrost Il-10 w porównaniu z grupą kontrolną, co jasno sugeruje zmianę proporcji czynników zapalnych w kierunku tych o działaniu przeciwwzapalnym⁷⁵. Ze względu na wysoką śmiertelność chorych z ciężkim przebiegiem COVID-19 ważnym aspektem jest poziom przeżywalności pacjentów. Zgodnie z badaniem przeprowadzonym przez Häberle i in. po serii wlewów MSCs 4 z 5 badanych pacjentów dożyło do momentu wypisu ze szpitala i wykazywało poprawę czynności płuc, podczas gdy w grupie kontrolnej zaledwie u 8 z 18 pacjentów nie stwierdzono zgonu w trakcie hospitalizacji⁷⁶.

Istotnym problemem dotyczącym bezpieczeństwa terapii z użyciem MSCs jest kwestia możliwości infekcji tych komórek przez wirusa SARS-CoV-2. Wspomniane wyżej badanie przeprowadzone przez Leng i in. obejmowało również analizę ekspresji genów i wykazało, że MSC wykazują brak ekspresji ACE2 (receptora enzymu konwertującego angiotensynę 2) i TMPRSS2 (receptora transbłonowej proteazy serynowej typu II).⁷⁵ Czynniki te są głównymi receptorami, które obecne w komórce gospodarza pośredniczą w wywoływaniu ADRS. Zostało to potwierdzone przez Avanzini i in. dla MSCs pochodzących z owodni, krwi pępowinowej, tkanki pępowinowej, tkanki tłuszczowej i szpiku kostnego. Żadne z tych komórek nie wykazują ekspresji tych czynników i nie są infekowane przez wirusa SARS-COV-2 co jest kolejnym dowodem, poza brakiem poważnych efektów niepożądanych, na bezpieczeństwo użycia MSCs w terapii COVID-19⁷⁷. Terapia celowana w ACE2 z użyciem MSCs może przynieść znaczące korzyści. Sugeruje się, że zwiększanie powinowactwa MSCs do komórek z ekspresją ACE2 i jednoczesne utrudnianie wejścia wirusa SARS-COV-2 do tych komórek może

okazać się skuteczną możliwością terapeutyczną, która wymaga jednak dalszych badań⁷⁸.

Tang i in. zasugerowali konserwowanie MSCs w lokalnych bankach i późniejsze użycie ich u pacjentów wymagających szybkich interwencji i będących w stanach nagłych (jak na przykład w przebiegu ARDS). Dodatkowo udowodnili, że doskonałym źródłem MSCs do przeszczepiania u pacjentów z ciężkim przebiegiem COVID-19 jest krew menstruacyjna. Mimo ograniczonej ilości badań wykorzystujących ten typ komórek w badaniu został wykazany pozytywny wpływ MSCs w terapii COVID-19. W próbie wzięło udział dwóch pacjentów, którzy otrzymali komórki pochodzące z krwi 28-letniej kobiety. W wyniku leczenia stan kliniczny pacjentów uległ poprawie. Zaobserwowano ograniczenie stanu zapalnego oraz poprawę parametrów oddechowych. Ciśnienie parcjalne tlenu i saturacja tlenem uległa znacznemu zwiększeniu. Dodatkowo, badania RTG wykazały stopniowe wchłanianie wysięku w obrębie pól płucnych zmienionych chorobowo w przebiegu COVID-19⁷⁹. Podobne wyniki w postaci wchłonięcia wysięków w jamie opłucnowej i poprawienie stanu ogólnego pacjenta z ciężkim przebiegiem COVID-19 wykazali Peng i in. Przypadek ten polegał na podaniu badanemu osocza ozdrowieńca, a następnie na transplantacji MSCs pochodzących z ludzkiej pępowiny. Pierwszy zabieg spowodował powrót do normy limfocytów krwi obwodowej, natomiast działanie MSCs spowodowało poprawę czynności płuc i wchłonięcie wysięków⁸⁰. Synergistyczne działanie MSCs i osocza ozdrowieńców może stanowić nową linię leczenia ciężkiego przebiegu COVID-19. Potencjalna rola osocza ozdrowieńców była wielokrotnie podkreślana zarówno jako strategia leczenia COVID-19, jak i profilaktyki zachorowania u osób narażonych⁸¹.

Liczba prób klinicznych i badań, a także kolejnych ich faz, związanych z przeszczepianiem MSCs wciąż się zwiększa. Badanie obejmujące 18 pacjentów przeprowadzone przez Meng i in. wykazało bezpieczeństwo i skuteczność terapii z użyciem MSCs w COVID-19⁸². Drugą fazę tych badań, przeprowadzoną przez Shi i in., cechuje zdecydowanie większa liczba (100 osób) zrekrutowanych pacjentów i liczna mierzonych parametrów. W czasie pierwszego tego typu, podwójnie ślepego, randomizowanego badania podano 65-ciu pacjentom z ciężkim przebiegiem COVID-19 i/lub towarzyszącym zapaleniem płuc z uszkodzeniem tkanki płucnej 3 wlewy MSCs pochodzących z pępowiny. Jednocześnie sprawdzano te same parametry u liczącej 35 osób grupy kontrolnej otrzymującej preparat placebo. W porównaniu z grupą kontrolną, pacjenci, którzy otrzymali MSCs pokonywali średnio 27 metrów więcej w próbie 6-cio minutowego chodu, a całkowita objętość zmian w płucach

w porównaniu ze stanem początkowych zmniejszyła się o 13% w stosunku do próby kontrolnej. W próbie Shi i in. wykazano znaczącą poprawę innych parametrów niż dotąd badano w próbach leczenia COVID-19 z użyciem MSCs, jednakże stwierdzono potrzebę rozpoczęcia badań 3 fazy, aby oszacować wpływ takiego zabiegu na śmiertelność i zapobieganie długotrwałemu uszkodzeniu płuc⁸³. Było to jedyne badanie, którego wyniki zostały ocenione w dłuższym zakresie czasowym (po roku). Wykazano, że w 12 miesiącu po infuzji MSCs zmiany w płucach zostały całkowicie cofnięte u części pacjentów jedynie w grupie badanej. Można zatem przypuszczać, że terapia z użyciem MSCs przynosi również długoterminowe skutki⁸⁴. Inne, randomizowane badanie na 12 pacjentach z grupą kontrolną przeprowadzone przez Shu i in. wykazało, że stan żadnego pacjenta w grupie badanej nie uległ pogorszeniu do stanu krytycznego, podczas gdy w grupie kontrolnej (liczącej 29 pacjentów) takich pacjentów było czterech. W grupie badanej, znacząca poprawa stanu pacjentów mierzona jako poziom osłabienia i zmęczenia, duszność i niskie nasycenie krwi tlenem, spadek poziomu CRP i Il 6, powrót liczby limfocytów do poziomu normy miała miejsce już 3 dni po infuzji MSCs⁸⁵. Innym aspektem, który być może przybliży środowisko naukowe do szerszego zbadania potencjału MSCs w COVID-19 jest odkrycie dokonane przez Kaushala i in. Stwierdzono, że po podaniu pacjentom z ARDS w przebiegu COVID-19, którzy wymagali terapii wspomagającej ECMO (pozaustrojowe natlenianie krwi, ang. *Extra Corporeal Membrane Oxygenation*) dożylną infuzji MSCs znacząco zmniejszył się poziom egzosomów zawierających białko Spike wirusa SARS-CoV-2 w osoczu (w porównaniu z grupą kontrolną). Przypuszcza się, że oprócz właściwości immunomodulujących i przeciwzapalnych, lecznicza rola MSCs w terapii COVID-19 wynika również ze zdolności usuwania wirusa z ustroju⁸⁶.

Przegląd najważniejszych badań dotyczących infuzji MSCs u chorych na COVID-19 zaprezentowano w tabeli nr.2

Tab 2. Przegląd wybranych badań klinicznych dotyczących infuzji MSCs chorym ze stwierdzonym COVID-19 [opracowanie własne]

Źródło MSCs	Liczba uczestników badania	Średni wiek badanych	Rodzaj badania	Stan badanych	Liczba wlewów MSCs	Ref.
Krew pępowinowa	1	65 lat	Case report	Ciężki, z zapaleniem płuc	3	70

Krew pępowinowa	1	72 lata	Case report	Ciężki (ARDS), z wielochorobowością (cukrzyca, niewydolność nerek, nefropatia cukrzycowa)	5 (co 48h)	71
Pępowina	1	48 lat	Case report	Ciężki, bez chorób towarzyszących	1	72
Pępowina	24 (12 badanych, 12 w próbie kontrolnej)	58.58 ± 15.93	Randomizowane, kontrolowane badanie fazy 1/2a z podwójnie ślełą próbą	Ciężki (ARDS)	2	73
Galareta Whartona (pępowina)	1	54	Case report	Ciężki, z towarzyszącym zapaleniem płuc i cukrzycą typu 2	1	74
Brak danych	7	45-65	Próba pilotażowa	Umiarkowany, ciężki, bardzo ciężki (z towarzyszącym zapaleniem płuc)	1	75
Krew menstruacyjna	2	37 i 71	Próba pilotażowa	Ciężki	3	79
Pępowina	100 (65 badanych, 35 w próbie kontrolnej placebo)	60	Randomizowane, kontrolowane badanie fazy 2, z podwójnie ślełą próbą	Ciężki, przebiegający z uszkodzeniem płuc	3 (w odstępach 3 dni)	83
Brak danych	23 (5 badanych, 28 w próbie kontrolnej)	39	Nierandomizowane, z grupą kontrolną	Ciężki	2/3	76
Pępowina	41 (12 badanych, 29 w próbie kontrolnej)	61	Jednośrodkowe, otwarte, randomizowane z grupą kontrolną	Ciężki	1	85
Szpik kostny	43 (12 badanych, 31 w grupie kontrolnej)	39-72	Kliniczno- kontrolne	Ciężki z ARDS, wymagający wspomagania poprzez ECMO	3	86

8. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe i sekretom pochodzące z MSCs w terapii COVID-19

W badaniach nad potencjalnymi terapiami COVID-19 z użyciem komórek macierzystych zwrócono także uwagę na pęcherzyki zewnątrzkomórkowe

wydzielane poza komórkę przez MSCs. Zgodnie ze stanowiskiem Międzynarodowego Towarzystwa Pęcherzyków Zewnątrzkomórkowych (ang. *International Society for Extracellular Vesicles*), pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi określa się cząsteczki naturalnie uwalniane z komórki, otoczone podwójną warstwą lipidową i nieposiadające zdolności do replikacji⁸⁷.

W skład EVs wchodzić może szereg substancji, jednakże w kontekście terapii COVID-19 szczególną uwagę należy zwrócić na małe niekodujące mikro-RNA (miRNA). Park i in. wykazali, że traktowanie komórek zakażonych wirusem SARS-COV-2 przez EVs pochodzące z MSCs powoduje tłumienie odpowiedzi zapalnej i hamowanie replikacji wirusa. W procesie tym uczestniczy łącznie 17 rodzajów miRNA, z czego ulegające najwyższej ekspresji to: miR-92a-3p, miR-26a-5p, miR-23a-3p, miR-103a-3p i miR-181a-5p⁸⁸. Zgodnie z wynikami badań Schultza i in. w sekretomie EVs pochodzących z różnych źródeł (szpik kostny, pępowina i tkanka tłuszczowa) zidentyfikować można w sumie 58 wspólnych rodzajów miRNA. Stwierdzono, że miRNA obecne w EVs oprócz działania przeciwzapalnego, mogą jednocześnie spełniać kilka ról, m.in. wpływać supresyjnie na geny śmierci komórkowej a także na niektóre czynniki biorące udział w procesie krzepnięcia, przyczyniając się do zmniejszenia stopnia uszkodzenia tkanek, co szczególnie jest pożądane w przypadku leczenia COVID-19⁸⁹.

Ważną rolę dla EVs upatruje się także w zapobieganiu powikłań sercowo-naczyniowych w przebiegu COVID-19. EVs pochodzące z MSCs lub komórek pochodzących z kardiosfery, zmodyfikowane w celu dostarczania leków zmniejszających burzę cytokinową podczas infekcji SARS-COV-2 mogą działać kardioprotekcyjnie hamując procesy zwłóknienia, a promując angiogenezę i zwiększenie kurczliwości serca⁹⁰. Podobne wnioski zostały wyciągnięte w kwestii udaru niedokrwiennego i wtórnego zapalenia nerwów jako powikłania COVID-19 o wysokim ryzyku niepełnosprawności lub śmierci. Wiele badań wskazuje na potencjalną rolę EVs w leczeniu zdarzeń niedokrwiennych, dlatego społeczność naukowa stoi przed wyzwaniem szerszego badania terapii opartych na wykorzystaniu EVs w leczeniu udaru niedokrwiennego będącego powikłaniem infekcji SARS-COV-2⁹¹. Ostatnie badania wskazują, że to właśnie dzięki mi-RNA zawartemu w EVs możliwe jest tłumienie reakcji zapalnej w obrębie nerwów przez działanie immunomodulujące na głąz⁹².

Wśród EVs wyróżnia się m.in. egzosomy, które zostały również zbadane w kontekście narzędzia terapeutycznego w terapii COVID-19. Sengupta i in. wykorzystali egzosomy- w postaci preparatu ExoFloTM wyizolowane z MSCs pochodzenia szpikowego do leczenia pacjentów z ciężkim przebiegiem

COVID-19. W wyniku tej próby 17 z 24 badanych pacjentów wróciło do zdrowia, 3 pozostało w stanie krytycznym, lecz stabilnym. W badanej grupie stwierdzono 4 zgony, jednakże nie były one związane z zastosowanym leczeniem. Po jednorazowym wstrzyknięciu ExoFloTM zaobserwowano ustabilizowanie liczby neutrofilii i leukocytów oraz obniżenie poziomu wskaźników stanu zapalnego- CRP, ferrytyny, a także D-Dimerów⁹³. Zgodnie z Babajani i in. egzosomy mogą pełnić również znaczącą rolę w procesie transferu mitochondriów z MSCs do zakażonej wirusem SARS-COV-2 komórki. Teoria ta wymaga szerszych badań, ponieważ mitochondria na swojej zewnętrznej błonie zawierają mitochondrialne przeciwwirusowe białko sygnalizacyjne (ang. *mitochondrial antiviral-signaling protein*, MAVS), które dzięki stymulowaniu produkcji interferonu i pobudzaniu wrodzonej odporności immunologicznej może okazać się nową metodą w walce z zakażeniem wirusem SARS-COV-2⁹⁴. Terapia z użyciem egzosomów ma szansę stać się nowym sposobem bezkomórkowego leczenia COVID-19, ze względu na ich właściwości immunomodulujące, regeneracyjne i przeciwdrobnoustrojowe. Dodatkową zaletą takiej terapii w porównaniu z użyciem samych MSCs jest możliwość jednoczesnego dostarczenia leków za pomocą egzosomów. Obecnych jest wiele doniesień dotyczących wpływu MSCs na poszczególne tkanki, zatem konieczne jest sprawdzenie czy egzosomy charakteryzują się taką samą swoistością wobec tkanki docelowej jak MSCs z których pochodzą⁹⁵. Niestety, potencjalna terapia z wykorzystaniem egzosomów wydaje się być na chwilę obecną obarczoną wieloma problemami technicznymi sposobem leczenia COVID-19. Trudności te dotyczą m.in. sposobów produkowania, izolowania, oczyszczania egzosomów, a także wytwarzania ich w wystarczająco dużych ilościach⁹⁶.

Wykazano również, że podawanie pacjentom sekretom wyizolowanego z MSCs może być równie skutecznym podejściem w leczeniu ciężkiego przebiegu COVID-19. Abdullah i in. przeprowadzili wieloośrodkowe, randomizowane, badanie z podwójnie ślepą próbą z grupą badaną i kontrolną liczącą po 20 osób. W 14 dniu po podaniu przygotowanego preparatu z sekretom MSCs poziom markerów stanu zapalnego w grupie kontrolnej był znacząco zwiększony w porównaniu z grupą badaną. Wykazano ponadto brak działań niepożądanych takiej terapii⁹⁷. Podobnej próby podjął się Putra i in. wykorzystując sekretom MSCs poddanych niedotlenieniu, ze względu na poprzednie przypuszczenia o zwiększonym wydzielaniu czynników przeciwzapalnych przez MSCs poddanych takim warunkom. Terapia ta wykorzystana u trzech pacjentów z ciężkim przebiegiem COVID-19 spowodowała u badanych

znaczny spadek D-dimerów i CRP, a także poprawę stanu pacjenta ocenianą w badaniach radiologicznych, gazometrycznych i hematologicznych⁹⁸.

8. Ograniczenia i perspektywy terapii COVID-19 z użyciem MSCs

Mimo rozpoczęcia procesu powszechnych szczepień i prowadzenia wielu prób klinicznych związanych z leczeniem COVID-19, a szczególnie o ostrym przebiegu, często ze współistniejącym uszkodzeniem wielu narządów, wciąż palącym problemem wydaje się być znalezienie specyficznego leku dla chorych na COVID-19. Trwająca od kilku lat popularność terapii komórkowych spowodowała w czasie pandemii wzrost doniesień naukowych na temat ich zastosowania w terapii COVID-19. Istnieje jednak wiele ograniczeń dotyczących zastosowania w praktyce klinicznej terapii z zastosowaniem komórek macierzystych. Przede wszystkim konieczne jest ustandaryzowanie protokołów i schematów wlewów MSCs z ustaleniem konkretnej dawki oraz interwałów podania MSCs w zależności od stanu pacjenta⁹⁹. Istotną kwestią są odpowiednio dobrane kryteria doborów dawców. Aby konkretna linia komórkowa mogła zostać użyta w terapii chorych, konieczne jest scharakteryzowanie markerów wytwarzanych przez konkretne komórki, ich potencjału wzrostu i różnicowania, a także potencjału leczniczego mierzonego jako siła działania i wywoływania pożądanych efektów terapeutycznych¹⁰⁰. Dodatkowo cennym narzędziem byłoby wdrożenie systemu klasyfikowania pacjentów zgodnie z ich stanem klinicznym w celu wydajnego leczenia za pomocą komórek macierzystych. Taki system prezentujący inteligentne ramy transfuzji MSC w czasie rzeczywistym oparte na wielokryterialnych metodach podejmowania decyzji został zaprezentowany przez Alsalem i in.¹⁰¹. Ponadto ważnymi kwestiami, które muszą zostać precyzyjniej zbadane w pierwszej kolejności są: los MSCs po infuzji dożylniej, możliwość ewentualnego usunięcia MSCs z ustroju przez komórki układu odpornościowego, a także potencjalna, niekorzystna rola MSCs w rozwoju lekooporności. Dodatkowo należy poznać konkretne mechanizmy, które pozwalają na doprowadzenie MSCs *stricto* do miejsca zapalenia¹⁰².

Badania i próby kliniczne nad użyciem MSCs w terapii COVID-19 trwają nieprzerwanie od początku pandemii na całym świecie m.in. w Chinach, Francji, Jordanii czy Brazylii. W wielu krajach badania nad komórkami macierzystymi podlegają bardzo ścisłym regulacjom. W Chinach, gdzie przeprowadzanych jest wyjątkowo dużo prób użycia MSCs, nadzór nad próbami klinicznymi prowadzi: Chińska Narodowa Komisja Zdrowia i Chiński

Narodowy Instytut Kontroli Żywności i Leków, a także Narodowa Komisja Terapii Komórkami Macierzystymi ds. COVID-19, która zaproponowała system oceny powodzenia terapii z użyciem MSCs zgodnie z zasadą: Regulacja-Nauka-Komórki-Postęp-Jakość (ang. *Regulation-Science-Cells-Progress-Quality*, RSCPQ)¹⁰³. W kontekście etycznym należy również uregulować kwestie związane z wykorzystaniem komórek macierzystych pochodzenia płodowego i niemowlęcego (w tym także MSCs), a także potwierdzić bezpieczeństwo terapii z ich użyciem w badaniach długoterminowych¹⁰⁴.

Mimo coraz większej powszechności szczepień trudne wydaje się być określenie czasu ochrony zapewnianej przez szczepionki. Dodatkowym ograniczeniem jest brak gwarancji co do ich całkowitej skuteczności. Zatem ze względu na ciężkie powikłania COVID-19 konieczne jest dopracowanie metod leczenia już zakażonych wirusem chorych. Mimo licznych ograniczeń i problemów, którym muszą sprostać badacze takich jak: brak badań przedklinicznych z użyciem zwierząt SARS-COV-2, trudniejsza rekrutacja pacjentów ze względu na zmniejszający się odsetek chorych w ciężkim stanie oraz trudności z normalizacją techniki i źródeł izolowania MSCs, terapia ta wciąż określana jest jako obiecująca i znacząca¹⁰⁵. Jednakże, wobec trwającego od początku pandemii ogromnego optymizmu związanego z potencjalną rolą komórek macierzystych w leczeniu COVID-19, Międzynarodowe Towarzystwo Badań nad Komórkami Macierzystymi (ang. *International Society for Stem Cell Research*, ISSCR) w marcu 2020r. zajęło zdecydowane stanowisko w sprawie przedwczesnego marketingu i przeprowadzania terapii z użyciem MSCs w COVID-19, które nie zostały poddane rygorystycznym badaniom klinicznym, a stały się przedmiotem komercyjnych, niesprawdzonych metod w branży klinik komórek macierzystych¹⁰⁶. Dotychczasowe badania przedkliniczne i badania dotyczące mechanizmów działania wirusa SARS-COV-2, a także działanie MSCs w terapii COVID-19 powinny być wsparciem dla projektowania szerokich badań, które spełniają najwyższe standardy naukowe. Dzięki temu możliwe będzie zaprojektowanie sprawdzonych protokołów przeszczepiania MSCs o potwierdzonej skuteczności, a w późniejszym etapie wprowadzenie terapii z użyciem MSCs do praktyki klinicznej¹⁰⁷.

9. Podsumowanie

Pandemia COVID-19 jest bezprecedensową sytuacją. W obliczu tego problemu naukowcy z całego świata stanęli przed wyzwaniem opracowania metod ograniczenia rozprzestrzeniania wirusa SARS-CoV-2 oraz leczenia

osób, które uległy zakażeniu. U części pacjentów przebieg choroby jest bardzo ciężki i wiąże się z licznymi powikłaniami. Brak skutecznego celowanego leczenia skłonił do poszukiwania nowoczesnych terapii m.in. wykorzystujących komórki macierzyste, które od wielu lat znajdują zastosowanie w różnych dziedzinach medycyny. MSCs dzięki swoim właściwościom immunomodulującym oraz zdolności do zmniejszenia wydzielania cytokin prozapalnych w przebiegu ostrego stanu zapalnego są wciąż testowane jako potencjalna metoda leczenia ciężkiego przebiegu COVID-19. Potencjał regeneracyjny i immunomodulujący MSCs został udowodniony już przed wybuchem pandemii m.in. w innych chorobach wirusowych i tych, uszkadzających tkankę płucną. Zastosowanie komórkowych terapii mimo wielu korzyści wiąże ze sobą szereg ograniczeń. Są to m.in. zagrożenie różnicowaniem się w kierunku tkanki nowotworowej, brak ustandaryzowanych protokołów i schematów izolowania oraz podawania komórek, dobór odpowiednich dawców, zagrożenie powstania lekooporności. Poza komórkami zwrócono również uwagę na możliwości terapeutyczne substancji i cząsteczek wydzielanych przez MSCs. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EVs) mogą stanowić narzędzie terapeutyczne w leczeniu COVID-19 dzięki swoim właściwościom zmniejszającym proces zapalny, ograniczając burzę cytokinową oraz hamując replikację wirusa. Możliwości terapeutyczne przedstawionych metod leczenia są ogromne, lecz wybór najskuteczniejszej z nich, wymaga dalszych szczegółowych badań.

Referencje

1. Ciotti, M., Angeletti, S., Minieri, M., Giovannetti, M., Benvenuto, D., Pascarella, S., ... & Ciccozzi, M. (2019). COVID-19 outbreak: an overview. *Chemotherapy*, 64(5-6), 215-223
2. Saldanha-Araujo, F., Melgaço Garcez, E., Silva-Carvalho, A. E., & Carvalho, J. L. (2020). Mesenchymal stem cells: a new piece in the puzzle of COVID-19 treatment. *Frontiers in immunology*, 11, 1563.
3. Felsenstein, S., Herbert, J. A., McNamara, P. S., & Hedrich, C. M. (2020). COVID-19: Immunology and treatment options. *Clinical immunology*, 215, 108448.
4. Solter, D. (2006). From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research. *Nature Reviews Genetics*, 7(4), 319-327.

5. Alanazi, A. (2021). COVID-19 and the Role of Stem Cells. *Regenerative Therapy*, 18, 334-338.
6. Lango, M. N. (2020). How did we get here? Short history of COVID-19 and other coronavirus-related epidemics. *Head & neck*, 42(7), 1535-1538.
7. Chlamydas, S., Papavassiliou, A. G., & Piperi, C. (2021). Epigenetic mechanisms regulating COVID-19 infection. *Epigenetics*, 16(3), 263-270.
8. Bao, L., Deng, W., Huang, B., Gao, H., Liu, J., Ren, L., ... & Qin, C. (2020). The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice. *Nature*, 583(7818), 830-833.
9. Hu, B., Huang, S., & Yin, L. (2021). The cytokine storm and COVID-19. *Journal of medical virology*, 93(1), 250-256.
10. Touma, M. (2020). COVID-19: molecular diagnostics overview. *Journal of molecular medicine*, 98(7), 947-954.
11. Tang, Y., Liu, J., Zhang, D., Xu, Z., Ji, J., & Wen, C. (2020). Cytokine storm in COVID-19: the current evidence and treatment strategies. *Frontiers in immunology*, 1708.
12. Bianco, P., Robey, P. G., & Simmons, P. J. (2008). Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell stem cell*, 2(4), 313-319.
13. Szabłowska-Gadomska, I., Bużańska, L., & Małecki, M. (2017). Właściwości komórek macierzystych, regulacje prawne oraz zastosowanie w medycynie. *Postepy Hig Med Dosw (online)*, 71, 1216-1230.
14. Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., & Rybak, Z. (2019). Stem cells: past, present, and future. *Stem cell research & therapy*, 10(1), 1-22.
15. Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research*, 9(5), 641-650.
16. Dominici, M. L. B. K., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., ... & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells.

- The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317.
17. Satué, M., Schüler, C., Ginner, N., & Erben, R. G. (2019). Intra-articularly injected mesenchymal stem cells promote cartilage regeneration, but do not permanently engraft in distant organs. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.
18. Utomo, D. N., Mahyudin, F., Wardhana, T. H., Purwati, P., Brahmana, F., & Gusti, A. W. R. (2019). Physicobiochemical characteristics and chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (hBM-MSCs) in biodegradable porous sponge bovine cartilage scaffold. *International journal of biomaterials*, 2019.
19. Zhang, Y., Xing, Y., Jia, L., Ji, Y., Zhao, B., Wen, Y., & Xu, X. (2018). An in vitro comparative study of multisource derived human mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. *Stem cells and development*, 27(23), 1634-1645.
20. Ezhilarasu, H., Sadiq, A., Ratheesh, G., Sridhar, S., Ramakrishna, S., Ab. Rahim, M. H., ... & Reddy, V. J. (2019). Functionalized core/shell nanofibers for the differentiation of mesenchymal stem cells for vascular tissue engineering. *Nanomedicine*, 14(2), 201-214.
21. Uccelli, A., Moretta, L., & Pistoia, V. (2006). Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *European journal of immunology*, 36(10), 2566-2573
22. Prasanna, S. J., Gopalakrishnan, D., Shankar, S. R., & Vasandan, A. B. (2010). Pro-inflammatory cytokines, IFN γ and TNF α , influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. *PloS one*, 5(2), e9016.
23. Andrzejewska, A., Lukomska, B., & Janowski, M. (2019). Concise review: mesenchymal stem cells: from roots to boost. *Stem cells*, 37(7), 855-864.
24. Thompson, M., Mei, S. H., Wolfe, D., Champagne, J., Fergusson, D., Stewart, D. J., ... & McIntyre, L. (2020). Cell therapy with intravascular administration of mesenchymal stromal cells continues to appear safe: an updated systematic review and meta-analysis. *EClinicalMedicine*, 19, 100249.

25. Lukomska, B., Stanaszek, L., Zuba-Surma, E., Legosz, P., Sarzynska, S., & Drela, K. (2019). Challenges and controversies in human mesenchymal stem cell therapy. *Stem cells international*, 2019.
26. Atoui, R., & Chiu, R. C. (2012). Concise review: immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells in cellular transplantation: update, controversies, and unknowns. *Stem cells translational medicine*, 1(3), 200-205.
27. Yoo, K. H., Jang, I. K., Lee, M. W., Kim, H. E., Yang, M. S., Eom, Y., ... & Koo, H. H. (2009). Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. *Cellular immunology*, 259(2), 150-156.
28. Krampera, M., Cosmi, L., Angeli, R., Pasini, A., Liotta, F., Andreini, A., ... & Annunziato, F. (2006). Role for interferon- γ in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem cells*, 24(2), 386-398.
29. William, T. T., Pendleton, J. D., Beyer, W. M., Egalka, M. C., & Guinan, E. C. (2003). Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*, 75(3), 389-397.
30. Kanai, R., Nakashima, A., Doi, S., Kimura, T., Yoshida, K., Maeda, S., ... & Masaki, T. (2021). Interferon- γ enhances the therapeutic effect of mesenchymal stem cells on experimental renal fibrosis. *Scientific reports*, 11(1), 1-14.
31. Bernardo, M. E., & Fibbe, W. E. (2013). Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell stem cell*, 13(4), 392-402.
32. English, K., Barry, F. P., & Mahon, B. P. (2008). Murine mesenchymal stem cells suppress dendritic cell migration, maturation and antigen presentation. *Immunology letters*, 115(1), 50-58.
33. Gomzikova, M. O., James, V., & Rizvanov, A. A. (2019). Therapeutic application of mesenchymal stem cells derived extracellular vesicles for immunomodulation. *Frontiers in immunology*, 10, 2663.

34. Hu, H., Wang, D., Li, L., Yin, H., He, G., & Zhang, Y. (2021). Role of microRNA-335 carried by bone marrow mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles in bone fracture recovery. *Cell Death & Disease*, 12(2), 1-16.
35. Kraińska, M. M., Pietrkowska, N., Turlej, E., Zongjin, L., & Marycz, K. (2021). Extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells as a potential therapeutic agent in acute kidney injury (AKI) in felines: review and perspectives. *Stem Cell Research & Therapy*, 12(1), 1-16.
36. Herman, S., Fishel, I., & Offen, D. (2021). Intranasal delivery of mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles for the treatment of neurological diseases. *Stem Cells*, 39(12), 1589-1600.
37. Levy, O., Zhao, W., Mortensen, L. J., LeBlanc, S., Tsang, K., Fu, M., ... & Karp, J. M. (2013). mRNA-engineered mesenchymal stem cells for targeted delivery of interleukin-10 to sites of inflammation. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 122(14), e23-e32.
38. Klingemann, H., Matzilevich, D., & Marchand, J. (2008). Mesenchymal stem cells—sources and clinical applications. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 35(4), 272-277.
39. Jiang, B., Yan, L., Wang, X., Li, E., Murphy, K., Vaccaro, K., ... & Xu, R. H. (2019). Concise Review: Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Pluripotent Cells, an Unlimited and Quality-Controllable Source for Therapeutic Applications. *Stem cells*, 37(5), 572-581.
40. Kim, S., Lee, S. K., Kim, H., & Kim, T. M. (2018). Exosomes secreted from induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells accelerate skin cell proliferation. *International journal of molecular sciences*, 19(10), 3119.
41. Jiang, D., Xiong, G., Feng, H., Zhang, Z., Chen, P., Yan, B., ... & Lian, Q. (2019). Donation of mitochondria by iPSC-derived mesenchymal stem cells protects retinal ganglion cells against mitochondrial complex I defect-induced degeneration. *Theranostics*, 9(8), 2395.

42. Li, X., Michaeloudes, C., Zhang, Y., Wiegman, C. H., Adcock, I. M., Lian, Q., ... & Chung, K. F. (2018). Mesenchymal stem cells alleviate oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction in the airways. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(5), 1634-1645.
43. Karaöz, E., Okçu, A., Gacar, G., Sağlam, Ö., Yürüker, S., & Kenar, H. (2011). A comprehensive characterization study of human bone marrow mscs with an emphasis on molecular and ultrastructural properties. *Journal of cellular physiology*, 226(5), 1367-1382.
44. Lin, H., Sohn, J., Shen, H., Langhans, M. T., & Tuan, R. S. (2019). Bone marrow mesenchymal stem cells: Aging and tissue engineering applications to enhance bone healing. *Biomaterials*, 203, 96-110.
45. Sekiya, I., Larson, B. L., Vuoristo, J. T., Cui, J. G., & Prockop, D. J. (2004). Adipogenic differentiation of human adult stem cells from bone marrow stroma (MSCs). *Journal of Bone and Mineral Research*, 19(2), 256-264.
46. Karaoz, E., Aksoy, A., Ayhan, S., Sarıboyacı, A. E., Kaymaz, F., & Kasap, M. (2009). Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochemistry and cell biology*, 132(5), 533.
47. McClain Caldwell, I., Hogden, C., Nemeth, K., Boyajian, M., Krepuska, M., Szombath, G., ... & Mezey, E. (2020). Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (MSCs) modulate the inflammatory character of alveolar macrophages from sarcoidosis patients. *Journal of clinical medicine*, 9(1), 278.
48. Hu, J., Zhao, W., Huang, Y., Wang, Z., Jiang, T., & Wang, L. (2019). MiR-1180 from bone marrow MSCs promotes cell proliferation and glycolysis in ovarian cancer cells via SFRP1/Wnt pathway. *Cancer cell international*, 19(1), 1-10.
49. Lotfy, A., El-Sherbiny, Y. M., Cuthbert, R., Jones, E., & Badawy, A. (2019). Comparative study of biological characteristics of mesenchymal stem cells isolated from mouse bone marrow and peripheral blood. *Biomedical reports*, 11(4), 165-170.

50. int Anker, P. S., Scherjon, S. A., Kleijburg-Van der Keur, C., Noort, W. A., Claas, F. H., Willemze, R., ... & Kanhai, H. H. (2003). Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood*, 102(4), 1548-1549.
51. Lee, O. K., Kuo, T. K., Chen, W. M., Lee, K. D., Hsieh, S. L., & Chen, T. H. (2004). Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*, 103(5), 1669-1675.
52. Watson, N., Divers, R., Kedar, R., Mehindru, A., Mehindru, A., Borlongan, M. C., & Borlongan, C. V. (2015). Discarded Wharton jelly of the human umbilical cord: a viable source for mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 17(1), 18-24.
53. Suzuki, S., Muneta, T., Tsuji, K., Ichinose, S., Makino, H., Umezawa, A., & Sekiya, I. (2012). Properties and usefulness of aggregates of synovial mesenchymal stem cells as a source for cartilage regeneration. *Arthritis research & therapy*, 14(3), 1-13.
54. Valente, S., Alviano, F., Ciavarella, C., Buzzi, M., Ricci, F., Tazzari, P. L., ... & Pasquinelli, G. (2014). Human cadaver multipotent stromal/stem cells isolated from arteries stored in liquid nitrogen for 5 years. *Stem Cell Research & Therapy*, 5(1), 1-14.
55. Felix, R. G., Fabro, A. T., Vicentini-Oliveira, J. C., Bianchi, E. H., de Assis Golim, M., Cotrim, O. S., ... & Deffune, E. (2016). Rat mesenchymal stem cells from adipose tissue reduce bleomycin-induced lung remodeling in late stage. *Stem Cell Discovery*, 6(01), 24.
56. Averyanov, A., Koroleva, I., Konoplyannikov, M., Revkova, V., Lesnyak, V., Kalsin, V., ... & Baklaushev, V. (2020). First-in-human high-cumulative-dose stem cell therapy in idiopathic pulmonary fibrosis with rapid lung function decline. *Stem cells translational medicine*, 9(1), 6-16.
57. Chan, M. C., Kuok, D. I., Leung, C. Y., Hui, K. P., Valkenburg, S. A., Lau, E. H., ... & Peiris, J. M. (2016). Human mesenchymal stromal cells reduce influenza A H5N1-associated acute lung injury in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(13), 3621-3626.

58. Wang, X., Chen, H., Zeng, X., Guo, W., Jin, Y., Wang, S., ... & Mei, L. (2019). Efficient lung cancer-targeted drug delivery via a nanoparticle/MSC system. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 9(1), 167-176.
59. Eggenhofer, E., Benseler, V., Kroemer, A., Popp, F., Geissler, E., Schlitt, H., ... & Hoogduijn, M. J. (2012). Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. *Frontiers in immunology*, 3, 297
60. Li, L., Tian, H., Chen, Z., Yue, W., Li, S., & Li, W. (2011). Inhibition of lung cancer cell proliferation mediated by human mesenchymal stem cells. *Acta Biochim Biophys Sin*, 43(2), 143-148.
61. Cortes-Dericks, L., & Galetta, D. (2019). The therapeutic potential of mesenchymal stem cells in lung cancer: benefits, risks and challenges. *Cellular Oncology*, 42(6), 727-738.
62. Sutton, M. T., Fletcher, D., Ghosh, S. K., Weinberg, A., van Heeckeren, R., Kaur, S., ... & Bonfield, T. L. (2016). Antimicrobial properties of mesenchymal stem cells: therapeutic potential for cystic fibrosis infection, and treatment. *Stem cells international*, 2016.
63. Zumla, A., Wang, F. S., Ippolito, G., Petrosillo, N., Agrati, C., Azhar, E. I., ... & Maeurer, M. (2020). Reducing mortality and morbidity in patients with severe COVID-19 disease by advancing ongoing trials of Mesenchymal Stromal (stem) Cell (MSC) therapy—Achieving global consensus and visibility for cellular host-directed therapies. *International Journal of Infectious Diseases*, 96, 431-439.
64. Zhao, Y., Yan, Z., Liu, Y., Zhang, Y., Shi, J., Li, J., & Ji, F. (2021). Effectivity of mesenchymal stem cells for bleomycin-induced pulmonary fibrosis: a systematic review and implication for clinical application. *Stem Cell Research & Therapy*, 12(1), 1-14
65. Chena, J., Hua, C., Chena, L., Tangb, L., Zhub, Y., Xu, X., ... & Lia, L. (1920). Clinical study of mesenchymal stem cell treating acute respiratory distress syndrome induced by epidemic Influenza A (H7N9) infection, a hint for COVID-19 treatment.

66. Thompson, B. T., Chambers, R. C., & Liu, K. D. (2017). Acute respiratory distress syndrome. *New England Journal of Medicine*, 377(6), 562-572.
67. Wilson, J. G., Liu, K. D., Zhuo, H., Caballero, L., McMillan, M., Fang, X., ... & Matthay, M. A. (2015). Mesenchymal stem (stromal) cells for treatment of ARDS: a phase 1 clinical trial. *The Lancet Respiratory Medicine*, 3(1), 24-32.
68. Samara, A., & Herlenius, E. (2021). Is There an Effect of Fetal Mesenchymal Stem Cells in the Mother–Fetus Dyad in COVID-19 Pregnancies and Vertical Transmission?. *Frontiers in Physiology*, 11, 1874.
69. Zumla, A., Hui, D. S., Azhar, E. I., Memish, Z. A., & Maeurer, M. (2020). Reducing mortality from 2019-nCoV: host-directed therapies should be an option. *The Lancet*, 395(10224), e35-e36.
70. Liang, B., Chen, J., Li, T., Wu, H., Yang, W., Li, Y., ... & Hu, M. (2020). Clinical remission of a critically ill COVID-19 patient treated by human umbilical cord mesenchymal stem cells: A case report. *Medicine*, 99(31).
71. Tao, J., Nie, Y., Wu, H., Cheng, L., Qiu, Y., Fu, J., & Jiang, X. (2020). Umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in treating a critically ill COVID-19 patient. *Journal of Infection in Developing Countries*, 14(10).
72. Zhu, Y., Zhu, R., Liu, K., Li, X., Chen, D., Bai, D., ... & Zhao, R. C. (2020). Human umbilical cord mesenchymal stem cells for adjuvant treatment of a critically ill COVID-19 patient: a case report. *Infection and Drug Resistance*, 13, 3295.
73. Lanzoni, G., Linetsky, E., Correa, D., Messinger Cayetano, S., Alvarez, R. A., Kouroupis, D., ... & Ricordi, C. (2021). Umbilical cord mesenchymal stem cells for COVID-19 acute respiratory distress syndrome: A double-blind, phase 1/2a, randomized controlled trial. *Stem cells translational medicine*, 10(5), 660-673.
74. Zhang, Y., Ding, J., Ren, S., Wang, W., Yang, Y., Li, S., ... & Zhou, C. (2020). Intravenous infusion of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells as a potential

- treatment for patients with COVID-19 pneumonia. Stem cell research & therapy, 11, 1-6.
75. Leng, Z., Zhu, R., Hou, W., Feng, Y., Yang, Y., Han, Q., ... & Zhao, R. C. (2020). Transplantation of ACE2-mesenchymal stem cells improves the outcome of patients with COVID-19 pneumonia. Aging and disease, 11(2), 216.
76. Häberle, H., Magunia, H., Lang, P., Gloeckner, H., Körner, A., Koeppen, M., ... & Mirakaj, V. (2021). Mesenchymal stem cell therapy for severe COVID-19 ARDS. Journal of Intensive Care Medicine, 36(6), 681-688.
77. Avanzini, M. A., Mura, M., Percivalle, E., Bastaroli, F., Croce, S., Valsecchi, C., ... & Gnechi, M. (2021). Human mesenchymal stromal cells do not express ACE2 and TMPRSS2 and are not permissive to SARS-CoV-2 infection. Stem cells translational medicine, 10(4), 636-642.
78. Bakry, N. S., Abdelgawad, M., Abdel-Latif, A., & Lotfy, A. (2022). Mesenchymal stromal cells coated with anti-ACE2 antibodies might improve efficacy against COVID-19. Human Cell, 35(1), 418-420.
79. Tang, L., Jiang, Y., Zhu, M., Chen, L., Zhou, X., Zhou, C., ... & Li, L. (2020). Clinical study using mesenchymal stem cells for the treatment of patients with severe COVID-19. Frontiers of medicine, 14(5), 664-673.
80. Peng, H., Gong, T., Huang, X., Sun, X., Luo, H., Wang, W., ... & Li, H. (2020). A synergistic role of convalescent plasma and mesenchymal stem cells in the treatment of severely ill COVID-19 patients: a clinical case report. Stem Cell Research & Therapy, 11(1), 1-6.
81. Bloch, E. M., Shoham, S., Casadevall, A., Sachais, B. S., Shaz, B., Winters, J. L., ... & Tobian, A. A. (2020). Deployment of convalescent plasma for the prevention and treatment of COVID-19. The Journal of clinical investigation, 130(6), 2757-2765.
82. Meng, F., Xu, R., Wang, S., Xu, Z., Zhang, C., Li, Y., ... & Wang, F. S. (2020). Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cell therapy in patients with COVID-19: a phase 1 clinical trial. Signal transduction and targeted therapy, 5(1), 1-7.

83. Shi, L., Huang, H., Lu, X., Yan, X., Jiang, X., Xu, R., ... & Wang, F. S. (2021). Effect of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on lung damage in severe COVID-19 patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. *Signal transduction and targeted therapy*, 6(1), 1-9.
84. Shi, L., Yuan, X., Yao, W., Wang, S., Zhang, C., Zhang, B., ... & Wang, F. S. (2022). Human mesenchymal stem cells treatment for severe COVID-19: 1-year follow-up results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *EBioMedicine*, 75, 103789.
85. Shu, L., Niu, C., Li, R., Huang, T., Wang, Y., Huang, M., ... & Feng, G. (2020). Treatment of severe COVID-19 with human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Stem cell research & therapy*, 11(1), 1-11.
86. Kaushal, S., Khan, A., Deatrick, K., Ng, D. K., Snyder, A., Shah, A., ... & Hare, J. M. (2020). Intravenous Mesenchymal Stem Cells in Extracorporeal Oxygenation Patients with Severe COVID-19 Acute Respiratory Distress Syndrome. *MedRxiv*.
87. Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., ... & Jovanovic-Talisman, T. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of extracellular vesicles*, 7(1), 1535750.
88. Park, J. H., Choi, Y., Lim, C. W., Park, J. M., Yu, S. H., Kim, Y., ... & Moon, J. (2021). Potential therapeutic effect of micrnas in extracellular vesicles from mesenchymal stem cells against SARS-CoV-2. *Cells*, 10(9), 2393.
89. Schultz, I. C., Bertoni, A. P. S., & Wink, M. R. (2021). Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles carrying miRNA as a potential multi target therapy to COVID-19: an in silico analysis. *Stem cell reviews and reports*, 1-16.
90. Pironti, G., Andersson, D. C., & Lund, L. H. (2021). Mechanistic and therapeutic implications of extracellular vesicles as a potential link between Covid-19 and cardiovascular disease manifestations. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 197.

91. Norouzi-Barough, L., Asgari Khosroshahi, A., Gorji, A., Zafari, F., Shahverdi Shahraki, M., & Shirian, S. (2022). COVID-19-Induced Stroke and the Potential of Using Mesenchymal Stem Cells-Derived Extracellular Vesicles in the Regulation of Neuroinflammation. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 1-10.
92. Giunti, D., Marini, C., Parodi, B., Usai, C., Milanese, M., Bonanno, G., ... & Uccelli, A. (2021). Role of miRNAs shuttled by mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles in modulating neuroinflammation. *Scientific reports*, 11(1), 1-17.
93. Sengupta, V., Sengupta, S., Lazo, A., Woods, P., Nolan, A., & Bremer, N. (2020). Exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells as treatment for severe COVID-19. *Stem cells and development*, 29(12), 747-754.
94. Babajani, A., Hosseini-Monfared, P., Abbaspour, S., Jamshidi, E., & Niknejad, H. (2021). Targeted mitochondrial therapy with over-expressed MAVS protein from mesenchymal stem cells: a new therapeutic approach for COVID-19. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9.
95. Gupta, S., Krishnakumar, V., Sharma, Y., Dinda, A. K., & Mohanty, S. (2021). Mesenchymal stem cell derived exosomes: a nano platform for therapeutics and drug delivery in combating COVID-19. *Stem cell reviews and reports*, 17(1), 33-43.
96. Hosseini, N. F., Dalirfardouei, R., Aliramaei, M. R., & Najafi, R. (2022). Stem cells or their exosomes: which is preferred in COVID-19 treatment?. *Biotechnology Letters*, 1-19.
97. Abdullah, M., Pawitan, J. A., Irawan, C., Aditjaningsih, D., Liem, I. K., Sinto, R., ... & Dilogio, I. H. (2022). Effectiveness and safety profile of mesenchymal stem cell secretome as a treatment for severe cases of COVID-19: a randomized controlled trial. *F1000Research*, 11(143), 143.
98. Putra, A., Widyatmoko, A., Ibrahim, S., Amansyah, F., Amansyah, F., Berlian, M. A., ... & Rachmad, B. (2021). Case series of the first three severe COVID-19 patients treated with the secretome of hypoxia-mesenchymal stem cells in Indonesia. *F1000Research*, 10(228), 228.

99. Abu-El-Rub, E., Khasawneh, R. R., Almahasneh, F., Altaany, Z., Bataineh, N., Zegallai, H., & Sekaran, S. (2021). Mesenchymal stem cells and COVID-19: What they do and what they can do. *World Journal of Stem Cells*, 13(9), 1318.
100. Trivedi, A., Miyazawa, B., Gibb, S., Valanoski, K., Vivona, L., Lin, M., ... & Pati, S. (2019). Bone marrow donor selection and characterization of MSCs is critical for pre-clinical and clinical cell dose production. *Journal of translational medicine*, 17(1), 1-16.
101. Alsalem, M. A., Albahri, O. S., Zaidan, A. A., Al-Obaidi, J. R., Alnoor, A., Alamoodi, A. H., ... & Jumaah, F. M. (2022). Rescuing emergency cases of COVID-19 patients: An intelligent real-time MSC transfusion framework based on multicriteria decision-making methods. *Applied Intelligence*, 1-25.
102. Li, C., Zhao, H., & Wang, B. (2020). Challenges for mesenchymal stem cell-based therapy for COVID-19. *Drug Design, Development and Therapy*, 14, 3995.
103. Zhao, R. C. (2020). Stem cell-based therapy for coronavirus disease 2019. *Stem Cells and Development*, 29(11), 679-681.
104. Cuevas-Gonzalez, M. V., Garcia-Perez, Á., Gonzalez-Aragon Pineda, Á. E., Espinosa-Cristobal, L. F., Donohue-Cornejo, A., Tovar-Carrillo, K. L., ... & Cuevas-Gonzalez, J. C. (2021). Stem Cells as a Model of Study of SARS-CoV-2 and COVID-19: A Systematic Review of the Literature. *BioMed research international*, 2021.
105. Li, S., Zhu, H., Zhao, M., Liu, W., Wang, L., Zhu, B., ... & Jiang, X. (2022). When stem cells meet COVID-19: recent advances, challenges and future perspectives. *Stem Cell Research & Therapy*, 13(1), 1-16.
106. International Society for Stem Cell Research (ISSCR). ISSCR Statement Regarding the Marketing of Unproven Stem Cell Treatments for COVID-19, (<https://www.isscr.org/news-publicationsss/isscr-news-articles/article-listing/2020/03/06/isscr-statement-regarding-the-marketing-of-unproven-stem-cell-treatments-for-covid-19>), Dostęp z dnia 05.02.22r.

107. Khoury, M., Cuenca, J., Cruz, F. F., Figueroa, F. E., Rocco, P. R., & Weiss, D. J. (2020). Current status of cell-based therapies for respiratory virus infections: applicability to COVID-19. *European respiratory journal*, 55(6).

ZASTOSOWANIE ADUKANUMABU W PRZYZYNOWYM LECZENIU CHOROBY ALZHEIMERA

**Julia Koronczok, Donata Kowalczyk, Wiktoria Król,
Konrad Kulka, Patryk Kubiak**

Studenckie Koło Naukowe im. Zbigniewa Religii przy Katedrze Biofizyki w Zabrze,
Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Abstrakt:

W roku 2021 choroba Alzheimerera dotyczy już 44 mln ludzi, zaś średnio co trzy sekundy diagnozowany jest kolejny przypadek. Pogłębiające się zaburzenia pamięci i zachowania u osób dotkniętych tą chorobą w sposób znaczący upośledzają możliwość normalnego, pełnowartościowego funkcjonowania. Prowadzone od lat próby farmakologicznego zatrzymania postępu zmian neurodegeneracyjnych odpowiedzialnych za te zwyrodnienia, dotychczas nie przynosiły oczekiwanych rezultatów. Obecnie stosowane leczenie, za pomocą środków farmaceutycznych takich jak inhibitory acetylocholinesterazy (rywastygmina, galantamina), memantyna (inhibitor receptora NMDA) z jednoczesnym zastosowaniem diety śródziemnomorskiej (czynnik protekcyjny otępienia), ma charakter wyłącznie objawowy i nie likwiduje przyczyny choroby. Nowe perspektywy pojawiają się wraz z wprowadzeniem na rynek adukanumabu (produkowanego i sprzedawanego pod nazwą handlową Aduhelm), przeciwciała monoklonalnego, które wiąże się z wysokim powinowactwem z zagregowanym β -amyloidem ($A\beta$). Tym samym preparat ten zmniejsza liczbę blaszek amyloidu poprzez promowanie usuwania $A\beta$ w drodze fagocytozy za pośrednictwem receptora Fc. Zatwierdzenie Aduhelmu, w ramach procedury przyspieszonej rejestracji przez FDA, stwarza nie tylko nowe możliwości dla pacjentów z wczesną postacią choroby Alzheimerera, ale również rozbudza zainteresowanie innymi terapiami celowanymi ograniczającymi produkcję amyloidu.

Słowa kluczowe: adukanumab, β -amyloid, choroba Alzheimerera, neurologia, przeciwciała monoklonalne

Abstract:

By 2021, Alzheimer's disease already affects 44 million people, while on average, a new case is diagnosed every three seconds. The worsening memory and behavioral disorders of those affected significantly impair the ability to function normally and fully. Attempts over the years to stop the progression of neurodegenerative changes responsible for these degenerations have so far been unsuccessful. The current treatment, with pharmaceuticals such as acetylcholinesterase inhibitors (rivastigmine, galantamine), memantine (NMDA receptor inhibitor) with a Mediterranean diet (a protective factor for dementia), is only symptomatic and does not eliminate the cause of the disease. New perspectives are emerging with the launch of aducanumab (manufactured and marketed under the trade name Aduhelm), a monoclonal antibody that binds with high affinity to aggregated β -amyloid ($A\beta$). Thus, this formulation reduces the number of amyloid plaques by promoting the removal of $A\beta$ via Fc-receptor-mediated phagocytosis. The approval of Aduhelm, under the FDA's accelerated registration process, not only creates new opportunities for patients with early-onset Alzheimer's disease, but also sparks interest over other targeted therapies that reduce amyloid production.

Keywords: aducanumab, β -amyloid, Alzheimer's disease, neurology, monoclonal antibodies

1. Wstęp

Choroba Alzheimera (AD) jest najczęstszą przyczyną otępienia wśród ludzi w podeszłym wieku. Prawdopodobieństwo wystąpienia choroby zwiększa się z wiekiem, występując u 19% osób między 75. i 84. r.ż i 47% w wieku powyżej 84 r.ż.

Uznaje się, że peptydowe produkty degradacji białka APP, fibrylujące peptydy typu β -amyloidu ($A\beta$) są nierozzerwalnie związane z rozwojem choroby. Z racji lokalizacji genów specyficznych białek, biorących udział w patogenezie choroby, ryzyko AD jest podwyższone u osób z zespołem Downa i wśród osób z nadekspresją genu dla prekursora¹. W chorobie Alzheimera przemianom, uszkodzeniu i następczemu zanikowi ulegają komórki nerwowe wielu obszarów mózgu. Neurodegeneracja rozpoczyna się na poziomie allokory, stopniowo obejmując hipokamp, ciało migdałowate, wzgórze i przedmózgowie. W zaawansowanej formie choroby $A\beta$ znajduje się również w śródmózgowiu, dolnym pniu mózgu i korze mózdzku^{2,3}.

Zmiany te wywierają wtórne efekty kliniczne - dochodzi do spadku wyższych funkcji intelektualnych, upośledzenia umiejętności społecznych, pojawiają się problemy z pamięcią oraz zmiany nastroju i dezorientacja. W późniejszym okresie zaostrzania pierwotnych zmian i zajmowania coraz większych obszarów ośrodkowego układu nerwowego, stan chorego pogarsza się i staje się on głęboko niepełnosprawny, niemy oraz nieruchomy^{3,4}.

2. Patofizjologia

Patogenezę AD jest wieloczynnikowa. Głównym zaburzeniem w AD jest jednak gromadzenie dwóch białek, białka tau i amyloidu A β , w odpowiednich obszarach mózgu w postaci blaszek i splotów. Bezpośrednio mutacje w genie tau nie powodują jednak AD, podczas gdy mutacje i zmiana liczby kopii genu dla prekursora białka A β zwiększają ryzyko rozwoju choroby Alzheimera².

2.1. β - amyloid

Hipoteza amyloidu zakłada, że degradacja A β , pochodzącego z APP przez β - i γ -sekretazę, zmniejsza się zarówno z wiekiem jak i w związku z przebiegiem procesów patologicznych, co prowadzi do akumulacji peptydów A β 40 i A β 42^{4,7}. Złogi nierozpuszczalnego A β , wytrącają się wewnątrzkomórkowo, a po śmierci neuronu pozostają pozakomórkowo, głównie w obrębie pili nerwowej.

Wolny przebieg czasu akumulacji białka sprzyja jego modyfikacjom, tj. racemizacji, izomeryzacji, cyklizacji i oligomeryzacji. Początkowo małe oligomery tworzą coraz większe agregaty, które są składnikiem fazy. Obecnie przyjmuje się, że to właśnie pierwsze formy fizykochemicznie powstające na szlaku fazy i postaci nieco większe, ale nie fazy, są neurotoksyczne i odpowiadają za uszkodzenia komórek. Dodatkowo oligomery odpowiadają za zaburzenie czynności już istniejących synaps, zakłócając sygnalizację synaptyczną^{3,4}. Z kolei A β w postaci fazy zapoczątkowują reakcję mikrogleju i astrocytów^{4,5}. Prawdopodobnie również ta spolimeryzowana forma prowadzi do aktywacji kinaz odpowiadających za hiperfosforylację białka tau związanego z mikrotubulami i w efekcie za jego kumulację w postaci nierozpuszczalnych splotów neurofibrilarnych (ang. neurofibrillary tangles, NFT)^{3,5}.

3. Diagnostyka

Zaleca się stosowanie kilku etapowego procesu formułowania diagnostycznego, na który składa się odpowiednio wywiad z identyfikacją i klasyfikacją ogólnego poziomu upośledzenia, ocena postępu zmian z wykorzystaniem dostępnych testów i skal oraz zastosowanie badań laboratoryjnych i neuroobrazowania⁷.

3.1. Anamneza

Pierwszym krokiem w kierunku postawienia diagnozy AD jest rzetelny wywiad z pacjentem i z kompetentnymi ludźmi z jego najbliższego otoczenia. Na jego podstawie ocenia się czynności życiowe pacjenta i ustala objawy neuropsychiatryczne, takie jak apatia, zmiany nastroju, zaburzenia snu, zaburzenia poznawcze czy drażliwość, występowanie halucynacji, urojeń czy objawów afektywnych⁶. Uzupełnieniem anamnezy jest ogólne badanie somatyczne oraz neurologiczne.

3.2. Testy neuropsychologiczne

Wyraźny wpływ wieku, wykształcenia czy stanu emocjonalnego i sprawności zmysłów badanego na wynik, uniemożliwia stworzenie testu, który z wykorzystaniem wartości liczbowych umożliwiłaby ocenę demencji. Część wspomnianych ograniczeń można zniwelować wykorzystując ujednolicejące tabele i skale⁸.

Istnieje wiele skal do oceny stopnia otępienia przebiegających z zastosowaniem zarówno werbalnych jak i pisemnych odpowiedzi potencjalnie chorego. Na potrzeby tego artykułu istotna jest znajomość przynajmniej dwóch niżej opisanych.

3.2.1. Skala Klinicznej Oceny Demencji (ang. *Clinical Dementia Rating Sum of Boxes*, CDR-SB)

Skala CDR-SB cechuje się wysoką wiarygodnością i trafnością⁹⁻¹¹. Stanowi ona złożony miernik służący do oceny funkcji poznawczych i określenia stopnia zaawansowania ich zaburzenia. Instrument opiera się o niezależne, ustrukturyzowane wywiady z pacjentem i partnerem badania. Ocenie podlega sześć domen poznawczych i funkcjonalnych, zgrupowanych odpowiednio w kategoriach: pamięć, orientacja, ocena i rozwiązywanie problemów (funkcje poznawcze) oraz sprawy społeczne, dom i hobby oraz opieka osobista (funkcje funkcjonalne). Uzyskane informacje odnosi się do 5-stopniowej skali, w której wynik 0 sugeruje brak upośledzenia, a wyniki 0,5, 1, 2 i 3 oznaczają kolejno bardzo łagodną, łagodną, umiarkowaną łagodną i ostatecznie ciężką demencję^{7,9}. Kategorie CDR-CB i przypisane im sumy punktów przedstawia Tabela 1^{7,9,11}. CDR-SB syntetyzuje również informacje o już istniejącej

demencji i stopniu jej nasilenia odnosząc dane do poprzednich poziomów w kontinuum AD¹².

Tabela 1. Suma domen skali CDR-SB w określaniu stopnia demencji

Zakres CDR-SB	Przypisane zmiany funkcji
0	brak zmian
0,5-4,0	wątpliwe upośledzenie funkcji poznawczych
0,5-2,5	wątpliwe upośledzenie
3,0-4,0	bardzo łagodna demencja
4,5-9,0	łagodna demencja
9,5-15,5	umiarkowana demencja
16,0-18	ciężka demencja

3.2.2. Krótka Skala Oceny Stanu Psychicznego (ang. *Mini-Mental State Examination*, MMSE)

Test MMSE jest najczęściej stosowanym narzędziem przy podejrzeniu zaburzenia funkcji poznawczych, co może mieć związek z jego powszechnym zatwierdzeniem w wielu językach i krajach^{13,14}. Badanie składa się z 30 zagadnień, które umożliwiają ilościową ocenę funkcji poznawczych pacjenta. Obszary badane to odpowiednio: orientacja w czasie, zapamiętywanie, uwaga i liczenie, przypominanie, nazywanie, powtarzanie, rozumienie, czytanie, pisanie i rysowanie.

Maksymalnie zdobyć można 30 punktów. Punktem odcięcia przy stwierdzaniu otępienia są wyniki poniżej 24. Wartości w zakresach 23-19, 18-11, 10-0 punktów świadczą kolejno o otępieniu lekkiego i średniego stopnia oraz o głębokim otępieniu.

3.3. Badania laboratoryjne i biomarkery

Do charakterystycznych białek AD (markerów) zalicza się A β i białko tau. Za powszechny uznaje się fakt występowania tych białek w odpowiedniej proporcji w próbkach PMR pochodzących od pacjentów z AD. W PMR stwierdza się obniżenie poziomu A β i podwyższony poziom białka tau. Zmiany te występują już na wczesnym etapie choroby¹⁵. Problematiczne może być jednak uzyskanie próbki od osób starszych i w gorszej kondycji zdrowotnej, z tego względu przewagę nad klasycznymi metodami laboratoryjnymi zyskują metody neuroobrazowania.

3.4. Neuroobrazowanie

W przypadku diagnozowania AD na wczesnym etapie choroby, prawdopodobny wynik badania neurologicznego nie wykaże żadnych nieprawidłowości względem osób zdrowych, dlatego też wyniki testów i badań należy odnosić do otrzymanych skanów strukturalnych mózgu. Metody diagnozowania strukturalnego ujawniają atrofię i inne statyczne nieprawidłowości w obrębie mózgowia^{3,6,16}.

3.4.1. Rezonans magnetyczny (ang. *Magnetic Resonance Imaging*, MRI)

MRI jest pierwszym badaniem strukturalnym zalecanym w przypadku podejrzeń AD. W wyjątkowych sytuacjach, tj. gdy MRI jest przeciwwskazane lub niedostępne, zaleca się korzystanie z tomografii komputerowej (ang. Computed Tomography, CT). Występowanie AD potwierdza się na podstawie uwidocznienia zaniku hipokampa i redukcji objętości kory śródwęchowej^{7,16}. Skany strukturalne mogą także wykazywać hiperintensywność istoty białej, z przewagą w obrębie płata czołowego oraz zmniejszenie grubości kory regionów skroniowych, oczodołowo- czołowych i ciemieniowych^{16,17}.

W ostatnich latach coraz większą popularnością cieszy się funkcjonalny MRI, który służy ocenie aktywności mózgu. Metoda ta opiera się na wykorzystaniu sygnału zależnego od poziomu tlenu¹⁶.

4. Leczenie objawowe

Leczenie objawowe skupia się na ograniczeniu zaburzeń w zakresie funkcji poznawczych, psychicznych i zachowań związanych z otępieniem¹⁸. Obecnie w zastosowaniu są preparaty wywodzące się wyłącznie z dwóch grup leków, tj. inhibitorów acetylocholinesterazy, niekonkurencyjni antagoniści receptora NMDA.

Inhibitory acetylocholinoesterazy są najszerzej stosowaną grupą leków w AD. Na rynku znajdują się trzy leki z tej grupy: donepezyl, rywastygmina oraz galantamina⁶. Preparaty te zwiększają ilość dostępnej w synapsach acetylocholino i są najbardziej skuteczne w łagodnym i umiarkowanym stadium choroby. Uznaje się równość leków z tej grupy względem wywieranego efektu klinicznego^{6,19}.

Jedyny przedstawiciel drugiej grupy leków, memantyna przepisany jest wyłącznie pacjentom z średnim lub mocno zaawansowanym stadium

choroby, lub gdy inhibitory acetylocholinesterazy nie są tolerowane^{8,6,19}. Memantyna hamuje działanie glutaminianu poprzez niekompetycyjne wiązanie się z jego receptorem.

5. Adukanumab - nowe podejście do leczenia AD

Adukanumab (sprzedawany pod nazwą Alduhelm) jest przeciwciałem monoklonalnym przeznaczonym do leczenia AD, które selektywnie wiąże się z fibrylami β -amyloidu i rozpuszczalnymi oligomerami, białkami toksycznymi dla neuronów, odpowiadającymi za neurodegenerację w AD. Preparat ten zmniejsza ilość neurodegeneracyjnego białka poprzez promowanie usuwania A β na drodze fagocytozy za pośrednictwem receptora Fc. Komórkami, które posłużyły do wytworzenia rekombinowanych przeciwciał w procesie odwrotnej translacji, były limfocyty krwi osób zdrowych w podeszłym wieku, które miały prawidłowe funkcje poznawcze lub nieznaczny spadek funkcji poznawczych²⁰⁻²².

5.1. Badania kliniczne nad skutecznością Alduhelmu

Między październikiem 2012 a styczniem 2014 firma Biogen przeprowadziła pierwsze podwójnie ślepe, randomizowane badanie PRIME (NCT 01677572) oceniające skuteczność Alduhelmu wobec kontroli przyjmującej placebo. Kohorta obejmowała 165 pacjentów z klinicznym rozpoznaniem prodromalnego lub łagodnego AD i wizualnie dodatnim badaniem PET A β (43% pacjentów w stadium 3 i 57% pacjentów w stadium 4)²³⁻²⁵. Średni wiek pacjentów wynosił 73 lata, w przedziale od 51-91 lat. Pacjenci otrzymywali comiesięczne dożylnie wlewy adukanumabu w dawkach 1, 3, 6 lub 10 mg/kg m.c przez 44 tygodnie lub placebo przez okres 12 miesięcy²⁵. Spośród osób biorących udział w badaniu 125 zakończyło leczenie, a 40 przerwało leczenie z powodu zdarzeń niepożądanych lub wycofania zgody²⁴.

Wyniki badania wykazały znaczne zmniejszenie liczby blaszek amyloidowych zależne od dawki i czasu leczenia, tak że po zakończeniu badania prawie połowa pacjentów, którzy otrzymali dawkę 10 mg/kg m.c, miała ujemny wynik badania PET z amyloidem. Jednak oceny efektów klinicznych za pomocą skal klinicznych, po 6 i 12 miesiącach leczenia, były znacznie mniej pewne²³.

Kolejne dwa równoległe przeprowadzane badania ENGAGE (NCT 02477800) i EMERGE (NCT 02484547), o identycznym projekcie względem poprzedniego PRIME, przeprowadzono w 2015 roku²³. Wśród

uczestników znajdowali się pacjenci z klinicznym rozpoznaniem łagodnej choroby Alzheimera oraz z potwierdzoną obecnością patologicznego amyloidu (80% pacjentów w stadium 3 i 20% pacjentów w stadium 4)²⁵. W tym około 2/3 pacjentów okazało się nosicielami ApoE ε4²³. Uczestnicy zostali losowo przydzieleni do grup otrzymujących: małe dawki adukanumabu (3 mg/kg m.c [nosiciele ApoE ε4] lub 6 mg/kg m.c), wysokie dawki adukanumabu (10 mg/kg m.c) oraz placebo, co 4 tygodnie przez 18 miesięcy. Oba badania zakładały początkowy okres zwiększania dawki do wartości docelowej w czasie pierwszych 6 miesięcy. Grupie nosicieli ApoE ε4, która otrzymywała wysokie dawki leku, miareczkowano początkowo maksymalnie 6 mg/kg, po czym zwiększono dawkę do wartości maksymalnej (10 mg/kg m.c)^{23,25}.

Pierwszorzędowe wyniki odniesiono względem klasyfikacji w skali CDR-SB na początku badania. Drugorzędowymi punktami końcowymi były odpowiednio różnice wyników pacjentów w skalach: MMSE, 13-punktowej skali oceny choroby Alzheimera (ang. Alzheimer's Disease Assessment Scale-Cognitive Subscale, ADAS-Cog 13) oraz skali kooperacyjnego badania choroby Alzheimera (ang. Mild Cognitive Impairment MCI). Badania ENGAGE i EMERGE zostały przerwane, a ich analiza przebiegała w oparciu o określony z góry plan analizy statystycznej²³.

Na konferencji 22 października 2019 roku firma Biogen ujawniła, że w badaniu ENGAGE nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic między leczonymi adukanumabem a pacjentami przyjmującymi placebo, w odniesieniu do wyniku CDR-SB po 78 tygodniach. W badaniu EMERGE wykazano statystycznie istotny wpływ leczenia na zmianę wartości CDR-SB w porównaniu z placebo u 22% badanych^{23,25}.

5.2. Kryteria leczenia Alduhelmem

Po zatwierdzeniu adukanumabu przez amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków do leczenia choroby Alzheimera, grono ekspertów zebrało się w celu opracowania zgodnych zaleceń dotyczących właściwego stosowania leku w praktyce klinicznej. Eksperci sugerują, aby decyzja związana z wyborem terapii Alduhelmem była poprzedzona kompleksowymi dyskusjami z pacjentem i partnerem opiekuńczym w zakresie wymagań dotyczących terapii, oczekiwanego efektu leczenia, potencjalnego ryzyka i skutków ubocznych oraz bezpieczeństwa pacjenta. Zgodnie z zaleceniami ekspertów leczenie adukanumabem ma naśladować badania kliniczne fazy III EMERGE i ENGAGE²⁰. Zalecenia te obejmują kluczowe informacje o dawkowaniu, miareczkowaniu,

farmakokinetyce leku i działaniach niepożądanych oraz bardziej szczegółowe wskazówki dotyczące stosowania adukanumabu w praktyce klinicznej. Przełożenie wymagań protokołu badania klinicznego względem rzeczywistego zastosowania adukanumabu w praktyce podsumowano w Tabeli 2. Należy jednak pamiętać, że zalecenia ekspertów mogą ulegać zmianie w miarę publikacji kolejnych badań i danych dotyczących stosowania Alduhelmu²⁰.

Tabela 2. Kryteria włączenia do badania klinicznego i odpowiednie kryteria stosowania adukanumabu w praktyce klinicznej²⁰

Funkcja uczestnika	Kryteria włączenia do badania klinicznego	Właściwe zastosowanie w praktyce klinicznej
Wiek	50–85	Młodszy lub starsi pacjenci spełniający wszystkie pozostałe kryteria leczenia mogą być uważani za kandydatów do leczenia adukanumabem
Diagnoza	Kryteria kliniczne MCI z powodu AD lub łagodnego otępienia AD	Kryteria kliniczne MCI z powodu AD lub łagodnego otępienia AD
Skala wyników na początku	Globalny wynik CDR 0,5; MMSE 24-30;	MMSE 21-30 lub równoważny, taki jak MoCA 17-30
Stan amyloidu	PET z amyloidem (odczyt wizualny)	Wyniki badania PET z obecnością amyloidu (odczyt wizualny) lub płynu mózgowo-rdzeniowego zgodne z AD
Badania genetyczne	Zgoda na genotypowanie APOE	Genotypowanie należy omówić z pacjentem/partnerem opieki. Należy opisać ryzyko ARIA i ocenić preferencje pacjenta
Badanie neurologiczne	Wykluczono zaburzenia neurologiczne inne niż AD, udar mózgu i TIA	Wykluczono zaburzenia neurologiczne inne niż AD
Historia sercowo-naczyniowa	Dusznicza; zawał mięśnia sercowego; wykluczono zastoinową niewydolność serca	Wymagane stabilne warunki sercowo-naczyniowe; decyzja kliniczna może być podjęta na podstawie zdolności pacjenta do bezpiecznego udziału w schemacie terapeutycznym
Historia medyczna	Wykluczono: klinicznie istotną chorobę ogólnoustrojową; - cukrzyca, której nie można opanować; - niekontrolowane nadciśnienie (skurczowe > 165; rozkurczowe > 100); - historia raka, chyba że w remisji trwającej 5 lat lub zlokalizowanej na skórze lub prostaty; - upośledzona czynność wątroby, zapalenie wątroby; - zakażenie wirusem HIV	Wymagane stabilne warunki medyczne; decyzja kliniczna może być podjęta na podstawie zdolności pacjenta do bezpiecznego udziału w schemacie terapeutycznym
Historia psychiatryczna	Niestabilna choroba psychiczna w ciągu ostatnich 6 miesięcy; nadużywanie alkoholu lub substancji w ciągu ostatniego roku; stosowanie kannabinoidów; dodatnie testy moczu na wykluczone substancje	Musi być stabilny psychicznie; decyzja kliniczna może być podjęta na podstawie zdolności pacjenta do bezpiecznego udziału w schemacie terapeutycznym

Stan rozrod- czy	Wyłączono kobiety w ciąży lub karmiące piersią; kobiety w wieku rozrodczym muszą stosować antykoncepcję	Wyłączono kobiety w ciąży lub karmiące piersią; kobiety w wieku rozrodczym muszą stosować antykoncepcję
Stan krzep- nięcia	Zaburzenia krwawienia, z wyłączeniem antykoagulantów	Pacjenci przyjmujący antykoagulanty są wykluczeni
Leki to- warzyszające	Dozwolone inhibitory cholinesterazy i memantina	Pacjenci mogą być na standardowej opiece z inhibitorami cholinesterazy i memantyną
Wyjściowy rezonans magnetyczny	Wyjściowy wynik MRI wykluczający udział: ostry lub podostry krwotok, makrokrwotok, ponad 4 mikrokrwotoki, zawał korowy (>1,5 cm), 1 zawał lakunarny (>1,5 cm), powierzchowna syderoza lub rozlana choroba istoty białej	Pacjentów należy wykluczyć, jeśli istnieją dowody ostrego lub podostrego krwotoku, makrokrwotoku, powyżej 4 mikrokrwotoków, zawału kory (>1,5 cm), 1 zawału lakunarnego (>1,5 cm), >1 obszaru powierzchniowej syderozy lub rozlanej choroby istoty białej
Wsparcie opieki	Wiarygodny informator lub partner w opiece	Może mieszkać samodzielnie lub z partnerem do opieki
Świadoma zgoda	Musi być podpisany przez uczestnika i partnera opieki	Pacjent i partner opieki muszą rozumieć charakter i wymagania terapii (np. comiesięczne wlewy wykonywane bezterminowo) oraz oczekiwany wynik terapii (spowolnienie pogarszania się objawów klinicznych)

Zdiagnozowanie wczesnej postaci choroby Alzheimera u pacjentów kwalifikujących się do leczenia adukanumabem, wymaga odpowiedniej oceny diagnostycznej obejmującej:

- szczegółowy wywiad z pacjentem oceniający jego zmiany czynnościowe i stan behawioralny w okresie objawów poznawczych,
- ocenę, za pomocą standaryzowanych testów, pogorszenia funkcji poznawczych,
- szczegółowe badanie neurologiczne i fizyczne,
- wykaz zażywanych przez pacjenta leków i suplementów diety,
- badania laboratoryjne (pełna morfologia, panel elektrolitowy, TSH, lipidy i trójglicerydy, testy czynności wątroby, B₁₂ w surowicy).

Ocenę ilościową zmian poznawczych i czynnościowych u pacjentów z wczesnym AD realizuje się za pomocą skal klinicznych CDR i MMSE. Globalny wynik CDR dla pacjentów spełniających kryteria badań klinicznych to 0,5, a MMSE to 24-30. Eksperci zalecają jednak, aby do leczenia włączyć chorych z wynikiem MMSE wynoszącym 21 lub wyższym, ze względu na obiecujące wyniki pierwszego badania PRIME u pacjentów z punktacją MMSE 20-30 (Tabela 2)²⁰.

Wykazanie obciążenia amyloidem (dodatni wynik PET) ma szczególne znaczenie dla doboru odpowiedniej terapii celowanej. Nawet 40% pacjentów ze zdiagnozowaną wczesną postacią AD nie ma patologii amyloidowej²⁰. Gdy rozważane jest włączenie leczenia adukanumabem, potrzebne jest potwierdzenie rozpoznania AD poprzez interpretacje amyloidowego PET. Alternatywą dla amyloidowego PET jest nakłucie łędźwiowe i ocena biomarkerów płynu mózgowo-rdzeniowego. Na obecność AD może wskazywać: niski A β 42, niski stosunek A β 42/A β 40, nieprawidłowy stosunek A β 42/tau i nieprawidłowy stosunek A β 42/p-tau. Zmiany A β 42 w PMR związane są z odkładaniem A β w korze i często poprzedzają objawy oraz dodatni wynik PET amyloidu. Jednak brak dowodów na obecność blaszek amyloidowych, pomimo nieprawidłowego PMR, wyłącza pacjentów z programu leczenia adukanumabem. Zaleca się też powtórzenie badania PET z amyloidem w tej grupie osób po 1-3 latach²⁰.

Eksperti sugerują, aby programy oferujące leczenie Aduhelmem angażowały ludzi odpowiednio wykwalifikowanych w analizowaniu wyników amyloidowego PET, co zwiększa pewność diagnostyczną i szanse na pozytywną odpowiedź pacjenta na lek. Zaleca się, aby wszyscy pacjenci kwalifikowani do leczenia adukanumabem mieli rozpoznanie AD potwierdzone klinicznie zwalidowanymi badaniami amyloidu, takimi jak amyloid PET lub analiza płynu mózgowo-rdzeniowego²⁰.

5.3. Działania niepożądane

Adukanumab zwiększa częstość występowania zaburzeń obrazowania związanych z amyloidem (ang. amyloid-related imaging abnormalities, ARIA), które w badaniu MRI mogą być obserwowane jako wysięki mózgowe lub krwotoki. ARIA o typie wysiękowym (ARIA-E) lub typie krwotocznym (ARIA-H) to najczęstsze zdarzenia niepożądane wywołane przez adukanumab. Badania kliniczne III fazy ukazują, że ARIA (-E i/lub -H) zaobserwowano u 41% pacjentów leczonych preparatem Aduhelm dawką 10 mg/kg, w tym większość zdarzeń radiologicznych wstąpiła na początku leczenia (w ciągu pierwszych 8 dawek), szczególnie podczas miareczkowania^{20,25,26}. Epizody ARIA zwykle ustępowały w ciągu 4-16 tygodni²⁰. ARIA-E zaobserwowano u 35% pacjentów, w porównaniu z 3% pacjentów otrzymujących placebo. Częstość występowania ARIA-E była wyższa u nosicieli ApoE ϵ 4 niż u osób nieposiadających tego genu (odpowiednio 42% i 20%). Większość zdarzeń ARIA, wykrytych w MRI, było bezobjawowych. Wśród pacjentów

z objawową ARIA objawy łagodne zaobserwowano u 67,7% osób, umiarkowane u 28,3%, a ciężkie u 4%. Poważne objawy związane z ARIA odnotowano u 0,3% pacjentów²⁵. Najczęściej zgłaszanymi objawami były: splątanie lub zaburzenia stanu psychicznego (5%), zawroty głowy (4%), zaburzenia widzenia (2%) i nudności (2%). ARIA była skutecznie leczona - u większości pacjentów objawy kliniczne ustąpiły w okresie obserwacji. W trakcie badań u 6,2% pacjentów otrzymujących aducanumab i 0,6% pacjentów otrzymujących placebo ARIA doprowadziła do przerwania terapii^{20,25}.

Każdemu pacjentowi podczas leczenia adukanumabem należy wykonać rezonans magnetyczny w celu oceny obecności bezobjawowej ARIA przed 7. i 12. infuzją leku. W trakcie podawania pierwszych 8 dawek preparatu Alduhelm zaleca się szczególną czujność kliniczną. W przypadku stwierdzenia ciężkiej ARIA-H, leczenie można kontynuować dopiero po potwierdzeniu stabilności radiograficznej u pacjenta. Przy zaobserwowaniu ARIA-E lub łagodnej/umiarkowanej ARIA-H leczenie można kontynuować przy zachowaniu szczególnej ostrożności. Jeśli kolejne infuzje leku zostały tymczasowo wstrzymane, dawkowanie można wznowić przy tej samej dawce i zachowaniu odpowiedniego schematu leczenia. Wcześniej jednak należy obiektywnie rozważyć korzyści kliniczne dla pacjenta oraz ocenić potencjalne ryzyko leczenia zwiększoną dawką leku^{20,25}.

Do innych zdarzeń niepożądanych, różnych od ARIA, można zaliczyć: ból głowy (zgłaszany przez 20,5% pacjentów przyjmujących adukanumab względem 15,2% przyjmujących placebo), upadki (15% i 11,8% w placebo) i biegunkę (8,9% i 6,8% w placebo). Poważne zdarzenia niepożądane wystąpiły u 13,9% pacjentów otrzymujących placebo i 13,6% pacjentów otrzymujących aducanumab. Liczba zgonów wśród pacjentów leczonych Alduhelmem wynosiła 8, a u pacjentów otrzymujących placebo 5²⁵.

ARIA-E lub ARIA-H są bardziej powszechne u nosicieli genu APOEε4, dlatego w badaniach klinicznych wymagane były testy genetyczne w celu określenia genotypów uczestników. Wyczerpujące omówienie zwiększonego ryzyka ARIA u osób z allelem APOEε4, może wpłynąć na ostateczną decyzję pacjenta o leczeniu adukanumabem²⁰.

Oprócz badania genetycznego zaleca się wykonanie obrazowania mózgu metodą rezonansu magnetycznego w roku poprzedzającym rozpoczęcie terapii, aby wykluczyć obecność powierzchownej syderozy, krwotoku większego niż 1 cm, mikrokrwotoków w mózgu (więcej niż 4) czy rozsianej choroby istoty białej, co zwalnia z leczenia preparatem Alduhelm^{20,25}. CT nie dostarcza

szczegółowych informacji do monitorowania ARIA, dlatego osoby posiadające np. rozrusznik serca, nie mogą być leczone adukanumabem²⁰.

Zaburzenia krzepnięcia zwiększają również ryzyko wystąpienia ARIA. Pacjenci przyjmujący leki przeciwzakrzepowe lub z zaburzeniami krzepnięcia są wykluczeni z terapii Alduhelmem. U takich osób nie można także wykonać nakłucia lędźwiowego w celu zbadania biomarkerów płynu mózgowo-rdzeniowego. W terapii skojarzonej dopuszczalne są tylko leki przeciwapagacyjne²⁰.

Podczas badań klinicznych nie odnotowano żadnych interakcji lekowych, co umożliwia stosowanie przez pacjentów aducanumabu wraz z innymi lekami, takimi jak: inhibitory cholinesterazy (donepezyl, rywastygmina, galantamina), memantyna oraz środki psychotropowe (leki przeciwdepresyjne, przeciwpsychotyczne, nasenne). Inne zaburzenia neurologiczne oraz poważne choroby medyczne (np.: niewydolność serca, rak), które nie są ustabilizowane, mogą osłabić pozytywną odpowiedź pacjenta na leczenie. Dlatego eksperci zalecają, aby odroczyć leczenie u tych osób do momentu ustalenia stabilności behawioralnej oraz opanowania choroby²⁰.

6. Dostępność leku

Adukanumab nie jest dopuszczony do obrotu zarówno na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej jak i Europy. Mimo figurowania w Rejestrze Produktów Leczniczych zatwierdzonych przez FDA pod nazwą Alduhelm, lek w formie roztworu do wstrzykiwań, dostępny jest jedynie w Stanach Zjednoczonych. Nie podlega on refundacji²⁵.

7. Dyskusja

7 czerwca 2021 roku Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (FDA) ostatecznie zatwierdziła aducanumab w ramach procedury przyspieszonej rejestracji, wbrew zaleceniom Komitetu Doradczego ds. Leków Obwodowego i Ośrodkowego Układu Nerwowego (ang. Peripheral and Central Nervous System Drugs Advisory Committee, PCNSDAC)^{27,28}. Decyzję o znacznie przyspieszonym zatwierdzeniu adukanumabu FDA argumentowała wpływem leku na redukcję blaszek β -amyloidu oraz możliwością zapewnienia wcześniejszego dostępu do nowych, wartościowych terapii pacjentom z AD²⁹. Wraz z wprowadzeniem leczenia adukanumabem oczekuje się zmniejszenia blaszki amyloidowej i tym samym poprawy stanu klinicznego chorych. Spodziewane

korzyści spełniają według FDA standardy wymagane w procesie przyspieszonego zatwierdzenia leku, mimo braku pewności co do rzeczywistych efektów klinicznych^{27,29}.

Jednocześnie Komitet Doradczy ds. Leków Obwodowego i Ośrodkowego Układu Nerwowego nie zgodził się, aby rozważenie korzyści klinicznych z jednego udanego, zakończonego badania (PRIME) było traktowane jako podstawowy dowód potwierdzający zatwierdzenie. Zdaniem PCNSDAC wnioski uzyskane w pozostałych identycznie zaprojektowanych badaniach klinicznych III fazy, dotyczących choroby Alzheimera, nie są bezpośrednie i nie stanowią dowodu o skuteczności aducanumabu.²⁹ Wątpliwości budzi również fakt ich przerwania. Oba zostały zatrzymane po wczesnych analizach na danych z grudnia 2018 roku. Jednak firma Biogen ponownie przeanalizowała dane uzyskane z badań z uwzględnieniem pacjentów, którzy kontynuowali badania od 26.12.2018 roku do 21.03.2019 roku, czyli od daty granicznej do czasu kiedy ogłoszono daremność. Na tej podstawie stwierdzono, że jedno z badań wykazało pozytywne wyniki, co zostało częściowo potwierdzone prowadzonym równolegle innym badaniem³⁰.

W związku z przyspieszonym zatwierdzeniem sponsor badań (Biogen) zobowiązany jest do przeprowadzenia badań porejestacyjnych (badań potwierdzających fazy IV) w celu zweryfikowania przewidywanych korzyści klinicznych. Przy niewykazaniu korzyści wynikających z leczenia FDA zastosuje procedury regulacyjne wycofujące lek z rynku^{26,27,29}.

Ważną kwestią jest też cena leku, która wynosi około 56 000 USD na rok^{26,28,31}. Wysokie koszty leczenia adukanumabem implikują wiele problemów związanych z zaspokojeniem zapotrzebowania na lek wśród wszystkich pacjentów, którzy mogliby odnieść korzyści kliniczne. Stanowi to wyzwanie zarówno dla środowiska neurologów, którzy przepisują Alduhelm, jak i dla krajowych systemów ubezpieczeń zdrowotnych^{26,28}. Przeciwnicy aducanumabu obawiają się, że przyspieszone zatwierdzenie leku przez FDA zachęci innych sponsorów do daremnych inwestycji nad terapiami skierowanymi przeciwko amyloidowi, co odwróci uwagę od skutecznych działań zapobiegawczych tj. aktywność fizyczna czy lepsze wsparcie pacjenta po wystawieniu diagnozy³⁰.

Z drugiej strony dla zwolenników stworzenie przeciwciała monoklonalnego przeciwko A β w chorobie AD daje nadzieję na podobne podejście do problematyki i leczenia pozostałych chorób związanych z gromadzeniem pozakomórkowo i pozanaczyniowo w tkankach i narządach amyloidu. Do chorób o wspomnianej patogenie należą m.in. amyloidoza rodzinna, amyloidoza AL a także amyloidoza A β_2 m o lokalizacji kostno-stawowej. Być może

wprowadzenie na rynek pierwszego preparatu, o mechanizmie związanym z degradacją amyloidu stanie się konkurencją dla tradycyjnych złożonych metod leczenia, takich jak chemioterapia w przypadku amyloidozy AL, obarczonych licznymi, groźnymi działaniami niepożądanymi.

Referencje

1. Head E, Lott IT. Down syndrome and beta-amyloid deposition. *Curr Opin Neurol.* 2004;17(2):95-100. doi:10.1097/00019052-200404000-00003
2. Marszałek M. Choroba Alzheimer'a a produkty degradacji białka APP. *Biologia, patobiologia i fizykochemia fibrylujących peptydów – wybrane aspekty.* *Postepy Hig Med Dosw (online).* 2017;71:398-410. <https://phmd.pl/api/files/view/544357.pdf>. Accessed February 9, 2022
3. Tiwari S, Atluri V, Kaushik A, Yndart A, Nair M. Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *Int J Nanomedicine.* 2019;14:5541-5554. Published 2019 Jul 19. doi:10.2147/IJN.S200490
4. Leszek J. Choroba Alzheimer'a: obecny stan wiedzy, perspektywy terapeutyczne. *Pol Przegl Neurol.* 2012;8(3):101-106.
5. Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules.* 2020;25(24):5789. Published 2020 Dec 8. doi:10.3390/molecules25245789
6. Høgh P. [Alzheimer's disease]. *Ugeskr Laeger.* 2017;179(12):V09160686.
7. Li Y, Xiong C, Aschenbrenner AJ, et al. Item response theory analysis of the Clinical Dementia Rating. *Alzheimers Dement.* 2021;17(3):534-542. doi:10.1002/alz.12210
8. Hausz-Piskorz B, Buczkowski K. Diagnostyka i leczenie choroby Alzheimer'a w warunkach praktyki lekarza rodzinnego. *Forum Medycyny Rodzinnej* 2013;7(4):198-207
9. Huang HC, Tseng YM, Chen YC, Chen PY, Chiu HY. Diagnostic accuracy of the Clinical Dementia Rating Scale for detecting mild

- cognitive impairment and dementia: A bivariate meta-analysis. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2021;36(2):239-251. doi:10.1002/gps.5436
10. Grober E, Qi Q, Kuo L, Hassenstab J, Perrin RJ, Lipton RB. Stages of Objective Memory Impairment Predict Alzheimer's Disease Neuropathology: Comparison with the Clinical Dementia Rating Scale-Sum of Boxes. *J Alzheimers Dis*. 2021;80(1):185-195. doi:10.3233/JAD-200946
 11. Gallagher J, Rick J, Xie SX, et al. Psychometric Properties of the Clinical Dementia Rating Scale Sum of Boxes in Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis*. 2021;11(2):737-745. doi:10.3233/JPD-202390
 12. Lessov-Schlaggar CN, Del Rosario OL, Morris JC, Ances BM, Schlaggar BL, Constantino JN. Adaptation of the Clinical Dementia Rating Scale for adults with Down syndrome. *J Neurodev Disord*. 2019;11(1):39. Published 2019 Dec 16. doi:10.1186/s11689-019-9300-2
 13. O'Bryant SE, Waring SC, Cullum CM, et al. Staging dementia using Clinical Dementia Rating Scale Sum of Boxes scores: a Texas Alzheimer's research consortium study. *Arch Neurol*. 2008;65(8):1091-1095. doi:10.1001/archneur.65.8.1091
 14. Myrberg K, Hydén LC, Samuelsson C. The mini-mental state examination (MMSE) from a language perspective: an analysis of test interaction. *Clin Linguist Phon*. 2020;34(7):652-670. doi:10.1080/02699206.2019.1687757
 15. Beck B, Bożena S. Współczesna diagnostyka laboratoryjna choroby Alzheimera. *Laboratorium Medyczne*. 2019;1:40-44.
 16. Chandra A, Dervenoulas G, Politis M; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Magnetic resonance imaging in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *J Neurol*. 2019;266(6):1293-1302. doi:10.1007/s00415-018-9016-3
 17. van Oostveen WM, de Lange ECM. Imaging Techniques in Alzheimer's Disease: A Review of Applications in Early Diagnosis and Longitudinal Monitoring. *Int J Mol Sci*. 2021;22(4):2110. Published 2021 Feb 20. doi:10.3390/ijms22042110

18. Binert-Kusztal Ż., Starek M., Dąbrowska M. Neurodegeneration and the pharmacotherapeutic aspect of Alzheimer's disease. *Farm Pol.* 2021;77(7):451-457. doi:10.32383/farmpol/142108
19. Knapskog AB, Engedal K, Selbæk G, Øksengård AR. Alzheimers sykdom – diagnostikk og behandling [Alzheimer's disease – diagnosis and treatment]. *Tidsskr Nor Lægeforen.* 2021;141(7):10.4045/tidsskr.20.0919. Published 2021 Apr 29. doi:10.4045/tidsskr.20.0919
20. Cummings J., Aisen P., Apostolova L.G., Atri A., Salloway S., & Weiner M. (2021). Aducanumab: Appropriate Use Recommendations. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*, 1–13. <https://doi.org/10.14283/jpad.2021.41>
21. Tolar M., Abushakra S., Hey J. A., Porsteinsson A. & Sabbagh M. (2020). Aducanumab, gantenerumab, BAN2401, and ALZ-801-the first wave of amyloid-targeting drugs for Alzheimer's disease with potential for near term approval. *Alzheimer's Research & Therapy*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13195-020-00663-w>
22. Aducanumab (marketed as Aduhelm) Information. FDA.gov. 07.08.2021. Dostęp 08.02.2022. <https://www.fda.gov/drugs/post-market-drug-safety-information-patients-and-providers/aducanumab-marketed-aduhelm-information>. Dostęp 08.02.2022.
23. Schneider L. (2020). A resurrection of aducanumab for Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, 19(2), 111–112. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(19\)30480-6](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(19)30480-6)
24. Sevigny J., Chiao P., Bussière T., Weinreb P. H., Williams L., Maier M., Dunstan R., Salloway S., Chen T., Ling Y., O'Gorman J., Qian F., Arastu M., Li M., Chollate S., Brennan M. S., Quintero-Monzon O., Scannevin R. H., Arnold H. M., ... Sandrock A. (2016). The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature*, 537(7618), 50–56. <https://doi.org/10.1038/nature19323>
25. Alduhelm label. FDA.gov. Dostęp 08.02.2022. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/761178s000lbl.pdf.
26. Lalli G., Schott J. M., Hardy J. & De Strooper, B. (2021). Aducanumab: a new phase in therapeutic development for Alzheimer's disease? *EMBO Molecular Medicine*, 13(8). <https://doi.org/10.15252/emmm.202114781>

27. Dunn B., Stein P. & Cavazzoni P. (2021). Approval of Aducanumab for Alzheimer Disease-the FDA's Perspective. *JAMA Internal Medicine*. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2021.4607>
28. The Lancet Neurology. (2021). A contentious FDA ruling for Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, 20(8), 585. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(21\)00215-5](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(21)00215-5)
29. Cavazzoni P.. FDA's Decision to Approve New Treatment for Alzheimer's Disease. *FDA.gov*. 6.07.2021. Dostęp 08.02.2022. <https://www.fda.gov/drugs/news-events-human-drugs/fdas-decision-approve-new-treatment-alzheimers-disease>
30. Walsh S., Merrick R., Milne R. & Brayne C. (2021). Aducanumab for Alzheimer's disease? *BMJ*, n1682. <https://doi.org/10.1136/bmj.n1682>
31. Alexander G. C. & Karlawish, J. (2021). The Problem of Aducanumab for the Treatment of Alzheimer Disease. *Annals of Internal Medicine*. <https://doi.org/10.7326/m21-2603>

ZASTOSOWANIE KOMÓREK MACIERZYSTYCH W EKSPERYMENTALNEJ TERAPII BIELACTWA

**Patryk Kubiak¹, Julia Koronczok¹, Wiktoria Król¹,
Donata Kowalczyk¹, Konrad Kulka¹**

Studenckie Koło Naukowe im. Zbigniewa Religii przy Katedrze Biofizyki w Zabrze,
Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Abstrakt:

Bielactwo nabyte to autoimmunologiczna choroba charakteryzująca się postępowym niszczeniem dojrzałych melanocytów naskórka, które ulegają dysfunkcji i śmierci w nieznanym dotąd mechanizmie. Dotyczy ona około 1% populacji światowej. Nową nadzieję dla pacjentów niosą terapie eksperymentalne z zastosowaniem komórek macierzystych. Najnowsze badania nad patogenezą bielactwa wskazują, że zmienione chorobowo próbki skóry charakteryzują się unikalną ekspresją genów, z których jeden - PTEN wykazuje w nich zdecydowanie zwiększoną ekspresję. Dowody wskazują, że MSC mogą regulować ekspresję PTEN w melanocytach, a następnie zmniejszać upośledzenie spowodowane nadekspresją PTEN i stresem oksydacyjnym. MSC mogą celować w PTEN jako obiecujące leczenie bielactwa nabytego. W niniejszym przeglądzie przedstawione zostaną innowacyjne przeszczepy kokultur melanocytów z komórkami macierzystymi MSC, ADSCs oraz DMSCs, ich znaczenie i dalsze perspektywy w medycynie regeneracyjnej oraz badania nad komórkami iPSC.

Słowa kluczowe: bielactwo, komórki, macierzyste, PTEN

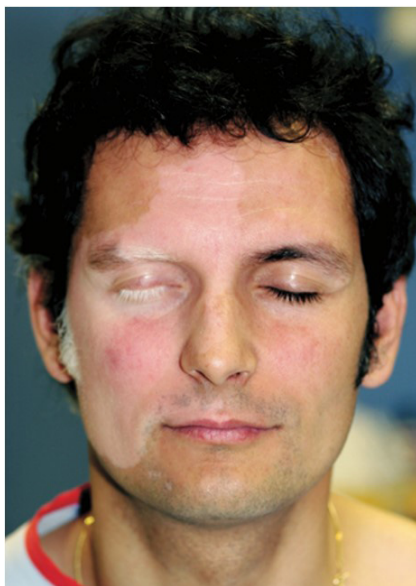
Abstract:

Vitiligo is an autoimmune disease characterised by the progressive destruction of mature epidermal melanocytes, which become dysfunctional and die by an unknown mechanism. It affects about 1% of the world population. Experimental stem cell therapies offer new hope for patients. Recent studies on the pathogenesis of vitiligo indicate that affected skin samples are characterised by a unique expression of genes, one of which, PTEN, shows markedly increased expression in them. Evidence suggests that MSCs can regulate PTEN expression in melanocytes and then reduce the impairment caused by PTEN overexpression and oxidative stress. MSCs may target PTEN as a promising treatment for vitiligo. In this review, innovative melanocyte coculture transplants with MSCs, ADSCs and DMSCs stem cells, their significance and further prospects in regenerative medicine and iPSC cell research will be presented.

Keywords: vitiligo, stem, cells, PTEN

1. Wstęp

Przypadki bielactwa nabytego odnotowano już w starożytnych pismach egipskich i hinduskich 3500 lat temu jako białe łatki na skórze¹. Bielactwo jest depigmentacyjną chorobą skóry, charakteryzującą się selektywną utratą melanocytów, co z kolei prowadzi do rozrzedzenia pigmentu w zmienionych obszarach skóry. Dotknięty zmianą obszar skóry jest pozbawiony melanocytów, wygląda jak kredowobiała plamka z wyraźnymi brzegami. Obecnie bielactwo klasyfikowane jest jako choroba autoimmunologiczna, związana z czynnikami genetycznymi i środowiskowymi, a także ze stresem metabolicznym, oksydacyjnym i zaburzeniami oddzielania komórek². W 2011 roku międzynarodowy konsensus podzielił bielactwo na dwie główne formy: bielactwo niesegmentowe (NSV) i bielactwo segmentowe (SV), a termin bielactwo został zdefiniowany na określenie wszystkich postaci NSV (w tym wariantu akrofazowego, słuzówkowego, uogólnionego, uniwersalnego, mieszanego i rzadkiego)³.



Rycina 1. Typowe bielactwo segmentowe twarzy z bielactwem brwi i rzęs⁴

2. Epidemiologia

Bielactwo jest najczęstszą chorobą depigmentacyjną skóry. Dotyka grupy etniczne i ludzi o wszystkich typach skóry. Częstość występowania bielactwa na świecie wynosi 0,5-1%, natomiast dokładna częstość występowania

jest trudna do oszacowania³. Dorośli i dzieci obu płci są w równym stopniu dotknięci chorobą, natomiast kobiety i dziewczęta częściej zgłaszają się na leczenie, prawdopodobnie ze względu na większe negatywne skutki społeczne dla dotkniętych kobiet i dziewcząt niż dla mężczyzn i chłopców^{5,6}. Bielactwo niesegmentowe zwykle występuje u ludzi młodych między 10. a 30. rokiem życia, ale może wystąpić w każdym wieku^{5,7,8,9}. Bielactwo segmentowe ma tendencję do występowania w młodym wieku, przed 30. rokiem życia w 87% przypadków¹⁰.

3. Objawy

Bielactwo charakteryzuje się występowaniem plam depigmentacyjnych (odbarwionych), które są dobrze odgraniczone od zdrowej skóry. Plamy mogą mieć wielkość od kilku milimetrów do kilku centymetrów o barwie białej lub mlecznej. Zmiany mogą przyjmować różne kształty od owalnych lub okrągłych do nawet wydłużonych¹¹.

W formie segmentowej bielactwa zmian może być jedna lub więcej, które mogą być umiejscowione wzdłuż linii Blaschko (są to występujące u każdego człowieka, szlaki migracji melanocytów tworzące linie na skórze. U zdrowych ludzi ich przebieg jest niewidoczny, zauważalny dopiero w przebiegu niektórych chorób, np. bielactwa). Są ograniczone do jednej połowy ciała i zazwyczaj nie przekraczają linii pośrodkowej¹².

W typie niesegmentowym bielactwa zmiany barwnikowe pojawiają się głównie w okolicach często ekspozowanych na światło słoneczne, takich jak: twarz, szyja, dystalne części kończyn. Plamy mogą pojawiać się również w innych okolicach ciała, w tym błon śluzowych¹³. W przypadku urazów, oparzeń, rozcięć skóry, a nawet lekkich otarć spowodowanych przez noszone ubrania, na ich miejscu pojawiają się nowe zmiany bielactwa - jest to zjawisko Koebnera i dotyczy nawet 20-60% przypadków¹⁴.

4. Etiopatogeneza

Bielactwo jest wieloczynnikowym schorzeniem, którego dokładny mechanizm rozwoju nie został jeszcze poznany. Na etiopatogenezę choroby ma wpływ wiele procesów prowadzących ostatecznie do destrukcji melanocytów¹¹. Powstało dotychczas kilka teorii objaśniających przyczyny bielactwa:

- genetyczna - badania epidemiologiczne wskazują, że czynniki genetyczne mogą predysponować do rozwoju bielactwa i mają tendencję do agregacji w rodzinach, chociaż ryzyko genetyczne nie jest bezwzględne¹⁵.
- stresu oksydacyjnego - zauważono, że melanocyty od pacjentów z bielactwem nabytym są bardziej podatne na stres oksydacyjny niż zdrowe kontrole. Dochodzi również do zaburzonego transferu elektronów i produkcji ATP w mitochondriach. Zmiany te mogą przyczyniać się do śmierci melanocytów zależnej od mitochondriów¹⁵.
- autoimmunologiczna - najlepiej udokumentowana hipoteza przyczyn bielactwa¹⁶. Częstość występowania u osób z bielactwem jednej lub kilku chorób o podłożu autoimmunizacyjnym wynosi od 14,4% do 25%, w surowicy pacjentów wykazano także obecność krążących przeciwciał przeciwko białkom melanocytów¹¹.
- autozapalna - melanocyty w odpowiedzi na stres wywołany chemicznie wydzielają egzosomy, które pobudzają wrodzony układ odpornościowy¹⁵. Egzosomy zawierają: antygeny melanocytów, miRNA, białka szoku cieplnego oraz inne białka, które działają jako wzorce molekularne związane z uszkodzeniem (DAMPs) i aktywują komórki dendrytyczne do produkcji cytokin prozapalnych⁴.
- neurogenna - założeniem tej teorii jest cytotoksyczny wpływ układu nerwowego na melanocyty, co może przyczyniać się do rozwoju bielactwa¹¹.
- zaburzeń przylegania,
- apoptotyczna,
- wieloczynnikowa¹⁷.

5. Diagnostyka

Rozpoznanie bielactwa opiera się głównie na rozpoznaniu klinicznym, na podstawie stwierdzenia białych, mlecznych plam o wyraźnych brzegach w typowym rozmieszczeniu. Nie jest konieczne wykonywanie dodatkowych badań laboratoryjnych ani badania histopatologicznego, natomiast jest to wskazane w przypadkach wątpliwych.

Obecność lub brak melanocytów w zmianie skórnej można nieinwazyjnie sprawdzić za pomocą mikroskopii konfokalnej in vivo lub biopsji skóry. Badanie histopatologiczne stwierdza całkowitą utratę pigmentu melaninowego w naskórku pobranej zmiany i brak melanocytów^{18,19}. Bielactwo od innych

zaburzeń hipopigmentacji różnicuje występowanie resztkowej pigmentacji okołomieszkowej i występowanie teleangiektazji²⁰. Możliwe jest również określenie charakteru zmiany - zmiany postępujące wyróżniają się pigmentacją okołomieszkową, natomiast zmiany stabilne lub ustępujące wykazują depigmentację okołomieszkową.

6. Leczenie

Celem leczenia bielactwa jest opanowanie autoimmunologicznego uszkodzenia melanocytów i pobudzenie ich migracji. Obecne metody leczenia bielactwa są dalekie od ideału, ponieważ nie są skuteczne u wszystkich pacjentów i nie powodują repigmentacji we wszystkich lokalizacjach anatomicznych. Niestety wszystkie obecne metody leczenia przynoszą jedynie krótkotrwałe korzyści, ponieważ u pacjentów dochodzi do nawrotu choroby w 40% w ciągu pierwszego roku po przerwaniu leczenia²¹. Leczenie można podzielić na farmakologiczne, fizykalne i chirurgiczne. W leczeniu farmakologicznym zastosowanie mają: glikokortykosteroidy, inhibitory kalcyneuryny, analogi witaminy D, inhibitory kinazy JAK, natomiast w leczeniu fizykalnym: fototerapia oraz laseroterapia jest to tzw. terapia laserem (światłem) niskiego poziomu (LLLT).

Leczenie chirurgiczne jest zarezerwowane dla pacjentów ze stabilnym bielactwem, u których leczenie farmakologiczne zawiodło²². Leczenie chirurgiczne jest zwykle stosowane w przypadku trudnych do leczenia obszarów, takich jak dłonie, stopy, wargi i brodawki sutkowe, lepsze wyniki leczenia wykazano w przypadku bielactwa segmentowego niż uogólnionego²³.

Techniki przeszczepu tkanek:

- Punch Grafting (PG) - miniprzyszczepy,
- Suction blister epidermal grafting (SBEG) - przeszczepianie pęcherzy naskórkowych,
- Split thickness grafts - przeszczepy o podzielonej grubości,
- Autologous non-cultured epidermal cell suspension (NCECS) - przeszczepianie autologicznych niehodowlanych zawiesin komórek naskórka.

7. Leczenie eksperymentalne

Opisane w podrozdziale leczenie eksperymentalne opiera się na zmodyfikowanym leczeniu chirurgicznym w którym zastosowanie znalazły już dawno poznane komórki macierzyste.

Komórkę macierzystą charakteryzuje zdolność do samoodnowy i potencjał do różnicowania. Komórki macierzyste zasiedlają odpowiednie miejsca w tkankach, zwane nisząmi komórek macierzystych - są to miejsca, w których komórki te utrzymują się w gotowości do podziału komórkowego i stają się aktywne w czasie gojenia i regeneracji tkanek. Najważniejszą właściwością komórek macierzystych jest ich plastyczność, czyli możliwość przybierania form różnych typów komórek pochodzących nawet z innego listka zarodkowego²⁴.

Klasyfikacja komórek macierzystych ze względu na potencjał różnicowania:

- komórki totipotencjalne (zdolne do różnicowania się we wszystkie tkanki, które tworzą ludzkie ciało, w tym łożysko i błony komórek embrionalnych - taką komórką jest np. zygota),
- komórki pluripotencjalne (mogą się różnicować w komórki pochodzące z różnych listków zarodkowych: ektodermy, mezodermy, endodermy),
- komórki multipotencjalne (mogą dać początek komórkom pochodzącym tylko z jednego listka zarodkowego i mają mniejszy zakres różnicowania się, np. z ektodermy powstają neurony, nabłonki, komórki gruczołowe, a z mezodermy - komórki mięśniowe)
- komórki unipotencjalne (mogą wytworzyć tylko jeden typ komórek, np. komórki warstwy podstawnej naskórka regenerujące keratynocyty)²⁵⁻²⁷.

Skóra jest niewyczerpalnym źródłem komórek macierzystych, dodatkowo jako komórki własne pacjenta - autologiczne, umożliwiają uniknięcie powikłań, takich jak reakcja immunologiczna przeciwko allogenicznemu przeszczepowi²⁵.

Autologiczne przeszczepy skóry i melanocytów stanowią jedną z opcji terapeutycznych u osób z postacią zlokalizowaną bielactwa, u których nie powiodło się leczenie farmakologiczne lub fototerapia. Komórki macierzyste melanocytów (MeSCs - Melanocyte Stem Cells) zlokalizowane są w dolnej części mieszków włosowych w okolicy lejka^{28,29}. Natomiast melanocyty rzadko

podlegają mitozie bez pomocy czynników wzrostu lub czynników mitogen-nych, a sama repigmentacja może być niewystarczalna lub znikoma. Efekty podawania samych melanocytów w plamy bielacze były słabsze niż w przypadku podawania ich z komórkami naskórka w formie przeszczepów^{30,31}. Dlatego w niniejszej pracy skupiliśmy się na wykorzystaniu komórek pochodzących z tkanki tłuszczowej (ADSCs - Adipose-Derived Stem Cells), skórnych mezenchymalnych komórek macierzystych (DMSCs - Dermal Mesenchymal Stem Cells) oraz mezenchymalnych komórkach macierzystych (MSCs - Mesenchymal Stem Cells), które hodowane oddzielnie, ale podawane razem w przeszczepach z melanocytami w różnych proporcjach są źródłem czynników wzrostu dla melanocytów. Takie przeszczepy charakteryzują się lepszymi efektami terapeutycznymi oraz efektywniejszą repigmentacją. Wspomnieliśmy również o badaniach nad wykorzystaniem indukowanych pluripotent-nych komórek macierzystych (IPSC - induced pluripotent stem cells), z których bezpośrednio mogą różnicować się melanocyty. MSCs, ADSCs i DMSCs należą do grupy komórek multipotencjalnych, natomiast IPSC - komórek pluripotentnych.

7.1. Mezenchymalne komórki macierzyste (MSCs)

Wiele czynników środowiskowych, głównie promieniowanie UV przyczyniają się do szybszego wytwarzania reaktywnych form tlenu (ROS) i nad-tlenku wodoru we wnętrzu komórek ciała. W reakcji obronnej przed promieniowaniem UV komórki skóry uruchamiają szlak melanogenezy, który również uwalnia nadtlenek wodoru, przyczyniając się do zwiększenia stresu komórkowego³². Stres komórkowy indukuje powstawanie ROS, co aktywuje odpowiedź białkową komórki (UPR - unfolded protein response), która sprzyja bielactwu. Niestety melanocyty przez kosztowny energetycznie proces jakim jest synteza melaniny, są szczególnie podatne na stres oksydacyjny³³.

Według badań mezenchymalne komórki macierzyste (MSCs) tłumią reakcje immunologiczne, zmniejszając poziom cytokin zapalnych^{34,35}. MSCs charakteryzują się multipotencjalnym potencjałem różnicowania oraz ograniczoną immunogennością, co więcej są słabo rozpoznawane przez biorców zgodnych w zakresie HLA³⁶. Wykazano, że MSCs wydzielają cząsteczki parakrynnne, zwiększające zdolności proliferacyjne sąsiednich komórek podczas hodowli *in vitro*^{35,37}. Badania *in vitro* i przedkliniczne dowiodły, że terapia MSC hamuje stres oksydacyjny.

PTEN jest białkiem kodowanym przez gen PTEN, uważanym za jeden z najważniejszych supresorów nowotworowych. PTEN hamuje szlak onkogenny PI3K^{38,39}. Dzięki swojej cytoplazmatycznej aktywności wobec szlaku PTEN/PI3K/AKT reguluje wzrost komórek poprzez zatrzymanie cyklu komórkowego i indukowanie apoptozy.

W badaniu przeprowadzonym przez Lifei Zhu i in. zidentyfikowano szlaki sygnałowe zaangażowane w inicjację i progresję bielactwa. Spróbowano wykorzystać te szlaki w skutecznej terapii bielactwa. Pobrano próbki skóry od osób ze zdiagnozowanym aktywnym bielactwem, które nie otrzymywały żadnego innego leczenia. Próbkę skóry normalnej, które zostały wykorzystane jako kontrolne, zostały pobrane od tych samych pacjentów z bielactwem.

Do badania pacjenci zostali najpierw zdiagnozowani jako osoby z aktywnym bielactwem segmentowym bez innych powiązanych chorób i nie otrzymywali żadnego leczenia lub leków. Podczas oceny w zakresie aktywności choroby - Vitiligo Disease Activity Score (VIDA) i punktacji Vitiligo Area Scoring Index (VASI), tylko osoby z wynikiem VIDA większym lub równym 2 punktom zostały zrekrutowane.

Analiza wzbogacenia genów wykazała, że ścieżka sygnalizacyjna FoxO, która jest zaangażowana między innymi w różnicowanie komórek, proliferację, uszkodzenia DNA, apoptozę i naprawę oraz działa jako mediator stresu oksydacyjnego była znacząco podwyższona. W trakcie analizy szlaku sygnałowego FoxO, zaobserwowano, że ekspresja PTEN była zwiększona 3,4 raza. Szlak sygnałowy PI3K/AKT/mTOR wykazywał znaczną aktywność, podobnie jak szlak odpowiedzi na promieniowanie UV. Analiza KEGG pokazała, że szlak PTEN/PI3K/AKT wykazywał większą aktywność w próbkach tkanek z bielactwem, co sugeruje, że PTEN może być potencjalnym markerem inicjacji bielactwa. Aby potwierdzić ekspresję PTEN w tkankach z bielactwem wykonano immunoblotting z 11 próbek. Ekspresja PTEN w próbkach z bielactwem była 1,06 do 2,23 - krotnie wyższa niż w próbkach niezmiennych chorobowo⁴⁰.

Wykazano, że MSCs produkują i uwalniają czynniki wzrostu, egzosomy i cytokiny, które wpływają na komórki w ich otoczeniu⁴¹. Egzosomy pochodzące z MSC promują wzrost aksonów poprzez szlak PTEN/mTOR. MSCs znacząco zwiększają poziom sygnalizacyjnych białek czynników wzrostu PI3K, AKT i mTOR oraz obniżają poziom białka PTEN, co więcej mogą hamować ekspresję PTEN, aktywować szlak PI3K/AKT i prowadzić do ochrony przed śmiercią komórki wywołaną stresem oksydacyjnym⁴².

Przeprowadzono test immunofluorescencyjny, aby określić, w jaki sposób MSCs zmieniają ekspresję PTEN w melanocytach. Wynika z niego, że całkowita ilość PTEN w grupie melanocytów hodowanych z MSCs była mniejsza niż w grupie bez kokultury. MSCs mogą regulować ekspresję PTEN w melanocytach, a następnie zmniejszać negatywne skutki spowodowane nadekspresją PTEN i stresem oksydacyjnym.

Porównano działanie MSCs z keratynocytami, aby zrozumieć, czy MSCs mają korzystny wpływ na melanocyty poprzez badanie cytometrii przepływowej, aby określić różnicę w skuteczności leczenia pomiędzy kokulturą melanocytów i MSCs a melanocytów z keratynocytami. Dane wykazały, że kokultura z keratynocytami nie mogła zmniejszyć stopnia apoptozy indukowanej H_2O_2 . Wyniki pokazują, że MSCs promują detoksykację i proliferację komórek w melanocytach, co wskazuje na potencjalne właściwości terapeutyczne MSCs w bielactwie⁴⁰.

Przeszczep autologicznych melanocytów służy jako alternatywna metoda leczenia chirurgicznego zmian bielactwa zlokalizowanych w miejscach słabo reagujących na leczenie⁴³. Jako odpowiedź na czynniki stresogenne, ROS są uwalniane w trakcie zabiegów chirurgicznych, które mogą powodować śmierć i dysfunkcję melanocytów, co prowadziłoby do ponownego wystąpienia depigmentacji. Biorąc pod uwagę zdolność MSC do ratowania melanocytów oraz liczne funkcje, jakie MSC pełnią w stanie zapalnym i stresie oksydacyjnym, proponuje się kotransplantację autologicznych MSC i melanocytów w stosunku 1:1 u pacjentów z bielactwem, około 5×10^5 melanocytów i MSC na 1 cm^2 powierzchni skóry⁴⁴.

7.2. Adipocytarne komórki macierzyste (ADSCs)

ADSCs to komórki macierzyste pochodzące z tkanki tłuszczowej. ADSCs są przedmiotem obserwacji w badaniach przedklinicznych dotyczących wielu chorób, ponieważ wydają się być idealną populacją komórek do wykorzystania w medycynie regeneracyjnej ze względu na łatwość izolacji, nieimmunogenność, multipotencjalny charakter, możliwość różnicowania w różne linie komórkowe oraz mają potencjał angiogeny.

Źródłem ADSCs jest brunatna i biała tkanka tłuszczowa. Jest to niedrogi i nieograniczony rezerwuuar komórek macierzystych⁴⁵⁻⁴⁸. Ponadto można je łatwo pozyskiwać bez dylematów etycznych związanych z ich wykorzystaniem^{49,50}. Dzięki dużej zawartości ADSCs w tkance tłuszczowej nie jest

konieczna długa hodowla *in vitro*, co zmniejsza ryzyko wystąpienia różnych nieprawidłowości chromosomalnych⁵¹.

Lokalizacja ADSCs w tkance tłuszczowej jest trudna do określenia, jednakże większość z nich występuje w okolicach okołonaczyniowych. Morfologicznie ADSCs przypominają fibroblasty⁵². Ekspresja antygenów na ich powierzchni jest podobna do MSCs szpiku kostnego⁵²⁻⁵⁴. ADSCs nie wykazują ekspresji HLA-DR, są zatem komórkami o obniżonej immunogenności^{55,56}.

ADSCs w odpowiednich warunkach mogą być prekursorem wielu komórek, lecz ich najważniejszą funkcją jest stymulacja otaczających je komórek do różnicowania pod wpływem określonych czynników wzrostu⁵⁷⁻⁵⁹. Ich działanie opiera się na produkcji wielu czynników wzrostu i cytokin m.in.: czynnika wzrostu naskórka (EGF), transformującego czynnika wzrostu β (TGF- β), czynnika wzrostu śródbłónka naczyniowego (VEGF), IL-6, IL-8, IL-11, IL-12^{53,57,59}. ADSCs hamują produkcję cytokin prozapalnych, zwiększają produkcję przeciwzapalnej IL-10, stymulują limfocyty Treg oraz angiogenezę poprzez różnicowanie się w komórki śródbłónka, a także chronią komórki przed apoptozą^{47,48,53,60,61}. ADSCs mogą wychwytywać wolne rodniki i białka szoku cieplnego w stanie niedokrwienia, co wskazuje na ich działanie antyoksydacyjne^{46,62}.

ADSCs mogą być źródłem czynników wzrostu dla melanocytów hodowanych w obecności keratynocytów⁶³. Lim i in. badając skuteczność pigmentacji przeszczepili myszom i szczurom Sprague-Dawley ludzkie melanocyty i melanocyty wzbogacone o ludzkie ADSCs. Lepsze wyniki terapii wykazano w przypadku przeszczepiania melanocytów i ADSCs hodowanych oddzielnie, a następnie zmieszanych w stosunku 1:1, 1:2 lub 1:3, w porównaniu do przeszczepiania samych melanocytów²⁹.

W badaniach wykazano, że proliferacja i migracja melanocytów były znacząco stymulowane przez kokulturę ADSCs w porównaniu z melanocytami z monokultury. Może to być związane z obecnością bFGF (podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów) i MGF (czynnika wzrostu melanocytów) produkowanych przez ADSCs⁶⁴. Stosunek melanocytów z dodatnią ekspresją TRP-2 (tautomeraza dopachromowa), E-kadheryny i N-kadheryny był istotnie zwiększony w kokulturach z ADSCs w porównaniu z monokulturami keratynocytów i melanocytów. Melanocyty z dodatnią ekspresją TRP-2 są uważane za prekursor melanocytów, natomiast TRP-1 dodatnie są uważane za zróżnicowane i dojrzałe^{64,65}. Natomiast im większa liczba niedojrzałych melanocytów, tym lepsze wyniki kliniczne. W interakcjach komórka-komórka biorą udział receptory adhezji komórkowej zależne od kadheryny. E-kadheryna

warunkuje adhezję między keratynocytami i melanocytami, a N-kadheryna ułatwia kontakt między fibroblastami i melanocytami^{64,66}. Badania potwierdziły, że hodowle z ADSCs zwiększają proliferację i migrację melanocytów, zmniejszając jednocześnie ich różnicowanie⁶⁴.

Kotransplantacja ADSCs i melanocytów może znacznie zwiększać szanse udanego leczenia i utrzymanie się przeszczepu. Za stosowaniem ADSCs przemawia fakt ich łatwego pozyskiwania oraz zmniejszone koszty hodowli w porównaniu do innych komórek macierzystych.

7.3. Skórne mezenchymalne komórki macierzyste (DMSCs)

Klinicznie udowodniono, że najskuteczniejszą opcją terapeutyczną dla pacjentów z bielactwem jest przeszczepienie autologicznych melanocytów pacjenta^{67,68,23}. Liczba cytotoksycznych limfocytów T CD8+ jest wyższa w aktywnej niż stabilnej chorobie, a same cytotoksyczne limfocyty T CD8+ mogą dyktować losy przeszczepu w bielactwie⁶⁹. DMSCs posiadają potencjał do różnicowania się w adipocyty, osteocyty i chondrocyty⁷⁰.

W badaniu Miao-ni Zhou i in. zbadano skuteczność autologicznego przeszczepu melanocytów u 23 pacjentów z bielactwem, koncentrując się na limfocytach T CD8+ zasiedlających skórę wokół zmian. Zbadano wpływ DMSCs na aktywność limfocytów T CD8+ w warunkach *in vitro*. Badanie wskazuje, że skuteczność przeszczepu była ściśle związana z aktywnością limfocytów T CD8+ typu skin-homing (komórek napływających). Niska skuteczność repigmentacji została zaobserwowana u pacjentów z wysoką liczbą limfocytów T CD8+ lub wysokim poziomem cytokin w okolicy okołoustnej.

Spośród 23 pacjentów z autologicznym przeszczepem melanocytów, 52,17% pacjentów miało doskonałą repigmentację, 26,09% miało dobrą repigmentację, 21,74% miało wystarczającą lub słabą repigmentację. U wszystkich pacjentów zaobserwowano naciek limfocytów T CD8+ w okolicy bielactwa okołoustnego. Pacjenci z wysoką liczbą limfocytów T CD8+ wokół zmian bielactwych byli związani z niskim wskaźnikiem repigmentacji lub złym rokowaniem, a pacjenci z doskonałą lub dobrą repigmentacją mieli znacznie mniejszą liczbę limfocytów T CD8+. Wyniki te sugerują, że naciek limfocytów T CD8+ jest związany z wydajnością repigmentacji u pacjentów z przeszczepem.

Przeanalizowano w sumie 79 cytokin i chemokin za pomocą RayBio[™] Human Cytokine Array V. Wyniki wskazywały, że poziomy cytokin prozapalnych takich jak: IL-1 α , IL-1 β i IL-12 oraz cytokin związanych z limfocytami

T CD8+, takich jak: IL-10, IL-13 i IFN γ były znacznie wyższe w płynie naskórkowym pacjentów ze słabą repigmentacją. Co sugeruje, że poziom ekspresji cytokin i chemokin w płynie naskórkowym są związane z efektywnością repigmentacji u pacjentów po przeszczepie.

Wyniki wykazały, że proliferacja limfocytów T CD8+ została znacząco zahamowana podczas kokultury z DMSCs w stosunku 1:1, a odsetek proliferujących limfocytów T CD8+ spadł z 94,72% do 39,50%. W grupie kontrolnej bez DMSCs, odsetek apoptozy limfocytów T CD8+ wynosił 3,2%, odsetek ten wzrósł do 9,6% w grupie z kokulturą z DMSCs. Potwierdza to tłumiące proliferację limfocytów T CD8+ oraz indukujące apoptozę właściwości komórek DMSCs w systemie kokulturowym.

Z uzyskanych badań można wnioskować, że efektywność przeszczepu autologicznych melanocytów u pacjentów z bielactwem zależy od aktywności skórnych limfocytów T CD8+, a DMSCs mogą być wykorzystane w celu poprawy skuteczności przeszczepu i przebiegu ogólnego leczenia⁷¹.

7.4. Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (IPSCs)

Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste pozyskuje się z niepluripotentnych komórek poprzez indukowanie w nich ekspresji odpowiednich genów⁷². Uzyskane w ten sposób komórki mogą stanowić prekursorów melanocytów, które mogą zostać wykorzystane w leczeniu chorób polegających na depigmentacji skóry, takich jak bielactwo. iMels (induced melanocytes) posiadają zdolność do wytwarzania melanosomów, dzięki czemu są zdolne do syntezy melaniny. Badania na myszach laboratoryjnych polegające na wszczepianiu im iMels wykazały po upływie dwóch tygodni obecność mieszków włosowych zawierających pigment w pobranych wycinkach. Pigmentacja zlokalizowana była głównie w cebulkach włosa, łodygach włosa, a także w odtworzonym naskórku. Jest to bardziej zadowalający wynik niż przy zastosowaniu transplantacji z użyciem HEMs (human epidermal melanocytes), gdzie ogrom melaniny odkładał się wokół tkanki łącznej, a ilość w cebulkach włosa była niewielka. Zastosowanie przeciwciał anty-asialo GM1, które powoduje wyczerpanie komórek NK, monocytów i makrofagów *in vivo*, spowodowało przeżycie iMels i ich wykrycie w mieszkach włosowych w siódmym tygodniu po przeszczepie. Obserwowano pigmentację w naskórku, cebulce włosa i łodygach włosa, co wskazuje na możliwość długotrwałego utrzymania efektów nawet po cyklu wzrostu włosa. Wyniki te pokazują, że iMels funkcjonowały po przeszczepie prawidłowo i przyczyniły się do odtworzenia

mieszka włosowego oraz naskórka. Dojrzałe hiMels wkomponowały się w cebulkę włosa i warstwę komórek podstawnych oraz brały udział w tworzeniu zawierających pigment łożyg włosa i naskórka. Istniejące komórki macierzyste mieszków włosowych w regionie wybrzuszenia funkcjonują jako nisza dla komórek macierzystych melanocytów, które powinny wspierać i zapewniać długoterminowe utrzymanie funkcji hiMels⁷³. Obiecujące rezultaty przeprowadzonych badań świadczą o możliwości zastosowania IPSCs w leczeniu bielactwa u ludzi na szeroką skalę w przyszłości.

8. Podsumowanie

Leczenie bielactwa do chwili obecnej jest bardzo trudne, a obecne wyniki leczenia różnią się u poszczególnych osób i często są niezadowolające. Terapia eksperymentalna komórkami macierzystymi może znacznie poprawić komfort życia wielu osobom, u których leczenie standardowe nie przyniosło zadowolających efektów. Niestety z leczenia chirurgicznego, w tym leczenia eksperymentalnego nie mogą skorzystać pacjenci z aktywnym bielactwem. Minusem leczenia chirurgicznego z zastosowaniem komórek macierzystych jest ich wysoka cena i niewielka dostępność. Jednak upowszechnienie tego typu leczenia, stosowania i hodowli komórek macierzystych powinno obniżyć koszty leczenia w przyszłości, a wysoka cena nie może być przeszkodą w nowoczesnej alternatywnej terapii chorób. Co więcej, izolowanie komórek macierzystych przedstawionych w niniejszej pracy nie powinno napotykać przeszkód ze strony etycznej. Wyniki badań bezpośrednio dowodzą, że stosowanie MSCs, ADSCs i DMSCs przyczyniają się do lepszego przyjęcia przeszczepu, jak i sama repigmentacja daje znacznie bardziej zadowolające efekty. To samo dotyczy IPSCs, w przypadku których wyniki badań wskazują na lepszą efektywność transplantacji zawierających IPSC w stosunku do tych zawierających jedynie HEMs.

Rozwijanie badań nad skutecznością i bezpieczeństwem komórek macierzystych w leczeniu bielactwa może w przyszłości pozwolić na szersze ich zastosowanie u osób dotkniętych chorobą. Byłoby to bardzo korzystne ze względu na obiecujące wyniki badań pokazujące korzystniejsze przyjęcie się przeszczepów zawierających komórki macierzyste w stosunku do leczenia tradycyjnego, co przełożyłoby się na poprawę komfortu i jakości życia u chorych zmagających się z bielactwem.

Referencje

1. Frisoli ML, Essien K, Harris JE. Vitiligo: Mechanisms of Pathogenesis and Treatment. *Annual Review of Immunology*. 2020;38(1):621-648. doi:10.1146/annurev-immunol-100919-023531
2. van den Boorn JG, Konijnenberg D, Dellemijn TAM, et al. Autoimmune Destruction of Skin Melanocytes by Perilesional T Cells from Vitiligo Patients. *Journal of Investigative Dermatology*. 2009;129(9):2220-2232. doi:10.1038/jid.2009.32
3. Ezzedine K, Lim HW, Suzuki T, et al. Revised classification/nomenclature of vitiligo and related issues: the Vitiligo Global Issues Consensus Conference. *Pigment Cell & Melanoma Research*. 2012;25(3):E1-E13. doi:10.1111/j.1755-148x.2012.00997.x
4. Khaled Ezzedine, Viktoria Eleftheriadou, Whitton M, Nanja van Geel. Vitiligo. *The Lancet*. 2015;386(9988):74-84. doi:10.1016/S0140-6736(14)60763-7
5. Singh M, Singh G, Kanwar AJ, Belhaj MS. Clinical pattern of vitiligo in Libya. *International Journal of Dermatology*. 1985;24(4):233-235. doi:10.1111/j.1365-4362.1985.tb05768.x
6. Alikhan A, Felsten LM, Daly M, Petronic-Rosic V. Vitiligo: A comprehensive overview. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2011;65(3):473-491. doi:10.1016/j.jaad.2010.11.061
7. Sehgal V, Srivastava G. Vitiligo: Compendium of clinico-epidemiological features. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*. 2007;73(3):149. doi:10.4103/0378-6323.32708
8. Das SK, Majumder PP, Chakraborty R, Majumdar TK, Haldar B, Rao DC. Studies on vitiligo I. Epidemiological profile in Calcutta, India. *Genetic Epidemiology*. 1985;2(1):71-78. doi:10.1002/gepi.1370020107
9. Ezzedine K, Diallo A, Léauté-Labrèze C, et al. Pre- vs. post-pubertal onset of vitiligo: multivariate analysis indicates atopic diathesis association in pre-pubertal onset vitiligo. *British Journal of Dermatology*. 2012;167(3):490-495. doi:10.1111/j.1365-2133.2012.11002.x

10. Nicolaidou E, Antoniou C, Miniati A, et al. Childhood- and later-onset vitiligo have diverse epidemiologic and clinical characteristics. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2012;66(6):954-958. doi:10.1016/j.jaad.2011.07.010
11. Putynkowska A, Czubek M, Dermatologii O, Szkoła W.; 2018. Accessed February 10, 2022. <http://aestheticcosmetology.com/wp-content/uploads/2019/01/ke2018.5-4.pdf>
12. Hann, Seung-Kyung, and Sungbin Im. "Clinical variants of vitiligo." *Basic And Clinical Dermatology* 29 (2004): 159-172.
13. Gawkrödger DJ, Ormerod AD, Shaw L, et al. Guideline for the diagnosis and management of vitiligo. *British Journal of Dermatology*. 2008;159(5):1051-1076. doi:10.1111/j.1365-2133.2008.08881.x
14. van Geel N, Speeckaert R, Taieb A, et al. Koebner's phenomenon in vitiligo: European position paper. *Pigment Cell & Melanoma Research*. 2011;24(3):564-573. doi:10.1111/j.1755-148x.2011.00838.x
15. Bergqvist C, Ezzedine K. Vitiligo: A Review. *Dermatology*. Published online March 10, 2020;1-22. doi:10.1159/000506103
16. Kutwin M, Sysa-Jędrzejowska A, Woźniacka A. Vitiligo and autoimmune diseases. *Dermatology Review/Przegląd Dermatologiczny*. 2016;103(5):400-404. doi:10.5114/dr.2016.62892.
17. Czajkowski R, Placek W, Flisiak I, et al. Vitiligo. Diagnostic and therapeutic recommendations of the Polish Dermatological Society. *Dermatology Review/Przegląd Dermatologiczny*. 2019;106(1):1-15. doi:10.5114/dr.2019.83440.
18. Van Geel NAC, Mollet IG, De Schepper S, et al. First histopathological and immunophenotypic analysis of early dynamic events in a patient with segmental vitiligo associated with halo nevi. *Pigment Cell & Melanoma Research*. 2010;23(3):375-384. doi:10.1111/j.1755-148x.2010.00703.x
19. Reichert Faria A, Tarlé RG, Dellatorre G, Mira MT, Silva de Castro CC. Vitiligo - Part 2 - classification, histopathology and treatment. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2014;89(5):784-790. doi:10.1590/abd1806-4841.20142717

20. Thatte SS, Khopkar US. The utility of dermoscopy in the diagnosis of evolving lesions of vitiligo. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*. 2014;80(6):505-508. doi:10.4103/0378-6323.144144
21. Cavalié M, Ezzedine K, Fontas E, et al. Maintenance therapy of adult vitiligo with 0.1% tacrolimus ointment: a randomized, double blind, placebo-controlled study. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2015;135(4):970-974. doi:10.1038/jid.2014.527
22. Parsad D, Gupta S, IADVL Dermatosurgery Task Force. Standard guidelines of care for vitiligo surgery. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*. 2008;74 Suppl:S37-45. Accessed February 10, 2022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18688102/>
23. Njoo MD, Westerhof W, Bos JD, Bossuyt PM. A systematic review of autologous transplantation methods in vitiligo. *Archives of Dermatology*. 1998;134(12):1543-1549. doi:10.1001/archderm.134.12.1543
24. Drewa G, Ferenc T. Genetyka Medyczna Podręcznik Dla Studentów. Elsevier Urban & Partner sp. z o.o.; 2011:691-699.
25. Singh RK, Gaikwad SM, Chatterjee S, Ray P. Stem Cells: The Holy Grail of Regenerative Medicine. *Engineering in Translational Medicine*. Published online December 20, 2013:19-69. doi:10.1007/978-1-4471-4372-7_2
26. Verfaillie CM. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends in Cell Biology*. 2002;12(11):502-508. doi:10.1016/s0962-8924(02)02386-3
27. Yarak S, Okamoto OK. Human adipose-derived stem cells: current challenges and clinical perspectives. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2010;85(5):647-656. doi:10.1590/S0365-05962010000500008
28. Lee JH, Fisher DE. Melanocyte stem cells as potential therapeutics in skin disorders. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2014;14(11):1569-1579. doi:10.1517/14712598.2014.935331
29. Aziz Jalali M, Jafari B, Isfahani M, Nilforoushzadeh MA. Treatment of segmental vitiligo with normal-hair follicle autograft. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*. 2013;27(4):210-214. Accessed February 10, 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4011411/>
30. Lim W-S, Kim C-H, Kim J-Y, Do B-R, Kim EJ, Lee A-Y. Adipose-Derived Stem Cells Improve Efficacy of Melanocyte Transplantation in Animal Skin. *Biomolecules & Therapeutics*. 2014;22(4):328-333. doi:10.4062/biomolther.2014.065

31. Olsson MJ, Juhlin L. Long-term follow-up of leucoderma patients treated with transplants of autologous cultured melanocytes, ultrathin epidermal sheets and basal cell layer suspension. *British Journal of Dermatology*. 2002;147(5):893-904. doi:10.1046/j.1365-2133.2002.04837.x
32. Meyskens Jr. FL, Farmer P, Fruehauf JP. Redox Regulation in Human Melanocytes and Melanoma. *Pigment Cell Research*. 2001;14(3):148-154. doi:10.1034/j.1600-0749.2001.140303.x
33. Denat L, Kadekaro AL, Marrot L, Leachman SA, Abdel-Malek ZA. Melanocytes as Instigators and Victims of Oxidative Stress. *Journal of Investigative Dermatology*. 2014;134(6):1512-1518. doi:10.1038/jid.2014.65
34. Galipeau J, Sensébé L. Mesenchymal Stromal Cells: Clinical Challenges and Therapeutic Opportunities. *Cell Stem Cell*. 2018;22(6):824-833. doi:10.1016/j.stem.2018.05.004
35. English K, French A, Wood KJ. Mesenchymal Stromal Cells: Facilitators of Successful Transplantation? *Cell Stem Cell*. 2010;7(4):431-442. doi:10.1016/j.stem.2010.09.009
36. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *European Journal of Immunology*. 2006;36(10):2566-2573. doi:10.1002/eji.200636416
37. Tyndall A, Houssiau FA. Mesenchymal stem cells in the treatment of autoimmune diseases. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2010;69(8):1413-1414. doi:10.1136/ard.2010.132639
38. Lee Y-R, Chen M, Pandolfi PP. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor: new modes and prospects. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2018;19(9):547-562. doi:10.1038/s41580-018-0015-0
39. Inoue-Narita T, Hamada K, Sasaki T, et al. Pten Deficiency in Melanocytes Results in Resistance to Hair Graying and Susceptibility to Carcinogen-Induced Melanomagenesis. *Cancer Research*. 2008;68(14):5760-5768. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0889
40. Zhu L, Lin X, Zhi L, et al. Mesenchymal stem cells promote human melanocytes proliferation and resistance to apoptosis through PTEN pathway in vitiligo. *Stem Cell Research & Therapy*. 2020;11(1). doi:10.1186/s13287-019-1543-z

41. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2006;98(5):1076-1084. doi:10.1002/jcb.20886
42. Ahmed ESA, Ahmed NH, Medhat AM, Said UZ, Rashed LA, Abdel Ghafar ARB. Mesenchymal stem cells targeting PI3K/AKT pathway in leukemic model. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2019;41(4):1010428319846803. doi:10.1177/1010428319846803
43. Falabella R. Surgical treatment of vitiligo: why, when and how. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*. 2003;17(5):518-520. doi:10.1046/j.1468-3083.2003.00718.x
44. Czajkowski R, Placek W, Drewna T, Kowaliszyn B, Sir J, Weiss W. Autologous Cultured Melanocytes in Vitiligo Treatment. *Dermatologic Surgery*. 2007;33(9):1027-1036. doi:10.1111/j.1524-4725.2007.33216.x
45. Owczarczyk-Saczonek A, Placek W, Maksymowicz W. The importance and use of stem cells in dermatology. *Dermatology Review/Przegląd Dermatologiczny*. 2016;103(4):309-315. doi:10.5114/dr.2016.61781.
46. Beeson W, Woods E, Agha R. Tissue Engineering, Regenerative Medicine, and Rejuvenation in 2010: The Role of Adipose-Derived Stem Cells. *Facial Plastic Surgery*. 2011;27(04):378-388. doi:10.1055/s-0031-1283056
47. Koźlik M, Wójcicki P. The Use of Stem Cells in Plastic and Reconstructive Surgery. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. 2014;23(6):1011-1017. Accessed February 10, 2022. <https://advances.umw.edu.pl/en/article/2014/23/6/1011/>
48. Ogliari KS, Marinowic D, Brum DE, Loth F. Stem cells in dermatology. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2014;89(2):286-291. doi:10.1590/abd1806-4841.20142530
49. Cherubino M, Rubin JP, Miljkovic N, Kelmendi-Doko A, Marra KG. Adipose-Derived Stem Cells for Wound Healing Applications. *Annals of Plastic Surgery*. 2011;66(2):210-215. doi:10.1097/SAP.0b013e3181e6d06c
50. Kim E-H. Current applications of adipose-derived stem cells and their future perspectives. *World Journal of Stem Cells*. 2014;6(1):65. doi:10.4252/wjsc.v6.i1.65

51. Jeon B-G, Kumar BM, Kang E-J, et al. Characterization and comparison of telomere length, telomerase and reverse transcriptase activity and gene expression in human mesenchymal stem cells and cancer cells of various origins. *Cell and Tissue Research*. 2011;345(1):149-161. doi:10.1007/s00441-011-1191-9
52. Hassan WU, Greiser U, Wang W. Role of adipose-derived stem cells in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*. 2014;22(3):313-325. doi:10.1111/wrr.12173
53. Bajek A, Gurtowska N, Olkowska J, Kazmierski L, Maj M, Drewa T. Adipose-Derived Stem Cells as a Tool in Cell-Based Therapies. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2016;64(6):443-454. doi:10.1007/s00005-016-0394-x
54. Musina RA, Bekchanova ES, Sukhikh GT. Comparison of Mesenchymal Stem Cells Obtained from Different Human Tissues. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2005;139(4):504-509. doi:10.1007/s10517-005-0331-1
55. Niemeyer P, Vohrer J, Schmal H, et al. Survival of human mesenchymal stromal cells from bone marrow and adipose tissue after xenogenic transplantation in immunocompetent mice. *Cytotherapy*. 2008;10(8):784-795. doi:10.1080/14653240802419302
56. Cerqueira MT, Pirraco RP, Santos TC, et al. Human Adipose Stem Cells Cell Sheet Constructs Impact Epidermal Morphogenesis in Full-Thickness Excisional Wounds. *Biomacromolecules*. 2013;14(11):3997-4008. doi:10.1021/bm4011062
57. Kim W-S, Han J, Hwang S-J, Sung J-H. An update on niche composition, signaling and functional regulation of the adipose-derived stem cells. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2014;14(8):1091-1102. doi:10.1517/14712598.2014.907785
58. Kim W-S, Park B-S, Sung J-H. The wound-healing and antioxidant effects of adipose-derived stem cells. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2009;9(7):879-887. doi:10.1517/14712590903039684
59. Park B-S, Kim W-S, Choi J-S, et al. Hair growth stimulated by conditioned medium of adipose-derived stem cells is enhanced by hypoxia: evidence of increased growth factor secretion. *Biomedical Research*. 2010;31(1):27-34. doi:10.2220/biomedres.31.27

60. Gonzalez-Rey E, Gonzalez MA, Varela N, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T cell responses and induce regulatory T cells in vitro in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2010;69(01):241-248. doi:10.1136/ard.2008.101881
61. Skalska U, Kontny E, Prochorec-Sobieszek M, Maslinski W. Intra-articular adipose-derived mesenchymal stem cells from rheumatoid arthritis patients maintain the function of chondrogenic differentiation. *Rheumatology*. 2012;51(10):1757-1764. doi:10.1093/rheumatology/kes129
62. Gimble JM, Floyd ZE, Bunnell BA. The 4th dimension and adult stem cells: Can timing be everything? *Journal of Cellular Biochemistry*. 2009;107(4):569-578. doi:10.1002/jcb.22153
63. Owczarczyk-Saczonek A, Wociór A, Placek W, Maksymowicz W, Wojtkiewicz J. The Use of Adipose-Derived Stem Cells in Selected Skin Diseases (Vitiligo, Alopecia, and Nonhealing Wounds). *Stem Cells International*. 2017;2017:1-11. doi:10.1155/2017/4740709
64. Lee A, Kim J, Park C, Lee J, Lee C, Do B. Co-culture of Melanocytes with Adipose-derived Stem Cells as a Potential Substitute for Co-culture with Keratinocytes. *Acta Dermato Venereologica*. 2012;92(1):16-23. doi:10.2340/00015555-1174
65. Botchkareva NV, Botchkarev VA, Gilchrist BA. Fate of Melanocytes During Development of the Hair Follicle Pigmentary Unit. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. 2003;8(1):76-79. doi:10.1046/j.1523-1747.2003.12176.x
66. Derycke LDM, Bracke ME. N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. *The International Journal of Developmental Biology*. 2004;48(5-6):463-476. doi:10.1387/ijdb.041793ld
67. Hong W, Hu D, Qian G, McCormick S, Xu A. Treatment of vitiligo in children and adolescents by autologous cultured pure melanocytes transplantation with comparison of efficacy to results in adults. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2011;25(5):538-543. doi:10.1111/j.1468-3083.2010.03824.x
68. Hong WS, Hu DN, Qian GP, McCormick SA, Xu AE. Ratio of size of recipient and donor areas in treatment of vitiligo by autologous cultured m

- elanocyte transplantation. *British Journal of Dermatology*. Published online August 2011;no-no. doi:10.1111/j.1365-2133.2011.10398.x
69. Rao A, Gupta S, Dinda AK, et al. Study of clinical, biochemical and immunological factors determining stability of disease in patients with generalized vitiligo undergoing melanocyte transplantation. *British Journal of Dermatology*. 2012;166(6):1230-1236. doi:10.1111/j.1365-2133.2012.10886.x
70. Bartsch G, Yoo JJ, De Coppi P, et al. Propagation, Expansion, and Multilineage Differentiation of Human Somatic Stem Cells from Dermal Progenitors. *Stem Cells and Development*. 2005;14(3):337-348. doi:10.1089/scd.2005.14.337
71. Zhou M, Zhang Z, Wu J, et al. Dermal Mesenchymal Stem Cells (DMSCs) Inhibit Skin-Homing CD8+ T Cell Activity, a Determining Factor of Vitiligo Patients' Autologous Melanocytes Transplantation Efficiency. Choi S, ed. *PLoS ONE*. 2013;8(4):e60254. doi:10.1371/journal.pone.0060254
72. Baker, M. Adult cells reprogrammed to pluripotency, without tumors. *Nat Rev Stem Cells* (2007). doi:10.1038/stemcells.2007.124
73. Liu LP, Li YM, Guo NN, et al. Therapeutic Potential of Patient iPSC-Derived iMelanocytes in Autologous Transplantation. *Cell Rep*. 2019;27(2):455-466.e5. doi:10.1016/j.celrep.2019.03.046

TERAPIE GENOWE W DZIEDZICZNYCH DYSTROFIACH SIATKÓWKI

**Paulina Redel, Aneta Rasińska,
Magdalena Kałucka-Janik, Marta Gmerek**

Studenckie Koło Naukowe im. Zbigniewa Religii przy Katedrze Biofizyki w Zabrze,
Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Abstrakt

Dystrofie siatkówki od dawna były uważane za nieuleczalne schorzenia oczu. Intensywne badania w połączeniu z dużymi postępami technologicznymi i rozwojem technik sekwencjonowania genomu, umożliwiły opracowanie pierwszych podejść terapeutycznych. Zwyródnienia siatkówki stanowią wyjątkowe wyzwanie, ponieważ postęp choroby jest nieodwracalny, a siatkówka ma niewielki potencjał regeneracyjny. Ze względu na swoje korzystne cechy anatomiczne i immunologiczne oko znajduje się w czołówce translacyjnej terapii genowej. To sprawiło, że choroby siatkówki znalazły się na czele postępów w terapiach genowych. Terapia augmentacji genów za pośrednictwem wirusów okazała się skuteczna w przywracaniu wzroku. Zatwierdzenie przez FDA oraz EMA leku LuxturnaTM, wektora terapii augmentacji genów dla IRD związanych z RPE65, jest uważane za kamień milowy w tej dziedzinie i doprowadziło do opracowania podobnych lub różnych strategii terapeutycznych dla wielu innych podtypów IRD, a niektóre z nich przeszły do środowiska klinicznego.

Słowa kluczowe: IRD, ślepotą Lebera, Luxturna, AAV

Abstract

Retinal dystrophies have long been considered as an incurable eye disorder. Intensive research combined with great technological advances and with the development of genome sequencing techniques have enabled the possibility of the first therapeutic attempts. Retinal degeneration presents as a unique challenge because the progression of this disease is irreversible and the retina's regenerative potential is very small. Due to its favorable anatomical and immunological characteristics, the eye is in the lead of translational gene therapy. This has put retinal diseases at the forefront of advances in gene therapy. Virus-mediated gene augmentation therapy has been proven as an effective in restoring vision. FDA and EMA approval of LuxturnaTM, a gene augmentation therapy vector for RPE65-related IRDs, is considered as a milestone in this field and has led to the development of similar or different therapeutic strategies for many other IRD subtypes, some of which have passed into the clinical environment.

Keywords: IRD, Leber's blindness, Luxturna, AAV

1. Wstęp

Neuroretina to światłoczuła błona zlokalizowana w tylnej części oka, posiadająca wyspecjalizowane właściwości sensoryczne umożliwiające wychwytywanie światła przez fotoreceptory, jego przekształcanie w sygnały elektryczne w procesie fototransdukcji oraz dalszą integrację i przetwarzanie impulsów w obraz na poziomie ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Jednowarstwowy nabłonek barwnikowy siatkówki (RPE - retinal pigment epithelium) odgrywa zasadniczą rolę we wspieraniu metabolizmu fotoreceptorów. Światłoczułe komórki, tworzące zewnętrzną siatkówkę, są podzielone na czopki i pręciki, na podstawie ich zdolności do bycia bardziej aktywnymi odpowiednio w jasnym lub słabym świetle. Na tym poziomie zachodzi fototransdukcja, a światło zamieniane jest na sygnał elektryczny przekazywany do połączenia synaptycznego komórek dwubiegunowych. Te interneurony, zamknięte w wewnętrznej siatkówce, są elementami łączącymi z komórkami zwojowymi siatkówki (RGC - retinal ganglion cells), których włókna tworzą nerw wzrokowy¹. Dziedziczne choroby siatkówki (IRD - inherited retinal dystrophy), określane również jako dziedziczne dystrofie siatkówki, są klinicznie i genetycznie niejednorodną grupą rzadkich zaburzeń neurodegeneracyjnych, obejmujących głównie fotoreceptory, nabłonek barwnikowy siatkówki (RPE) i/lub naczyńiówkę². Postęp degradacji siatkówki jest często nieodwracalny, pacjenci dotknięci dziedzicznym zwyrodnieniem barwnikowym siatkówki (RP) i naczyńiówki (CHM) często doświadczają stopniowej utraty widzenia nocnego, a także mogą rozwinąć widzenie tunelowe, inni z wrodzoną ślepotą Lebera (LCA), mogą urodzić się z lub doświadczyć wczesnej utraty wzroku. U pacjentów z młodzieńczą retinoschisis sprzężoną z chromosomem X (XLRS) obserwuje się często zwyrodnienie plamki żółtej o wczesnym początku, utratę ostrości wzroku i rozszczepienie warstw siatkówki³. Cechą charakterystyczną tej grupy zaburzeń jest przedwczesna degeneracja pręcików i czopków, prowadząca do wczesnej utraty wzroku⁴. Jako całość, IRD mają szacunkową globalną częstość występowania około 1 na 2000 osób, dotycząc ponad dwóch milionów ludzi na całym świecie i wyróżniając się jako główna przyczyna ślepoty w wieku produkcyjnym.² Dziedziczne choroby siatkówki są klasyfikowane według różnych kryteriów, w tym pierwotnie chorego typu komórek (choroba z przewagą pręcików, choroba z przewagą czopków, uogólnione zwyrodnienia siatkówki i zaburzenia witreoretinalne), wieku zachorowania, postępu zaburzeń widzenia w czasie (stacjonarne lub postępujące) oraz obecności lub braku powiązanych cech

ogólnoustrojowych (izolowane lub syndromiczne IRD)². IRD można podzielić, w zależności od zajętego fotoreceptora, na dystrofie zdominowane przez pręciki, dystrofie zdominowane przez czopki i dystrofie uogólnione obejmujące zarówno pręciki, jak i czopki. IRD obejmują postacie syndromiczne, takie jak zespół Ushera i postacie niesyndromiczne, takie jak barwnikowe zapalenie siatkówki (RP), wrodzona ślepotą Lebera, dystrofia plamki Stargarda, choroideremia, zwyrodnienie plamki żółtej lub wrodzona stacjonarna ślepotą nocna. Ta heterogeniczność utrudnia znalezienie konkretnej mutacji, a także prawidłowe leczenie większości z tych chorób⁵. Od czasu identyfikacji pierwszego genu odpowiedzialnego za IRD w 1988 r., poczyniono ogromne postępy w dziedzinie testów molekularnych, co doprowadziło do identyfikacji ponad 270 genów chorobowych, zaangażowanych w rozwój oka, przeżycie fotoreceptorów, mechanizmy fototransdukcji, cykl retinoidowy, funkcję enzymatyczną siatkówki lub strukturę komórki, ale diagnostyka molekularna nadal pozostaje nieuchwytna w około jednej trzeciej przypadków^{1,2}. Przed identyfikacją genów sprawczych klinicyści klasyfikowali pacjentów na grupy na podstawie dziedziczenia Mendla, wieku zachorowania i cech klinicznych. Odkrycie podstawowych przyczyn genetycznych w ciągu ostatnich dwóch dekad doprowadziło do znacznie lepszego zrozumienia mechanizmów chorobowych w IRD, co wpłynęło na rozwój nowych terapii⁶. Niemniej jednak, aż do niedawna, te główne postępy diagnostyczne nie szły w parze z rozwojem strategii terapeutycznych oszczędzających lub przywracających wzrok, a IRD od dawna uważano za choroby w dużej mierze nieuleczalne. W ciągu ostatnich dziesięcioleci ten pogląd uległ zmianie, ponieważ w badaniach przedklinicznych zaczęto stosować nowe opcje terapeutyczne, a niektóre z nich przeszły do środowiska klinicznego, w tym terapia genowa, terapia komórkowa, protetyka siatkówki, a nawet bezpośrednia stymulacja mózgu. W tym kontekście terapie genowe wyróżniają się jako jeden z najbardziej obiecujących obszarów leczenia IRD, a wprowadzenie woretygenu neparwoweku (Luxturna), pierwszej terapii genowej zatwierdzonej przez FDA i EMA, utorowało drogę do dalszych badań². Rozwój metodologiczny technik sekwencjonowania genomu, którego byliśmy świadkami w ostatniej dekadzie, stanowił punkt zwrotny nie tylko w diagnostyce i prognozowaniu, ale przede wszystkim w identyfikacji nowych perspektyw terapeutycznych. Odkrycie nowych genów chorobowych i mechanizmów patogenetycznych leżących u podstaw IRD położyło podwaliny pod metody terapii genowej. Pacjenci z IRD mają znaczne i postępujące upośledzenie wzroku i mogą być monitorowani przez pomiary ostrości wzroku, ocenę pola widzenia, zapisy elektroretinograficzne

(ERG), obrazowanie strukturalne z autofluorescencją, optyczną tomografię koherentną w domenie spektralnej (OCT) i angiografię OCT. Chociaż dzięki tym innowacyjnym i nieinwazyjnym narzędziom można postawić dokładną diagnozę kliniczną, testy genetyczne są niezbędne do potwierdzenia określonego fenotypu, a analiza segregacji może z większą precyzją zająć się wzorcem dziedziczenia. Niektóre IRD są monogeniczne lub digeniczne, jednak w niektórych przypadkach ten sam gen może kodować różne fenotypy¹. Mutacje w tym samym genie mogą prowadzić do różnych diagnoz, na przykład barwnikowego zwyrodnienia siatkówki lub dystrofii czopków. I odwrotnie, mutacje w różnych genach mogą prowadzić do tego samego fenotypu. Wiek w momencie wystąpienia objawów oraz częstość i charakterystyka pogorszenia widzenia obwodowego i centralnego mogą się znacznie różnić w zależności od grupy choroby, a nawet w obrębie rodziny⁷. Na przykład wykazano, że mutacje genu PROM1 powodują zwyrodnienie barwnikowe siatkówki (RP), ale także chorobę Stargarda. Ta skrajna niejednorodność genetyczna jest podstawą około 30% niepowodzeń wykrywania w diagnostyce molekularnej. Aby sprostać ważnej potrzebie diagnostyki genetycznej i zwiększyć wskaźnik wykrywalności mutacji sprawczej, zbadano nowe i fascynujące ścieżki diagnostyczne, począwszy od sekwencjonowania pojedynczego genu DNA (przy użyciu techniki Sanger), poprzez sekwencjonowanie paneli genów (metodą sekwencjonowania nowej generacji (NGS)) całego egzomu (za pomocą sekwencjonowania całego egzomu (WES)) aż do zbadania całego genomu (za pomocą sekwencjonowania całego genomu (WGS)). Ze względu na niejednorodną prezentację IRD zgodność diagnozy klinicznej i molekularnej jest niezbędnym celem dokładnego scharakteryzowania fenotypu i zwiększenia szansy na zastosowanie strategii korzystnych terapeutycznie¹. Wzorce dziedziczenia w IRD obejmują dziedziczenie autosomalne recesywne, autosomalne dominujące oraz sprzężone z płcią. Te różnorodne mechanizmy choroby stanowią wyjątkowe wyzwanie dla terapii genowej. Na przykład mutacje autosomalne recesywne wymagają wymiany genów. Mutacje autosomalne dominujące z dominującymi negatywnymi skutkami lub toksycznym wzmocnieniem funkcji, mogą wymagać supresji genów z dalszą wymianą genu lub bez niej. Niektóre geny są zbyt duże dla obecnych wektorów. W przypadku tych chorób, w których bezpośrednia wymiana genów nie jest praktyczna, może być potrzebna ekspresja czynników neuroprotektynowych, które działają w sposób niezależny od mutacji. Wreszcie, konwencjonalna terapia zastępcza genów nie byłaby korzystna u pacjentów z poważną lub całkowitą utratą fotoreceptorów⁸. Nieodwracalny postęp wad wzroku i brak

skutecznych terapii podkreślają potrzebę innowacyjnych strategii terapeutycznych. Ze względu na uprzywilejowaną immunologicznie charakterystykę oczu i ciągłą identyfikację genów sprawczych, terapia genowa może być bardzo obiecująca w leczeniu IRD³.

2. Terapia genowa

Koncepcja terapii genowej pojawiła się natychmiast po odkryciu DNA. Historia badań nad terapią genową człowieka sięga lat sześćdziesiątych. Jednak wstępne próby zakończyły się niepowodzeniem ze względu na ograniczoną wiedzę na temat ekspresji genów i niemożność ustalenia najlepszej metody dostarczania materiału genetycznego.⁹ W ciągu ostatnich dwóch dekad nastąpił postęp w identyfikacji genów sprawczych przyczyniających się do patologii chorób oczu^{3,10}. W szczególności dramatycznie wzrosła wiedza na temat genetyki dziedzicznych chorób siatkówki (IRD)¹⁰. Rozwój metodologiczny technik sekwencjonowania genomu stanowił punkt zwrotny nie tylko w diagnostyce i prognozowaniu, ale przede wszystkim w rozwoju terapii genowej jako nowego podejścia terapeutycznego^{1,3}. Zidentyfikowano nie tylko geny powodujące choroby dla IRD, ale także zmapowano specyficzne warianty związane z patologią. Postępy te nie ograniczały się do monogenetycznych zaburzeń oczu, zidentyfikowano również szereg wariantów genów, które są związane z podatnością lub opornością na choroby wielogenowe, takie jak AMD¹¹. Terapia genowa jest nowym podejściem terapeutycznym do leczenia lub zapobiegania chorobie za pomocą metod genetycznych, które obejmują wprowadzenie zdrowej kopii wadliwego genu lub korektę genu w celu przywrócenia jego funkcji biologicznej^{11,12}. Wykorzystuje ona mechanizm syntezy białek gospodarza do lokalnego wytwarzania substancji terapeutycznych i obejmuje transfer kwasów nukleinowych (DNA lub mRNA) do komórek docelowych w celu skorygowania lub zastąpienia zmutowanego produktu genu lub wprowadzenia nowej funkcji, która zmieni patogenezę choroby¹⁴. mRNA ma tę zaletę, że nie wymaga dostarczania do jądra, co zmniejsza ryzyko integracji z genomem gospodarza, natomiast jest znacznie bardziej immunogeny i mniej stabilny od platformy DNA². Interesujący gen jest wprowadzany do komórki gospodarza za pośrednictwem wektora wirusowego, najczęściej AAV^{10,13}. Istotną przewagą terapii genowej nad tradycyjnymi podejściami farmakologicznymi jest to, że korzyści terapeutyczne mogą być utrzymywane przez długi czas bez konieczności powtarzania interwencji, a także połączenie wektorów i promotorów specyficznych dla danego typu komórki może

ograniczyć ekspresję genu terapeutycznego do pożądaných komórek docelowych¹⁴. Postępy w projektowaniu i produkcji wektorów dostarczających geny były ważną częścią rozwoju terapii genowej.¹² Terapie genowe mogą opierać się na różnych strategiach, w zależności od cech i patogenezy molekularnej chorób². Strategie te obejmują 1) metody terapii specyficznej dla genów, której celem jest ukierunkowanie na pierwotny defekt genetyczny w dotkniętych komórkach w celu wyleczenia choroby oraz 2) terapie niespecyficzne dla genów, których celem jest wydłużenie czasu poprawnego widzenia poprzez modulowanie choroby lub wykorzystanie pozostałych komórek do przywrócenia wzrokowej percepcji¹⁴. W chorobach autosomalnych recesywnych (AR) lub recesywnych sprzężonych z chromosomem X (XLR); mutacja powodująca chorobę znosi normalną funkcję genu i jest definiowana jako „mutacja utraty funkcji”. W tym przypadku mechanizm leżący u podstaw zaburzenia towarzyszącego jest spowodowany utratą funkcji, przez co pojedyncza kopia genu (w przypadku dziedziczenia AR) lub brak funkcjonalnych alleli (w przypadku dziedziczenia XLR u hemizygotycznych mężczyzn) nie jest wystarczające do zagwarantowania wystarczających poziomów białka². Choroby autosomalne dominujące (AD) są zwykle spowodowane mutacjami polegającymi na przejęciu funkcji, w wyniku których powstaje nieprawidłowe białko, co skutkuje zakłóceniem aktywności komórkowej lub tkankowej, lub dominującym negatywnym efektem, w którym uszkodzona podjednostka zatruwa kompleks wielkocząsteczkowy. Augmentacja genów jest uznanym podejściem do recesywnych zaburzeń monogenowych, ale nie jest odpowiednia w przypadku chorób AD i mutacji polegających na nabyciu funkcji, które wymagają oprócz wzmocnienia genu również wyciszenie zmutowanych alleli^{2,12}. Wśród podejść terapeutycznych mających na celu spowolnienie lub zatrzymanie postępu choroby u pacjentów, terapia genowa oka daje wiele nadziei, a ostatnie postępy w manipulowaniu materiałem genetycznym nadały impetu terapii genowej jako obiecującej nadchodzącej dziedzinie^{3,14}.

3. Oko jako idealny cel terapii genowej

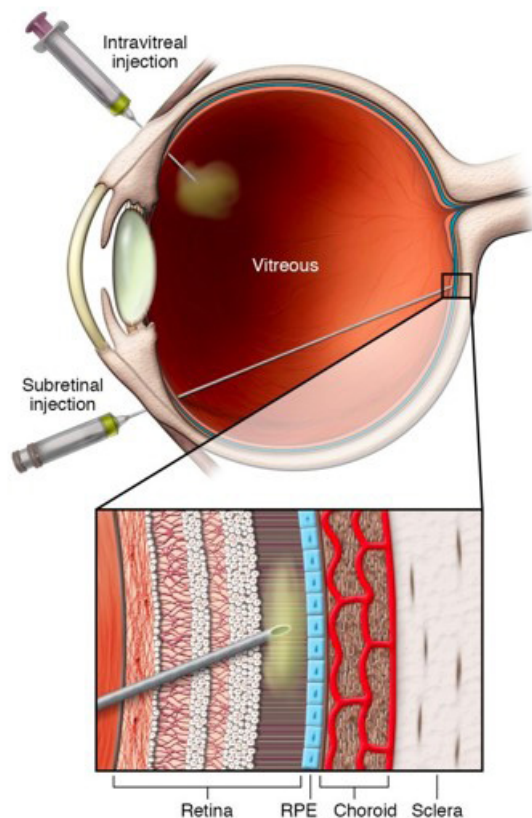
Siatkówka jest pożądanym celem terapii genowej ze względu na złożoną wrodzoną transmisję sygnałów wizualnych, której zmodernizowane narzędzia nie są w stanie przywrócić³. Specyficzne zalety oka jako tkanki docelowej umieściły ten narząd w czołówce rozwoju terapii genowej w ciągu ostatnich 20 lat, czy to w terapii addycyjnej z użyciem wektorów wirusowych do transferu prawidłowych kopii DNA, czy też wyciszania genów¹⁵. Ze względu

na swoje specyficzne właściwości anatomiczne, fizjologiczne i immunologiczne, siatkówka stanowi idealny cel dla terapii genowych i komórkowych z kilku powodów^{12,14}. Po pierwsze, dzięki barierze krew-siatkówka zbudowanej z ściśle połączonych między sobą komórek śródbłonka mikronaczyń siatkówki i komórek nabłonka barwnikowego siatkówki (RPE), siatkówka jest tkanką o względnie wysokim stopniu odporności^{2,10}. Uprzywilejowane mikrośrodowisko wewnątrzgałkowe powoduje miejscowe hamowanie odpowiedzi immunologicznych, oznacza to, że wprowadzenie obcego antygeny, takiego jak wektor wirusowy, jest zwykle tolerowane bez ryzyka stymulowania ciężkiej ogólnoustrojowej odpowiedzi^{9,10}. Chociaż działania niepożądane związane z wektorami są rzadkie, może wystąpić przekrwienie, światłowstręt lub pogorszenie widzenia⁹. Po drugie, oko jest stosunkowo małym i zamkniętym przedziałem². Wystarczy niewielka ilość wektora do uzyskania odpowiedzi terapeutycznej, co dodatkowo minimalizuje wszelkie skutki toksyczne związane z wektorem^{9,10}. Komórki siatkówki są postmitotyczne, dlatego pojedyncza dawka wektora może zapewnić długotrwałą ekspresję transgeny³. Ponadto oko jest obszarem łatwo dostępnym, zarówno z chirurgicznego, jak i z diagnostycznego punktu widzenia². Dostępnych jest szereg nieinwazyjnych technik monitorowania struktury siatkówki i oceny funkcji wzroku po operacji, co ułatwia ocenę skuteczności leczenia¹⁰. Łatwy dostęp chirurgiczny do oka umożliwia dostarczenie materiału genetycznego bezpośrednio do pożądanego warstwy i docelowej masy komórkowej. Podawanie do oka odbywa się zwykle dwoma drogami: do ciała szklanego i podsiatkówkowo⁹. Wstrzyknięcia podsiatkówkowe, które są bardziej inwazyjne, mają na celu dokładniejsze dotarcie do obszaru RPE i fotoreceptorów¹. Ponadto obustronny i symetryczny charakter IRD pozwala na wykorzystanie jednego oka jako kontroli do oceny progresji choroby i leczenia⁹. Jedną z wad jest wymieniony wcześniej postmitotyczny charakter siatkówki, ze względu na ograniczony dostęp wektorów, które są w stanie przeniknąć tylko podczas podziału komórki. Dodatkowo sukces terapeutyczny zależy od poziomu zwyrodnienia siatkówki w czasie leczenia, ponieważ komórki neuronalne nie mogą być zastąpione po ich zwyrodnieniu¹.

4. Drogi podania

Powodzenie terapii genowej zależy od drogi jej podania². W praktyce typ komórki docelowej i system dostarczania dyktują drogę podawania. Miejscowe wkraplanie, najmniej inwazyjna droga podania, jest również

najmniej skuteczna w przypadku dostarczania niewirusowego. Podobnie, drogi okołogałkowe, takie jak wstrzyknięcia pozagałkowe lub podspojówkowe, mają ograniczoną użyteczność w dostarczaniu niewirusowym ze względu na niezdolność kwasów nukleinowych o dużej masie cząsteczkowej do penetracji tkanki ocznej¹¹. Zastrzyki do ciała szklanego i podsiatkówkowe są dwiema najczęstszymi drogami podawania w terapii genowej. Jednak obie metody mają swoje wady i zalety. W większości badań klinicznych stosuje się wstrzyknięcie podsiatkówkowe (SRI), ponieważ pozwala na podanie wektora w bliskiej odległości od najczęstszego miejsca docelowego (tj. RPE i fotoreceptorów). SRI umieszcza materiał terapeutyczny w zamkniętym przedziale uprzywilejowanym immunologicznie, zmniejszając w ten sposób ryzyko reakcji ogólnoustrojowych. SRI wymagają witrektomii, retinotomii i rozwoju przejściowego jatrogennego przemieszczenia nerwów². W przeciwieństwie do podania do ciała szklanego, wstrzyknięcie podsiatkówkowe AAV jest bardziej inwazyjne, co wiąże się z ryzykiem uszkodzenia tkanki siatkówki. Potencjalne powikłania zabiegu obejmują otwory w plamce, krwotok podsiatkówkowy, zwłóknienie podsiatkówkowe, odwarstwienie i rozerwanie siatkówki¹¹. Wstrzyknięcie do ciała szklanego jest mniej inwazyjne². Chociaż dostarczanie do ciała szklanego wydaje się być bezpośrednią drogą do siatkówki, istnieją anatomiczne bariery, które uniemożliwiają dyfuzję wirusów, w szczególności wewnętrzna błona ograniczająca. Strategie wzmacniające transdukcję AAV po podaniu do ciała szklanego obejmują łagodne trawienie enzymatyczne lub chirurgiczne złuszczenie wewnętrznej błony ograniczającej, a także projektowanie wektorów drugiej generacji, które są zdolne pokonać bariery anatomiczne¹¹. Poza tymi dwoma głównymi drogami podawania, obecnie badana jest trzecia, czyli nadnaczyniówkowa, w której terapeutyki są transportowane w przestrzeni pomiędzy twardówką a naczyniówką i stanowi ona mniej inwazyjną alternatywę dla wstrzyknięć podsiatkówkowych^{2,11}.



Rycina 1. Dostarczanie do ciała szklanego jest łatwiejsze i wiąże się z mniejszym ryzykiem związanym ze strukturalnym uszkodzeniem tkanek oka, jednak skoncentrowane dostarczenie wektora do chorej tkanki może być problematyczne ze względu na objętość dyfuzyjną ciała szklanego. Dostarczanie podsiatkówkowe jest trudniejsze i powoduje przejściowe odwarstwienie siatkówki, co stwarza ryzyko trwałego uszkodzenia, jednak efekty terapii genowej i transdukcja do pobliskiej tkanki są znacznie większe²⁶

5. Systemy dostarczania genów

5.1 Wektory wirusowe

Pierwotna koncepcja zastosowania wektorów została zaproponowana na początku lat 90, gdzie retrowirusy z defektem replikacji były wykorzystywane jako wektory dostarczania genów, ale nadzieje te zostały wkrótce osłabione przez obawy dotyczące skutków ubocznych, w tym reakcji zapalnych i potencjalnej genotoksyczności spowodowanej integracją wektora z genomem. Postępy w wirusologii, immunologii i innych powiązanych dziedzinach

doprowadziły do zidentyfikowania bezpiecznego i wydajnego narzędzia do dostarczania genów - wirusa związanego z adenowirusem (AAV) pochodzącego z niepatogennych i bezotczkowych parwowirusów z defektem replikacji¹¹. Pomimo ciągłego odkrywania nowych genów odpowiedzialnych za IRD, dostarczanie genów za pośrednictwem wirusa napotyka na kilka przeszkód. Ze względu na sam charakter dostarczania genów za pomocą wektorów integrujących, translacja, zastosowanie i żywotność terapii genowej była ograniczona przez konstytutywne wywoływanie odpowiedzi immunologicznej, mutagenzę insercyjną, tropizm wirusowy, aktywność poza celem i wysoki profil niepożądanych zdarzeń klinicznych. Pomimo tego, że terapia genową jest potencjalnie potężnym narzędziem do leczenia choroby na poziomie genetycznym, niemożność przeprowadzenia kontrolowanej manipulacji i bezpiecznej insercji transgenu, ograniczyła rzeczywiste jej zastosowanie³. Sukces terapii genowej zależy od wyboru wektora¹. Dlatego też identyfikacja bezpiecznych i wygodnych wektorów miała kluczowe znaczenie dla postępu terapii genowej³. Dystrofia siatkówki wymaga trwałej korekcji, stąd potrzeba jak najdłuższej ekspresji transgenu i niskiej immunogenności. W ostatnich latach oceniono mnóstwo wektorów wirusowych i niewirusowych pod kątem ich skuteczności transdukcji w komórkach najbardziej dotkniętych zwyrodnieniem siatkówki - RPE i fotoreceptorach. Korzystne są wektory, które nie integrują się z genomem gospodarza, ponieważ taka integracja może powodować niepożądane zdarzenia po mutagenzie insercyjnej. Inne pożądane cechy wektora obejmują specyficzność komórkową, w której transdukowane są tylko komórki docelowe, z dużą lub nieograniczoną zdolnością klonowania, brakiem toksyczności i możliwością wytwarzania przy wysokich mianach i poziomach czystości¹. Obecnie terapia genowa opiera się na dostarczaniu genów za pośrednictwem wirusów i mechanizmów fizycznych (w tym zastosowania nanomateriałów). Wektory wirusowe są reprezentowane głównie przez adenowirusa (AV), lentiwirusa (LV) i wirusa związanego z adenowirusem (AAV). Ponieważ wektory adenowirusowe są immunogenne, a wektory lentiwirusowe integrują się z genomem gospodarza, wektory AAV są najkorzystniejszym wyborem do praktycznego zastosowania³.

5.1.1. Adenowirusy (AV)

Adenowirusy (AV) to rodzina wirusów z liniowym dwuniciowym DNA². Są najczęściej stosowaną grupą wektorów terapii genowej ze względu na ich zdolność do pomyślnej transdukcji do dużej liczby typów komórek,

a także do uzyskania wysokiego poziomu ekspresji transgenu niezależnie od etapu cyklu komórkowego¹. Istnieje 51 ludzkich serotypów adenowirusa, pogrupowanych od A do F. Wirusy A2 i A5 w podgrupie C są wykorzystywane w terapii genowej i nie są onkogenne, dodatkowo nie wpływają na cykl komórkowy gospodarza, a tym samym nie prowadzą do śmierci komórki. Ponadto, ponieważ wirusowy DNA nie integruje się z genomem komórki gospodarza, nie powodują mutagenyzy⁹. Adenowirusy zostały w dużej mierze przetestowane jako wektory terapii genowej, głównie ze względu na ich pojemność ładunkową (około 8–36 kb) i zdolność do transdukcji wielu typów komórek². W porównaniu z innymi wektorami, wektory adenowirusowe mają tę zaletę, że mogą przenosić bardzo duże wstawki, do 48 kb, ale mają ograniczenia pod względem bezpieczeństwa i braku długowieczności ekspresji, ze względu na ekspresję niektórych genów wirusowych w transdukowanych komórkach. To wyzwała odpowiedź immunologiczną przeciwko transdukowanym komórkom¹. Dlatego konwencjonalne wektory adenowirusowe (AV), skonstruowane przez zastąpienie regionu E1 kasetą transgenu odniosły tylko ograniczony sukces. Problemy te zostały częściowo rozwiązane za pomocą wektorów drugiej i trzeciej generacji². Nowsze adenowirusy drugiej generacji zostały skonstruowane z dodatkowymi delecjami lub mutacjami w wirusowych regionach E2 i E4, zapobiegając ekspresji genów i replikacji genomu wirusa. Dalsza poprawa bezpieczeństwa i skuteczności wektorów adenowirusowych nastąpiła wraz z opracowaniem wektorów adenowirusowych zależnych od substancji pomocniczych, które są pozbawione wszystkich sekwencji kodujących wirusa. Zawierają tylko wirusowe odwrócone powtórzenia końcowe i sekwencje pakowania. Zachowują one zalety wektorów adenowirusowych pierwszej generacji pod względem wysokiej wydajności w transdukcji in vivo i ekspresji transgenów oraz są w stanie pośredniczyć w długoterminowej ekspresji transgenów na wysokim poziomie przy braku przewlekłej toksyczności. Jednak zgłaszano problemy związane z tymi technikami, takie jak zanieczyszczenie wirusami pomocniczymi, niestabilność wektora i pojawienie się adenowirusów zdolnych do replikacji¹.

5.1.2. Lentiwirusy (LV)

Lentiwirusy (LV) są retrowirusami o większej pojemności upakowania, gdzie ładunek pojemności transgenu wynosi ~8–10 kb, co czyni je atrakcyjną alternatywą dla wektorów AAV dla tych IRD, których sekwencja kodująca gen sprawczy przekracza limit 4,7 kb, takich jak choroba Stargardta związana

z ABCA4 i MYO7A, Zespół Ushera typu 1B^{1,2}. LV posiadają odwrotną transkryptazę, dzięki której są w stanie zintegrować swój retrotranskrybowany prowirusowy DNA z chromosomami komórek gospodarza. Do tej pory badano retrowirusowy wariant ludzkiego wirusa niedoboru odporności typu 1 (HIV-1) i wirusa niedokrwistości zakaźnej koni (EIAV)². LV skutecznie integrują swój genom z komórką gospodarza, prowadząc do stabilnej ekspresji. To jednak zwiększa ryzyko mutagenyzy insercyjnej. Jak dotąd zastosowanie wektorów lentiwirusowych do terapii genowej w oku wydaje się ograniczać do korekcji genetycznej w RPE, ponieważ jest to jedyny rodzaj komórek transdukowanych z wystarczająco wysoką skutecznością do celów terapeutycznych. Wektory lentiwirusowe mogą być przydatne w leczeniu defektów fotoreceptorów poprzez pośredniczenie w dostarczaniu do RPE czynników, takich jak czynniki neurotroficzne lub antyapoptotyczne¹.

5.1.3. Wirusy związane z adenowirusami (AAV)

Wirusy związane z adenowirusami (AAV) to wadliwe jednoniciowe (ss) parwowirusy DNA z ponad 20 miejscami integracji w ludzkim genomie¹⁶. Spośród wszystkich wektorów stosowanych w oku do terapii genowej, wektory oparte na AAV stanowią najbardziej obiecujące podejście do leczenia wielu IRD pod względem wydajności i stabilności transferu genów. Kilka cech czyni je odpowiednimi do terapii genowej siatkówki, takich jak brak patogenności, minimalna immunogenność i zdolność do transdukcji komórek dzielących się. Główne problemy są reprezentowane przez ich ograniczoną pojemność pakowania, co wyklucza ich zastosowanie do leczenia IRD spowodowanych mutacjami w genach, których sekwencja kodująca przekracza 5 kb. Wirusy związane z adenowirusami należą do najmniejszych wirusów, z niezwinętym ikozaedrycznym kapsydem o długości około 22 nm¹. AAV typu dzikiego są niezdolne do replikacji i wymagają pomocniczych AV do wejścia w cykl lityczny, są klasyfikowane jako dependowirusy, które są naturalnie pozbawione replikacji i niepatogenne^{1,3}. AAV może infekować zarówno dzielące się, jak i dzielące się komórki i ma szeroki tropizm, który pozwala mu infekować wiele typów komórek w zależności od konkretnego serotypu¹. Do tej pory z naczelnych wyizolowano 13 naturalnie występujących serotypów AAV (AAV1–AAV13): różne serotypy mają różną konformację kapsydu i różne właściwości, zwłaszcza jeśli chodzi o tropizm². Rekombinowane wektory AAV (rAAV) stosowane w terapii genowej oparte są głównie na serotypie 2 (AAV2); był to pierwszy opisany ludzki serotyp

i najlepiej scharakteryzowany serotyp AAV¹. Genom rekombinowanego wirusa związanego z adenowirusem (rAAV) jest przetwarzany w dwuniciowy kolisty episom, który jest utrzymywany poza chromosomem. Podobna do chromatyny struktura genomu wektora AAV nie wywołuje negatywnych skutków dla komórek gospodarza i umożliwia długotrwałą ekspresję transgenu w niedzielących się komórkach. Białko Rep dostarczane w postaci trans eliminuje zdolność integracji genomowej³. Oprócz korzystnej toksyczności i profilu immunogennego, rekombinowane wektory AAV są odpowiednie do terapii genowej siatkówki ze względu na ich stabilny, nieintegrujący materiał genetyczny i zdolność do transdukcji postmitotycznych docelowych komórek siatkówki¹⁰. Dodatkową zaletą AAV jest to, że jest małym wirusem, który może łatwo dyfundować przez bariery biologiczne i w obrębie tkanki nerwowej. Jest to jedyny wektor, który może zapewnić dostarczanie genów do wewnętrznej siatkówki po podaniu do ciała szklistego. Chociaż mały rozmiar cząstki AAV jest zaletą, to jest też jej słabością: 25-nm cząstki AAV mogą pomieścić zaledwie 4,7 kb materiału genetycznego, co ogranicza jego zastosowanie w niektórych chorobach. Niemniej jednak AAV jest wirusem bezotoczkowym, a jego kapsyd można łatwo modyfikować za pomocą technik inżynierii genetycznej. Na przykład, został zaprojektowany tak, aby zapewnić dostarczanie genów do głębszych warstw siatkówki po podaniu do ciała szklistego, eliminując potrzebę odwarstwienia podsiatkówkowego¹². Wektory oparte na AAV są wykorzystywane do leczenia choroideremii (AAV2-REP1), RP sprzężonego z chromosomem X (XLRP; AAV-RPGR, AAV-RPGR, rAAV2tYF-GRK1-RPGR), RP z powodu mutacji w PDE6B (HORA-PDE6B), retinoschisis sprzężone z chromosomem X (AAV-RS1; rAAV2tYF-CB-hRS1) i achromatopsję (AAV-CNGB3, rAAV2tYF-PR1.7-hCNGB3 i AGTC-402; rAAV.hCNGA3)¹⁰.

5.2. Niewirusowy transfer genów

Chociaż różne wektory wirusowe wykazały swój potencjał w leczeniu IRD, istnieje ciągła potrzeba ulepszenia wektorów dostarczających. Dlatego też wysiłki badawcze zostały skierowane również na rozwój niewirusowych systemów dostarczania, takich jak nanocząstki (NP), nagie DNA czy liposomy, które są znacznie tańsze i łatwiejsze w produkcji w dużych ilościach w porównaniu z wektorami wirusowymi¹. Niewirusowe systemy dostarczania mają pewne zalety w porównaniu z wirusowymi, w tym potencjalnie nieograniczoną pojemność ładunkową, jednoczesne przenoszenie

wielu leków, niską immunogenność. Niewirusowe systemy dostarczania wykorzystują czynniki fizykochemiczne do zagęszczania DNA i/lub transportu go przez błony. Metody fizyczne obejmują, na przykład, sonoporację i elektroporację (tj. użycie ultradźwięków lub elektryczności w celu tymczasowego zwiększenia przepuszczalności komórek) oraz bezpośrednie wstrzyknięcie DNA do komórek docelowych, które nie zapewniają ochrony przed enzymatyczną degradacją terapeutycznych kwasów nukleinowych. Do środków chemicznych, które chronią ładunek przed działaniem nukleaz, należą m.in. liposomy kationowe i nanocząsteczki (NP)². Spośród różnych metod, wstrzykiwanie lub elektroporacja komórek z nagim plazmidowym DNA są szczególnie obiecujące, biorąc pod uwagę ich bezpieczeństwo i biokompatybilność. Nanocząstki (NP) można wykorzystać do dostarczenia plazmidowego DNA zawierającego funkcjonalną kopię genu w siatkówce¹. Pojemność nanocząsteczek DNA wynosi 20 kb. Ten wektor może nieść największy badany gen, gen USH, który ma rozmiar 15,6 kb i jest odpowiedzialny za zespół Ushera typu 2A⁹. Kompozycje nanocząstek metal/polimer mają zdolność przechodzenia przez błonę plazmatyczną, ucieczki z endosomów i transportu plazmidowego DNA do jądra. Lipidowe NP są stabilne i biokompatybilne i nie wywołują odpowiedzi immunologicznej po podaniu do oka. Zgłaszano jednak pewne wady, takie jak niższa ekspresja genów w porównaniu z uzyskaną w przypadku tych samych transgenów dostarczanych przy użyciu wektorów wirusowych¹.

6. Wyciszanie genów

Augmentacja genów jest uznanym podejściem do recesywnych zaburzeń monogenowych, ale nie jest odpowiednia w przypadku chorób AD². Choroby dominujące stanowią dodatkowe wyzwanie dla ich leczenia za pomocą terapii genowej, ponieważ w kilku przypadkach nieprawidłowe białko nie tylko wykazuje zaburzoną funkcję, ale także zmienia ekspresję lub funkcję białka typu dzikiego¹⁴. W takich przypadkach celem terapeutycznym jest zapobieganie ekspresji i kodowaniu nieprawidłowego białka przez zmieniony gen, który mógłby zakłócać normalne funkcjonowanie komórki². Wymaga to supresji dominującego allelu w celu zmniejszenia toksyczności przy jednoczesnym zachowaniu ekspresji allelu typu dzikiego¹⁴. W tym celu można przyjąć kilka różnych podejść, które schematycznie mogą działać na trzech poziomach: DNA, mRNA i pośredniego procesu pomiędzy nimi (tj. transkrypcji). We wszystkich tych przypadkach, kwasy nukleinowe gospodarza

mogą być celem na dwa sposoby, w sposób zależny od mutacji, przy czym poszukuje się specyficznego hamowania alleli w celu umożliwienia ekspresji kopii genu typu dzikiego lub sposób niezależny od mutacji, w którym połączone podejście z augmentacją genu jest obowiązkowe, ponieważ obie kopie genu (zmutowana i funkcjonalna) są wyciszane i zastępowane. Chociaż strategie specyficzne dla allelu nie zakłócają endogennego genomu typu dzikiego, podejścia niezależne od allelu są znacznie bardziej praktyczne, ponieważ nie muszą być dostosowywane do konkretnych mutacji powodujących chorobę. Strategie niezależne od alleli wymagają jednak ekspresji obu części kwasu nukleinowego w tym samym wektorze i dlatego są ograniczone przez kwestie pakowania².

5.1. Terapie oparte na DNA (edycja genomu)

Jak dotąd system CRISPR/Cas9 jest uważany za najbardziej zaawansowane narzędzie do edycji genomu. System ten składa się z endonukleazy Cas9, dostarczanej do komórek docelowych w połączeniu z kierującym RNA (sgRNA), które jest w stanie przeciąć genom w dowolnym miejscu genomu. Pęknięcia dwuniciowe (DSB) utworzone przez enzym aktywują następnie jeden ze szlaków naprawy DNA: łączenie niehomologicznych końców (NHEJ), naprawa ukierunkowana na homologię (HDR) lub łączenie za pośrednictwem mikrohomologii². NHEJ to podatny na błędy szlak edycji genomu, który może wprowadzać dodatkowe insercje i delecje w DSB. Dochodzi do przesunięcia ramki odczytu w sekwencji, co może generować przedwczesne kodony stop, tworząc нефunkcjonalne białko. To podejście może być stosowane do specyficznego hamowania zmutowanego allelu, jeśli przewodnik RNA celuje tylko w ten allel lub oba allele. NHEJ jest szeroko stosowany do delecji genów. System Cas9 mógłby potencjalnie działać jako podejście terapeutyczne do korygowania mutacji genetycznych RP i wielu innych chorób dziedzicznych. Nieustanny rozwój tej technologii w celu scharakteryzowania i poprawy bezpieczeństwa i wydajności edycji genetycznej pomoże spełnić jej obietnicę w leczeniu chorób genetycznych¹. Podejście do degradacji transkryptów oparte na CRISPR/Cas9 zostało z powodzeniem zastosowane w badaniach nad autosomalnym dominującym barwnikowym zapaleniem siatkówki (adRP) związanym z mutacjami rodopsyny (RHO- adRP)².

5.2. Wyciszanie mRNA

Strategie wyciszania mRNA opierają się na różnych inhibitorach antysensownych (tj. cząsteczkach kwasu nukleinowego, które są komplementarne i hybrydują z mRNA kodującymi białka) i działają poprzez usuwanie cząsteczek mRNA lub hamowanie ich translacji. Strategie wyciszania mRNA obejmują:

5.2.1. Rybozomy

Rybozomy to cząsteczki RNA zdolne do katalizowania reakcji chemicznej, które można wykorzystać do promowania specyficznego miejscowego rozszczepiania wiązania fosfodiesterowego w celu zahamowania ekspresji genów. Rybozomy były pierwszą strategią terapeutyczną opartą na RNA badaną w IRD. Podejście to zostało jednak w dużej mierze porzucone i zastąpione nowszymi technologiami opartymi na RNA, głównie dlatego, że sekwencja rozpoznawania tych cząsteczek jest silnie reprezentowana w ludzkim genomie, co w konsekwencji wiąże się z ryzykiem efektów odbiegających od celu². Chociaż zastosowanie rybozymów *in vivo* przyniosło obiecujące wyniki, można uzyskać jeszcze silniejsze i trwalsze podejście poprzez inhibicję RNA za pomocą siRNA¹.

5.2.2. Małe interferujące RNA

Interferencja RNA (iRNA) to kolejna technologia posttranskrypcyjnego wyciszania genów. (siRNA), to dwuniciowe (ds) cząsteczki RNA o długości 21–23 nukleotydów zdolne do hamowania ekspresji genów poprzez wiązanie się z określonymi mRNA. Mogą być albo naturalnie otrzymywane, które - do celów terapii genowej - są cięte przez enzym RNazy III zwany Dicer². Alternatywnie, siRNA można wytworzyć syntetycznie, a następnie bezpośrednio wprowadzić do komórki, omijając w ten sposób mechanikę Dicer¹. To drugie podejście jest mniej immunogenne, ponieważ długie ds-RNA mogą wywołać odpowiedź immunologiczną². Zazwyczaj najczęściej stosowaną strategią jest wstrzyknięcie do ciała szklatego. Ponieważ syntetyczne siRNA mogą być degradowane przez endonukleazy, zwykle wymagane są wielokrotne wstrzyknięcia, ze zwiększonym ryzykiem działań niepożądanych, takich jak zaćma, odwarstwienie siatkówki, krwotok do ciała szklatego i zapalenie wnętrza gałki ocznej¹.

5.3. Oligonukleotydy antysensowne

Oligonukleotydy antysensowne (AON) to małe cząsteczki DNA lub RNA, które można zaprojektować jako komplementarne do ich docelowych mRNA. W ostatnich latach AONs są przedmiotem rosnącego zainteresowania, ponieważ reprezentują jedyne podejście, poza augmentacją genów, które dotarło do środowiska klinicznego². W porównaniu z terapią wzmacniającą geny, terapia oparta na AON ma wiele zalet. Dodatkowo, w tym przypadku przywilej immunologiczny oka daje możliwość dostarczania cząsteczek AON bezpośrednio do siatkówki przez wstrzyknięcia do ciała szklistego lub podsiatkówkowe, przy minimalnych toksycznych immunologicznych skutkach ubocznych. W siatkówkach humanizowanego mysiego modelu CEP290, który nosi mutację LCA, dostarczanie nagiego AON za pośrednictwem AAV zmniejszyło liczbę nieprawidłowych transkryptów CEP290, wykazując, że AON stanowi doskonałą strategię leczenia LCA związanego z CEP290. Terapia oparta na AON może być skutecznym sposobem zatrzymania progresji lub poprawy funkcji wzroku¹.

5.4. Nieukierunkowane terapie genowe

Z ponad 270 genami powiązanymi z IRD, opracowanie metod specyficznych dla mutacji lub nawet dla genów staje się wyzwaniem. W tym kontekście rolą nieukierunkowanej terapii genowej jest zapewnienie alternatywnych strategii, mających na celu poprawę widzenia niezależnie od genu sprawczego. Podjęto próby dostarczania za pośrednictwem wektorów AAV cząsteczek zdolnych do przedłużenia przeżycia komórek fotoreceptorów, w tym czynników neurotroficznych, takich jak rzęskowy czynnik neurotroficzny (CNTF), czynnik neurotroficzny pochodzący z linii komórek glejowych, podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów oraz środki przeciwapoptotyczne, takie jak inhibitor apoptozy sprzężony z chromosomem X².

6. Zaburzenia nabłonka barwnikowego siatkówki

6.1. Wrodzona ślepota Lebera (LCA)

Jedną z najcięższych postaci dziedzicznego zwyrodnienia siatkówki jest wrodzona ślepota Lebera¹⁷. Jest to grupa monogenowych, wrodzonych

dystrofii siatkówki, które zazwyczaj wykazują wczesny początek i poważne zaburzenia widzenia^{1,18}. LCA jest obecnie jedyną uleczalną IRD ze względu na sukces terapii genowej¹. Dziedziczona jest zwykle w sposób autosomalny recesywny, chociaż odnotowano również wzorzec autosomalny dominujący¹⁹. LCA została po raz pierwszy opisana przez Theodore'a Lebera w 1869 roku²⁰. U jednego młodego dorosłego pacjenta niewidomego od urodzenia opisał konstelację słabego lub nieobecnego widzenia ze źrenicami amaurotycznymi, oczopląsem wędrownym i retinopatią barwnikową. Pośmiertne badanie histologiczne ujawniło wyraźną atrofię siatkówki zaakcentowaną w warstwach zewnętrznych i obwodowych, pogrubienie i stwardnienie naczyń, zmiany w nabłonku barwnikowym siatkówki (RPE) i pigmentację śródsiatkówkową. W 1954 Franceschetti i Dieterle opisali brak lub znaczne zmniejszenie mierzonej elektroretinografii (ERG) jako cechę charakterystyczną LCA, tym samym odróżniając ją od innych dystrofii siatkówki¹⁹. Częstość występowania wrodzonej ślepoty Lebera wynosi od 1 na 33 000 do 1 na 81 000 i uważa się, że stanowi ona $\geq 5\%$ wszystkich IRD²⁰. W patogenezie choroby zaangażowanych jest aż 28 genów, większość jest wyrażana wyłącznie lub głównie w siatkówce lub nabłonku barwnikowym siatkówki (RPE)^{20,21}. Wykazano, że geny te kodują białka o zróżnicowanym zakresie funkcji w siatkówce, biorące udział w fototransdukcji, cyklu widzenia, rozwoju/integracji fotoreceptorów, przy czym najczęściej występują GUCY2D, CEP290, CRB1, RDH12 i RPE65²⁰. Mutacje w tych genach stanowią prawie 75% przypadków²¹. Geny te regulują takie procesy jak transport do fotoreceptorów rzęskowych (CEP290, IQCB1, LCA5, RPGRIP1, SPATA7, TULP1, IFT140), morfogeneza fotoreceptorów (CRB1, CRX, GDF6, CLUAP1, PRPH2), fototransdukcja (AIPL1, GUCY2D, RD3), cykl retinoidowy (LRAT, RDH12, RPE65), transdukcja sygnału (CABP4, KCNJ13), różnicowanie siatkówki (OTX2), synteza guaniny (IMPDH1), fagocytoza zewnętrznego segmentu (MERTK), biosynteza koenzymu NAD (NMNAT1), podskładnik kompleksu opiekuńczego (CCT2) lub innej nieznannej funkcji białka (DTHD1)^{2,6}. Wśród tych genów gen RPE65, ulegający ekspresji w komórkach RPE, koduje specyficzne białko 65 kDa, które katalizuje konwersję estrów all-trans retinyłu do 11-cis retinalu. Bez siatkówki 11-cis opsyny nie mogą wychwytywać światła i przekształcać go w impulsy elektryczne. Utrata RPE65 zaburza cykl widzenia, powodując akumulację estrów retinylowych w kropelkach lipidów i wzrost ziarnistości lipofuscyny w komórkach RPE. Rezultatem jest postępująca degeneracja siatkówki i utrata wzroku¹. Pacjenci z wrodzoną ślepotą Lebera

wykazują poważną utratę wzroku¹⁷. LCA charakteryzuje się słabym widzeniem od urodzenia lub pierwszych kilku miesięcy życia, płaskimi lub prawie niewykrywalnymi odpowiedziami podczas elektroretinografii, oczopląsem i nieprawidłowymi odruchami źrenicowymi^{17,20}. Osłabienie lub brak odpowiedzi ERG oraz objawy dna oka są cechami charakterystycznymi stanu w pierwszych latach życia. Postęp jest bardzo szybki, a pacjenci szybko doświadczają ślepoty we wczesnej dorosłości, czego ostatecznym skutkiem jest zazwyczaj całkowita utrata wzroku po 30/40 roku życia^{1,22}. Dotknięte chorobą niemowlęta często mają wysoką nadwzroczność lub rzadziej wysoką krótkowzroczność, co sugeruje upośledzoną emmetropizację. Biorąc pod uwagę często ciężką i wczesną utratę wzroku, inne obszary rozwoju, w tym mowa, umiejętności społeczne i zachowanie, mogą być opóźnione²⁰. Inne towarzyszące objawy okulistyczne obejmują objaw oczno-palcowy (nawykowe pocieranie lub szturchanie oczu), zaćmę, zez, wewnątrzsiatkówkową migrację barwnika, zanik plamki żółtej i błąd nerwu wzrokowego. Nierzadko zdarza się, że pacjenci z LCA mają powiązaną niepełnosprawność intelektualną¹⁹. Dziedziczne retinopatie, takie jak wrodzona ślepota Lebera typu 2 (LCA2), która jest związana z mutacjami w genie RPE65, były przedmiotem wczesnych zainteresowań i sukcesu klinicznego.¹¹ Jeszcze dziesięć lat temu IRD leczono głównie suplementami odżywczymi, których celem było spowolnienie choroby¹⁸. Wraz z postępem w dziedzinie genetyki i późniejszą identyfikacją genów sprawczych, obecnie istnieje znacznie lepsze zrozumienie patologii chorobowych w IRD. Aktualne podejście polega na klasyfikowaniu IRD na podstawie genotypu, a nie fenotypu. Leczenie LCA od dawna budzi kontrowersje. Próbowano różnych terapii, w tym terapii farmakologicznej, chirurgicznej, elektrycznej, ozonowej i komórkami macierzystymi, zanim LCA stała się pierwszą chorobą oka skutecznie leczoną terapią genową. Terapia genowa LCA z wroetygenem neparwowek (VN) (LUXTURN) jest pierwszą taką terapią zatwierdzoną dla IRD w 2017 roku po publikacji badań fazy III. Został opracowany przez Spark Therapeutics jako AAV2- hRPE65v2²¹. Zatwierdzenie takiego podejścia terapii genowej wywołało większe zainteresowanie rozwojem terapii innych IRD¹⁸.

Tabela 1. Znane geny związane z LCA, ich lokalizacja i funkcja ¹⁹

Disorder	Gene	Location	Protein	Function
LCA1	GUCY2D	17p13.1	Guanylate cyclase 2D	Phototransduction
LCA2	RPE65	1p31	65-kilodalton RPE-localized protein	Retinoid phototransduction cycle
LCA3	SPATA7	14q31.3	Spermatogenesis-associated protein	Unknown retinal function
LCA4	AIPL1	17p13.1	Aryl hydrocarbon interacting protein	cGMP-PDE folding, cell cycle progression
LCA5	LCA5	6q14.1	Lebercillin	Centrosomal or ciliary function
LCA6	RPGRIP1	14q11	RP GTPase regulator-interacting protein 1	Outer segment formation
LCA7	CRX	9q13.3	Homeodomain transcription factor	Photoreceptor development
LCA8	CRB1	1q31	Crumbs like protein 1	Photoreceptor morphogenesis
LCA9	Unknown	1p36	—————	—————
LCA10	CEP290	12q21.3	Centrosomal protein (Bardet- Biedel Syndrome)	Centrosome maintenance
LCA11	IMPDH1	17q31.3	Inosine monophosphate dehydrogenase	Cell growth
LCA12	RD3	1q32.3	Retinal degeneration protein	Nuclear PML bodies
LCA13	RDH12	14q24.1	Retinol dehydrogenase	Retinoid phototransduction cycle
LCA14	LRAT	4q32.1	Lecithin retinol acyltransferase	Retinoid phototransduction cycle
LCA15	TULP1	6p21.3	Tubby-like protein	Phagocytosis

6.1.1. Gen GUCY2D (locus LCA1)

GUCY2D był pierwszym genem powiązanym z LCA i jest jedną z najczęstszych mutacji²⁰. Mutacja GUCY2D (zlokalizowana na chromosomie 17) odpowiada za 10–20% przypadków autosomalnej recesywnej LCA i 40% przypadków autosomalnej dominującej dystrofii pręcików i czopków. Gen koduje białko, cyklazę guanylanową-1-retinyłu (GC-1), która jest wyrażana w zewnętrznych segmentach fotoreceptorów, w większym stopniu w czopkach niż w pręcikach i bierze udział w syntezie c-GMP^{20,21}.

GC-1 odgrywa ważną rolę w regeneracji fotoreceptorów po fototransdukcji, tym samym jego niedobór skutkuje biochemicznym odpowiednikiem przewlekłej ekspozycji na światło²⁰. Umożliwia wskrzeszenie kanałów bramkowanych cGMP w komórce, przywracając w ten sposób spoczynkowy stan depolaryzacji po bodźcu aktywacyjnym. U pacjentów z LCA związanych z GUCY2D zwykle od wczesnego dzieciństwa występuje znaczna utrata wzroku, światłowstręt, nadwzroczność, oczopląs i wadliwy ERG. Terapia genowa na modelu zwierzęcym dla mutacji GUCY2D wykorzystuje zarówno wektory AAV, jak i lentiwirusowe²¹. Początkowo zastąpienie genów było badane przy użyciu wektora lentiwirusowego opartego na HIV1 w naturalnie występującym modelu kurczaka i wykazało poprawę odruchów optokineetycznych. Następnie wiele grup odniosło sukces terapeutyczny w zmodyfikowanych modelach mysich. Wykazano, że zarówno wektory wirusa serotypu 5 (AAV5), jak i rekombinowanego wirusa związanego z adenowirusem o serotypie 2/8 (AAV 2/8) niosące odpowiednio zwierzęcy i ludzki komplementarny DNA (cDNA), przywracają funkcję siatkówki i chronią fotoreceptory czopków w modelach myszy knock-out GC-1. Te udane badania na zwierzętach zaowocowały zaawansowanym przygotowaniem do próby terapii genowej na ludziach²⁰.

6.1.2. Gen AIPL1 (locus LCA 4)

Mutacja genu AIPL1 odpowiada za 4-8% przypadków recesywnej LCA. Wyrażany jest wyłącznie w pręcikach, fotoreceptorach stożkowych i szyszyńce²¹. Warianty sekwencji w AIPL1 są związane ze stosunkowo ciężkim fenotypem wrodzonej LCA, z ciężką i szybko postępującą utratą wzroku²⁰. U pacjentów we wczesnym wieku rozwijają się zmiany barwnikowe i makulopatie²¹. Wykazano, że terapia zastępcza genów z użyciem wektora AAV2/8 w modelu myszy z knock-outem AIPL1 skutkuje przywróceniem funkcji komórkowej z zachowaniem komórek fotoreceptorowych i poprawą funkcji siatkówki, pomimo ciężkiego, szybko postępującego zwyrodnienia siatkówki o wczesnym początku²⁰. Sekwencja AIPL1 ma mały rozmiar (~1,2 kb), dzięki czemu można ją sprawnie spakować. Jednak ze względu na szybką progresję i wczesny początek, istnieje tylko wąskie okno terapeutyczne²¹.

6.1.3. RPGRIP1 (locus LCA 6)

Mutacja genu RPGRIP1 (chromosom 14q11) odpowiada za 5% przypadków LCA. RPGRIP1 koduje 1287-aminokwasowe białko, które wiąże się z regulatorem GTPazy barwnikowej siatkówki (RPGR) i jest niezbędne do zakotwiczenia RPGR w rzęskach łączących między wewnętrznym i zewnętrznym segmentem fotoreceptorów^{20,21}. W przeciwieństwie do innych form LCA, RPGRIP1-LCA wydaje się być względnie niepostępujący, po początkowym szybkim pogorszeniu funkcji wzrokowych²⁰. Ponadto fotoreceptory w środkowej siatkówce pozostają zachowane przez dłuższy czas po pogorszeniu widzenia²¹. Cechy te sugerują szerokie okno możliwości potencjalnej interwencji. Scharakteryzowano modele myszy i psów z nokautem RPGRIP1. U myszy wykazano zarówno poprawę morfologii segmentu zewnętrznego, dłuższe przeżycie fotoreceptorów, jak i lepsze zachowanie odpowiedzi ERG w przypadku wymiany genu RPGRIP1 przy użyciu zarówno wektorów AAV2, jak i AAV8. W modelu psim wykazano również poprawę funkcji fotoreceptorów do 24 miesięcy po wstrzyknięciu podsiatkówkowym²⁰.

6.1.4. Gen CRB1 (locus LCA 8)

CRB1 to „ludzki homolog genu *Drosophila melanogaster*”. Mutacje CRB1 związane są z RP, LCA (7-17% wszystkich przypadków) i niektórymi innymi IRD. CRB1 bierze udział w adhezji komórkowej, utrzymaniu polaryzacji wierzchołkowo-podstawnej i komunikacji komórkowej. Uważa się, że ma kluczowe znaczenie dla struktury i funkcji fotoreceptorów. Występowanie mutacji CRB1 różni się znacznie w różnych regionach geograficznych i waha się od 17% w Hiszpanii do prawdopodobnie 0% (brak) w Indiach. Terapia zastępcza genów w przypadku retinopatii związanych z CRB1 jest wyzwaniem ze względu na duże rozmiary cDNA, które zbliżają się do granic pojemności upakowania AAV. Innym wyzwaniem w terapii genowej CRB1 jest równoczesna ekspresja wektora terapeutycznego w różnych typach komórek, które wymagają funkcji CRB²¹.

6.1.5. Gen CEP290 (locus LCA 10)

CEP290-LCA odpowiada za 15-20% przypadków, co czyni go najczęściej zaangażowanym genem^{20,21}. CEP290 to białko centrosomalne obecne w rzęście łączącej fotoreceptorów²¹. Oprócz transportu związanego

z mikrotubulami przez rzęskę, jest wymagane do regeneracji segmentu zewnętrznego (OS) i fototransdukcji². Mutacja genów kodujących białko rzęskowe prowadzi do zaburzeń zwanych ciliopatiami. Barierą w dostarczaniu CEP290 za pośrednictwem AAV jest rozmiar cDNA (~8 kb), który przewyższa maksymalną pojemność tradycyjnych wektorów (~4,7-4,9 kb)²¹.

6.1.6. Gen RDH 12 (locus LCA 13)

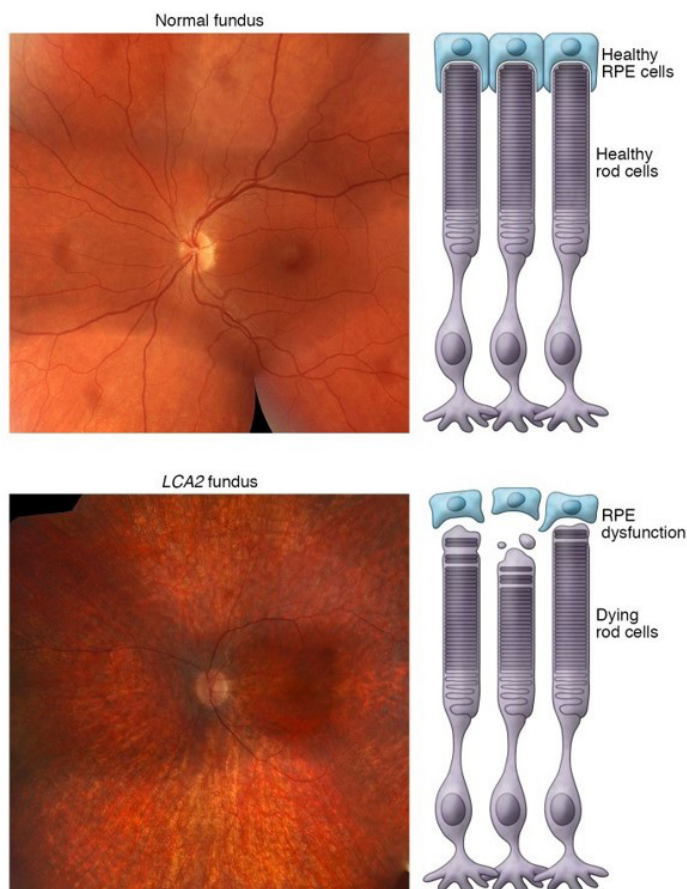
Mutacja genu RDH12 odpowiada za około 4–5% recesywnej LCA²¹. RDH12 koduje dehydrogenazę retinową-12, składnik cyklu wzrokowego²⁰. Enzym jest obecny w wewnętrznym segmencie fotoreceptorów i ma aktywność reduktazy, która redukuje all- trans-retinal do all-trans-retinolu. Enzym naturalnie chroni przed nadmiernym gromadzeniem się aldehydu retinowego i wynikającą z tego cytotoksycznością²¹. Jego niedobór może powodować toksyczność siatkówkową wtórną do akumulacji all-trans- retinalnej. Obiecujące wyniki terapii zastępowania genu RDH12 za pośrednictwem wektora AAV2/8 u myszy z nokautem RDH12 wskazują na możliwość przeprowadzenia w przyszłości badań klinicznych na ludziach²⁰.

6.1.7. RPE65 (locus LCA 2)

Mutacja RPE65 odpowiada zarówno za LCA (3-16%), jak i recesywne RP (~2%). Najwyższą częstość występowania wariantów RPE65 obserwuje się w populacjach rasy kaukaskiej (16,5%) i azjatyckiej (16%). Gen jest zlokalizowany na chromosomie 1p31 i składa się z 31 eksonów²¹. RPE65 koduje izomerazę retinoidową 65 kD wyrażaną w RPE, stanowiącą krytyczny składnik cyklu retinoidowego²⁰. Po raz pierwszy został opisany w 1993 r.²³ Białko RPE65 odpowiada za produkcję 11-cis- retinalu z estrów all-trans-retinylowych w nabłonku barwnikowym siatkówki. Brak 11- cis-retinalu prowadzi do niezdolności opsyn do wychwytywania i przekształcania światła w sygnały elektryczne²². Dochodzi do akumulacji estrów retinylowych w kropelkach lipidów i wzrostu ziarnistości lipofuscyny w komórkach RPE. Rezultatem jest postępująca degeneracja siatkówki i utrata wzroku⁹. Mutacja RPE65 w różny sposób wpływa na fotoreceptory pręcikowe i czopkowe. Niedobór 11-cis retinalu w fotoreceptorach pręcikowych powoduje wczesną i głęboką ślepotę wzrokową. Jednak fotoreceptory stożkowe mają alternatywną ścieżkę cyklu retinoidowego do generowania 11-cis-retinalu, która nie zależy od RPE65, a tym samym utrzymuje się widzenie za pośrednictwem stożka²¹.

To wyjaśniałoby, dlaczego dzieci z LCA zachowują wzrok za pośrednictwem stożka. Niemniej jednak, ciągle pogarszanie się stanu komórek stożkowych w końcu doprowadzi do utraty wzroku wspomagane przez komórki stożkowe¹⁹. Większość dzieci z niedoborem RPE65 wykazuje głęboką ślepotę nocną od urodzenia, ale resztkowym widzeniem za pośrednictwem czopków i często łagodnym oczopląsem²⁰. RPE65-IRD zazwyczaj przedstawia się przed 5 rokiem życia. Niemowlęta i małe dzieci dotknięte chorobą mają trudności z nawigacją lub rozpoznawaniem przedmiotów, zabawek i twarzy rodziców w słabo oświetlonym otoczeniu. Powszechne jest wpatrywanie się w jasno oświetlone obiekty (fotofilia). Rodzice rozpoznają również oczopląs wahadłowy o małej amplitudzie, rzadziej oczopląs rotacyjny. W przeciwieństwie do innych form molekularnych LCA, pocieranie lub otarcia oka w celu wywołania fotopsji, czyli objawu oczno-palcowego Franceschetti, obserwuje się tylko u pacjentów z najcięższymi zmianami²⁴. Modele zwierzęce dostarczyły bogatej wiedzy na temat patofizjologii LCA oraz umożliwiły przetestowanie bezpieczeństwa i skuteczności wirusowej terapii genowej. Najbardziej znanym z nich jest szwedzki pies Briard, który ma naturalną delecję czterech par zasad genu RPE65. Podobnie jak ludzie, zwierzęta te są ślepe od urodzenia i nie mają odpowiedzi ERG. Wstrzyknięcie podsiatkówkowe zrekombinowanego wektora wirusa związanego z adenowirusem o serotypie 2 (AAV2) z cDNA psiego RPE65 z promotorem CMV i wzmacniaczem β -aktyny u 4-miesięcznych psów spowodowały poprawę ERG, odpowiedzi źrenic i zachowań zależnych od wzroku^{19,20}. Poprawa utrzymywała się przez ponad 10 lat²⁰. Analizy histologiczne ujawniły wykrywalną ekspresję 11-cis-retinalu w siatkówce, co wskazuje na funkcjonalny powrót szlaku transdukcji wzrokowej. Badania te wykazały również, że wstrzyknięcia podsiatkówkowe mają większą skuteczność niż wstrzyknięcia do ciała szklistego¹⁹. Sukces w modelach psich i mysich zaowocował czterema próbami klinicznymi terapii genowej u ludzi²⁰. Pierwsze badania kliniczna terapii zastępczej genów rozpoczęły się w 2007 roku. Pacjenci otrzymali pojedyncze wstrzyknięcie podsiatkówkowe wektora AAV2 niosącego gen RPE65 w najbardziej dotknięte chorobą oko¹². Wstępne wyniki zostały podane w 2008 roku przez dwie niezależne grupy. Oprócz poprawy wyników wizualnych, badania funkcjonalnego rezonansu magnetycznego (fMRI) dostarczyły dowodów na to, że ludzka kora wzrokowa reaguje na odzyskiwanie funkcji siatkówki za pośrednictwem terapii genowej. Multimodalne nieinwazyjne neuroobrazowanie ujawniło długoterminową plastyczność strukturalną dróg wzrokowych u pacjentów z LCA, którzy otrzymali terapię augmentacji genów. Jednak w 2013 r. dwie

grupy zgłosiły, że wczesna poprawa widzenia u pacjentów z LCA leczonych RPE65 utrzymuje się do 3 lat, bez wykrywalnego pogorszenia widzenia. Jednak zwyrodnienie siatkówki nadal postępowało. Te nowe odkrycia dowodzą, że przynajmniej przez kilka lat terapia genowa może poprawić widzenie, ale także wskazują, że fotoreceptory nadal umierają po szczytowej poprawie, niezależnie od leczenia¹². Zaproponowano, że ciągła degeneracja siatkówki może być spowodowana suboptymalną ekspresją RPE65 w siatkówce ludzkiej, co doprowadziło do dalszych prac nad optymalizacją wektora, promotora i transgenu, mając nadzieję na uzyskanie trwalszych korzyści²⁰. Inny potencjalny winowajca przemijających efektów jest związany ze stadium siatkówki w momencie interwencji i postępującą utratą podparcia troficznego (zwłaszcza w odniesieniu do czopków). Zdrowsze fotoreceptory przetrwały w leczonej siatkówce, podczas gdy inne, bardziej obciążone pręciki były już w stanie przedapoptotycznym („w punkcie bez powrotu”) i nadal umierały. Utrata funkcji widzenia w późniejszym czasie po leczeniu jest zgodna z naturalnym postępem zwyrodnienia. Co więcej, zmniejszenie liczby fotoreceptorów pręcikowych pomimo terapii mogło ostatecznie doprowadzić do utraty wsparcia troficznego dla czopków, które początkowo zareagowały na terapię¹². Mimo to badanie zostało ogłoszone jako przełomowe w dziedzinie terapii genowej. Zatwierdzenie terapii genowej z RPE65 zostało wydane w grudniu 2017 roku dla pacjentów z dystrofią siatkówki spowodowaną mutacjami RPE65. Była to pierwsza zatwierdzona przez FDA terapia zastępcza genów wykorzystująca wektory AAV. Komisja Europejska zatwierdziła VN w dniu 23 listopada 2018 r. jako jednorazową terapię zastępczą genów w przypadku dystrofii²¹. Długoterminowe badania kontrolne wykazały inne potencjalne skutki terapii genowej siatkówki. Po 1,5 roku odpowiedź źrenic pozostała istotnie poprawiona, amplituda oczopląsu zmniejszyła się, ostrość wzroku z najlepszą korekcją nadal się poprawiała. Funkcjonalne obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego (fMRI), stosowane do badania aktywacji określonych obszarów mózgu na dyskretne bodźce, przeprowadzono po 2 latach u trzech pacjentów. Wraz z poprawą pola widzenia pacjenci wykazywali większą aktywację dróg korowych w leczonym oku¹⁹. Spark Therapeutics nadal prowadzi badania kliniczne w celu określenia długoterminowego działania leku Luxturna¹. Różne zdarzenia niepożądane dotyczące oczu związane z leczeniem w okresie obserwacji trwającym od 1 do 6 lat obejmowały makulopatię (5%), otwory w plamce (7%), rozerwanie siatkówki (10%), podwyższone ciśnienie wewnątrzgałkowe (IOP) (15%) i zaćmę (20%). Ogólnie rzecz biorąc, 66% leczonych pacjentów doświadczyło jednego lub więcej



Rycina 2. Mutacje w genie kodującym izomerazę RPE65 powodują zwyrodnienie RPE i śmierć fotoreceptorów²⁶

zdarzeń niepożądanych dotyczących oka, głównie łagodnych lub umiarkowanych. U dwóch (5%) uczestników badania wystąpiła nieodwracalna utrata wzroku, jedna z powodu podwyższonego zaniku wzroku związanego z IOP, a druga z powodu atrofii plamki żółtej wtórnej do zabiegu²¹. Budzi to obawy dotyczące stosowania tego zabiegu chirurgicznego w tkankach siatkówki uszczuplonych procesami zwyrodnieniowymi. Kolejnym z zagrożeń jest to, że wirus nieumyślnie rozprzestrzeni się do drugiego oka, jak pokazano w jednym badaniu na psach, lub do mózgu. W jednym z raportów białko RPE65 odnotowano w oku kontrolnym, co sugeruje rozprzestrzenianie się wektora wirusowego przez aksony komórek zwojowych siatkówki w nerwie wzrokowym. Może to reprezentować transneuronalne rozprzestrzenianie się

przez komórki zwojowe siatkówki lub przez komunikację w osłonkach nerwu wzrokowego¹⁹. Dopóki Luxturna nie stała się dostępna, jedyne opcje leczenia choroby związanej z RPE65 były wspomagające. Te zabiegi wspomagające są nadal ważne. Duże wady refrakcji nie są rzadkością w LCA i należy zapewnić odpowiednią korekcję refrakcji. Pacjentom zaleca się zwiększenie ilości oświetlenia w swoim otoczeniu, aby zmaksymalizować wykorzystanie ich wzroku. Szturchanie gałki ocznej może powodować atrofię okołogałkowej tkanki tłuszczowej i jest uważane za pośrednią przyczynę stożka rogówki u pacjentów z LCA. Szturchanie oczu można kontrolować za pomocą terapii behawioralnej i za pomocą okularów ochronnych²⁴.

6.2. Choroideremia (CHM)

Choroideremia (CHM) jest uważana za recesywną, rzadką IRD związaną z chromosomem X, charakteryzującą się postępującym, dośrodkowym zwyrodnieniem siatkówki, z częstością występowania 1:50 000 przypadków². Dotyka głównie mężczyzn¹⁰. Charakteryzuje się zwyrodnieniem RPE, naczyń włosowatych i fotoreceptorów. Pacjenci doświadczają postępującego ograniczenia widzenia w nocy i utraty widzenia peryferyjnego w okresie dojrzewania oraz różnego stopnia upośledzenia wzroku, aż do ślepoty w późnych fazach życia. Kobiety nosicielki mogą również wykazywać różne stopnie choroby¹⁹. Zwyrodnienie siatkówki jest wynikiem mutacji w genie CHM²². Konsekwencją tego jest brak funkcjonalnego produktu genu CHM, białka Rab-1 (REP1). Białka Rab są enzymami hydrolazy trifosforanu guanozyny, których funkcja jest niezbędna dla procesów przemieszczania pęcherzyków w komórkach. Białka te regulują tworzenie pęcherzyków, ruchliwość, wiązanie i fuzję z błoną oraz przekazywanie sygnałów do innych organelli. Funkcjonalność Rab zależy od aktywacji REP, a następnie prenylacji¹⁰. Prenylacja jest ważnym procesem, który pośredniczy w łączeniu się białek cytozolowych z błonami biologicznymi. Uważa się, że nagromadzenie nieprenylowanych białek Rab jest głównym mechanizmem śmierci komórek siatkówki²⁵. U ssaków występują dwa białka REP, białko REP1 i białko REP2¹⁰. W większości tkanek, w tym w nadnerczach, mózgu i tarczycy, REP2 jest w stanie skompensować niedobór lub niefunkcjonalność REP1^{10,16}. Powody, dla których REP2 nie zapobiega wystąpieniu choroby w oku, nie zostały jeszcze wyjaśnione². Uważa się, że funkcjonalny niedobór REP1 i zmniejszona prenylacja Rab początkowo powodują defekty w RPE, po których wtórną konsekwencją jest śmierć komórek fotoreceptorów¹⁰. W rzadkich przypadkach CHM może być częścią

zespołu sąsiedniego genu. U mężczyzn z dużymi delecjami dodatkowej części chromosomu X, innej niż Xq21, może rozwinąć się CHM wraz z wadami wrodzonymi, rozszczepem wargi i podniebienia, agenezją ciała modelowatego i poważnymi deficytami poznawczymi². Choroideremia jest obiecującym kandydatem do terapii genowej. cDNA CHM (1,9 kb) jest wystarczająco mały, aby dopasować się do wielkości wektorów AAV2. Poprzez wprowadzenie funkcjonalnego genu CHM i zwiększoną ekspresję białka REP1, terapia genowa choroideremii ma na celu przywrócenie wewnątrzkomórkowego transportu białek i zmniejszenie akumulacji produktów przemiany materii w komórkach siatkówki, a tym samym spowolnienie lub zatrzymanie pogorszenia widzenia. Wykazano, że konstrukt wektora AAV2 kodujący REP1 (AAV2-REP1) dostarcza funkcjonalną wersję genu CHM do komórek RPE i fotoreceptorów. Przywrócenie ekspresji i funkcji REP1 wykazano w modelach komórkowych i zwierzęcych, a celem tych badań była funkcjonalna aktywacja białek Rab, przywrócenie aktywności prenylacji, a w modelach zwierzęcych pozytywny wpływ na czynność siatkówki. Pierwsze badania były przeprowadzone na modelach choroideremii *in vitro*, gdzie stosowano wadliwe limfocyty i fibroblasty pozbawione REP1 izolowane od pacjentów. Wyniki wykazały skuteczne dostarczanie REP1 do dotkniętych komórek, jak również przywrócenie ekspresji i funkcji białka. W kolejnym badaniu modele choroideremii *in vitro* zostały wygenerowane przy użyciu limfoblastów lub indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych od pacjentów. Zaobserwowano 50-krotny wzrost ekspresji REP1 w komórkach traktowanych AAV2- hCHM w porównaniu z komórkami niezainfekowanymi. Transdukcja dotkniętych komórek transgenem CHM przywróciła aktywność enzymatyczną REP1 i skorygowała defekt transportu białka spowodowany utratą funkcji tego genu¹⁰. Wyniki pierwszego badania klinicznego na ludziach sięgają 2014 roku². Badanie to było badaniem I fazy i objęło 6 mężczyzn w wieku 35-63 lat, reprezentujących różne stadia choroideremii i zwyrodnienia dołka^{10,22}. Wstępne wyniki wykazały poprawę funkcji pręcików i czopków oraz średni przyrost odczytanych liter o 3,8 litery. Zaobserwowano również trwałą poprawę wzroku u 2 z 6 pacjentów, z postępującą degeneracją i utratą wzroku u nieleczonych grup kontrolnych²⁶. Dane z tych badań pokazują, że podsiatkówkowe dostarczanie funkcjonalnego genu CHM ułatwia ekspresję REP1, tym samym spowalniając lub zatrzymując postęp choroby i pogorszenie widzenia¹⁰.

7. Zaburzenia fotoreceptorów

7.1. Barwnikowe zapalenie siatkówki (RP)

Uważa się, że RP jest najczęstszą IRD i dotyka 1,5 miliona ludzi na całym świecie, a częstość występowania waha się od 1 na 3000 do 1 na 4000 w niektórych populacjach^{1,9}. Jest to heterogeniczna grupa IRD o zmiennych fenotypach – od łagodnej postaci po całkowitą ślepotę – oraz genotypach – z ponad 100 zidentyfikowanymi genami. Możliwe są tutaj wszystkie wzorce dziedziczenia, w tym autosomalne dominujące, autosomalne recesywne lub zaburzenia sprzężone z chromosomem X, podczas gdy dziedziczenie matczyne (mitochondrialne) jest bardzo rzadkie². XLRP ma zwykle cięższy przebieg niż RP dziedziczone autosomalnie recesywnie, podczas gdy pacjenci z autosomalnym dominującym RP mają na ogół najlepsze rokowanie pod względem utrzymania ostrości wzroku. Około 20–30% pacjentów z RP ma postać syndromiczną, która wiąże się z dodatkowymi nieprawidłowościami poza okiem⁹. Barwnikowe zapalenie siatkówki charakteryzuje się postępującą utratą funkcji fotoreceptorów i integralności strukturalnej¹. W początkowych stadiach dochodzi do degeneracji komórek fotoreceptorowych pręcików, powodując ślepotę nocną, z trudnościami w widzeniu w słabym świetle^{2,9}. Wraz z postępem choroby następuje śmierć czopków i pogorszenia ostrości wzroku². RP początkowo objawia się ślepotą zmierzchową i utratą widzenia obwodowego, ostatecznie prowadzącą do utraty widzenia centralnego w późniejszym życiu¹³. Po wykryciu mutacji genetycznych u pacjentów z RP rozpoczęto u tych pacjentów badania związane z terapią genową. Istnieją dwa podejścia do terapii genowej w RP. Pierwsze podejście polega na umieszczeniu normalnej kopii chorego genu w AAV i podaniu przez wstrzyknięcie podsiatkówkowe. Drugim podejściem jest inaktywacja zmutowanego genu⁹.

7.1.1. RPGR-XLRP

Barwnikowe zwyrodnienie siatkówki sprzężone z chromosomem X (XLRP) stanowi 10–20% wszystkich RP^{2,9}. Do tej pory zidentyfikowano trzy geny powodujące chorobę: regulator GTPazy RP (RPR) w locus RP3, zwyrodnienie barwnikowe siatkówki 2 (RP2) w locus RP2 oraz zespół ustno-palcowy typu 1². Przy czym mutacje w genie regulatora GTPazy RP (RPGR) odpowiadają za około 70% postaci choroby sprzężonej z chromosomem X. RPGR jest zakotwiczony w rzęsce łączącej segment wewnętrzny

i zewnętrzny komórki fotoreceptora i bierze udział w mechanizmie bramkowania ułatwiającym i ograniczającym ruch białek, zwłaszcza opsyn, między segmentami. Chociaż nie jest to jeszcze w pełni wyjaśnione, uważa się, że degeneracja fotoreceptorów obserwowana u pacjentów z XLRP spowodowana mutacją w RPGR jest wynikiem wadliwego transportu białek w rzęskach łączących⁹. Barwnikowe zwyrodnienie siatkówki sprzężone z chromosomem X jest uważane za najbardziej agresywny podtyp genetyczny RP, hemizygotyczne samce wykazują szczególnie ciężki fenotyp, charakteryzujący się wczesnym początkiem i szybką progresją, ostatecznie prowadzącym do ślepoty pod koniec trzeciej dekady życia². XLRP to IRD z największą liczbą trwających badań klinicznych dotyczących terapii genowej, z których wszystkie opierają się na strategii zastępowania genów za pośrednictwem AAV2. Wykazano, że wstrzyknięcie podsiatkówkowe wektora AAV2/5 niosącego ludzki RPGR do psiego modelu XLRPA2 powstrzymuje zwyrodnienie siatkówki i powoduje korektę translokacji białka opsyny^{9,26}.

7.1.2. RHO-RP

Gen rodopsyny (RHO) był pierwszym zidentyfikowanym genem powodującym RP². Zdecydowana większość mutacji RHO wykazuje wzorzec dziedziczenia AD (RHO- adRP), stanowiący 30% przypadków RP^{2,9}. RHO koduje rodopsynę, która stanowi ponad 90 % całkowitego białka w zewnętrznych segmentach fotoreceptorów pręcikowych. Rodopsyna pochłania światło wpadające do oka i zostaje aktywowana, inicjując szlak transdukcji wzrokowej. Stwierdzono, że mutacje w RHO wpływają na fałdowanie, aktywację i transport białka rodopsyny, zakłócając w ten sposób cykl widzenia i wpływając na funkcję widzenia⁹. IRD związane z toksycznym nabraniem funkcji nie mogą być leczone metodą zastępowania genów². Ekspresja ze zmutowanego allelu musi zostać wyciszona. Opracowano dwuetapowe podejście, w ramach którego allele RHO zmutowanego i typu dzikiego są tłumione za pomocą interferencji kwasu rybonukleinowego i wprowadza się odporny na supresję funkcjonalny gen RHO⁹.

7.1.3. PDE6B-RP

PDE6B koduje podjednostkę beta cGMP-fosfodiesterazy pręcika, enzymu, który odgrywa kluczową rolę podczas fototransdukcji. Mutacje w PDE6B odpowiadają za 2–5% autosomalnego recesywnego barwnikowego

zwyrodnienia siatkówki (arRP)⁹. Podsiatkówkowe podawanie AAV2-MERTK w modelu mysim zapobiegało degeneracji fotoreceptorów¹.

7.1.4. PDE6A-RP

PDE6A koduje podjednostkę alfa cGMP-fosfodiesterazy pręcika. Utrata funkcji tego enzymu prowadzi do chronicznie podwyższonych poziomów cGMP, co powoduje zwiększony napływ wapnia do komórki, a tym samym hiperaktywację szlaków śmierci komórkowej. Mutacje w PDE6A powodują 2-5% arRP⁹.

7.1.5. RLBP1-RP

RLBP1 (znany również jako CRALBP) koduje komórkowe białko wiążące aldehyd retinowy, które działa głównie jako akceptor 11-cis-retinalu podczas etapu izomeryzacji cyklu widzenia⁹.

7.1.6. MERTK-RP

MERTK koduje kinazę tyrozynową Mer zaangażowaną w szlak transdukcji sygnału, który reguluje liczne procesy komórkowe. W siatkówce ulega ekspresji w RPE i bierze udział w fagocytozie OS pręcików². Podsiatkówkowe podawanie AAV2-MERTK w modelu mysim zapobiegało degeneracji fotoreceptorów⁹.

7.2. Zespół Ushera (USH)

Zespół Ushera obejmuje grupę zaburzeń dziedzicznych charakteryzujących się podwójnym upośledzeniem czuciowym układu słuchowego i wzrokowego, ze zmiennym obrazem dysfunkcji przedsionkowej w części przypadków. Jest najczęstsza przyczyna łącznego ubytku wzroku i słuchu, odpowiadająca za ponad połowę przypadków wrodzonej głuchoty-ślepoty. Szacuje się, że częstość jej występowania wynosi od 4 do 17 na 100 000 osób na całym świecie. USH stanowi 5% wszystkich przypadków wrodzonej głuchoty i 18% wszystkich przypadków zwyrodnienia barwnikowego siatkówki (RP)²⁷. Zespół został po raz pierwszy opisany w 1858 r. przez niemieckiego okulistę Albrechta Von Graefe, u trojga rodzeństwa z równoczesną wrodzoną głuchotą i RP, został później nazwany na cześć Charlesa Ushera,

szkockiego okulisty, który ustalił jego dziedziczność (1914 r.)²⁷. Utrata wzroku we wszystkich przypadkach jest postępująca i objawia się barwnikowym zwyrodnieniem siatkówki (RP), charakteryzującym się stopniową degeneracją fotoreceptorów. W pierwszej kolejności dochodzi do utraty funkcji pręcików obwodowych, co prowadzi do ślepoty nocnej i zwężenia pól widzenia, a następnie śmierci czopków i poważnych zaburzeń widzenia²⁸. USH jest zarówno klinicznie, jak i genetycznie niejednorodny i dzieli się na trzy odrębne podtypy kliniczne (USH1, USH2 i USH3), związane z wieloma genetycznymi loci, różniące się stopniem zaawansowania utraty słuchu oraz obecnością lub brakiem dysfunkcji przedsionkowej, przy czym utrata wzroku spowodowana RP jest wspólna dla wszystkich trzech podtypów^{27,29}. Około 98% pacjentów z zespołem USH należy do podgrup choroby typu 1 lub typu 2. Natomiast USH3 jest stosunkowo rzadki, stanowiąc około 2% wszystkich przypadków²⁸. Wszystkie typy zespołu Ushera są dziedziczone w sposób autosomalny recesywny. Do tej pory zidentyfikowano co najmniej 10 genów sprawczych. Geny Ushera kodują szereg strukturalnie i funkcjonalnie odrębnych białek; obejmują one białko motoryczne wiążące ak tyne (miozyna VIIA, USH1B), białka kielasowe (harmonina, USH1C; USH1G; USH2D), białka odpowiedzialne za adhezję komórkową/białka transbłonowe (kadheryna 23, USH1D; protokadheryna 15, USH1F; usherin, USH2A; clarin-1, USH3A), receptor adhezyjny (ADGRV1, USH2C) oraz białko wiążące wapń i integryny (CIB2, USH1J)²⁷. Białka kodowane przez geny odpowiedzialne za rozwój USH tworzą kompleksy, które odgrywają kluczową rolę w rozwoju i utrzymaniu struktur komórkowych w obrębie ucha wewnętrznego i siatkówki, mające minimalną zdolność naprawy lub regeneracji. W ślimaku stereocilia są odpowiedzialne za przekształcanie bodźców mechanicznych z fal ciśnienia akustycznego na sygnały chemiczne. Chorobotwórcze mutacje w genach USH mogą destabilizować połączenia, powodować defekty w transporcie białek i morfologii, hamując w ten sposób transdukcję mechanosensoryczną²⁷. Choć obecnie nie ma dostępnego leczenia, opracowuje się wiele strategii terapeutycznych dla RP związanych z zespołem Ushera i innych dziedzicznych chorób siatkówki (IRD): obejmują one zastępowanie genów, edycję genów, supresję nonsensowną i podejścia oparte na oligonukleotydach antysensownych (ASO), a wiele obiecujących metod leczenia jest w trakcie badań²⁷. W zależności od stopnia ubytku słuchu zespół Ushera dzieli się na trzy podtypy kliniczne.

7.2.1. Zespół Ushera typu 1

Zespół Ushera typu 1 (najczęstsza postać) charakteryzuje się głęboką, wrodzoną głuchotą czuciowo-nerwową (z następczą głuchotą przedjęzykową lub ciężkim upośledzeniem mowy), objawami przedsionkowymi i retinopatią o początku wieku dziecięcego². Wynika z mutacji w MYO7A (USH1B), HARMONIN (USH1C), CDH23 (USH1D), PCDH15 (USH1F), SANS (USH1G) i CIB2(USH1J)²⁷. Spośród tych genów MYO7A jest najczęstszą przyczyną Ushera 1, stanowiąc ponad połowę przypadków, będący pierwszym zidentyfikowanym genem USH1^{27,29}. MYO7A koduje miozynę VIIA, zaangażowaną w transport melanosomów i fagosomów wzdłuż filamentów aktynowych w RPE oraz opsyny i innych białek fototransdukcyjnych w fotoreceptorach². Pełni krytyczne funkcje zarówno w uchu wewnętrznym, jak i siatkówce²⁹. Gen MYO7A ma 49 eksonów i obejmuje około 87 kb sekwencji genomowej na chromosomie 11q13.5, tym samym znacznie przekraczając pojemność ładunkową wektorów AAV². Konwencjonalny AAV ma małą pojemność pakowania w porównaniu z wektorem lentiwirusowym (4,7 vs. 8,5 kb)²⁸. Z tego powodu podjęto próby dostarczenia MYO7A w mysim modelu zespołu Ushera typu 1B za pomocą wektora lentiwirusowego EIAV niosącego gen typu dzikiego (EIAV-CMV-MYO7A)². Wykazano, że podsiatkówkowe dostarczanie natywnego MYO7A w obrębie wektora EIAV u myszy znacznie zmniejszyło utratę fotoreceptorów i poprawiło wewnątrzkomórkowy transport białka G. To samo badanie wykazało, że wstrzyknięcie jest bezpieczne u makaków, co skłoniło do rozpoczęcia badania fazy I/IIa obejmującego podsiatkówkowe jednooczne wstrzyknięcie wektora EIAV -MYO7A (UshStat) u pacjentów z zespołem Ushera 1B²⁶. Podjęto również próby przywrócenia słuchu i funkcji przedsionkowej w mysim modelu USH1 przy użyciu antysensownego oligonukleotydu (ASO). Jest to pierwsza interwencja terapeutyczna mająca na celu ratowanie funkcji przedsionkowej i słuchowej w mysim modelu ludzkiej dziedzicznej głuchoty. ASO blokuje nieprawidłowe miejsce składania w mysim modelu USH1C, blokując nieprawidłowe miejsce splicingu w celu promowania prawidłowego, w efekcie syntetyzowane jest funkcjonalne białko harmoniny, które przywraca funkcję przedsionkową i słuchową. Pacjenci z USH2 zazwyczaj mają umiarkowany ubytek słuchu, prawidłową funkcję przedsionkową i rozwijają RP we wczesnej dorosłości²⁵. Ich objawy RP na ogół zaczynają się w drugiej dekadzie²⁸. W przypadku USH2A, choć jest on powiązany z recesywnymi IRD, szereg czynników, w tym słabe zrozumienie fizjologicznej funkcji usheryny i wielkości genu

USH2A (15 kb), stoi na przeszkodzie strategii zastępowania genów². Pacjenci z chorobą typu III spowodowaną mutacjami w genie CLRN1 (USH3A) mają postępujący ubytek słuchu, zmienną dysfunkcję przedsiionka i zmienny początek RP, który szybko przechodzi do ślepoty w czwartej dekadzie życia²⁸. Biorąc pod uwagę zatwierdzenie przez Agencję ds. Żywności i Leków oraz Europejską Agencję Leków terapii genowej Spark Therapeutics - Luxturna dla pacjentów z chorobą siatkówki związanej z RPE65, terapia zastępcza genów stała się bardziej prawdopodobną przyszłą opcją leczenia kilku podtypów Ushera. Jednak takie terapie są bardzo kosztowne, a konwencjonalne metody wirusowe nie są odpowiednie dla bardzo dużych genów, takich jak USH2A (długość cDNA >15 kb)²⁷.

7.3. Choroba Stargardta

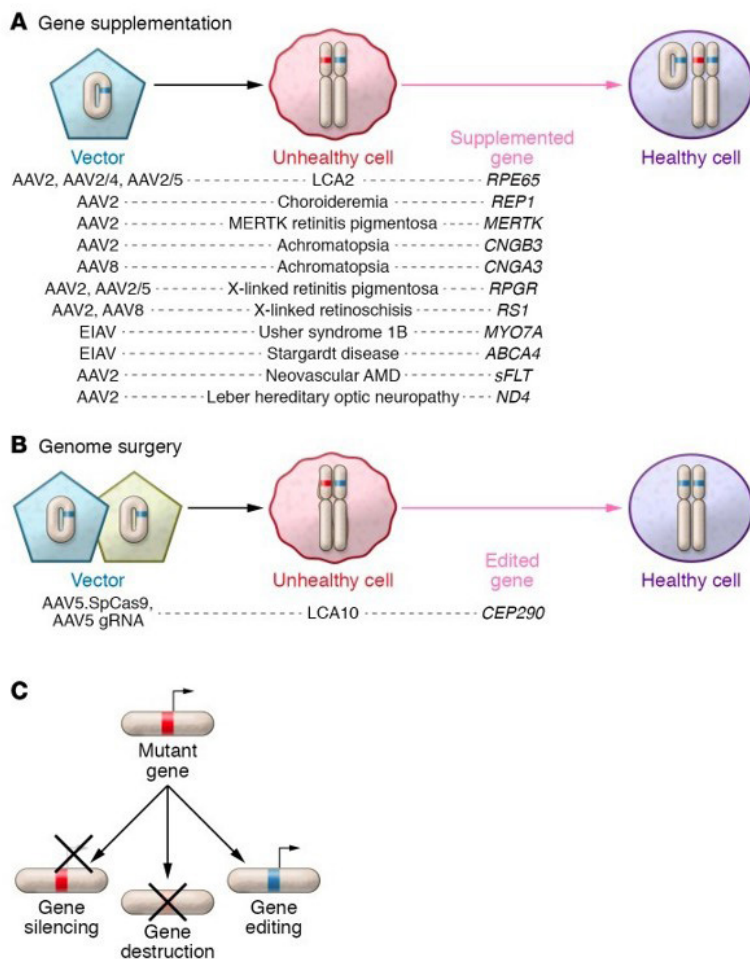
Choroba Stargardta jest najczęstszą dziedziczną dystrofią plamki żółtej¹. Częstość występowania wynosi 1:8 000–10 000 przypadków². Chorobę Stargardta można wyróżnić w trzech różnych postaciach: (I) STGD1, najczęstsza postać, wykazuje transmisję homozygotyczną lub heterozygotyczną złożoną z AR i jest spowodowana mutacjami w genie ABCA4; (II) STGD3, który jest określany przez mutacje AD w genie ELOVL4; (III) STGD4, rzadka postać AD związana z mutacjami w genie PROM1². Pacjenci wykazują obustronną centralną utratę wzroku, w tym dyschromatopsję i mroczki centralne, z charakterystycznym zanikiem plamki żółtej i żółto-białymi plamkami na poziomie nabłonka barwnikowego siatkówki (RPE)³⁰. Białko ABCA4 jest białkiem transportowym niezbędnym dla cyklu wzrokowego. Odpowiada za przenoszenie retinoidów, w szczególności N- retynyldenofosfatydyloetanoloaminy i fosfatydyloetanoloaminy³¹. Mutacje w ABCA4 prowadzą do tworzenia toksycznych związków retinoidowych²⁹. Komórki RPE zużywają pochodne retinoidu, a ponieważ A2E jest nierozpuszczalny, utrzymuje się w tych komórkach, gdzie ma tendencję do agregacji i tworzenia lipofuscyny. To ostatecznie prowadzi do uszkodzenia i degeneracji komórek RPE, a kiedy komórki RPE umierają, wspierane przez nie fotoreceptory zaczynają tracić funkcję, a ostatecznie także ulegać degeneracji. Pomimo tego, że jest najczęstszą przyczyną dziedzicznej ślepoty u dzieci, choroba Stargardta nie osiągnęła jeszcze takiego samego sukcesu w badaniach klinicznych, jak w przypadku innych dziedzicznych chorób siatkówki³¹. Terapia zastępcza genów jest ukierunkowana na zdolne do życia fotoreceptory, a podstawowym celem jest spowolnienie lub zapobieganie dalszej degeneracji siatkówki; więc optymalna jest

wczesna interwencja³⁰. STGD1 byłby uważany za silnego kandydata do strategii suplementacji genów, ale duża sekwencja kodująca ABCA4 o długości 6,8 kb prowadzi do trudności w dostarczaniu genów, ponieważ preferowanym wektorem jest wirus związany z adenowirusem (AAV), który ma optymalną zdolność upakowania ~4,7 kb³¹. Ukierunkowało to rozwój wektora EIAV, który, jak wykazano, zmniejsza akumulację lipofuscyny w fotoreceptorach po iniekcji podsiatkówkowej w mysim modelu *Abca4*²⁶. Odnotowano również obiecujące wyniki w modelach zwierzęcych z techniką niewirusową opartą na podsiatkówkowym dostarczaniu samoorganizujących się NP².

7.4. Achromatopsja (ACHM)

Achromatopsja jest rzadką, fenotypowo i genotypowo niejednorodną IRD z bardzo nielicznymi widocznymi oznakami zwyrodnienia czopka podczas badania dna oka^{1,2}. Jest to zaburzenie autosomalne recesywne, charakteryzujące się światłowstrętem, oczopląsem, ślepotą barw i bardzo niską ostrością wzroku¹. ACHM dotyka około 1 na 30 000 do 80 000 osób^{2,32}. Może występować w postaci pełnej lub niekompletnej. Pełny ACHM charakteryzuje się całkowitym zniesieniem funkcji czopków i całkowitym brakiem percepcji kolorów. Inne cechy obejmują światłowstręt, oczopląs wahadłowy, mroczki centralne i duże wady refrakcji². Pacjenci zwykle wykazują całkowitą utratę funkcji czopka, na co wskazuje brak zapisów elektroretinogramu (ERG). Niepełny fenotyp występuje rzadziej, ale nie jest wyraźnie skorelowany z podstawową mutacją³². Mutacje w sześciu genach są odpowiedzialne za ponad 90% wszystkich przypadków ACHM, z których pięć jest zaangażowanych w proces fototransdukcji. CNGA3 i CNGB3, kodujące podjednostki α i β kanału kationowego bramkowanego cyklicznym nukleotydem CNG w czopkach, łącznie odpowiadają za 70–80% przypadków ACHM. GNAT2 koduje katalityczną podjednostkę α transducyny białka G i odpowiada za rzadką postać (<2%) ACHM². Próby na zwierzętach wykazały, że terapia genowa może przywrócić elektrofizjologiczną funkcję czopków³². Doniesiono o obiecujących wynikach badań przedklinicznych dla ACHM spowodowanego mutacjami w genach CNGA3, CNGB3 i GNAT2. Badania te zostały przeprowadzone na modelach myszy knock-out CNGA3 oraz naturalnie występujących modelach myszy, owiec i psów. Metody zastępowania genów są skuteczne i trwałe w ACHM, zwłaszcza jeśli są podawane we wczesnym okresie życia. Poza tymi zachęcającymi danymi, ACHM wydaje się szczególnie odpowiedni do augmentacji genów z wielu powodów, w tym obecności

żywych czopków u wszystkich pacjentów oraz jego stacjonarnego lub wolno postępującego charakteru, co zapewnia szerokie okno terapeutyczne².



Rycina 3.(A) Schemat suplementacji genów oraz wektorów. (B) Schemat chirurgii genomu. (C) Opis różnych podejść stosowanych do wpływania na ekspresję genów²⁶

9. Podsumowanie

Choroby zwyrodnieniowe siatkówki są głównymi przyczynami ślepoty na całym świecie. Jako grupa, charakteryzują się postępującą utratą jednego lub kilku typów komórek siatkówki, powodując nieodwracalną utratę wzroku. W ciągu ostatnich dwóch dekad szybkie wyjaśnienie mechanizmów molekularnych i genetycznych związanych z tymi chorobami doprowadziło do

zidentyfikowania nowych celów rozwoju terapii¹⁴. Zwyródnienia siatkówki stanowią wyjątkowe wyzwanie, ponieważ postęp choroby jest nieodwracalny, a siatkówka ma niewielki potencjał regeneracyjny. Żadne obecne metody leczenia dziedzicznej choroby siatkówki nie są w stanie odwrócić ślepoty, a obecne zalecenia dotyczące suplementów diety tylko opóźniają postęp choroby z różnymi wynikami²⁵. W ciągu ostatnich dwóch dekad znaczne postępy w zrozumieniu podstaw patofizjologicznych chorób siatkówki, w połączeniu ze wzrostem biotechnologii transferu genów i transplantacji komórek, stworzyły optymizm w aspekcie leczenia IRD³³. Chociaż terapia genowa jest traktowana jako strategia leczenia szeregu chorób genetycznych, zaburzenia oczu są szczególnie atrakcyjnym celem dla tego typu terapii²⁴. Ze względu na swoje korzystne cechy anatomiczne i immunologiczne oko znajduje się w czołówce translacyjnej terapii genowej³⁴. W tylnym odcinku oka komórki siatkówki są postmitotyczne, co pozwala na trwałą ekspresję genów bez konieczności genomowej integracji transgenu. Oko ma dobrze zdefiniowaną anatomię z ograniczoną i zamkniętą przestrzenią fizyczną, która oferuje unikalne korzyści dla dostarczania miejscowego, w tym możliwość bezpośredniej wizualizacji i dostępu do tkanki. Ponadto bariera krwi-gałka przyczynia się do uprzywilejowania immunologicznego oka i ogranicza odpowiedzi immunologiczne na produkty terapii genowej. Znaczny postęp w badaniach okulistycznych, w tym dostępność odpowiednich modeli zwierzęcych, również przyczynia się do zintensyfikowania działań w zakresie terapii genowej oka²⁴. W rezultacie postęp w leczeniu chorób siatkówki za pomocą narzędzi genetycznych poczynił ogromne postępy w ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat²⁶. W zwierzęcych modelach dziedzicznych zwyródnień siatkówki (IRD) uzyskano dziesiątki obiecujących wyników³⁴. Przełomy w wektorach dostarczania genów, zarówno wirusowych, jak i niewirusowych, umożliwiły dostarczanie ładunków genetycznych w przedklinicznych modelach zaburzeń siatkówki i utorowały drogę wielu udanym próbom klinicznym. Dodatkowo adaptacja systemów CRISPR-Cas do inżynierii genomu umożliwiła korektę zarówno recesywnych, jak i dominujących alleli patogennych, zwiększając moc terapii genowych w modyfikacji choroby²⁶. Terapie genowe i komórkowe mogą potencjalnie zapobiegać, zatrzymywać lub odwracać choroby siatkówki u pacjentów z obecnie nieuleczalnymi schorzeniami ślepoty³³. Opracowano i przetestowano kilka strategii terapii genowej na różnych zwierzęcych modelach zwyródnień siatkówki. Strategie te obejmują: metody terapii specyficznej dla genów, której celem jest ukierunkowanie na pierwotny defekt genetyczny w dotkniętych komórkach i terapie niespecyficzne dla genów,

których celem jest wydłużenie czasu użytecznego widzenia poprzez modulowanie choroby zwyrodnieniowej lub wykorzystanie pozostałych komórek do przywrócenia wzrokowej percepcji. Terapia zastępowania genów siatkówki postępuje obecnie szybciej niż kiedykolwiek¹⁴. Obecnie możliwe jest bezpieczne i stabilne dostarczanie sklonowanych genów do określonych typów komórek siatkówki u ludzi. Wstępne wyniki testowania strategii augmentacji genów w ludzkich chorobach recesywnych sugerują obiecujące profile bezpieczeństwa i skuteczności, w tym lepsze wyniki w zakresie funkcji wzrokowych w dłuższych okresach³³. Zatwierdzenie w 2017 roku worety genu neparwoweku stanowiło kamień milowy w ewolucji terapii genowej¹¹. Leczenie lekiem Luxturna nie tylko zmieniło życie osób, które wcześniej były przeznaczone do życia w ślepotcie, ale również wzbudziło zainteresowanie opracowaniem dodatkowych odczynników do terapii genowej ukierunkowanych na wiele innych genetycznych form dziedzicznej choroby siatkówki. Przed Luxturną nie było możliwości opracowania metod leczenia tak rzadkich, wyniszczających chorób. Zatwierdzenie Luxturny miało ogromny wpływ na rozwój terapii innych chorób sierocych, a zwłaszcza IRD. Badania kliniczne utorowały drogę do włączenia pacjentów pediatrycznych do prób terapii genowej, co jest ważnym krokiem, ponieważ większość chorób wrodzonych ma podłoże genetyczne. Nowe cele obejmują wiele postaci LCA i barwnikowego zwyrodnienia siatkówki, choroderemię, achromatopsję, zespół Ushera, dziedziczną neuropatię nerwu wzrokowego Lebera, chorobę Stargarda i zwyrodnienie plamki żółtej związane z wiekiem (AMD)²⁴. Jednak głównym wyzwaniem w nadchodzących dziesięcioleciach będzie nie tylko przełożenie większej liczby wyników badań na zwierzętach na badania kliniczne, ale także maksymalizacja skuteczności leczenia u pacjentów. Postępujący charakter zwyrodnień siatkówki może stanowić wyzwanie dla zapewnienia długoterminowych korzyści klinicznych, ponieważ śmierć zmutowanych komórek często powoduje śmierć sąsiadujących zdrowych komórek¹⁴.

Referencje

1. Ziccardi L, Cordeddu V, Gaddini L, et al. Gene Therapy in Retinal Dystrophies. *Int J Mol Sci.* 2019;20(22):5722. Published 2019 Nov 14. doi:10.3390/ijms20225722
- Chiu W, Lin TY, Chang YC, et al. An Update on Gene Therapy for Inherited Retinal Dystrophy: Experience in Leber Congenital Amaurosis Clinical Trials. *Int J Mol Sci.* 2021;22(9):4534. Published 2021 Apr 26. doi:10.3390/ijms22094534

2. Amato A, Arrigo A, Aragona E, et al. Gene Therapy in Inherited Retinal Diseases: An Update on Current State of the Art. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:750586. Published 2021 Oct 15. doi:10.3389/fmed.2021.750586
3. Chiu W, Lin TY, Chang YC, et al. An Update on Gene Therapy for Inherited Retinal Dystrophy: Experience in Leber Congenital Amaurosis Clinical Trials. *Int J Mol Sci*. 2021;22(9):4534. Published 2021 Apr 26. doi:10.3390/ijms22094534
4. Cehajic Kapetanovic J, McClements ME, Martinez-Fernandez de la Camara C, MacLaren RE. Molecular Strategies for RPGR Gene Therapy. *Genes (Basel)*. 2019;10(9):674. Published 2019 Sep 4. doi:10.3390/genes10090674
5. Olivares-González L, Velasco S, Campillo I, Rodrigo R. Retinal Inflammation, Cell Death and Inherited Retinal Dystrophies. *Int J Mol Sci*. 2021;22(4):2096. Published 2021 Feb 20. doi:10.3390/ijms22042096
6. Kumaran N, Moore AT, Weleber RG, Michaelides M. Leber congenital amaurosis/early-onset severe retinal dystrophy: clinical features, molecular genetics and therapeutic interventions [published correction appears in *Br J Ophthalmol*. 2019 Jun;103(6):862]. *Br J Ophthalmol*. 2017;101(9):1147-1154. doi:10.1136/bjophthalmol-2016-309975
7. Talib M, Boon CJF. Retinal Dystrophies and the Road to Treatment: Clinical Requirements and Considerations. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)*. 2020;9(3):159-179. doi:10.1097/APO.0000000000000290
8. Ku CA, Pennesi ME. Retinal Gene Therapy: Current Progress and Future Prospects. *Expert Rev Ophthalmol*. 2015;10(3):281-299. doi:10.1586/17469899.2015.1035711
9. Öner A. Recent Advancements in Gene Therapy for Hereditary Retinal Dystrophies. *Turk J Ophthalmol*. 2017;47(6):338-343. doi:10.4274/tjo.41017
10. Ong T, Pennesi ME, Birch DG, Lam BL, Tsang SH. Adeno-Associated Viral Gene Therapy for Inherited Retinal Disease. *Pharm Res*. 2019;36(2):34. Published 2019 Jan 7. doi:10.1007/s11095-018-2564-5

11. Rodrigues GA, Shalaev E, Karami TK, Cunningham J, Slater NKH, Rivers HM. Pharmaceutical Development of AAV-Based Gene Therapy Products for the Eye. *Pharm Res.* 2018;36(2):29. Published 2018 Dec 27. doi:10.1007/s11095-018-2554-7
12. Dalkara D, Goureau O, Marazova K, Sahel JA. Let There Be Light: Gene and Cell Therapy for Blindness. *Hum Gene Ther.* 2016;27(2):134-147. doi:10.1089/hum.2015.147
13. Chan L, Mahajan VB, Tsang SH. Genome Surgery and Gene Therapy in Retinal Disorders. *Yale J Biol Med.* 2017;90(4):523-532. Published 2017 Dec 19.
14. Petit L, Punzo C. Gene therapy approaches for the treatment of retinal disorders. *Discov Med.* 2016;22(121):221-229.
15. Yanik M, Müller B, Song F, et al. In vivo genome editing as a potential treatment strategy for inherited retinal dystrophies. *Prog Retin Eye Res.* 2017;56:1-18. doi:10.1016/j.preteyeres.2016.09.001
16. Amato A, Arrigo A, Aragona E, et al. Gene Therapy in Inherited Retinal Diseases: An Update on Current State of the Art. *Front Med (Lausanne).* 2021;8:750586. Published 2021 Oct 15. doi:10.3389/fmed.2021.750586
17. Maguire AM, High KA, Auricchio A, et al. Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial [published correction appears in *Lancet.* 2010 Jan 2;375(9708):30]. *Lancet.* 2009;374(9701):1597-1605. doi:10.1016/S0140-6736(09)61836-5
18. Cideciyan AV, Jacobson SG. Leber Congenital Amaurosis (LCA): Potential for Improvement of Vision. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2019;60(5):1680-1695. doi:10.1167/iovs.19-26672
19. Hufnagel RB, Ahmed ZM, Corrêa ZM, Sisk RA. Gene therapy for Leber congenital amaurosis: advances and future directions. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2012;250(8):1117-1128. doi:10.1007/s00417-012-2028-2
20. Kumaran N, Moore AT, Weleber RG, Michaelides M. Leber congenital amaurosis/early-onset severe retinal dystrophy: clinical features, molecular genetics and therapeutic interventions [published

- correction appears in Br J Ophthalmol. 2019 Jun;103(6):862]. Br J Ophthalmol. 2017;101(9):1147-1154. doi:10.1136/bjophthalmol-2016-309975
21. Padhy SK, Takkar B, Narayanan R, Venkatesh P, Jalali S. Voretigene Neparvovec and Gene Therapy for Leber's Congenital Amaurosis: Review of Evidence to Date. Appl Clin Genet. 2020;13:179-208. Published 2020 Nov 25. doi:10.2147/TACG.S230720
 22. Sharif W, Sharif Z. Leber's congenital amaurosis and the role of gene therapy in congenital retinal disorders. Int J Ophthalmol. 2017;10(3):480-484. Published 2017 Mar 18. doi:10.18240/ijo.2017.03.24
 23. Cai X, Conley SM, Naash MI. RPE65: role in the visual cycle, human retinal disease, and gene therapy. Ophthalmic Genet. 2009;30(2):57-62. doi:10.1080/13816810802626399
 24. Maguire AM, Bennett J, Aleman EM, Leroy BP, Aleman TS. Clinical Perspective: Treating RPE65-Associated Retinal Dystrophy. Mol Ther. 2021;29(2):442-463. doi:10.1016/j.ymthe.2020.11.029
 25. Sengillo JD, Justus S, Tsai YT, Cabral T, Tsang SH. Gene and cell-based therapies for inherited retinal disorders: An update. Am J Med Genet C Semin Med Genet. 2016;172(4):349-366. doi:10.1002/ajmg.c.31534
 26. DiCarlo JE, Mahajan VB, Tsang SH. Gene therapy and genome surgery in the retina. J Clin Invest. 2018;128(6):2177-2188. doi:10.1172/JCI120429
 27. Whatley M, Francis A, Ng ZY, et al. Usher Syndrome: Genetics and Molecular Links of Hearing Loss and Directions for Therapy. Front Genet. 2020;11:565216. Published 2020 Oct 22. doi:10.3389/fgene.2020.565216
 28. Dinculescu A, Link BA, Saperstein DA. Retinal Gene Therapy for Usher Syndrome: Current Developments, Challenges, and Perspectives. Int Ophthalmol Clin. 2021;61(4):109-124. doi:10.1097/HIO.0000000000000378

29. Boye SE, Boye SL, Lewin AS, Hauswirth WW. A comprehensive review of retinal gene therapy [published correction appears in *Mol Ther.* 2013 Nov;21(11):2130]. *Mol Ther.* 2013;21(3):509-519. doi:10.1038/mt.2012.280
30. Tanna P, Strauss RW, Fujinami K, Michaelides M. Stargardt disease: clinical features, molecular genetics, animal models and therapeutic options. *Br J Ophthalmol.* 2017;101(1):25-30. doi:10.1136/bjophthalmol-2016-308823
31. Piottter E, McClements ME, MacLaren RE. Therapy Approaches for Stargardt Disease. *Biomolecules.* 2021;11(8):1179. Published 2021 Aug 9. doi:10.3390/biom11081179
32. Hassall MM, Barnard AR, MacLaren RE. Gene Therapy for Color Blindness. *Yale J Biol Med.* 2017;90(4):543-551. Published 2017 Dec 19.
33. MacLaren RE, Bennett J, Schwartz SD. Gene Therapy and Stem Cell Transplantation in Retinal Disease: The New Frontier. *Ophthalmology.* 2016;123(10S):S98-S106. doi:10.1016/j.ophtha.2016.06.041
34. Trapani I, Banfi S, Simonelli F, Surace EM, Auricchio A. Gene therapy of inherited retinal degenerations: prospects and challenges. *Hum Gene Ther.* 2015;26(4):193-200. doi:10.1089/hum.2015.030

LEKI ANTYFIBROTYCZNE – PRZEŁOM W WALCE O POPRAWĘ JAKOŚCI ŻYCIA PACJENTÓW Z IDIOPATYCZNYM WŁÓKNIENIEM PŁUC

Aleksandra Włosowicz¹, Patrycja Pabis², Karol Żmudka³

1. Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze Chorób Wewnętrznych, Diabetologii i Nefrologii

2. Studenckie Koło Naukowe im. Prof. Zbigniewa Religi przy Katedrze Biofizyki

3. Studenckie Koło Naukowe im. Prof. Zbigniewa Religi przy Katedrze Biofizyki

Abstrakt:

Idiopatyczne włóknienie płuc (IPF) to rodzaj samoistnego śródmiąższowego zapalenia płuc, w którym na skutek działania czynników środowiskowych, genetycznych, a także powstawania mikrourazów w nabłonku pęcherzyków płucnych dochodzi do włóknienia tkanki płucnej. Klinicznie IPF cechuje się obniżoną natężoną pojemnością życiową (FVC), a najczęściej objawia się dusznością wysiłkową i nieproduktywnym kaszlem. W ostatnich latach po wielu nieudanych próbach wynalezienia leków skutecznych w terapii IPF do leczenia dopuszczono leki antyfibrotyczne- pirfenidon i nintedanib. Choć substancje te łączy efekt działania polegający na spowolnieniu progresji choroby i zmniejszeniu ilości zaostrzeń mogących prowadzić do zgonu, ich działanie jest odmienne. Nintedanib blokuje transdukcję sygnału przez inhibicję kinaz tyrozynowych, zaś pirfenidon ma właściwości przeciwzapalne, antyoksydacyjne i antyfibrotyczne. Niniejsza praca ma na celu wykazanie korzyści ze stosowania leków antyfibrotycznych w terapii IPF.

Słowa kluczowe: idiopatyczne włóknienie płuc, nintedanib, pirfenidon

Abstract:

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) a type of idiopathic interstitial pneumonia in which lung tissue fibrosis occurs due to environmental and genetic factors, as well as the formation of microtrauma in the alveolar epithelium. Clinically, IPF is characterized by reduced forced vital capacity (FVC) and most commonly manifests as exertional dyspnea and non-productive cough. In recent years, after many unsuccessful attempts to develop effective drugs for the treatment of IPF, antifibrotic drugs - pirfenidone and nintedanib - have been approved for treatment. Although these drugs have the same effect of slowing down the progression of the disease and reducing the number of exacerbations that can lead to death, they act differently. Nintedanib blocks signal transduction by inhibiting tyrosine kinases, while pirfenidone has anti-inflammatory, antioxidant and antifibrotic properties. The present study aims to demonstrate the benefits of antifibrotic drugs in the treatment of IPF.

Keywords: idiopathic pulmonary fibrosis, nintedanib, pirfenidone

1. Wstęp

1.1. Epidemiologia

Idiopatyczne włóknienie płuc (IPF) to przewlekła choroba śródmiąższowa płuc, w przebiegu której dochodzi do postępującej utraty funkcji tkanki płucnej, co w efekcie prowadzi do niewydolności oddechowej i ostatecznie do śmierci. IPF zalicza się do idiopatycznych śródmiąższowych zapaleń płuc, a te do śródmiąższowych chorób płuc. Badania retrospektywne wskazują, że mediana czasu przeżycia pacjentów z tym schorzeniem wynosi około 3-5 lat po postawieniu diagnozy ¹, wykazano również, że częstość występowania IPF wzrasta wraz z wiekiem (chorują głównie osoby po 60 roku życia) i jest większa u mężczyzn. Najczęstszą przyczyną zgonu pacjentów z IPF jest niewydolność oddechowa (80% przypadków), do innych zalicza się m.in. chorobę niedokrwienną serca, zatorowość płucną, niewydolność serca, rak oskrzela czy infekcje ².

Tabela 1. Choroby śródmiąższowe płuc- klasyfikacja ATS/ERS z 2002 roku ³

Choroby śródmiąższowe płuc wg klasyfikacji ATS/ERS z 2002 roku	
Choroby o znanej przyczynie	• Jatrogenne: polekowe, popromienne itd. • W przebiegu chorób współistniejących: np. zakażeń, układowych chorób tkanki łącznej • W przebiegu reakcji nadwrażliwości po ekspozycji na pyły
Samoistne (idiopatyczne) śródmiąższowe zapalenia płuc (IIP)	• Zwykłe zapalenie śródmiąższowe płuc (UIP) tj. idiopatyczne włóknienie płuc (IPF) • Złuszczające śródmiąższowe zapalenie płuc (DIP) • Organizujące się zapalenie płuc (OP) • Śródmiąższowa choroba płuc z zapaleniem oskrzelików oddechowych (RB-ILD) • Ostre śródmiąższowe zapalenie płuc tj. choroba Hamman-Richa (AIP/ H-R) • Nieswoiste śródmiąższowe zapalenie płuc (NSIP) • Limfocytowe śródmiąższowe zapalenie płuc (LIP)
Choroby ziarniniakowe	• Sarkoidoza • Alergiczne zapalenie pęcherzyków płucnych • Histiocytoza z komórek Langerhansa
Inne	• Limfangioleiomiomatoza • Proteinoza pęcherzyków płucnych • Mikrolitiaza pęcherzyków płucnych • Eozynofilie płucne

1.2. Czynniki ryzyka rozwoju IPF

Obecnie rolę w rozwoju tej choroby przypisuje się współdziałającym czynnikom genetycznym i środowiskowym, a także mikrourazom powstającym w starzejącym się nabłonku pęcherzyków płucnych⁴. Wykazano wpływ takich czynników środowiskowych jak ekspozycja na metale i pył drzewny w powstawaniu IPF⁵. Ponadto hodowla zwierząt, w tym ptaków, rolnictwo czy praca przy obróbce kamienia są również czynnikami ryzyka wystąpienia tego schorzenia⁶. Niektóre infekcje wirusowe (m.in. EBV, HCV) i bakteryjne (m.in. zakażenia paciorkowcami) mogą powodować uszkodzenia nabłonka pęcherzyków płucnych oraz mieć wpływ na odpowiedź immunologiczną, a w rezultacie brać udział w patogenezie IPF, jednakże potrzebne są dalsze badania zgłębiające tę kwestię⁷. Istotny wydaje się być wpływ predyspozycji genetycznych w rozwoju idiopatycznego włóknienia płuc, zwłaszcza w przypadkach fenotypu rodzinnego IPF. Mutacje genów kodujących białka surfaktantu płucnego C i A2⁸ oraz mutacje genów związanych z telomerami (m.in. hTERT⁹) mają istotną rolę w powstawaniu IPF. Wykryto także, że polimorfizm promotora MUC5B jest najsilniejszym genetycznym czynnikiem ryzyka rozwoju IPF, co więcej wariant ten umożliwia wcześniejszą diagnozę i wydaje się być związany z łagodniejszym przebiegiem choroby¹⁰. Również nikotynizm w wywiadzie jest istotnym czynnikiem rozwoju IPF, co związane jest głównie ze zjawiskiem skracania telomerów, a w efekcie zaburzeniem procesów regeneracji nabłonka pęcherzyków płucnych występującym w tej jednostce chorobowej, a także pobudzaniem uwalniania TGF- β wskutek palenia tytoniu¹¹. Choroby współistniejące takie jak refluks żołądkowo-przełykowy (GERD), cukrzyca czy obturacyjny bezdech senny (OSA) są powiązane z występowaniem idiopatycznego włóknienia płuc. W GERD przewlekła mikroaspiracja treści pokarmowej może stymulować zmiany w mięszu płucnym, niewykluczone jest jednak, że to IPF zwiększając ujemne ciśnienie wewnątrz klatki piersiowej może sprzyjać powstawaniu refluksu żołądkowo-przełykowego¹². Przewlekła hiperglikemia w przebiegu cukrzycy pobudza włóknienie płuc na skutek niszczenia komórek nabłonkowych pęcherzyków płucnych, a także wpływając stymulująco na wytwarzanie mediatorów prozapalnych i profibrotycznych¹³. Powiązanie obturacyjnego bezdechu sennego z IPF jest istotną kwestią, która wymaga dalszych badań, wiadome jest jednak że współwystępowanie tych dwóch schorzeń jest związane z cięższym przebiegiem IPF¹⁴. Ostatnim czynnikiem ryzyka rozwoju idiopatycznego włóknienia płuc są mikrourazy powstające wielokrotnie w starzejącym się nabłonku pęcherzyków

płucnych. Powodują one pobudzenie komórek nabłonkowych do wytwarzania licznych mediatorów istotnych w patogenezie IPF¹⁵.

Tabela 2. Czynniki ryzyka rozwoju IPF ^{4, 6, 15, 16}

Czynniki ryzyka rozwoju IPF	
Czynniki środowiskowe	• Ekspozycja na metal i pył drzewny • Rolnictwo • Hodowla ptaków • Ekspozycja na pył roślinny i zwierzęcy • Obróbka kamienia
Czynniki mikrobiologiczne	• Wirusy: EBV, CMV, HCV, HHV-7, HHV-8, herpesvirus saimiri • Bakterie: <i>Staphylococcus</i>, <i>Streptococcus</i>, <i>Haemophilus</i>, <i>Neisseria</i>, <i>Veillonella</i>
Czynniki genetyczne	• Warianty genowe warunkujące defekty surfaktantu- SFTPC, SFTPA2 • Geny związane z telomerami- TERT, TERC, DKC-1, TINF2, RTEL1, PARN • Polimorfizm pojedynczego nukleotydu w promotorze MUC5B
Inne	• Palenie tytoniu • Refluks żołądkowo-przełykowy • Cukrzyca • Obturacyjny bezdech senny

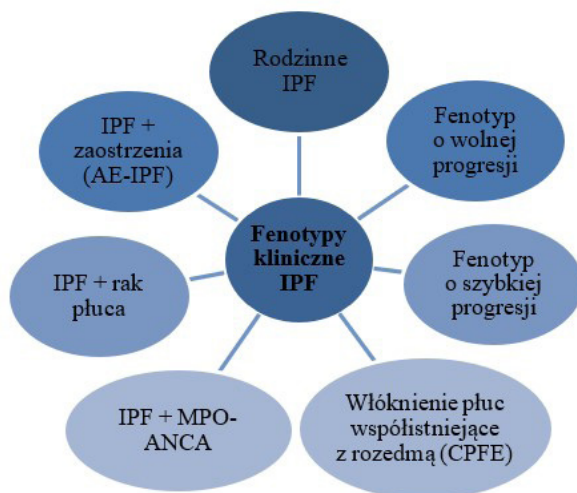
1.3. Patogeneza i patofizjologia

Początkowo włóknienie płuc w IPF było postrzegane jako skutek przewlekłego stanu zapalnego, jednakże przeświadczenie to okazało się być błędne. Obecna hipoteza zakłada, że wyżej wymieniane czynniki ryzyka np. palenie tytoniu czy ekspozycja na pyły wywołują u osób predysponowanych powtarzające się uszkodzenia komórek nabłonka pęcherzyków (AEC), a te wskutek nieprawidłowej aktywacji produkują mediatory. Ponadto zaburzony jest proces regeneracji nabłonka pęcherzyków płucnych, który napędzany jest przez miofibroblasty gromadzące się w miejscach destrukcji komórek. Również mediatory wytwarzane przez uszkodzone AEC stymulują powstawanie ognisk fibro- i miofibroblastów, które to odpowiadają za nadmierne wydzielanie macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), co skutkuje procesem włóknienia i przebudową śródmiąższu płucnego ¹⁷. Głównym czynnikiem zaangażowanym w progresję IPF jest transformujący czynnik wzrostu β (TGF- β), który m.in. powoduje apoptozę komórek nabłonka pęcherzyków płucnych, pobudza syntezę kolagenu oraz angiogenezę, a także proliferację fibroblastów i ekspresję metaloproteinaz macierzy. Jest też odpowiedzialny za transdiferencjację fibroblastów do miofibroblastów i przejście nabłonkowo-mezenchymalne

(EMT), czyli przekształcenie komórek nabłonkowych w mezenchymalne, które wówczas zdolne są do inwazji, migracji i produkcji ECM¹⁸. W patogenezie IPF bierze udział zarówno wrodzona, jak i nabyta odpowiedź immunologiczna. Elementami odporności wrodzonej, które najbardziej przyczyniają się do rozwoju IPF są neutrofile (elastaza neutrofilowa pobudza włóknienie), makrofagi (właściwości profibrotyczne), fibrocyty (produkcja ECM), a także komórki tuczne. Komórki Th będące zaś składowymi odporności nabytej powiązane są z wydzielaniem cytokin stymulujących procesy włóknienia- m.in. limfocyty Th2 wydzielają IL-4, IL-5 i IL-13, a limfocyty Th1- IFN- γ ¹⁹. Płuca pacjenta z IPF cechują się charakterystycznym rodzajem włóknienia, które dominuje w dolnych partiach płatów, całość jest określana jako obraz plastra miodu. W typowym dla IPF obrazie mikroskopowym występuje śródmiąższowe zapalenie płuc, które ma charakter heterogeny. Heterogenność ta polega na zmianie progresji obrazu w zależności od lokalizacji w obrębie płata płuca- przechodząc od obwodowej do centralnej części uszkodzenie zmienia się z przewlekłego poprzez ostre do nieobecnego, zwłóknienie ma zaś charakter plamisty, bardziej widoczny na obwodzie płata²⁰.

1.4. Obraz kliniczny i fenotypy kliniczne

Na początkowy obraz kliniczny idiopatycznego włóknienia płuc składają się głównie duszność wysiłkowa i suchy kaszel, które nasilają się w czasie. Do innych niespecyficznych objawów zalicza się zmęczenie, brak energii i stopniowe pogorszenie zdolności wykonywania codziennych czynności. W badaniu fizykalnym u większości pacjentów podczas osłuchiwania klatki piersiowej można wykryć trzeszczenia, zwykle u podstawy płuc (tzw. *velcro sounds* - dźwięki przypominające odrywanie rzepów), a w późniejszym okresie choroby można zauważyć palce pałeczkowate świadczące o przewlekłym niedotlenieniu organizmu. O zaawansowanej chorobie świadczy sinica, obecność tzw. serca płucnego, a także pojawienie się obrzęków obwodowych. Badania laboratoryjne wykonywane w trakcie diagnostyki IPF mają na celu wykluczenie innych jednostek chorobowych, głównie układowych chorób tkanki łącznej^{21, 22}. W badaniach czynnościowych płuc u pacjentów z IPF obserwuje się spadek natężonej pojemności życiowej (FVC) przebiegający praktycznie z liniową zależnością. Istotne jest, że u pacjentów z początkowo lepszym FVC dochodzi do pogorszenia tego parametru w takim samym tempie jak u osób z bardziej zaawansowanym przebiegiem choroby²³.



Rycina 1. Fenotypy kliniczne IPF [opracowanie własne]

Przebieg idiopatycznego włóknienia płuc jest zróżnicowany osobniczo, choroba ta ma niejednorodny przebieg kliniczny (rycina 1). Wyróżnia się kilka fenotypów klinicznych w zależności od charakterystycznych cech. Postać rodzinna (f-IPF), do której rozpoznania niezbędne jest potwierdzenie obecności co najmniej dwóch przypadków IPF w tej samej rodzinie cechuje się występowaniem mutacji genetycznych, m.in. hTERT, hTERC w genach kodujących białka surfaktantu. Szacuje się, że względna częstość występowania f-IPF wynosi między 0,5 a 9,5% wszystkich przypadków idiopatycznego włóknienia płuc²⁴. Ponadto wyodrębnia się też fenotypy o wolnej progresji i szybkiej progresji. W fenotypie o wolnej progresji charakterystyczny jest powolny spadek FVC i brak obrazu plastra miodu w TK. Natomiast w fenotypie o szybkiej progresji oprócz szybkiego spadku FVC i zaawansowanego obrazu choroby w TK obecne są autoprzeciwciała anti-HSP 70. Kolejną postacią kliniczną jest włóknienie płuc współistniejące z rozedmą (CPFE), w której dochodzi do rozwoju nadciśnienia płucnego. CPFE cechuje się rozedmą płatów górnych z towarzyszącym zwłóknieniem płatów dolnych, obserwuje się również zmniejszoną zdolność wymiany gazowej i duszność wysiłkową²⁵. Wyróżnia się też fenotyp MPO-ANCA + IPF, w którym obecne są przeciwciała przeciw cytoplazmie neutrofilii- typ ten może być też uznawany za osobną jednostkę chorobową²⁶. Współwystępowanie IPF z rakiem płuca jest kolejną postacią kliniczną, w której średni czas przeżycia jest znacznie krótszy w porównaniu do pacjentów bez diagnozy raka płuca i wynosi 1,6-1,7 roku. Zachorowalność

na raka płuc u pacjentów z IPF jest znacznie wyższa niż w ogólnej populacji i waha się pomiędzy 2,7% a 48%. Najczęstszym nowotworem płuca wśród pacjentów z idiopatycznym włóknieniem płuc jest rak kolczysto komórkowy²⁷. Ostatni fenotyp kliniczny to IPF z zaostrzeniami- w jego przebiegu może dojść do zaostrzenia choroby, którego epizod powoduje znaczny wzrost ryzyka zgonu, a śmiertelność 90-dniowa wynosi wówczas około 50%²⁸. Zaostrzenie IPF (AE-IPF) definiowane jest jako ostre, klinicznie istotne pogorszenie wydolności układu oddechowego o niewiadomej przyczynie²⁹. Do czynników ryzyka AE-IPF zalicza się zarówno niskie FVC, jak i niedawne pogorszenie wartości FVC, a także niską zdolność dyfuzyjną płuc dla gazów (niski wynik w badaniu współczynnika transferu płucnego dla tlenu węgla TLCO/DLCO). Ryzyko zwiększają również wcześniejszy epizod AE-IPF w wywiadzie, niska saturacja czy nieprawidłowy wynik testu marszu sześciominutowego³⁰. Istotny jest również wyjściowy wynik pacjenta w skali nasilenia duszności MRC- silna duszność wraz z wysokim BMI są kolejnymi czynnikami związanymi z wystąpieniem zaostrzenia IPF³¹.

1.5. Diagnostyka

Do ustalenia postępowania w kierunku rozpoznania IPF wykorzystywane są oficjalne wytyczne ATS/ERS/JRS/ALAT z 2018 roku, które dogłębnie przedstawiają możliwości diagnostyczne. Przede wszystkim istotne jest wykluczenie znanych przyczyn chorób śródmiąższowych płuc, a także potwierdzenie tzw. wzorca zwykłego śródmiąższowego zapalenia płuc (UIP) za pomocą badania tomografii komputerowej wysokiej rozdzielczości- HRCT (albo w przypadku niejednoznacznego wyniku obrazu w HRCT wykonanie badania patomorfologicznego po uprzedniej biopsji płuc). Ogromne znaczenie w diagnostyce IPF ma prawidłowo wykonane badanie podmiotowe, w którym szczególny nacisk powinien być położony na wywiad rodzinny, a także zweryfikowanie możliwej ekspozycji pacjenta na czynniki ryzyka rozwoju IPF. Ważne jest również ustalenie chorób współtowarzyszących i przyjmowanych leków, które potencjalnie mogły mieć wpływ na pogorszenie stanu płuc. Za zwyczaj pierwszym badaniem obrazowym wykonywanym przy podejrzeniu choroby śródmiąższowej płuc jest RTG klatki piersiowej, jednak badanie to nie jest wystarczające do postawienia diagnozy IPF- kluczowe jest tu HRCT, które umożliwia potwierdzenie włóknienia śródmiąższowego i obecności wzorca UIP, a jeżeli przyczyna włóknienia jest znana- wyklucza IPF. Wyróżnia się obrazy radiologiczne z ewidentnym wzorcem UIP, prawdopodobnym

UIP, wyniki nierozstrzygające i niezgodne z wzorcem UIP- w zależności od przypisania pacjentowi konkretnego wzorca ustalane jest dalsze postępowanie (tabela 3). Ponadto pacjentom z podejrzeniem choroby śródmiąższowej płuc wykonuje się oznaczenie miana autoprzeciwciał- przeciwciał przeciwjądrowych (ANA) i czynnika reumatoidalnego (RF) w celu różnicowania z układowymi chorobami tkanki łącznej. Badania inwazyjne wykonywane są jedynie w przypadku wzorca nierozstrzygającego lub obrazu sugerującego alternatywną diagnozę i należą do nich badanie popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL) lub biopsja płuca. Również w obrazie histopatologicznym wyróżnia się cechy definitywnie świadczące o UIP oraz te prawdopodobnie nakierowujące na tę diagnozę, nierozstrzygające i cechy wskazujące na inne rozpoznanie (tabela 4). Decyzję o rozpoznaniu idiopatycznego włóknienia płuc podejmuje zespół wielospecjalistyczny ³².

Tabela 3. Obrazy radiologiczne w HRCT- diagnostyka IPF ³²

Obrazy radiologiczne w HRCT	Charakterystyka obrazów radiologicznych
Definitywne UIP	• Obecność nasilonego włóknienia i/lub obrazu „plastra miodu”, zmiany obejmują obszar podopłucnowy i/lub lokalizują się wzdłuż przegród międzyzazikowych • Zaburzenia architektоники tkanki płucnej • Mozaikowatość zmian • Obecność ognisk fibroblastycznych • Nieobecność zmian wskazujących na inne rozpoznanie
Prawdopodobny UIP	• Obecność niektórych zmian jak w definitywnym UIP, ale o nasileniu uniemożliwiającym pewną diagnozę • Nieobecność zmian wskazujących na inne rozpoznanie • Lub obecność zmian o charakterze „plastra miodu”
Obraz nierozstrzygający	• Obecność włóknienia • Możliwe zaburzenie architektоники tkanki płucnej wraz ze zmianami mogącymi sugerować inne rozpoznanie • Obecność niektórych zmian jak w definitywnym UIP ale z cechami, które mogą sugerować inne rozpoznanie
Obraz niezgodny z wzorcem UIP	• Obecność zmian typowych dla innych włóknień śródmiąższowych bądź sugerujących inne rozpoznanie

Tabela 4. Obrazy histopatologiczne- diagnostyka IPF ³²

Obrazy histopatologiczne	Charakterystyka obrazów	Dalsze postępowanie
--------------------------	-------------------------	---------------------

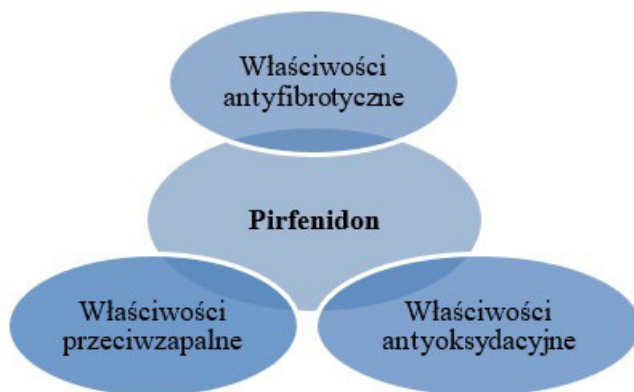
Wzorzec UIP	• Zmiany siateczkowate głównie w lokalizacji podopłucnowej i przypodstawnej • Zmiany o charakterze „plastra miodu” • Możliwe rozstrzenie oskrzeli i oskrzelików na obwodzie • Brak zmian wskazujących na inną chorobę	Możliwe jest rozpoznanie IPF bez diagnostyki inwazyjnej po wykluczeniu pozostałych przyczyn choroby śródmiąższowej.
Prawdopodobny UIP	• Zmiany siateczkowate głównie w lokalizacji podopłucnowej i przypodstawnej • Rozstrzenie oskrzeli i oskrzelików z pociągania zlokalizowane obwodowo • Brak zmian o charakterze „plastra miodu”	Możliwe jest rozpoznanie IPF bez diagnostyki inwazyjnej po wykluczeniu pozostałych przyczyn choroby śródmiąższowej i po przeanalizowaniu kontekstu klinicznego- m.in. wieku chorego, ekspozycji na czynniki ryzyka.
Wzorzec nierozstrzygający	• Ograniczone zmiany siateczkowate, często typu matowego szkła • Brak zmian o charakterze „plastra miodu” • Brak rozstrzeni oskrzeli i oskrzelików z pociągania • Brak innych cech pozwalających na inne rozpoznanie	Do potwierdzenia UIP niezbędna jest BAL lub biopsja płuca i wykonanie badania patomorfologicznego.
Obraz niezgodny z wzorcem UIP	• Obecność zmian niezwiązanych z UIP np. guzków, limfadenopatii, wysięku w opłucnej	Potrzebna dalsza diagnostyka- BAL/ biopsja płuca.

2. Początki leczenia IPF i odkrycie leków antyfibrotycznych

Początki terapii IPF bazowane były na przeświadczeniu, że choroba ta wynika z przewlekłego procesu zapalnego skutkującego uszkodzeniem nabłonka pęcherzyków płucnych i włóknienia³³. Do leczenia wprowadzono glikokortykosteroidy, które dzięki właściwościom przeciwzapalnym i immunosupresyjnym miały poprawiać stan pacjentów z IPF, jednakże dalsze badania wykazały, że terapia ta nie ma wpływu na naturalny przebieg choroby³⁴. Ponadto u pacjentów nie tolerujących sterydoterapii stosowano leki immunosupresyjne takie jak azatiopryna, a także próbowano leczenia za pomocą N-acetylocysteiny. Połączenie prednizonu, azatiopryny i N-acetylocysteiny w terapii skojarzonej okazało się być jednak niekorzystne- powodowało wzrost ryzyka zgonu i hospitalizacji³⁵. Podejmowano próby wprowadzenia innych leków,

jednakże zarówno leki przeciwzakrzepowe, sildenafil, ambrisentan, bosentan, etanercept oraz interferon gamma okazały się podczas badań klinicznych nieużyteczne w leczeniu IPF. Badania nad przeciwciałami monoklonalnymi – simtuzumabem czy tralokinumabem również nie przyniosły spodziewanych efektów³⁶. Wraz z odkrywaniem nowych faktów na temat patogenezы idiopatycznego włóknienia płuc zmieniono podejście do terapii tego schorzenia. Terapia IPF weszła na nowy poziom w 2014 roku kiedy FDA zaakceptowało wprowadzenie dwóch leków antyfibrotycznych do leczenia tej jednostki chorobowej. W 2015 roku w oficjalnych wytycznych ATS/ERS/JRS/ALAT pojawiły się rekomendacje stosowania pirfenidonu i nintedanibu jako leków mogących poprawić jakość życia pacjentów z idiopatycznym włóknieniem płuc³⁷.

3. Pirfenidon



Rycina 2. Działanie pirfenidonu [opracowanie własne]

Pirfenidon (PFD) był pierwszym lekiem antyfibrotycznym, który został zatwierdzony w leczeniu IPF. Jest to pochodna pyridonu – 5-metylo-1-fenylpirydyno-2(1H)-on- otrzymywana syntetycznie o właściwościach przeciwzapalnych, antyoksydacyjnych i przeciwzwłóknieniowych³⁸.

3.1. Działanie przeciwfibrotyczne

Istnieje kilka mechanizmów molekularnych działania PFD, głównie związanych z jego oddziaływaniem na TGF- β , a także na inne mediatory uczestniczące w procesach włóknienia. Wpływ pirfenidonu na działanie TGF- β jest kluczowe w jego właściwościach antyfibrotycznych. Lek ten przede wszystkim zmniejsza produkcję tego czynnika wzrostu, a ponadto hamuje różnicowanie

fibroblastów w miofibroblasty poprzez fosforylację SMAD3, p38 czy AKT w fibroblastach- dochodzi wówczas do tłumienia szlaków sygnalizacyjnych indukowanych w patogenezie IPF przez TGF- β ³⁹. Ze zmniejszeniem produkcji TGF- β związane jest również hamowanie ekspresji genów kodujących mediatory zaangażowane w procesy włóknienia, do których należy m.in. kolagen typu I, II, III, fibronektyna czy tenascyna-c, a także α -SMA biorącego udział w różnicowaniu miofibroblastów. Pirfenidon jest też odpowiedzialny za hamowanie transkrypcji genu kodującego białko HSP47 istotne w procesie powstawania prokolagenu. Kolejnymi punktami uchwytu działania PFD są PDGF (płytkopochodny czynnik wzrostu) oraz bFGF (czynnik wzrostu fibroblastów), które również należą do mediatorów biorących udział w procesach włóknienia. Na podstawie badań na modelach zwierzęcych wykazano, że pirfenidon hamuje syntezę izoform A i B PDGF, a także zmniejsza ekspresję bFGF ⁴⁰. Innymi substancjami, na które wpływa pirfenidon są metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej (MMPs). Te enzymy proteolityczne fizjologicznie uczestniczą w remodelingu ECM, a ich wyższe stężenia wiążą się z szybszą progresją IPF i gorszym rokowaniem⁴¹. PFD powoduje tłumienie ekspresji prokolagenu α 1 i TIMP-1, który jest inhibitorem MMP-s, przez co wykazuje działanie antyfibrotyczne⁴². Ponadto, biorąc pod uwagę, że MMP-9 i MMP-2 powodują aktywację TGF- β , a więc wpływają też na szlaki, w których bierze udział ten czynnik wzrostu, pirfenidon poprzez hamowanie ekspresji MMP-2 i MMP-9 blokuje mechanizmy patogenezy idiopatycznego włóknienia płuc ⁴³.

3.2. Działanie przeciwzapalne

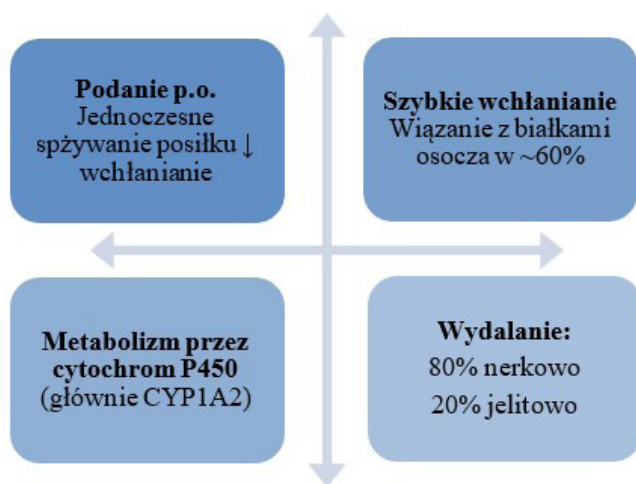
Właściwości przeciwzapalne pirfenidonu związane są przede wszystkim z hamowaniem wydzielania cytokin prozapalnych, głównie TNF- α (czynnik martwicy nowotworów α). Jest to białko uczestniczące w wielu reakcjach immunologicznych, którego uwolnienie indukuje burzę cytokinową- dochodzi wówczas do wydzielania prozapalnych interleukin, m.in. IL-1 i IL-6. Na podstawie badań nad oddziaływaniem PFD na TNF- α wykazano, że lek ten zmniejsza wydzielanie TNF- α (inhibicja zależna od dawki) oraz IL-6 ⁴⁴. Pirfenidon wpływa też bezpośrednio na komórki odpornościowe. Substancja ta powoduje zmniejszenie w komórkach dendrytycznych ekspresji cząsteczek MHC klasy II, upośledzenie zdolności do aktywacji limfocytów T, a także hamuje wydzielanie przez te komórki cytokin prozapalnych⁴⁵. PFD oddziałuje również na makrofagi i neutrofile, powodując zmniejszenie ich liczebności⁴⁶.

Hamuje też proliferację limfocytów CD4+ i CD8+, jednocześnie wpływając negatywnie na wydzielanie przez nich cytokin ⁴⁷. Na działanie przeciwzapalne pirfenidonu składa się również jego wpływ na inflammasomy, czyli kompleksy indukujące kaskadę prozapalną. Wykazano, że PFD blokuje aktywację inflammasomu NLRP3 w komórkach nabłonka oskrzelowego, co skutkuje hamowaniem procesu przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego zaangażowanego w patogenezę IPF ⁴⁸.

3.3. Działanie antyoksydacyjne

Zapobieganie stresowi oksydacyjnemu to kolejny mechanizm działania PFD, bardzo istotny w leczeniu IPF. Działanie antyoksydacyjne pirfenidonu zostało udowodnione w badaniach *in vitro* oraz na modelach zwierzęcych i wiąże się głównie z inhibicją izoform Nox4 i Nox1 oksydazy NADPH (NOX), która jest odpowiedzialna za wytwarzanie reaktywnych form tlenu, a także supresją mediatorów stresu oksydacyjnego ⁴⁹. Wykazano również zdolność PFD do hamowania ekspresji genów takich jak iNos (indukowalna syntaza tlenu azotu), Gpx1 (peroksydaza glutationowa 1), Nox1 (oksydaza NADPH 1) i Nox4 (oksydaza NADPH 4), których produkty to enzymy uczestniczące w zjawisku stresu oksydacyjnego. Ponadto, pirfenidon hamuje zależną od NADPH peroksydację lipidów, która jest jednym z mechanizmów prowadzących do uszkodzenia tkanki płucnej w IPF ⁵⁰.

3.4. Farmakokinetyka



Rycina 3. Farmakokinetyka pirfenidonu [opracowanie własne]

Pirfenidon jest lekiem podawanym doustnie w postaci kapsułek zawierających 267 mg substancji leczniczej. Charakteryzuje się szybkim wchłanianiem z przewodu pokarmowego, w około pół godziny osiąga swoje maksymalne stężenie w osoczu. Okres półtrwania PFD wynosi 3 godziny⁵¹. Substancja ta w blisko 60% wiąże się z białkami osocza⁵². Pirfenidon metabolizowany jest w wątrobie do 5-hydroksypirfenidonu i 5-karboksypirfenidonu, które to substancje również wykazują działanie antyfibrotyczne. 5-karboksypirfenidon powoduje zmniejszenie zawartości składowej kolagenu- hydroksyproliny- w fibroblastach, co skutkuje tłumieniem syntezy tego białka w przebiegu IPF⁵³. Największą rolę w metabolizowaniu PFD odgrywa CYP1A2, ponadto w procesach tych biorą też udział CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 i CYP2E1⁵⁴. Wydalanie pirfenidonu jest w 80% nerkowe, a w 20% eliminacja jest jelitowa, głównie pod postacią 5-karboksypirfenidonu⁵⁵.

3.5. Skuteczność kliniczna

Skuteczność terapii pirfenidonem wśród pacjentów z idiopatycznym włóknieniem płuc została potwierdzona za pomocą trzech randomizowanych badań fazy 3 z wykorzystaniem metody podwójnie ślepej próby z kontrolną grupą placebo. Należały do nich badania CAPACITY 004, CAPACITY 006 oraz ASCEND. W programach CAPACITY wzięli udział pacjenci z całego świata w wieku 40-80 lat, którym losowo przydzielano PFD lub placebo. W badaniu 004 zaobserwowano zmniejszenie tempa spadku FVC podczas przyjmowania pirfenidonu w stosunku do grupy placebo i było ono zależne od dawki. Efekt kliniczny widoczny był w 24. tygodniu stosowania leku i utrzymywał się do 72. tygodnia. Natomiast w badaniu 006 nie zaobserwowano istotnej różnicy w przewidywanej zmianie FVC pacjentów przyjmujących PFD w stosunku do placebo, a skuteczność działania leku widoczna była od 12. tygodnia stosowania do 48. Co więcej, wyniki testów marszu sześciominutowego wykonanych w 72. tygodniu u pacjentów z badania 006 były korzystniejsze w przypadku stosowania pirfenidonu, podobnej zależności nie zaobserwowano jednak w badaniu 004. W CAPACITY 004 czas przeżycia wolnego od progresji (PFS - *progression-free survival*) uległ wydłużeniu, jednakże w badaniu 006 nie uzyskano podobnego efektu. W analizie zbiorczej programu CAPACITY uzyskano wyniki świadczące o istotnie zmniejszonej śmiertelności w przypadku przyjmowania PFD niż w grupie placebo⁵⁶. Badanie ASCEND obejmowało zaś 555 pacjentów z IPF, którzy przyjmowali doustnie pirfenidon lub placebo w okresie 52 tygodni. Pokazało ono, że

u pacjentów stosujących PFD dochodziło do zmniejszenia tempa spadku FVC, wzrósł odsetek pacjentów, u których nie nastąpiło zmniejszenie FVC, a także poprawie uległy wyniki testu marszu sześciominutowego oraz doszło do wydłużenia PFS⁵⁷. Część pacjentów, którzy brali udział w badaniach CAPACITY lub ASCEND zostało również włączonych do programu RECAP, który miał za zadanie ocenić długoterminowe bezpieczeństwo stosowania pirfenidonu w terapii IPF. W badaniu RECAP wzięło udział 1058 pacjentów, którzy byli pod obserwacją przez okres 5 lat. Zaobserwowano, że prawie wszyscy zgłaszali co najmniej jedno działanie niepożądane, niemniej jednak głównie wynikało ono z progresji choroby bądź infekcji dróg oddechowych. Niemal 1/10 pacjentów musiała zaprzestać terapii z powodu działań niepożądanych, a najczęstszą przyczyną zgonu w wyniku zdarzeń niepożądanych związanych z leczeniem była progresja idiopatycznego włóknienia płuc, która wystąpiła u ok. 1/5 pacjentów⁵⁸. Kolejna analiza oceniająca bezpieczeństwo stosowania PFD i obejmująca 5 badań klinicznych- CAPACITY, ASCEND i RECAP została przeprowadzona na 1299 pacjentach i wykazała, że długotrwała terapia za pomocą pirfenidonu jest dobrze tolerowana i bezpieczna⁵⁹.

3.6. Działania niepożądane

Podczas badań klinicznych fazy 3 z udziałem 1345 osób oceniano bezpieczeństwo stosowania pirfenidonu. Na podstawie zgłaszanych przez uczestników badania dolegliwości do najczęstszych zdarzeń niepożądanych związanych ze stosowaniem PFD zalicza się problemy żołądkowo-jelitowe takie jak nudności, biegunkę czy niestrawność, a ponadto występowanie wysypki, zmęczenia czy reakcję nadwrażliwości na światło. Rzadziej pacjenci zgłaszali infekcje górnych dróg oddechowych i dróg moczowych, spadek apetytu i masy ciała, zaburzenia snu, bóle i zawroty głowy, zaburzenia smaku, pojawiały się również uderzenia gorąca, epizody duszności i kaszlu, a także podwyższone parametry prób wątrobowych. Często zgłaszano również inne niż wcześniej wymienione zaburzenia żołądkowo-jelitowe, m.in. refluks żołądkowo-przełykowy, wymioty, bóle brzucha, zaparcia, wzdęcia. Inne reakcje skórne takie jak świąd, obecność rumienia czy suchość skóry również były często odnotowywane, podobnie jak bóle mięśni i stawów. Co najważniejsze, ciężkie zdarzenia niepożądane podczas badań klinicznych były odnotowywane zarówno w grupie stosującej PFD, jak i w grupie placebo – ich częstość była podobna⁶⁰.

3.7. Interakcje i przeciwwskazania

W związku z metabolizowaniem pirfenidonu przez CYP1A2 i inne wyżej wymienione cytochromy, przyjmowanie PFD wraz z induktorami (np. barbiturany, karbamazepina, rifampicyna, omeprazol, papierosy) bądź inhibitorami (np. enoksacyna, cyprofloksacyna, amiodaron, propafenon) tych cytochromów może skutkować interakcjami. W trakcie leczenia za pomocą PFD należy unikać spożywania soku grejpfrutowego, który hamuje CYP1A2. Przeciwwskazana jest również fluwoksamina- lek przeciwdepresyjny z grupy selektywnych inhibitorów wychwytu zwrotnego serotoniny (SSRI). Pirfenidon jest także przeciwwskazany u pacjentów z ciężkimi zaburzeniami czynności wątroby lub nerek (klirens kreatyniny <30 ml/min) lub w stanach krańcowej niewydolności tych narządów, a także w przypadku nadwrażliwości na składniki preparatu. Pacjenci powinni minimalizować kontakty z promieniowaniem słonecznym podczas terapii PFD i unikać leków powodujących fotowrażliwość⁶¹.

3.8. Skuteczność pirfenidonu w terapii IPF

Na przestrzeni ostatnich lat stale pojawiają się nowe doniesienia na temat efektywności działania pirfenidonu wśród pacjentów z idiopatycznym włóknieniem płuc. W analizie zbiorczej obejmującej badania kliniczne fazy III zaobserwowano, że u pacjentów leczonych PFD w ciągu jednego roku obniżało się ryzyko hospitalizacji związanej z zaburzeniami oddychania w porównaniu z grupą kontrolną⁶². Ponadto, w Japonii dokonano badania obserwacyjnego na 1371 pacjentach, z których 2/3 osób znajdowało się w stadium III i IV choroby. Chorym podawano pirfenidon w ciągu roku od jego dopuszczenia do obrotu i wykazano dobrą tolerowalność (również u pacjentów w stanie ciężkiego upośledzenia czynności płuc), spadek zgłaszanych objawów podmiotowych oraz ustabilizowanie parametru pojemności życiowej (VC)⁶³. Wpływ pirfenidonu na zmniejszenie dolegliwości podmiotowych wśród pacjentów z IPF zostało również zaobserwowane przez naukowców badających efektywność PFD w stosunku do kaszlu- terapia PFD wpływała korzystnie powodując zmniejszenie natężenia kaszlu⁶⁴. Badanie retrospektywne prowadzone przez naukowców hiszpańskich obejmujące pacjentów z IPF którzy rozpoczęli leczenie PFD w latach 2011-2016 wykazało, że pomimo zmienności osobniczej w odpowiedzi na stosowanie PFD, lek ten wydaje się być skuteczny w długotrwałym stosowaniu⁶⁵. W innym badaniu oceniono

skuteczność działania PFD u pacjentów należących do europejskiego rejestru IPF (eurIPFreg)- PFD wpływało pozytywnie na chorych powodując zmniejszenie tempa spadku wartości FVC (zmniejszenie rocznego spadku o około 50%), zmniejszenie DLCO, lepsze wyniki testu marszu sześciominutowego oraz spłaszczenie skali duszności Borga ⁶⁶. Kolejne badanie retrospektywne przeprowadzone na 82 pacjentach z IPF wykazało, że pirfenidon powoduje wydłużenie 3-letniego współczynnika przeżycia nawet u pacjentów z ciężką postacią choroby, potwierdzono również bezpieczeństwo stosowania tego leku ⁶⁷. Przeprowadzono także badanie wśród pacjentów z IPF poddanych transplantacji pojedynczego płuca, którzy przyjmowali PFD- w porównaniu do pacjentów nieleczonych lekiem antyfibrotycznym mieli oni skrócony czas wentylacji mechanicznej i lepszą oksygenację. Co więcej, częstość wystąpienia ostrego odrzucenia przeszczepu w ciągu pierwszych 30 dni po transplantacji była niższa w przypadku pacjentów wcześniej przyjmujących PFD ⁶⁸. Na podstawie przytoczonych badań można wnioskować, że pirfenidon to lek dobrze tolerowany przez pacjentów z IPF, który wpływa korzystnie na ich stan, zmniejszając zarówno objawy, jak i powodując zwolnienie progresji choroby.

4. Nintedanib

Nintedanib (BIBF 1120) to substancja, którą odkryto w 1998 roku podczas badań firmy Boehringer Ingelheim nad inhibitorami angiogenezy do wykorzystania w terapii przeciwnowotworowej. Etanosulfonian nintedanibu jest 6-metoksykarbonyłopodstawioną pochodną indolinonu stosowaną w onkologii, a także w leczeniu idiopatycznego włóknienia płuc ⁶⁹. Nintedanib ma właściwości przeciwiangiogenne, przeciwzwłóknieniowe oraz przeciwnowotworowe.

4.1. Mechanizm działania

Nintedanib to inhibitor kompetycyjny, który przyłącza się do kieszeni wiążącej adenosynotrifosforan (ATP) w kinazach tyrozynowych VEGFR, FGFR oraz PDGFR ⁶¹. Jest również inhibitorem kinaz z rodziny Src (Lck, Lyn), a także kinaz Flt-3 (tabela 5). Efekty działania tego leku są wynikiem wpływu na proliferację i migrację fibroblastów oraz transformację fibroblastów do miofibroblastów. Nintedanib oddziałuje również na składowe macierzy zewnątrzkomórkowej, a także posiada właściwości antyangiogenne. W badaniach przeprowadzonych na modelach zwierzęcych (szczurach i myszach)

wykazano również jego właściwości antyfibrotyczne i przeciwzapalne. Szeroki wachlarz oddziaływania nintedanibu istotny jest w terapii IPF, a także w leczeniu przeciwnowotworowym ⁷⁰.

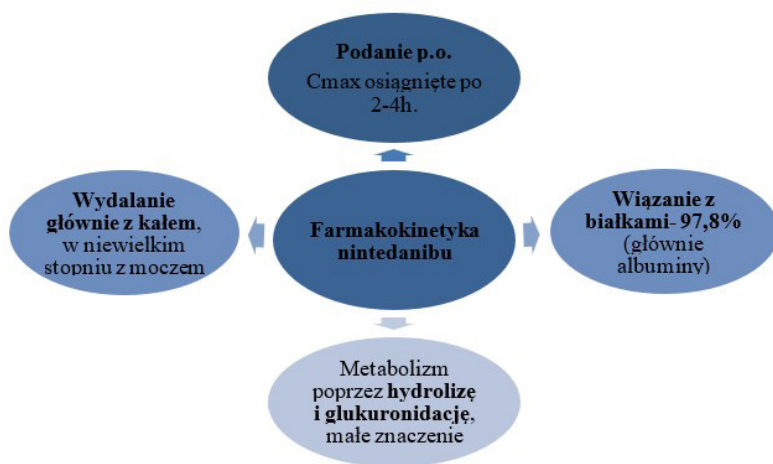
Tabela 5. Nintedanib jako inhibitor kinaz tyrozynowych ^{71, 72, 73, 74}

Kinazy tyrozynowe hamowane przez BIBF 1120	Charakterystyka
FGFR1, FGFR2, FGFR3	Wpływ na embriogenezę, angiogenezę i regenerację tkanek
PDGFR α , PDGFR β	Rola w procesach wzrostu i różnicowania komórek mezenchymalnych
VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3	Regulacja procesów angiogenezy i limfangiogenezy
Rodzina kinaz Src (Lck, Lyn)	Protoonkogeny mające wpływ na proliferację, morfologię, przeżywalność i ruchliwość komórek
Kinaza Flt-3	Wpływ na proliferację, przeżywalność i różnicowanie multipotentjalnych komórek macierzystych

Wpływ nintedanibu na funkcjonowanie fibroblastów badano porównując jego działanie na fibroblasty płucne pacjentów z IPF oraz fibroblasty osób należących do grupy kontrolnej. U chorych z IPF fibroblasty płucne charakteryzowały się wyższą ekspresją PDGFR i FGFR w porównaniu do pacjentów kontrolnych. Wykazano, że BIBF 1120 odwraca proproliferacyjny wpływ PDGF-BB, FGF-2 czy VEGF zarówno u pacjentów chorujących na idiopatyczne włóknienie płuc, jak i u dawców kontrolnych. Nintedanib powoduje więc hamowanie proliferacji fibroblastów, a także zmniejsza ich migrację. Właściwości antyfibrotyczne tej substancji są też związane ze zmniejszaniem indukowanego przez TGF- β wydzielania kolagenu, sekrecji TIMP-2 oraz pobudzaniem wydzielania pro-MMP-2 ⁷⁵. Co więcej, lek ten hamuje transformację fibroblastów do miofibroblastów, co zostało wykazane w badaniach na fibroblastach płucnych pacjentów z IPF poprzez zmniejszenie ekspresji mRNA α SMA, która jest markerem różnicowania miofibroblastów ⁷⁶. Właściwości antyangiogenne nintedanibu w dalszym ciągu wymagają doprecyzowania w kontekście terapii IPF. Hamowanie transdukcji sygnału szlaków, w których mediatorami są VEGF, PDGF i FGF powoduje hamowanie proliferacji komórek zaangażowanych w angiogenezę w tkance płucnej ⁷⁷, a co więcej zmniejszenie procesów angiogenezy nowotworów płuc ⁷⁸. Działanie przeciwwłóknieniowe i przeciwzapalne nintedanibu badano również in vivo na modelach zwierzęcych zwłóknienia płuc- indukowanego bleomycyną u myszy (1) i u szczurów (2), a także zwłóknienia wywołanego krzemionką u myszy (3). W przypadku modelu (1) doszło do niezależnej od dawki redukcji

stanu zapalnego w płucach, co zaobserwowane zostało m.in. poprzez zmniejszenie liczby limfocytów oraz poziomu prozapalnej cytokiny- IL-1 β . Ponadto spadkowi uległ poziom TIMP-1 oraz ilość kolagenu w tkance płucnej. W modelu (2) również zaobserwowano istotne osłabienie procesu włóknienia. Model (3) wykazał zaś, że nintedanib powodował spadek ilości neutrofilów i limfocytów, nie wpływał jednak na poziom makrofagów. Co więcej, lek ten w dużym stopniu powodował redukcję IL-1 β , CXCL1/KC i TIMP-1, miał też istotny wpływ na supresję zapalenia i zwłóknienia oraz tworzenia się ziarniników ⁷⁶

4.2. Farmakokinetyka



Rycina 4. Farmakokinetyka nintedanibu [opracowanie własne]

Nintedanib to lek podawany w postaci miękkiej kapsułki żelatynowej o okresie półtrwania wynoszącym około 12 godzin. Substancja ta osiąga maksymalne stężenie w osoczu po około 2-4 godzinach od podania. Cechuje się wysokim stopniem wiązania z białkami osocza, głównie albuminami- 97,8% nintedanibu ulega połączeniu z białkami ⁷⁹. Szybkość wchłaniania i biodostępność BIBF 1120 są zmniejszone wskutek działania glikoproteiny P oraz przez duży efekt pierwszego przejścia- całkowita biodostępność wynosi około 5% ⁸⁰. Metabolizm nintedanibu polega na hydrolizie katalizowanej przez esterazy, na skutek której powstaje BIBF-1202. Cząsteczka ta jest następnie przekształcana przez glukuronozylotransferazę 5'-difosforanu urydyny do glukuronidu. Proces ten zachodzi w jelitach i biorą w nim udział glukuronozylotransferazy UGT1A1, UGT1A7, UGT1A8 i UGT1A10, a także w wątrobie, gdzie

katalizowany jest przez UGT1A1. Mechanizmy metabolizmu nintedanibu poprzez cytochromy, głównie CYP3A4 mają niewielkie znaczenie⁸¹. Wydalanie nintedanibu i jego metabolitów zachodzi głównie z kałem, niewielka ilość eliminowana jest wraz z moczem⁸².

4.3. Skuteczność kliniczna

Skuteczność i bezpieczeństwo nintedanibu jako leku podawanego pacjentom z idiopatycznym włóknieniem płuc było oceniane w badaniach naukowych- TOMORROW (fazy II) oraz za pomocą dwóch badań INPULSIS (fazy III). W programie TOMORROW wzięło udział 432 pacjentów, którym po randomizacji podawano jedną z czterech dawek nintedanibu, bądź też placebo. Wykazano, że podawanie 150 mg BIBF 1120 dwa razy na dobę u pacjentów z IPF w porównaniu do pacjentów z grupy placebo powodowało zmniejszenie rocznego tempa spadku FVC, a także obniżało ryzyko zaostrzenia IPF (AE-IPF) oraz powodowało zachowanie poziomu jakości życia ocenianego według skali SGRQ (skali jakości życia według kwestionariusza Szpitala Św. Jerzego)⁸³. Badania fazy III (INPULSIS-1 i INPULSIS-2) to randomizowane, podwójnie zaślepione programy, które miały na celu zbadać bezpieczeństwo i skuteczność klinicznej stosowania nintedanibu w dawce dwa razy dziennie u pacjentów z IPF w porównaniu do grupy kontrolnej. Włączono do nich 1066 pacjentów. Oba badania wykazały, że roczne tempo spadku poziomu FVC ulegało istotnej redukcji pod wpływem nintedanibu w stosunku do grupy placebo. W badaniu INPULSIS-2 w porównaniu do badania INPULSIS-1 zaobserwowano również, że nintedanib wydłużał czas do wystąpienia zaostrzenia IPF⁸⁴. Opisywane badania uległy rozszerzeniu do otwartych badań. Badanie przedłużające program TOMORROW nie wykazało istotnych problemów dotyczących bezpieczeństwa stosowania nintedanibu w leczeniu IPF, a ponadto potwierdziło, że lek ten wpływa pozytywnie na pacjentów powodując spowolnienie progresji choroby powyżej 52 tygodni stosowania BIBF 1120⁸⁵. Program INPULSIS-ON, czyli rozszerzenie badań III fazy, również przyniósł korzystne wieści na temat długotrwałego bezpieczeństwa stosowania nintedanibu. Ponadto wykazano, że zmniejszenie szybkości postępu IPF jako efekt przyjmowania nintedanibu utrzymuje się powyżej czterech lat⁸⁶.

4.4. Działania niepożądane

Badania kliniczne INPULSIS wykazały, że częstość występowania jakichkolwiek działań niepożądanych w grupie pacjentów przyjmujących nintedanib w stosunku do grupy placebo była podobna. Najczęściej występującym efektem ubocznym była biegunka (62,4% w grupie badanej; 18,4% w grupie placebo), jednakże w większości przypadków nie była potrzebna redukcja dawki czy przerwanie terapii. Ponadto obserwowano wymioty, nudności i spadek apetytu. Innymi działaniami niepożądanymi były: podwyższona aktywność enzymów wątrobowych ALT i AST, a także wyższe stężenie bilirubiny. W większości przypadków wartości te wróciły do normy przed zakończeniem leczenia. Zareportowano również występowanie krwawień (10,3% w grupie badanej; 7,8% w grupie placebo), głównie z nosa. Co istotne, częstość występowania poważnych zdarzeń krwotocznych była podobna w obu grupach. Oprócz wyżej wymienionych działań niepożądanych zaobserwowano również perforację przewodu pokarmowego (2 przypadki w grupie badanej, żadnego w grupie placebo), nadciśnienie tętnicze, infekcje oraz zaburzenia pracy serca (epizody zawału mięśnia sercowego były częstsze w grupie badanej). Utrata masy ciała była częściej raportowana u pacjentów przyjmujących nintedanib niż u osób pobierających placebo ⁸⁷.

4.5. Interakcje i przeciwwskazania

W związku z niewielką rolą cytochromów P450 w metabolizmie nintedanibu interakcje tego leku z innymi substancjami są rzadkie. Jako substrat glikoproteiny P, nintedanib może wchodzić w interakcje z silnymi induktorami lub inhibitorami tego białka, np. ketokonazolem, erytromycyną, rifampicyną czy cyklosporyną. Z racji na inhibicję VEGRF przez BIBF 1120 istnieje zwiększone ryzyko krwawienia w przypadku stosowania antykoagulantów czy leków przeciwplatektykowych- każdy pacjent powinien mieć przeprowadzoną indywidualną ocenę ryzyka zdarzenia krwotocznego ⁸⁰. Nintedanib jest przeciwwskazany w przypadku nadwrażliwości na tę substancję, na orzechy ziemne, soję lub substancje pomocnicze.

4.6. Doniesienia nt. skuteczności nintedanibu w terapii IPF

Od momentu dopuszczenia nintedanibu jako leku w terapii IPF pojawiają się kolejne doniesienia na temat jego efektu działania. W jednym

z badań oceniano wpływ nintedanibu na zmiany zwłóknieniowe tkanki płucnej widoczne w obrazie HRCT i zaobserwowano, że stopień zwłóknienia płuc uległ zmniejszeniu po półrocznej terapii nintedanibem w porównaniu do grupy placebo. Potwierdzono również zmniejszenie tempa spadku FVC oraz polepszenie wyniku testu marszu sześciominutowego przy stosowaniu tego leku w stosunku do pacjentów nie otrzymujących nintedanibu ⁸⁸. Naukowcy porównywali także skuteczność BIBF 1120 w zależności od stopnia nasilenia IPF- pacjenci w lepszym stanie klinicznym mieli podobną odpowiedź organizmu na działanie nintedanibu jak pacjenci z obrazem plastra miodu w HRCT lub/i potwierdzeniem UIP w biopsji płuc ⁸⁹. Kolejną istotną kwestią potwierdzającą skuteczność nintedanibu jest niższe ryzyko wystąpienia ostrego zaostrzenia IPF (AE-IPF). Co więcej, udowodniono również, że działanie nintedanibu na spowolnienie progresji IPF może utrzymywać się ponad 5 lat ⁹⁰. Badano również jak terapia nintedanibem wpływa na pacjentów w starszym (75 lat lub więcej) wieku i wykazano, że osoby te musiały wcześniej przerwać leczenie, dlatego też istotne jest wczesne wprowadzenie tego leku do schematu leczenia. Dotyczyło to głównie pacjentów z niskimi wartościami FVC, masy ciała i BMI i często wiązało się z dolegliwościami żołądkowo-jelitowymi takimi jak nudności i anoreksja ⁹¹. Naukowcy z USA przeprowadzili również analizę profilu tolerancji i bezpieczeństwa nintedanibu korzystając z globalnej bazy danych obejmującej zgłoszenia działań niepożądanych podczas terapii za pomocą BIBF 1120. Dane z ponad 4 lat potwierdziły bezpieczeństwo stosowania nintedanibu ⁹². Podsumowując, doniesienia nt. włączenia nintedanibu do terapii idiopatycznego zwłóknienia płuc są bardzo korzystne i potwierdzają, że jest to lek bezpieczny.

5. Wnioski

Pacjenci z rozpoznaniem idiopatycznego zwłóknienia płuc stają twarzą w twarz z chorobą o bardzo niekorzystnym rokowaniu. Objawy takie jak duszność, kaszel i zmęczenie znacznie pogarszają ich jakość życia. Progresja choroby powoduje, że wykonywanie nawet codziennych czynności staje się wyzwaniem. Wprowadzenie leków antyfibrotycznych do terapii IPF jest nadzieją na poprawę sytuacji życiowej takich osób. Zarówno pirfenidon, jak i nintedanib cechują się wysoką tolerancją i profilem bezpieczeństwa. Oba leki zmniejszają tempo spadku FVC, polepszają też wyniki testu marszu sześciominutowego, co świadczy o spowalnianiu rozwoju choroby. Ponadto redukują też ryzyko wystąpienia ostrych zaostrzeń IPF, które często prowadzą do zgonu. Biorąc

pod uwagę ich potwierdzoną skuteczność wydaje się być zasadnym uznanie nintedanibu i pirfenidonu za leki przełomowe w walce o poprawę jakości życia pacjentów z idiopatycznym włóknieniem płuc.

Referencje

1. Wakwaya Y, Brown KK. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Epidemiology, Diagnosis and Outcomes. *The American Journal of the Medical Sciences*. 2019;357(5):359-369. doi:10.1016/j.amjms.2019.02.013
2. Raghu G, Weycker D, Edelsberg J, Bradford WZ, Oster G. Incidence and Prevalence of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174(7):810-816. doi:10.1164/rccm.200602-163OC
3. Kuś J. Interstitial lung diseases – classification and diagnostic approach. *Postępy Nauk Medycznych*. Published online March 16, 2011. Accessed December 5, 2021. <http://www.czytelniamedyczna.pl/3636,srodmiazszowe-choroby-pluc-podstawowa-klasyfikacja-i-zarys-postepowania-diagnos.html>
4. Richeldi L, Collard HR, Jones MG. Idiopathic pulmonary fibrosis. *The Lancet*. 2017;389(10082):1941-1952. doi:10.1016/S0140-6736(17)30866-8
5. MIYAKE Y, SASAKI S, YOKOYAMA T, et al. Occupational and Environmental Factors and Idiopathic Pulmonary Fibrosis in Japan. *The Annals of Occupational Hygiene*. 2005;49(3):259-265. doi:10.1093/annhyg/meh090
6. Spagnolo P, Sverzellati N, Rossi G, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: An update. *Annals of Medicine*. 2015;47(1):15-27. doi:10.3109/07853890.2014.982165
7. Molyneaux PL, Maher TM. The role of infection in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Review*. 2013;22(129):376-381. doi:10.1183/09059180.00000713
8. Moorsel C van, Vis J van der, Oosterhout M van, et al. Mutations in SFTPC, SFTPA2 and TERT explain 60% of familial pulmonary fibrosis and correlate to specific disease phenotypes. *European*

- Respiratory Journal*. 2011;38(Suppl 55). Accessed December 6, 2021. https://erj.ersjournals.com/content/38/Suppl_55/p1994
9. Tsang AR, Wyatt HDM, Ting NSY, Beattie TL. hTERT mutations associated with idiopathic pulmonary fibrosis affect telomerase activity, telomere length, and cell growth by distinct mechanisms. *Aging Cell*. 2012;11(3):482-490. doi:10.1111/j.1474-9726.2012.00810.x
 10. Yang IV, Fingerlin TE, Evans CM, Schwarz MI, Schwartz DA. MUC5B and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Ann Am Thorac Soc*. 2015;12(Suppl 2):S193-S199. doi:10.1513/AnnalsATS.201503-110AW
 11. Margaritopoulos GA, Harari S, Caminati A, Antoniou KM. Smoking-related idiopathic interstitial pneumonia: A review. *Respirology*. 2016;21(1):57-64. doi:10.1111/resp.12576
 12. Ghisa M, Marinelli C, Savarino V, Savarino E. Idiopathic pulmonary fibrosis and GERD: links and risks. *Ther Clin Risk Manag*. 2019;15:1081-1093. doi:10.2147/TCRM.S184291
 13. Wang D, Ma Y, Tong X, Zhang Y, Fan H. Diabetes Mellitus Contributes to Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Review From Clinical Appearance to Possible Pathogenesis. *Front Public Health*. 2020;8:196. doi:10.3389/fpubh.2020.00196
 14. Papadogiannis G, Bouloukaki I, Mermigkis C, et al. Patients with idiopathic pulmonary fibrosis with and without obstructive sleep apnea: differences in clinical characteristics, clinical outcomes, and the effect of PAP treatment. *Journal of Clinical Sleep Medicine*. Published online March 1, 2021. doi:10.5664/jcsm.8932
 15. Barratt SL, Creamer A, Hayton C, Chaudhuri N. Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF): An Overview. *J Clin Med*. 2018;7(8):201. doi:10.3390/jcm7080201
 16. Phan THG, Paliogiannis P, Nasrallah GK, et al. Emerging cellular and molecular determinants of idiopathic pulmonary fibrosis. *Cell Mol Life Sci*. Published online November 17, 2020:1-27. doi:10.1007/s00018-020-03693-7
 17. King TE, Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *The Lancet*. 2011;378(9807):1949-1961. doi:10.1016/S0140-6736(11)60052-4

18. Drakopanagiotakis F, Wujak L, Wygrecka M, Markart P. Biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *Matrix Biology*. 2018;68-69:404-421. doi:10.1016/j.matbio.2018.01.023
19. Heukels P, Moor CC, von der Thüsen JH, Wijsenbeek MS, Kool M. Inflammation and immunity in IPF pathogenesis and treatment. *Respiratory Medicine*. 2019;147:79-91. doi:10.1016/j.rmed.2018.12.015
20. Wolters PJ, Collard HR, Jones KD. Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Annu Rev Pathol*. 2014;9:157-179. doi:10.1146/annurev-pathol-012513-104706
21. Sgalla G, Biffi A, Richeldi L. Idiopathic pulmonary fibrosis: Diagnosis, epidemiology and natural history. *Respirology*. 2016;21(3):427-437. doi:10.1111/resp.12683
22. Overview of Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) and Evidence-Based Guidelines. AJMC. Accessed November 30, 2021. <https://www.ajmc.com/view/overview-of-idiopathic-pulmonary-fibrosis-ipf-and-evidence-based-guidelines-article>
23. Maher TM, Strek ME. Antifibrotic therapy for idiopathic pulmonary fibrosis: time to treat. *Respir Res*. 2019;20:205. doi:10.1186/s12931-019-1161-4
24. Krauss E, Gehrken G, Drakopanagiotakis F, et al. Clinical characteristics of patients with familial idiopathic pulmonary fibrosis (f-IPF). *BMC Pulm Med*. 2019;19:130. doi:10.1186/s12890-019-0895-6
25. Lin H, Jiang S. Combined pulmonary fibrosis and emphysema (CPFE): an entity different from emphysema or pulmonary fibrosis alone. *J Thorac Dis*. 2015;7(4):767-779. doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2015.04.17
26. Interstitial pneumonia associated with MPO-ANCA: Clinicopathological features of nine patients | Elsevier Enhanced Reader. doi:10.1016/j.rmed.2012.08.024
27. Ballester B, Milara J, Cortijo J. Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Lung Cancer: Mechanisms and Molecular Targets. *Int J Mol Sci*. 2019;20(3):593. doi:10.3390/ijms20030593

28. Kishaba T. Acute Exacerbation of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Medicina (Kaunas)*. 2019;55(3):70. doi:10.3390/medicina55030070
29. Poletti V, Ravaglia C, Buccioli M, et al. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Diagnosis and Prognostic Evaluation. *RES*. 2013;86(1):5-12. doi:10.1159/000353580
30. Leuschner G, Behr J. Acute Exacerbation in Interstitial Lung Disease. *Front Med (Lausanne)*. 2017;4:176. doi:10.3389/fmed.2017.00176
31. Kondoh Y, Taniguchi H, Katsuta T, et al. Risk factors of acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*. 2010;27(2):103-110.
32. Raghu G, Remy-Jardin M, Myers JL, et al. Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018;198(5):e44-e68. doi:10.1164/rccm.201807-1255ST
33. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Diagnosis and Treatment. 2000;161:19.
34. Richeldi L, Davies HRHR, Spagnolo P, Luppi F. Corticosteroids for idiopathic pulmonary fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2003;2003(3):CD002880. doi:10.1002/14651858.CD002880
35. Prednisone, Azathioprine, and N-Acetylcysteine for Pulmonary Fibrosis. *New England Journal of Medicine*. 2012;366(21):1968-1977. doi:10.1056/NEJMoa1113354
36. Torrisi SE, Kahn N, Vancheri C, Kreuter M. Evolution and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *La Presse Médicale*. 2020;49(2):104025. doi:10.1016/j.lpm.2020.104025
37. Raghu G, Rochwerg B, Zhang Y, et al. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline: Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Update of the 2011 Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;192(2):e3-e19. doi:10.1164/rccm.201506-1063ST
38. Taniguchi H, Ebina M, Kondoh Y, et al. Pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal*. 2010;35(4):821-829. doi:10.1183/09031936.00005209

39. Jin J, Togo S, Kadoya K, et al. Pirfenidone attenuates lung fibrotic fibroblast responses to transforming growth factor- β 1. *Respir Res.* 2019;20:119. doi:10.1186/s12931-019-1093-z
40. Ruwanpura SM, Thomas BJ, Bardin PG. Pirfenidone: Molecular Mechanisms and Potential Clinical Applications in Lung Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2020;62(4):413-422. doi:10.1165/rcmb.2019-0328TR
41. Guiot J, Moermans C, Henket M, Corhay JL, Louis R. Blood Biomarkers in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Lung.* 2017;195(3):273-280. doi:10.1007/s00408-017-9993-5
42. Di Sario A, Bendia E, Macarri G, et al. The anti-fibrotic effect of pirfenidone in rat liver fibrosis is mediated by downregulation of procollagen α 1(I), TIMP-1 and MMP-2. *Digestive and Liver Disease.* 2004;36(11):744-751. doi:10.1016/j.dld.2004.05.012
43. Kobayashi T, Kim H, Liu X, et al. Matrix metalloproteinase-9 activates TGF- β and stimulates fibroblast contraction of collagen gels. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2014;306(11):L1006-1015. doi:10.1152/ajplung.00015.2014
44. Cain WC, Stuart RW, Lefkowitz DL, Starnes JD, Margolin S, Lefkowitz SS. Inhibition of tumor necrosis factor and subsequent endotoxin shock by pirfenidone. *International Journal of Immunopharmacology.* 1998;20(12):685-695. doi:10.1016/S0192-0561(98)00042-3
45. Bizargity P, Liu K, Wang L, Hancock WW, Visner GA. Inhibitory Effects of Pirfenidone on Dendritic Cells and Lung Allograft Rejection. *Transplantation.* 2012;94(2):114-122. doi:10.1097/TP.0b013e3182584879
46. Trivedi R, Redente EF, Thakur A, Riches DWH, Kompella UB. Local delivery of biodegradable pirfenidone nanoparticles ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Nanotechnology.* 2012;23(50):505101. doi:10.1088/0957-4484/23/50/505101
47. Visner GA, Liu F, Bizargity P, et al. Pirfenidone Inhibits T Cell Activation, Proliferation, Cytokine and Chemokine Production, and Host Alloresponses. *Transplantation.* 2009;88(3):330-338. doi:10.1097/TP.0b013e3181ae3392

48. Li X, Yan X, Wang Y, et al. NLRP3 inflammasome inhibition attenuates silica-induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human bronchial epithelial cells. *Experimental Cell Research*. 2018;362(2):489-497. doi:10.1016/j.yexcr.2017.12.013
49. Gaggini F, Laleu B, Orchard M, et al. Design, synthesis and biological activity of original pyrazolo-pyrido-diazepine, -pyrazine and -oxazine dione derivatives as novel dual Nox4/Nox1 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2011;19(23):6989-6999. doi:10.1016/j.bmc.2011.10.016
50. Pourgholamhossein F, Rasooli R, Pournamdari M, et al. Pirfenidone protects against paraquat-induced lung injury and fibrosis in mice by modulation of inflammation, oxidative stress, and gene expression. *Food Chem Toxicol*. 2018;112:39-46. doi:10.1016/j.fct.2017.12.034
51. Aimo A, Cerbai E, Bartolucci G, et al. Pirfenidone is a cardioprotective drug: Mechanisms of action and preclinical evidence. *Pharmacological Research*. 2020;155:104694. doi:10.1016/j.phrs.2020.104694
52. Pirfenidone: A Novel Agent for the Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis - Jason Potts, Dinesh Yogaratnam, 2013. Accessed December 20, 2021. https://journals.sagepub.com/doi/10.1345/aph.1R337?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200pubmed
53. Togami K, Kanehira Y, Tada H. Possible Involvement of Pirfenidone Metabolites in the Antifibrotic Action of a Therapy for Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2013;36(10):1525-1527. doi:10.1248/bpb.b13-00452
54. Hu J, Shang D, Xu X, et al. Effect of grapefruit juice and food on the pharmacokinetics of pirfenidone in healthy Chinese volunteers: a diet-drug interaction study. *Xenobiotica*. 2016;46(6):516-521. doi:10.3109/00498254.2015.1089365
55. Huang NY, Ding L, Wang J, et al. Pharmacokinetics, Safety and Tolerability of Pirfenidone and its Major Metabolite after Single and Multiple Oral Doses in Healthy Chinese Subjects under Fed Conditions. *Drug Res (Stuttg)*. 2013;63(8):388-395. doi:10.1055/s-0033-1341478

56. Noble PW, Albera C, Bradford WZ, et al. Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials. *The Lancet*. 2011;377(9779):1760-1769. doi:10.1016/S0140-6736(11)60405-4
57. King TEJ, Bradford WZ, Castro-Bernardini S, et al. A Phase 3 Trial of Pirfenidone in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1402582>. doi:10.1056/NEJMoa1402582
58. Costabel U, Albera C, Lancaster LH, et al. An Open-Label Study of the Long-Term Safety of Pirfenidone in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis (RECAP). *RES*. 2017;94(5):408-415. doi:10.1159/000479976
59. Lancaster L, Albera C, Bradford WZ, et al. Safety of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: integrated analysis of cumulative data from 5 clinical trials. *BMJ Open Respir Res*. 2016;3(1):e000105. doi:10.1136/bmjresp-2015-000105
60. Esbriet.pdf. Accessed December 29, 2021. http://chpl.com.pl/data_files/Esbriet.pdf
61. Kim ES, Keating GM. Pirfenidone: A Review of Its Use in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Drugs*. 2015;75(2):219-230. doi:10.1007/s40265-015-0350-9
62. Ley B, Swigris J, Day B mo, et al. Pirfenidone Reduces Respiratory-related Hospitalizations in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;196(6):756-761. doi:10.1164/rccm.201701-0091OC
63. Ogura T, Azuma A, Inoue Y, et al. All-case post-marketing surveillance of 1371 patients treated with pirfenidone for idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Investigation*. 2015;53(5):232-241. doi:10.1016/j.resinv.2015.06.001
64. van Manen MJG, Birring SS, Vancheri C, et al. Effect of pirfenidone on cough in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. 2017;50(4):1701157. doi:10.1183/13993003.01157-2017
65. Marcos Ribes B, Sancho-Chust JN, Talens A, et al. Effectiveness and safety of pirfenidone for idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur J Hosp Pharm*. 2020;27(6):350-354. doi:10.1136/ejhp-2018-001806

66. Krauss E, Tello S, Wilhelm J, et al. Assessing the Effectiveness of Pirfenidone in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Long-Term, Real-World Data from European IPF Registry (eurIPFreg). *J Clin Med*. 2020;9(11):3763. doi:10.3390/jcm9113763
67. Margaritopoulos GA, Trachalaki A, Wells AU, et al. Pirfenidone improves survival in IPF: results from a real-life study. *BMC Pulm Med*. 2018;18:177. doi:10.1186/s12890-018-0736-z
68. Veit T, Leuschner G, Sisic A, et al. Pirfenidone exerts beneficial effects in patients with IPF undergoing single lung transplantation. *American Journal of Transplantation*. 2019;19(8):2358-2365. doi:10.1111/ajt.15378
69. Roth GJ, Binder R, Colbatzky F, et al. Nintedanib: From Discovery to the Clinic. *J Med Chem*. 2015;58(3):1053-1063. doi:10.1021/jm501562a
70. Wollin L, Wex E, Pautsch A, et al. Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal*. 2015;45(5):1434-1445. doi:10.1183/09031936.00174914
71. Weaver A, Bossaer JB. Fibroblast growth factor receptor (FGFR) inhibitors: A review of a novel therapeutic class. *J Oncol Pharm Pract*. 2021;27(3):702-710. doi:10.1177/1078155220983425
72. Papadopoulos N, Lennartsson J. The PDGF/PDGFR pathway as a drug target. *Molecular Aspects of Medicine*. 2018;62:75-88. doi:10.1016/j.mam.2017.11.007
73. Shibuya M. VEGFR and Type-V RTK Activation and Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(10):a009092. doi:10.1101/cshperspect.a009092
74. James AJ, Smith CC, Litzow M, et al. Pharmacokinetic Profile of Gilteritinib: A Novel FLT-3 Tyrosine Kinase Inhibitor. *Clin Pharmacokin*. 2020;59(10):1273-1290. doi:10.1007/s40262-020-00888-w
75. Hostettler KE, Zhong J, Papakonstantinou E, et al. Anti-fibrotic effects of nintedanib in lung fibroblasts derived from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res*. 2014;15(1):157. doi:10.1186/s12931-014-0157-3

76. Wollin L, Maillet I, Quesniaux V, Holweg A, Ryffel B. Antifibrotic and Anti-inflammatory Activity of the Tyrosine Kinase Inhibitor Nintedanib in Experimental Models of Lung Fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2014;349(2):209-220. doi:10.1124/jpet.113.208223
77. Hilberg F, Roth GJ, Krssak M, et al. BIBF 1120: Triple Angiokinase Inhibitor with Sustained Receptor Blockade and Good Antitumor Efficacy. *Cancer Res.* 2008;68(12):4774-4782. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6307
78. Crinò L, Metro G. Therapeutic options targeting angiogenesis in nonsmall cell lung cancer. *European Respiratory Review.* 2014;23(131):79-91. doi:10.1183/09059180.00008913
79. McCormack PL. Nintedanib: First Global Approval. *Drugs.* 2015;75(1):129-139. doi:10.1007/s40265-014-0335-0
80. Wind S, Schmid U, Freiwald M, et al. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Nintedanib. *Clin Pharmacokinet.* 2019;58(9):1131-1147. doi:10.1007/s40262-019-00766-0
81. Keating GM. Nintedanib: A Review of Its Use in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Drugs.* 2015;75(10):1131-1140. doi:10.1007/s40265-015-0418-6
82. Stopfer P, Rathgen K, Bischoff D, et al. Pharmacokinetics and metabolism of BIBF 1120 after oral dosing to healthy male volunteers. *Xenobiotica.* 2011;41(4):297-311. doi:10.3109/00498254.2010.545452
83. Richeldi L, Costabel U, Selman M, et al. Efficacy of a Tyrosine Kinase Inhibitor in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *New England Journal of Medicine.* 2011;365(12):1079-1087. doi:10.1056/NEJMoa1103690
84. Richeldi L, du Bois RM, Raghu G, et al. Efficacy and Safety of Nintedanib in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *New England Journal of Medicine.* 2014;370(22):2071-2082. doi:10.1056/NEJMoa1402584
85. Richeldi L, Kreuter M, Selman M, et al. Long-term treatment of patients with idiopathic pulmonary fibrosis with nintedanib: results from the TOMORROW trial and its open-label extension. *Thorax.* 2018;73(6):581-583. doi:10.1136/thoraxjnl-2016-209701

86. Long-term safety and tolerability of nintedanib in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: results from the open-label extension study, INPULSIS-ON - ClinicalKey. Accessed January 4, 2022. <https://www.clinicalkey.com/#!/content/playContent/1-s2.0-S2213260018303394?returnurl=https:%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2213260018303394%3Fshowall%3Dtrue&referrer=https:%2F%2Fpubmed.ncbi.nlm.nih.gov%2F>
87. Corte T, Bonella F, Crestani B, et al. Safety, tolerability and appropriate use of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res.* 2015;16:116. doi:10.1186/s12931-015-0276-5
88. Lancaster L, Goldin J, Trampisch M, et al. Effects of Nintedanib on Quantitative Lung Fibrosis Score in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Open Respir Med J.* 2020;14:22-31. doi:10.2174/1874306402014010022
89. Raghu G, Wells AU, Nicholson AG, et al. Effect of Nintedanib in Subgroups of Idiopathic Pulmonary Fibrosis by Diagnostic Criteria. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017;195(1):78-85. doi:10.1164/rccm.201602-0402OC
90. Martusewicz-Boros M, Górski K. Nintedanib — efficacy, safety and practical aspects of treatment for patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Advances in Respiratory Medicine.* 2020;88(6):599-607. doi:10.5603/ARM.a2020.0190
91. Uchida Y, Ikeda S, Sekine A, et al. Tolerability and safety of nintedanib in elderly patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Investigation.* 2021;59(1):99-105. doi:10.1016/j.resinv.2020.08.003
92. Lasky JA, Criner GJ, Lazarus HM, Kohlbrenner V, Bender S, Richeldi L. Safety of Nintedanib in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Global Pharmacovigilance Data. *Adv Ther.* 2020;37(10):4209-4219. doi:10.1007/s12325-020-01452-5

KANNABINOIDY W LECZENIU BÓLU NEUROPATYCZNEGO

Piotr Limanówka, Matylda Kujawińska

Studenckie Koło Naukowe im. Zbigniewa Religii przy Katedrze Biofizyki w Zabrze,
Wydział Nauk Medycznych w Zabrzu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Abstrakt

Ból neuropatyczny jest skutkiem uszkodzenia układu nerwowego. Dokładna definicja według Międzynarodowego Stowarzyszenia Badań nad Bólem brzmi następująco: „Ból spowodowany zmianą lub chorobą somatosensorycznego układu nerwowego”. Ta przypadłość jest związana z wieloma objawami klinicznymi jak np. drętwienie czy allodynia. Nie ma dokładnego schematu objawów, głównie ze względu na różne typy bólu neuropatycznego, wyróżnione głównie pod kryterium powód uszkodzenia nerwu. W tym przypadku wyróżniamy urazy nerwów spowodowanych przez: cukrzyce, pólpaśca, amputacje kończyny, uraz rdzenia kręgowego, zakażenie wirusem HIV i inne. Nawet jedne z najsilniejszych leków przeciwbólowych nie wykazują dobrego działania w przypadku bólu neuropatycznego. Substancjami, które są badane pod kątem skuteczności w przypadku leczenia bólu neuropatycznego są kannabinoidy. Wykazano ich skuteczność w tym schorzeniu, lecz ich systematyczne stosowanie wymaga jeszcze wielu badań. Celem tej pracy była ocena ogólnej skuteczności oraz możliwości terapeutycznej kannabinoidów w leczeniu bólu neuropatycznego oraz krótkie przedstawienie ich skutków ubocznych

Słowa kluczowe: Kannabinoidy, THC, CBD, ból neuropatyczny,

Abstract

Neuropathic pain is the result from damage to the nervous system. The exact definition of the International Association for the Study on Pain is as follows: "Pain caused by a lesion or disease of the somatosensory nervous system." This condition is associated with many clinical symptoms, such as numbness and allodynia. There is no exact pattern of the symptoms, mainly due to the different types of neuropathic pain, distinguished mainly by the cause of nerve damage. In this case, we distinguish nerve injuries caused by: diabetes, herpes zoster, limb amputation, spinal cord injury, HIV infection and others. Even some of the most powerful analgesics do not work well for neuropathic pain. The substances that are being tested for effectiveness in the treatment of neuropathic pain are Cannabinoids. They have been shown to be effective in this disease, but their systematic use requires a lot of research. The aim of this study was to assess the overall efficacy and therapeutic potential of cannabinoids in the treatment of neuropathic pain and to briefly describe their side effects

Key words: Cannabinoids, THC, CBD, neuropathic pain,

1. Wstęp

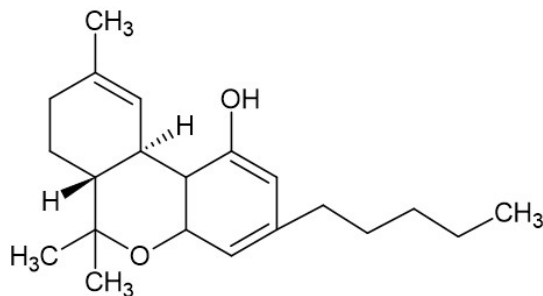
Ból jest definiowany jako nieprzyjemne doznanie czuciowe i emocjonalne związane z rzeczywistym lub potencjalnym uszkodzeniem tkanek lub opisywane w kategoriach takiego uszkodzenia. Jest to odczucie, które spełnia funkcję obronna organizmu. Ból neuropatyczny jest patologicznym zjawiskiem, które już nie spełnia funkcji obronnej. Obecnie nie ma sprawdzonej metody leczenia tego schorzenia, a znane są jedynie w niewielkim stopniu działające sposoby. Szacuje się, że występuje u 7-10% populacji¹. Obecnie uznaje się, iż najlepsze działanie mają substancje i grupy takich substancji jak trójcycliczne leki przeciwdepresyjne, inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny i noradrenaliny, pregabalina, gabapentyna². Nadzieją na znalezienie skutecznej metody leczenia są kannabionoidy. Skuteczność tych związków została wykazana w badaniach, lecz jest to niewystarczające, aby jednoznacznie określić ich jako leki na ból neuropatyczny³. Celem tej pracy jest próba oceny ogólnej skuteczności kannabinoidów w leczeniu bólu neuropatycznego z uwzględnieniem skutków ubocznych.

2. Krótka charakterystyka kannabinoidów

Pierwsze zapiski o medycznym zastosowaniu *Cannabis sativa L.*, znalezione na Egipskim papirusie, datuje się na około 1550 rok p.n.e.⁴ Spośród wielu substancji, które możemy wyodrębnić z tej rośliny największe znaczenie mają dwa związki: Δ^9 -tetrahydrokannabinol (THC) oraz kannabidiol (CBD).

2.1. THC

THC jest główną substancją odpowiedzialną za psychoaktywne właściwości konopi.



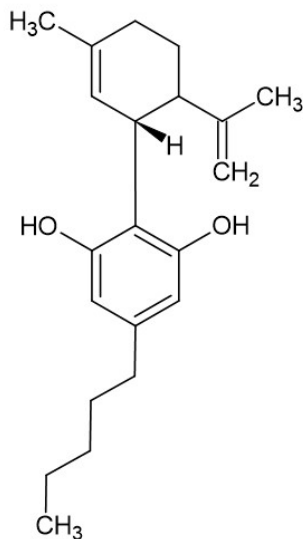
Rycina 1. Wzór chemiczny tetrahydrokannabinolu

THC jest agonistą dla receptorów CB1 i CB2. Jego działanie, po aktywacji presynaptycznych receptorów CB1 polega na zmniejszeniu neuroprzekaznictwa przez zmniejszenie syntezy cyklicznego adenozy-3',5'-monofosforanu⁵. Główne efekty tetrahydrokannabinolu na organizm to przykładowo: tachykardia^{6,7}, apatia, relaksacja, spowolniony czas reakcji⁸. Dodatkowo ma właściwości przeciwzapalne⁹, przeciwbólowe¹⁰.

Ponadto w Polsce dostępny jest lek – Dronabinol. W jego składzie znajduje się THC i wykazano jego działanie min. przeciwbólowe oraz przeciwwymiotne¹¹.

2.2. CBD

CBD w przeciwieństwie do THC nie wykazuje właściwości psychoaktywnych¹. Dokładny mechanizm działania CBD nie został w pełni poznany. Wiadomo, że ma niewielkie powinowactwo do receptorów CB1 oraz CB2. Kannabidiol może być dla tych receptorów zarówno agonistą jak i antagonistą. Dodatkowo jest częściowym agonistą serotoninowego receptora 5-HT1A¹³. CBD ma działanie między innymi: przeciwbólowe¹⁴, przeciwzapalne¹⁵, neuroprotekcyjne¹⁶, przeciwwymiotne¹⁷, przeciwłękowe¹⁸. W zależności od dawki oraz połączeniu z innymi lekami takimi jak lipoamid, peksydartynib, mipomersen ten kannabinoid może spowodować uszkodzenie wątroby¹⁴. Obecnie CBD jest z powodzeniem stosowane w leczeniu takich chorób jak: zaburzenia napadowe zespołu Lennox-Gastaut i zespołu Draveta¹³.



Rycina 2. Wzór chemiczny kannabidiolu

3. Kannabinoidy w leczeniu różnych typów bólu neuropatycznego

Typy bólu neuropatycznego możemy podzielić głównie ze względu na przyczynę uszkodzenia nerwu. Głównymi typami są te związane z takimi chorobami jak cukrzyca czy HIV ale również spowodowane urazami np. rdzenia kręgowego, ale również amputacjami kończyn. Szacuje się, że ból neuropatyczny może dotyczyć od 6,9% do nawet 10% populacji¹⁹, a mimo to około aż jedna trzecia nie przyjmuje żadnych leków w celu zniwelowania bólu, a tylko 2% jest objętych specjalistycznym leczeniem²⁰.

3.1. Zastosowanie kannabinoidów w leczeniu bólu neuropatycznego w cukrzycy

Występowanie neuropatii w cukrzycy jest zróżnicowane w populacji. Częstość samego bólu neuropatycznego, według jednych z badań wynosi 13,3% u ludzi dotkniętych cukrzycą²¹. W celu trafnego zdiagnozowania neuropatii spowodowanej cukrzycą należy wykluczyć inne czynniki, które mogą spowodować uszkodzenie nerwów; metaboliczne czy też spowodowane stanami zapalnymi²². W przypadku wystąpienia neuropatii, która powoduje ból, ogólna jakość życia spada, a koszty leczenia wzrastają²³. Mimo dużego problemu jakim są tego typu komplikacje, nadal nie został określony żaden sposób leczenia, który mógłby poprawić stan zdrowia chorych w znacznym stopniu. Metodą która, uważana była za mogącą zmienić możliwości terapeutyczne w przypadku tego schorzenia, było podawanie kannabinoidów. Od lat znane były przeciwbólowe właściwości kannabinoidów, więc naturalnym było iż naukowcy spróbują je również zaimplementować do leczenia bólu neuropatycznego. Wyniki badań klinicznych mogą wskazywać na poprawę stanu zdrowia chorych w przypadku podania syntetycznych kannabinoidów jako adjuwant lub jako główna substancja^{24,25}, natomiast w przypadku podawania THC oraz CBD naturalnego pochodzenia, wyniki są zróżnicowane^{26,27}. Liczba badań klinicznych w zakresie skuteczności kannabinoidów w leczeniu bólu neuropatycznego powiązanego z cukrzycą jest mocno ograniczona. Dodatkowo wyniki są zróżnicowane lub niejednoznaczne. Wartym uwagi jest fakt lepszych wyników badań prowadzonych z wykorzystaniem syntetycznych kannabinoidów. Mimo tej niewielkiej różnicy, nie można jednoznacznie stwierdzić większej wartości terapeutycznej syntetycznych kannabinoidów w porównaniu do ich odpowiedników naturalnego pochodzenia, ale również

ogólnego znaczenia terapeutycznego tych związków w leczeniu tego typu bólu neuropatycznego.

3.2. Zastosowanie kannabinoidów w leczeniu bólu neuropatycznego w stwardnieniu rozsianym

Ból neuropatyczny w przypadku stwardnienia rozsianego jest w głównej mierze związany z ośrodkowym układem nerwowym. Występuje on w od 17% do nawet 70% przypadków stwardnienia rozsianego²⁸. Warto zwrócić uwagę, iż częstość występowania tej dolegliwości zależy między innymi od wieku czy też czasu trwania choroby²⁹. W stwardnieniu rozsianym, ból ten jest jednym z najczęstszych objawów, które radykalnie obniżają jakość życia pacjentów. Podobnie jak w przypadkach innych typów bólu neuropatycznego, tak również jeżeli jest on powiązany ze stwardnieniem rozsianym, nie ma skutecznej formy leczenia. Obecnie najczęściej używanymi lekami, są leki takie jak: trójcykliczne leki przeciwdepresyjne (np. nortryptylina i amitryptylina), inhibitory wychwyty zwrotnego serotoniny i noradrenaliny (np. duloksetyna i wenlafaksyna), ale również leki z grupy silnych opioidów (np. morfina, fentanyl)³⁰. Niestety, nie są to wystarczające dowody aby wprowadzić taki typ leczenia jako podstawowe w przypadku tego schorzenia. Badania wskazują na pozytywny wpływ kannabinoidów na ból, lecz nie mają one z reguły fenomenalnych wyników. Mimo tych wątpliwości, są one obiecującym tematem w kontekście bólu związanego ze stwardnieniem rozsianym.

3.3. Zastosowanie kannabinoidów w leczeniu bólu neuropatycznego związanego z urazami

Rozwój bólu neuropatycznego w następstwie obwodowego uszkodzenia nerwów wynika z wielu zmian zainicjowanych przez utratę związku homeostatycznego między komórkami Schwanna i nienaruszonymi aksonami. Powoduje to proliferację komórek Schwanna i uwolnienie wielu czynników, które wywołują kaskadę zdarzeń, która obejmuje między innymi rekrutację komórek krwiotwórczych, fagocytozę uszkodzonej tkanki i zmiany w ekspresji genów wewnątrz komórki nerwowej, co skutkuje pojawieniem się nowych kanałów jonowych, które wywołują nadpobudliwość neuronalną, która leży u podstaw bólu neuropatycznego³⁵. W jednym z badań, które skupiło się na pacjentach po urazie splotu ramiennego, w 56% przypadków stwierdzono występowanie bólu neuropatycznego, który miał głównie charakter bólu

palącego³⁶. Jedną z metod leczenia bólu neuropatycznego w przypadku uszkodzenia nerwów obwodowych lub spłotu ramiennego jest neuroliza i naprawa nerwów. Takie zabiegi mogą być wystarczające do zmniejszenia bólu³⁷. W przypadku niewielkiej skuteczności często stosowanych farmaceutyków, lub nieskuteczności innych metod leczenia, środkiem który może uśmierzyć ból, są środki zawierające kannabinoidy. W badaniu, które sprawdzało skuteczność konopi indyjskiej zawierającej kannabinoidy, w leczeniu bólu neuropatycznego, będącego wynikiem urazu lub zabiegów chirurgicznych, wykazano działanie zmniejszające ból³⁸. Inne badanie, które objęło pacjentów z uszkodzeniem spłotu ramiennego wskazało na poprawę odczuwanego bólu, po podaniu kannabinoidów³⁹. W tym przypadku te substancje były podawane równolegle ze wcześniej podawanymi farmaceutykami. W przypadku bólu neuropatycznego spowodowanego urazami, związki chemiczne z grupy kannabinoidów wykazują działanie zmniejszające ból. W sytuacjach gdzie inne metody leczenia zawodzą, takie alternatywne sposoby mogą stać się dobrym sposobem na poprawę stanu zdrowia pacjentów.

3.4. Zastosowanie kannabinoidów w leczeniu bólu neuropatycznego związanego z nowotworami

Ból neuropatyczny może być spowodowany bezpośrednio rozwojem komórek nowotworowych, poprzez ucisk nerwu spowodowany guzem nowotworowym i/lub samą terapią, czyli zabiegami chirurgicznymi, chemioterapią, czy też radioterapią. Tą przypadłość można podzielić na kilka głównych kategorii: pleksopatia, radikulopatia, neuropatia obwodowa, złośliwa bolesna radikulopatia, przerzuty opon mózgowo-rdzeniowych, nerwoból czaszkowy, paranowotworowa neuropatia czuciowa⁴⁰. Częstość występowania określa się na około 40% wśród pacjentów z nowotworami⁴¹. Paklitaksel jest lekiem od działania cytostatycznym, stosowanym w leczeniu nowotworów między innymi: piersi, jajnika, płuc. Jego stosowanie często jest związane z bólem, który może mieć charakter bólu neuropatycznego⁴⁰. W modelach zwierzęcych wykazano bezpośredni wpływ komórek nowotworowych na odczuwanie bólu⁴². Obecnie nie ma metod zapobiegania temu schorzeniu, a leczenie polega głównie na łagodzeniu bólu. Ta przypadłość w przypadku wystąpienia po chemioterapii jest stosunkowo oporna na działanie leków przeciwbólowych, co stwarza problem terapeutyczny⁴³. Zastosowanie związków chemicznych z grupy kannabinoidów w tym przypadku nie jest dobrze poznane i prowadzone na niewielkiej liczbie badanych⁴⁴. W modelach zwierzęcych wykazano

działanie agonistów receptorów kannabinoidowych, które znacznie zmniejszało odczuwany ból^{45,46}. Napawa to optymizmem w związku z leczeniem tej przypadłości wśród ludzi, lecz bardzo ograniczona liczba badań uniemożliwia wprowadzenie tego typu leczenia do standardowego postępowania.

4. Skutki uboczne oraz toksyczność kannabinoidów

Jak większość leków tak i kannabinoidy mają swoje efekty uboczne. Po krótkotrwałym stosowaniu kannabinoidów, zdecydowana większość z działań niepożądanych była łagodna (96,6%)⁴⁷. Należą do nich przykładowo: nudności, zmęczenie, ból, anemia, zawroty głowy, duszność⁴⁸. Innym skutkiem ubocznym, są również ataki paniki, które częściej występują wśród kobiet oraz osób starszych⁴⁹. Wśród dzieci mogą występować zaburzenia głównie natury neurologicznej, takie jak ataksja, czy stupor⁵⁰. W przypadku długotrwałego użytkowania konopi indyjskich, badania przeprowadzone z wykorzystaniem neuroobrazowania, wykazały wzmożoną aktywność mózgu. Może to wskazywać, iż neurony muszą wykazać zwiększone działanie w celu zachowania odpowiedniego funkcjonowania całego narządu⁵¹. Skutki uboczne obejmują również układ krwionośny. W jednym z badań, które objęło 3882 osoby, wykazano, że ryzyko zawału jest zwiększone 4,8-krotnie, w stosunku do podstawowej wartości⁵². Udowodnione zostało również zwiększone ryzyko udaru⁵³. Do poważnych skutków ubocznych można zaliczyć wymioty lub zakażenia dróg moczowych⁴⁷. Rzadkie występowanie poważnych skutków ubocznych przemawia za bezpieczeństwem stosowania kannabinoidów. Należy również pamiętać o skutkach długotrwałych, które są mniej poznane, a zarazem na obecny stan wiedzy, wydają się poważniejsze.

5. Dostępność kannabinoidów w Polsce

W połowie 2017 roku, w Polsce została zalegalizowana medyczna marihuana. Zostało to uregulowane ustawą z dnia 7 lipca 2017 r. o zmianie ustawy o przeciwdziałaniu narkomanii oraz ustawy o refundacji leków, środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego oraz wyrobów medycznych. Umożliwiło to Polakom korzystanie z pozytywnych właściwości substancji zawartych w tej roślinie. Preparatem który został zarejestrowany do użytku oraz który cieszy się dużą popularnością jest Sativex®. Podawany jest w postaci aerozolu do jamy ustnej. W 1 mililitrze znajduje się 27 mg THC oraz 25 mg CBD. Dodatkowo w Polsce jest dostępnych kilka innych preparatów

w formie suszu, jak np.; Cannabis Flos THC 8% CBD 8%, Cannabis Flos THC 1% CBD 12%, Cannabis Flos THC 20% CBD 1%⁵⁴. Te produkty firmy Aurora Deutschland GmbH mają w swoim składzie różne stężenia kannabinoidów, w zależności od preparatu co umożliwia większą precyzję prowadzonej farmakoterapii. Kannabinoidy z pewnością są rzadko stosowanymi lekami. Niewiele aptek dysponuje wspomnianymi preparatami co znacznie utrudnia Polakom dostęp do tych substancji. W większości pozytywne wyniki badań, jak i również wzrastająca popularność z pewnością sprawi, iż kannabinoidy z czasem staną się szerzej znaną metodą leczenia w Polsce.

6. Dyskusja

Ból neuropatyczny jest powikłaniem, które może być spowodowane wieloma chorobami lub urazami. Jego patofizjologia nie jest w pełni poznana, co sprawia problemy terapeutyczne. Standardowe leki przeciwbólowe, nawet te z grupy opioidów, nie mają bardzo satysfakcjonujących efektów. Jeżeli objawy takiego bólu występują, przykładowo w związku z chemioterapią, jego leczenie jest wyjątkowo kłopotliwe. Właściwości przeciwbólowe kannabinoidów były znane już od dawna. W przedstawionej pracy podjęto próbę określenia ogólnej skuteczności kannabinoidów w leczeniu bólu neuropatycznego. Wyniki są zróżnicowane zarówno pomiędzy poszczególnymi badaniami, ale również zauważalne są różnice w wynikach badań między różnymi typami bólu neuropatycznego. W przypadku bólu związanego z cukrzycą, ciężko stwierdzić dużą skuteczność kannabinoidów. Interesująca jest różnica w efektywności terapii z użyciem syntetycznych kannabinoidów. Liczba badań jest niewystarczająca, aby stwierdzić iż mają one lepsze właściwości terapeutyczne, ale warto przeprowadzić dodatkowe badania w celu określenia, czy występują pewne różnice. Lepsze wyniki można znaleźć w badaniach opisujących działanie THC oraz CBD wśród pacjentów ze stwardnieniem rozsianym. Ból neuropatyczny będący skutkiem urazu jest bardzo zróżnicowany ze względu na przyczynę. Dlatego też metody leczenia są różne i nie zawsze skuteczne. W tym przypadku kannabinoidy mogą się stać dobrą alternatywą w momencie kiedy inne metody zawodzą. Kolejnym omawianym typem był ból związany z nowotworami. Ten typ również przysparza trudności w leczeniu. Kannabinoidy mogą być pomocne w tym przypadku, ponieważ łagodzą ból oraz mają dodatkowe, korzystne właściwości, jak np. działanie przeciwwymiotne, co może być bardzo pozytywnym działaniem w skutkach ubocznych chemioterapii. Skutki uboczne kannabinoidów są w większości łagodne co jest

dodatkową zaletą tych substancji. Dostępność tych związków chemicznych w Polsce jest niewielka. Niewielka liczba aptek jest w stanie zaopatrzyć pacjentów w takie preparaty. Należy pamiętać, że taka metoda leczenia jest stosunkowo nowa. Głównie pozytywne wyniki oraz wzrost popularności może spowodować łatwiejszy dostęp do tych leków.

7. Wnioski

Zastosowanie kannabinidów w przypadku tego typu bólu może być bardzo pomocne. Obecnie informacje na temat ich skuteczności są ograniczone, lecz mogą napawać optymizmem. Dokładne procedury związane z ich stosowaniem, między innymi dawkowanie, nie są dokładnie określone. Ze względu na ich pozytywne działanie mogą być skuteczną alternatywą w szczególnych sytuacjach. Dodatkowo ich stosunkowo niewielkie skutki uboczne, i tolerancja przez chorych jest zaletą tych substancji. Koniecznym jest przeprowadzenie większej liczby tych badań w celu optymalizacji leczenia z wykorzystaniem kannabinoidów.

Referencje

1. Petzke F, Tölle T, Fitzcharles MA, Häuser W. Cannabis-Based Medicines and Medical Cannabis for Chronic Neuropathic Pain. *CNS Drugs*. 2022;36(1):31-44. doi:10.1007/s40263-021-00879-w
2. Finnerup NB, Attal N, Haroutounian S, et al. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*. 2015;14(2):162-173. doi:10.1016/S1474-4422(14)70251-0
3. Bennici A, Mannucci C, Calapai F, et al. Safety of Medical Cannabis in Neuropathic Chronic Pain Management. *Molecules*. 2021;26(20):6257. doi:10.3390/molecules26206257
4. Russo EB. History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet. *Chem Biodivers*. 2007;4(8):1614-1648. doi:10.1002/cbdv.200790144
5. Demuth DG, Molleman A. Cannabinoid signalling. *Life Sci*. 2006;78(6):549-563. doi:10.1016/j.lfs.2005.05.055

6. Karschner EL, Darwin WD, McMahon RP, et al. Subjective and physiological effects after controlled sativex and oral THC administration. *Clin Pharmacol Ther.* 2011;89(3):400-407. doi:10.1038/clpt.2010.318
7. Ebbert JO, Scharf EL, Hurt RT. Medical Cannabis. *Mayo Clin Proc.* 2018;93(12):1842-1847. doi:10.1016/j.mayocp.2018.09.005
8. Martin-Santos R, A. Crippa J, Batalla A, et al. Acute Effects of a Single, Oral dose of d9-tetrahydrocannabinol (THC) and Cannabidiol (CBD) Administration in Healthy Volunteers. *Curr Pharm Des.* 2012;18(32):4966-4979. doi:10.2174/138161212802884780
9. Miller HP, Bonawitz SC, Ostrovsky O. The effects of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) on inflammation: A review. *Cell Immunol.* 2020;352:104111. doi:10.1016/j.cellimm.2020.104111
10. Mlost J, Bryk M, Starowicz K. Cannabidiol for pain treatment: Focus on pharmacology and mechanism of action. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22):1-22. doi:10.3390/ijms21228870
11. Kramer JL. Medical marijuana for cancer. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(2):109-122. doi:10.3322/caac.21260
12. Lucas CJ, Galettis P, Schneider J. The pharmacokinetics and the pharmacodynamics of cannabinoids. *Br J Clin Pharmacol.* 2018;84(11):2477-2482. doi:10.1111/bcp.13710
13. Meissner H, Cascella M. *Cannabidiol (CBD)*. StatPearls Publishing; 2020. Accessed January 3, 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556048/>
14. Amin MR, Ali DW. Pharmacology of Medical Cannabis. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1162:151-165. doi:10.1007/978-3-030-21737-2_8
15. Malfait AM, Gallily R, Sumariwalla PF, et al. The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritic therapeutic in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(17):9561-9566. doi:10.1073/pnas.160105897
16. Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, Wink D. Cannabidiol and (-)Δ9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(14):8268-8273. doi:10.1073/pnas.95.14.8268

17. Rock EM, Bolognini D, Limebeer CL, et al. Cannabidiol, a nonpsycho-tropic component of cannabis, attenuates vomiting and nau-sea-like behaviour via indirect agonism of 5-HT 1A somatoden-dritic autoreceptors in the dorsal raphe nucleus. *Br J Pharmacol.* 2012;165(8):2620-2634. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01621.x
18. Crippa JA, Guimarães FS, Campos AC, Zuardi AW. Translational investigation of the therapeutic potential of cannabidiol (CBD): Toward a new age. *Front Immunol.* 2018;9(SEP). doi:10.3389/fimmu.2018.02009
19. Van Hecke O, Austin SK, Khan RA, Smith BH, Torrance N. Neu-ro-pathic pain in the general population: A systematic review of epi-demiological studies. *Pain.* 2014;155(4):654-662. doi:10.1016/j.pain.2013.11.013
20. Breivik H, Collett B, Ventafridda V, Cohen R, Gallacher D. Survey of chronic pain in Europe: Prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur J Pain.* 2006;10(4):287. doi:10.1016/j.ejpain.2005.06.009
21. Ziegler D, Rathmann W, Dickhaus T, Meisinger C, Mielck A. Neu-ro-pathic pain in diabetes, prediabetes and normal glucose toleran-ce: The MONICA/KORA Augsburg surveys S2 and S3. *Pain Med.* 2009;10(2):393-400. doi:10.1111/j.1526-4637.2008.00555.x
22. Boulton AJM, Malik RA, Arezzo JC, Sosenko JM. Diabetic somatic neuropathies. *Diabetes Care.* 2004;27(6):1458-1486. doi:10.2337/diacare.27.6.1458
23. Gordoys A, Scuffham P, Shearer A, Oglesby A, Tobian JA. The he-alth care costs of diabetic peripheral neuropathy in the U.S. *Diabetes Care.* 2003;26(6):1790-1795. doi:10.2337/diacare.26.6.1790
24. Toth C, Mawani S, Brady S, et al. An enriched-enrolment, ran-domized withdrawal, flexible-dose, double-blind, placebo-con-trolled, parallel assignment efficacy study of nabilone as adjuvant in the treatment of diabetic peripheral neuropathic pain. *Pain.* 2012;153(10):2073-2082. doi:10.1016/j.pain.2012.06.024
25. Frank B, Serpell MG, Hughes J, Matthews JNS, Kapur D. Compa-ri-son of analgesic effects and patient tolerability of nabilone and di-hydrocodeine for chronic neuropathic pain: Randomised, crossover,

- double blind study. *BMJ*. 2008;336(7637):199-201. doi:10.1136/bmj.39429.619653.80
26. Wallace MS, Marcotte TD, Umlauf A, Gouaux B, Atkinson JH. Efficacy of Inhaled Cannabis on Painful Diabetic Neuropathy. *J Pain*. 2015;16(7):616-627. doi:10.1016/j.jpain.2015.03.008
27. Selvarajah D, Gandhi R, Emery CJ, Tesfaye S. Randomized placebo-controlled double-blind clinical trial of cannabis-based medicinal product (Sativex) in painful diabetic neuropathy: Depression is a major confounding factor. *Diabetes Care*. 2010;33(1):128-130. doi:10.2337/dc09-1029
28. Jones É, Vlachou S. A Critical Review of the Role of the Cannabinoid Compounds Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) and Cannabidiol (CBD) and their Combination in Multiple Sclerosis Treatment. *Molecules*. 2020;25(21). doi:10.3390/molecules25214930
29. O'Connor AB, Schwid SR, Herrmann DN, Markman JD, Dworkin RH. Pain associated with multiple sclerosis: Systematic review and proposed classification. *Pain*. 2008;137(1):96-111. doi:10.1016/j.pain.2007.08.024
30. Khan N, Smith MT. Multiple sclerosis-induced neuropathic pain: Pharmacological management and pathophysiological insights from rodent EAE models. *Inflammopharmacology*. 2014;22(1):1-22. doi:10.1007/s10787-013-0195-3
31. Schimrigk S, Marziniak M, Neubauer C, Kugler EM, Werner G, Abramov-Sommariva D. Dronabinol Is a Safe Long-Term Treatment Option for Neuropathic Pain Patients. *Eur Neurol*. 2017;78(5-6):320-329. doi:10.1159/000481089
32. Rog DJ, Nurmikko TJ, Friede T, Young CA. Randomized, controlled trial of cannabis-based medicine in central pain in multiple sclerosis. *Neurology*. 2005;65(6):812-819. doi:10.1212/01.wnl.0000176753.45410.8b
33. Langford RM, Mares J, Novotna A, et al. A double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group study of THC/CBD oromucosal spray in combination with the existing treatment regimen, in the relief of central neuropathic pain in patients with

- multiple sclerosis. *J Neurol.* 2013;260(4):984-997. doi:10.1007/s00415-012-6739-4
34. Svendsen KB, Jensen TS, Bach FW. Does the cannabinoid dronabinol reduce central pain in multiple sclerosis? Randomised double blind placebo controlled crossover trial. *BMJ.* 2004;329(7460):253. doi:10.1136/bmj.38149.566979.AE
35. Kuffler DP. Injury-Induced Effectors of Neuropathic Pain. *Mol Neurobiol.* 2020;57(1):51-66. doi:10.1007/s12035-019-01756-w
36. Ciaramitaro P, Padua L, Devigili G, et al. Prevalence of neuropathic pain in patients with traumatic brachial plexus injury: A multicenter prospective hospital-based study. *Pain Med (United States).* 2017;18(12):2428-2432. doi:10.1093/pm/pnw360
37. Lovaglio AC, Socolovsky M, Di Masi G, Bonilla G. Treatment of neuropathic pain after peripheral nerve and brachial plexus traumatic injury. *Neurol India.* 2019;67(7):S32-S37. doi:10.4103/0028-3886.250699
38. Ware MA, Wang T, Shapiro S, et al. Smoked cannabis for chronic neuropathic pain: A randomized controlled trial. *CMAJ.* 2010;182(14):E694. doi:10.1503/cmaj.091414
39. Berman JS, Symonds C, Birch R. Efficacy of two cannabis based medicinal extracts for relief of central neuropathic pain from brachial plexus avulsion: Results of a randomised controlled trial. *Pain.* 2004;112(3):299-306. doi:10.1016/j.pain.2004.09.013
40. Yoon SY, Oh J. Neuropathic cancer pain: Prevalence, pathophysiology, and management. *Korean J Intern Med.* 2018;33(6):1058-1069. doi:10.3904/kjim.2018.162
41. Bennett MI, Rayment C, Hjermstad M, Aass N, Caraceni A, Kaasa S. Prevalence and aetiology of neuropathic pain in cancer patients: A systematic review. *Pain.* 2012;153(2):359-365. doi:10.1016/j.pain.2011.10.028
42. Urch CE, Dickenson AH. Neuropathic pain in cancer. *Eur J Cancer.* 2008;44(8):1091-1096. doi:10.1016/j.ejca.2008.03.015

43. Davis MP. Cancer-Related Neuropathic Pain: Review and Selective Topics. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2018;32(3):417-431. doi:10.1016/j.hoc.2018.01.005
44. Lynch ME, Cesar-Rittenberg P, Hohmann AG. A double-blind, placebo-controlled, crossover pilot trial with extension using an oral mucosal cannabinoid extract for treatment of chemotherapy-induced neuropathic pain. *J Pain Symptom Manage.* 2014;47(1):166-173. doi:10.1016/j.jpainsymman.2013.02.018
45. Rahn EJ, Zvonok AM, Thakur GA, Khanolkar AD, Makriyannis A, Hohmann AG. Selective activation of cannabinoid CB2 receptors suppresses neuropathic nociception induced by treatment with the chemotherapeutic agent paclitaxel in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;327(2):584-591. doi:10.1124/jpet.108.141994
46. Pascual D, Goicoechea C, Suardíaz M, Martín MI. A cannabinoid agonist, WIN 55,212-2, reduces neuropathic nociception induced by paclitaxel in rats. *Pain.* 2005;118(1-2):23-34. doi:10.1016/j.pain.2005.07.008
47. Wang T, Collet JP, Shapiro S, Ware MA. Adverse effects of medical cannabinoids: A systematic review. *CMAJ.* 2008;178(13):1669-1678. doi:10.1503/cmaj.071178
48. Strasser F, Luftner D, Possinger K, et al. Comparison of orally administered cannabis extract and delta-9- tetrahydrocannabinol in treating patients with cancer-related anorexia-cachexia syndrome: A multicenter, phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial from the Cannab. *J Clin Oncol.* 2006;24(21):3394-3400. doi:10.1200/JCO.2005.05.1847
49. Williamson EM, Evans FJ. Cannabinoids in clinical practice. *Drugs.* 2000;60(6):1303-1314. doi:10.2165/00003495-200060060-00005
50. Wong KU, Baum CR. Acute Cannabis Toxicity. *Pediatr Emerg Care.* 2019;35(11):799-806. doi:10.1097/PEC.0000000000001970
51. Cohen K, Weizman A, Weinstein A. Positive and Negative Effects of Cannabis and Cannabinoids on Health. *Clin Pharmacol Ther.* 2019;105(5):1139-1147. doi:10.1002/cpt.1381

52. Mittleman MA, Lewis RA, Maclure M, Sherwood JB, Muller JE. Triggering myocardial infarction by marijuana. *Circulation*. 2001;103(23):2805-2809. doi:10.1161/01.CIR.103.23.2805
53. Thomas G, Kloner RA, Rezkalla S. Adverse cardiovascular, cerebrovascular, and peripheral vascular effects of marijuana inhalation: What cardiologists need to know. *Am J Cardiol*. 2014;113(1):187-190. doi:10.1016/j.amjcard.2013.09.042
54. Na rynku aptecznym w Polsce brakuje medycznej marihuany. Powód: brak zgód URPL - Puls Medycyny - pulsmedycyny.pl. Accessed April 22, 2022. <https://pulsmedycyny.pl/na-rynku-aptecznym-w-polsce-brakuje-medycznej-marihuany-powod-brak-zgod-urpl-1129474>

MDMA W LECZENIU PTSD: PSYCHOTERAPIA WSPOMAGANA PSYCHODELIKAMI NADZIEJĄ DLA CHORYCH?

Rafał Górka, Karolina Gancarczyk,
Aleksandra Kałuża, Krzysztof Gładkowski

Studenckie Koło Naukowe im. Prof. Zbigniewa Religii przy Katedrze Biofizyki,
Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Abstrakt:

PTSD (Zespół Stresu Pourazowego) jest zaliczany do grupy zaburzeń lękowych. Rozpija się po ekspozycji na traumatyczne wydarzenie jak np. wypadek, gwałt czy udział w wojnie. Szacunki występowania sięgają od kilku do kilkunastu procent w światowej populacji, a jednostka ta stanowi poważne obciążenie dla społeczeństwa i znacząco obniża jakość życia dotkniętych. Obecne metody terapii niefarmakologicznej (np. Terapia kognitywno-behawioralna) czy farmakologiczne jak antydepresanty mają ograniczoną skuteczność i grupa osób nieodpowiadających na leczenie pozostaje wysoka. Rozwiązaniem może okazać się psychoterapia wspomagana MDMA – ten związek z grupy entaktogenów działający głównie uwalniać monoaminy może wpływać na zaburzone w PTSD procesy wygaszania strachu i rekonsolidacji pamięci. Pozwala również na pełniejsze zaangażowanie w terapię, a dzięki stymulacji wydzielania oksytocyny na rozwinięcie lepszej więzi z psychoterapeutą. FDA nadała terapii tytuł przełomowej, a obecnie ma miejsce faza 3 badań klinicznych nad jej zastosowaniem.

Słowa kluczowe: MDMA, psychoterapia, PTSD, trauma, psychodeliki

Abstract:

PTSD (Post Traumatic Stress Disorder) is an anxiety disorder that develops after an exposure to significant trauma e.g., car accident, rape, or war experience. Estimates of its prevalence in world population vary between 2% and 18%. The disorder poses a significant social and economic burden, limiting the quality of life of diseased ones. Current therapeutic methods- both non-pharmacological (like CBT – Cognitive Behavioral Therapy) and pharmacological like antidepressants drugs show limited efficacy and the rate of non-responders remains high. A potential solution could be MDMA assisted psychotherapy. MDMA is a psychoactive compound from the group of entactogenes that work primarily by the release of monoamines. It can enhance the fear extinction process that is disturbed in subjects with PTSD as well as modulate memory reconsolidation. It also provides the optimal arousal zone for psychotherapy, prevents emotional numbing and strengthens the therapeutic alliance thanks to the release of oxytocin. FDA assigned it as a breakthrough therapy and phase 3 clinical trials are under way.

Keywords: MDMA, psychotherapy, PTSD, trauma, psychedelics

1. Wstęp

Substancje psychodeliczne stosowane są przez ludzkość od tysiącleci, a w XX wzbudziły również zainteresowanie naukowców z powodu ich potencjalnego użycia w leczeniu chorób psychiatrycznych. Licznie przeprowadzane badania dały bardzo obiecujące efekty, jednak rozpowszechnienie rekreacyjnego spożycia psychodelików doprowadziło do ich całkowitej delegalizacji, co przerwało doświadczenia. W ostatnich latach ponownie wzrasta zainteresowanie psychodelikami w psychiatrii, gdzie mówi się o renesansie tych związków. Przyczyniła się do tego w dużej mierze organizacja MAPS (*Multidisciplinary Association for Psychedelic Studies*) która wspiera i promuje powrót do psychodelików w psychiatrii. Jedną z substancji, nad którą badania są najdalej posunięte jest MDMA (3,4-Metylenodioksyfetamina) bardziej znana pod nazwą Ecstasy. Jej tłumiące strach, poprawiające nastrój i zwiększające otwartość oraz empatię właściwości sprawiły, że jest badana w połączeniu z psychoterapią jako terapią PTSD (Zespołu Stresu Pourazowego). Artykuł ten ma na celu przedstawienie potencjalnego mechanizmu działania MDMA w psychoterapii oraz ocenę skuteczności i bezpieczeństwa tego połączenia^{1,2}.

Obraz PTSD, występowania, metody leczenia oraz biologiczne podstawy schorzenia. Objawy Stresu pourazowego opisywano już podczas wojny secesyjnej czy wśród więźniów obozów koncentracyjnych, jednak jako oddzielną jednostkę chorobową wyodrębniono go dopiero w latach 70. XX wieku³. Dokładna definicja objawów różni się w zależności od użytych kryteriów diagnostycznych, w znacznym stopniu rozbieżne są również grupy z postawioną według nich diagnozą. Możemy jednak wyróżnić ogólne symptomy charakteryzujące PTSD. Zaliczamy do nich tzw. Intruzje, czyli nawracające wspomnienia traumy np. w formie koszmarów nocnych, uporczywych myśli czy tzw. *Flashbacks* to jest nagłych reminiscencji w których chory ponownie przeżywa dramatyczne wydarzenie. W dodatku czynniki zewnętrzne przypominające nawet w umiarkowanym stopniu traumę mogą wywołać niewspółmierną reakcję stresową np. panikę w reakcji na wybuch fajerwerk, a również agresję. Druga grupa zaburzeń związana jest z unikaniem bodźców związanych z traumą - osób, wydarzeń i przedmiotów. Dotyczy to również wspominania wydarzenia i rozmów o nim, dojść może nawet do zniekształcenia pamięci i niemożności przywołania elementów traumy. Związane jest to z obronnymi mechanizmami wyparcia, które uniemożliwiają efektywne przepracowanie i zintegrowanie traumy. Występują również nadmierna czujność, wrażliwość i pobudzenie oraz problemy ze snem i koncentracją. Chorzy zmagają się także

z zaburzeniami nastroju, odrętwieniem emocjonalnym, poczuciem odseparowania i izolacji, problemem w wyrażaniu pozytywnych uczuć jak miłość, obwinianie się oraz posiadanie nadmiernie negatywnych przekonań o świecie. Charakterystyczną cechą PTSD jest występowanie symptomów nie od razu po ekspozycji, a dopiero po dłuższym czasie – tygodniach lub miesiącach.

Chociaż dokładny mechanizm zaburzeń nie jest w pełni poznany, obserwowane są zmiany neurologiczne mogące tłumaczyć objawy: zmniejszenie aktywności i objętości kory przedczołowej, szczególnie obszarów przyśrodkowych, mały hipokamp, nadaktywność ciała migdałowatego, wyspy i przedniej części obręczy. Są to obszary odpowiedzialne za odpowiedź na zagrożenie, a ich nadaktywność w odniesieniu do ośrodków korowych może powodować nadmierną czujność i niepokój⁴. Znaczną rolę w rozwoju PTSD może grać nieprawidłowe warunkowanie i wygaszanie strachu oraz zaburzone odczytywanie sygnałów bezpieczeństwa^{3,4}. Głównym ośrodkiem odpowiedzialnym za warunkowanie strachu jest ciało migdałowate⁵. Odpowiada ona za wiele fizjologicznych reakcji na zagrożenie aktywując układ współczulny i oś podwzgórze–przysadka–nadnercze. Pozwala ono również na warunkowanie bodźca wcześniej neutralnego jako związany z zagrożeniem - np. mysz rażona prądem zawsze, gdy rozlega się pewien dźwięk zacznie po jakimś czasie reagować strachem na sam dźwięk. U osób z PTSD proces ten zachodzi abnormalnie i sygnały związane z bezpieczeństwem nie są w stanie stłumić reakcji lękowej. Zaburzone jest również wygaszanie lęku tzn. reakcja lękowa nie zanika z czasem, gdy bodziec powtarzany jest wielokrotnie bez wzmocnienia. Co ciekawe osoby badane z PTSD są często świadome że sytuacja nie stanowi zagrożenia jednak nie są w stanie powstrzymać reakcji lękowej⁶. Zaburzone jest również przetwarzanie kontekstualne – pozwala ono na identyfikowanie zagrożenia w zależności od otoczenia, np. tygrys na ulicy postrzegany jest jako niebezpieczeństwo, ale to samo zwierzę w ZOO wzbudza jedynie zainteresowanie. Za proces ten odpowiadają głównie hipokamp i kora przedczołowa, struktury, które wykazują zaburzoną aktywność w PTSD⁴. Ponadto zwiększona jest aktywność układu noradrenergicznego^{3,4}.

Szacunki występowania choroby w światowej populacji wahają się od 2-3% aż do 18%.³ Należy pamiętać, że PTSD rozwija się tylko w zdecydowanej mniejszości osób dotkniętych traumą – aż 70% światowej populacji doświadcza dramatycznego przeżycia w ciągu swojego życia, a jedna trzecia co najmniej 3 epizody tego typu. Szczególnie narażone są kobiety, osoby z przeżytą w dzieciństwie traumą oraz istniejącymi już zaburzeniami psychicznymi np. stanami lękowymi bądź depresją. Prawdopodobieństwo rozwinięcia

traumy jest również zależne od rodzaju i intensywności przeżycia - największe ryzyko niesie doświadczenie przemocy seksualnej⁷. Dużą rolę grają również czynniki genetyczne i epigenetyczne – dziedziczność PTSD szacowana jest na 30%⁸. W ponad 50% przypadków rozwija się długotrwałe PTSD trwające ponad rok – np. PTSD związane z wydarzeniami wojennymi trwa średnio ponad 13 lat. Stanowi to znaczne obciążenie dla zdrowia publicznego, do którego przyczyniają się nie tylko długi czas trwania, ale również bardzo wysokie występowanie chorób współistniejących jak depresja czy uzależnienia. PTSD wiąże się także z uogólnionym zapaleniem, niesprawnością oraz przedwczesną śmiercią, szczególnie z powodu chorób układu oddechowego i krążenia⁷. Społeczny ciężar PTSD powiększony jest jeszcze przez zaburzenie funkcjonowania rodzin, łącznie z przemocą domową⁸.

Istniejące do tej pory terapie możemy podzielić na dwie główne grupy - oparte na psychoterapii i farmakologiczne. Do tej pierwszej zaliczmy między innymi TF CBT (*Trauma Focused Cognitive Behavioral Therapy*), która jest metodą pierwszego wyboru mającą największe poparcie w badaniach^{3,4,9}. Protokoły poszczególnych modeli terapii są rozbieżne, jednym z podejść jest nauka pacjenta panowania nad emocjami np. za pomocą oddechu, a następnie stopniowe przywoływanie traumy, aż do momentu gdy dzięki nabytej zdolności kontrolowania reakcji i pomocy terapeuty nie wzbudza już ona skrajnych reakcji.⁴ Dobre wyniki osiągane są także w terapiach opartych na spisanim schemacie (tzw. *Manualized therapies*). Większość chorych otrzymuje również leczenie farmakologiczne, głównymi lekami są antydepresanty z grupy SSRI (Inhibitory zwrotnego wychwyty serotoniny) jak paroksetyna czy setralina^{3,4}. Stosowane są również inne leki np. anksjolityki czy lekki nasenne. Mimo istnienia licznych możliwości leczenia, odpowiedź na nie jest bardzo zróżnicowana z dużym odsetkiem nie odpowiadających. Leki antydepresyjne nie tylko muszą być przyjmowane codziennie i wiążą się z występowaniem skutków ubocznych, ale działają głównie na symptomy nie usuwają przyczyny co związane jest z dużym odsetkiem nawrotów po zaprzestaniu leczenia⁴. Psychoterapie, w których pacjent konfrontowany jest z traumą są stosunkowo skuteczne, ale wiążą się ze znaczną ilością osób rezygnujących z leczenia. Wynika to głównie z potrzeby unikania wspomnień traumatycznego przeżycia.

2. Jak MDMA może wspierać psychoterapię?

MDMA jest syntetyczną substancją psychoaktywną która wykazuje strukturalne podobieństwa zarówno do klasycznych psychodelików jak i do

stymulantów układu nerwowego, np. amfetaminy. Jednak ze względu na sposób działania, który nie odpowiada żadnej z tych grup, zaliczono go do nowej grupy tzw. entaktogenów zwanych również empatogenami¹⁰. Substancja ta wywiera swój efekt głównie uwalniając serotoninę (5-HT), a także norepinefrynę (NE) oraz dopaminę (DA). Wpływa również na poziom oksytocyny i kortyzolu, oraz podobnie jak psychodeliki stymuluje receptory 5HT-2, co tłumaczyć może umiarkowane właściwości halucynogenne (żywsze kolory, zniekształcone kształty)^{10,11}. Użytkownicy doświadczają stanu pobudzenia i podniecenia, poprawy nastroju, a nawet euforii. Charakterystyczny, typowy dla entaktogenów jest również wzrost ekstrawersji, towarzyskości, poczucia bliskości wobec innych oraz tolerancji¹³. Chociaż mechanizm działania MDMA w wspomaganiu psychoterapii nie jest całkowicie wyjaśniony, proponuje się parę opartych na działaniu MDMA uzupełniających się modeli:

- **Wygaszanie strachu (*fear extinction*)**^{11,12,14}: Jak już wspomniano mechanizm wygaszania strachu jest jednym z procesów zaburzonych w PTSD. W badaniach na gryzoniach MDMA podane przed treningiem habituacyjnym (wielokrotne powtarzanie bodźca warunkowego bez następującego wzmocnienia np. impulsu elektrycznego) znacząco zwiększyło stopień wygaszania w porównaniu do próby kontrolnej. MDMA wpływa na przepływ krwi (CBF, ang. *Cerebral blood flow*) i aktywność kluczowych struktur w wygaszaniu strachu^{10,11,15}. Zmniejsza CBF w lewym ciele migdałowatym, którego aktywność koreluje pozytywnie z poczuciem lęku¹⁰, a także w pobudzonej w zaburzeniach lękowych wyspie¹⁶. Po podaniu MDMA zwiększona jest również aktywność przyśrodkowej kory przedczołowej (mPFC, ang. *Medial prefrontal cortex*), która hamuje reakcję lękową co jest konieczne w wygaszaniu reakcji na bodziec lękowy¹³. To działanie MDMA może przeciwstawić się patologicznemu wzorcowi pobudzenia struktur mózgowych w PTSD i przywracać ich prawidłowe współdziałanie. Kluczowym mechanizmem w wygaszaniu strachu jest potencjalnie zwiększenie ekspresji BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*) w ciele migdałowatym¹⁴. Neurotrofina ta moduluje plastyczność synaptyczną i procesy uczenia, a jej poziom jest obniżony w zaburzeniach nastroju, depresji i chronicznym stresie. Zwiększoną ekspresję mRNA genu dla BDNF zanotowano po podaniu MDMA i treningu habituacyjnym, a inhibicja działania BDNF w ciele migdałowatym zniosła również efekt MDMA na wygaszanie strachu¹³. Warto zauważyć że ekspresja BDNF potencjalnie tłumaczy długotrwały efekt terapii MDMA – może ona wywoływać trwałe zmiany osobowości, szczególnie wzrost otwartości, który koreluje

z redukcją symptomów PTSD, a także spadkiem neurotyczności¹⁷. Sugeruje się że związane jest to z epigenetycznymi modyfikacjami genu dla BDNF, a efekt ten może być remedium na niekorzystne zmiany osobowości w PTSD¹⁷.

- **Rekonsolidacja Pamięci:** termin ten odnosi się do procesu, w którym element zostaje przywołany z długotrwałej pamięci, zdestabilizowany, a następnie zapisany w zmodyfikowanej przez nowe bodźce formie. Do destabilizacji śladu pamięciowego może dojść wskutek niedopasowania między wspomnieniem, a teraźniejszymi odczuciami jak np. przywołując traumatyczne wydarzenia będąc pod wpływem MDMA w zapewniającym poczucie bezpieczeństwa otoczeniu¹¹. Badani, którym podano MDMA oceniali złe wspomnienia jako mniej negatywne i wyraziste, co korelowało z obserwowaną zmniejszoną aktywnością przedniego, lewego płata skroniowego, który związany jest z przetwarzaniem negatywnych wspomnień¹⁸. MDMA osłabia również zapamiętywanie i przywoływanie wzbudzających emocje szczegółów, zarówno pozytywnych jak i negatywnych, nie wpływając na pamięć neutralnych faktów¹⁹. W ten sposób MDMA pozwala na łatwiejsze, mniej emocjonalne przywołanie przeżytych wydarzeń i spojrzenie na nie z nowej perspektywy i rekonsolidację pamięci. Zgadza się to z opisywanymi doświadczeniami pacjentów, którzy mówią o możliwości myślenia o traumie w bardziej neutralny, "bezpieczny" sposób oraz o poczuciu po raz pierwszy współczucia do samego siebie w kontekście traumatycznych wydarzeń¹¹.

- **Zapewnienie optymalnych warunków do psychoterapii:** Uwalnianie przez MDMA norepinefryna oraz kortyzol wywołują u wśród pacjentów optymalny stan pobudzenia fizycznego i emocjonalnego, który pozwala na pełniejsze zaangażowanie się w terapię. Jest to szczególnie ważne, gdyż emocjonalne wycofanie jest częstym problemem w terapii PTSD^{11,15,20}. Poza tym kortyzol i norepinefryna synergistycznie stymulują procesy zapamiętywania, wspomagając rekonsolidację pamięci i wygaszanie lęku¹¹. Istotną rolę odgrywa uwalniania oksytocyna – pomaga ona w wytworzeniu więzi między pacjentem, a terapeutą. Jakość tej relacji w istotny sposób determinuje wynik leczenia, a osoby z PTSD często borykają się z problemem braku zaufania i poczucia społecznego wsparcia^{13,20}.

3. Jak przeprowadzana jest psychoterapia wspomagana PTSD?

Dla sukcesu tej terapii konieczne jest nie tylko farmakologiczne działanie MDMA, ale raczej jej współdziałanie z pracą psychoterapeuty i zapewniającym poczucie bezpieczeństwa odpowiednim otoczeniem (tzw. *setting*)

oraz odpowiednim nastawieniem pacjenta (tzw. *set*)^{10,11}. Model psychoterapii opiera się na wcześniejszych już protokołach terapii z użyciem LSD w latach 90²¹. Większość sesji odbywa się bez użycia narkotycznej substancji i ma na celu przygotowanie pacjenta do sesji z MDMA, nawiązanie relacji zaufania z terapeutą, a także ugruntowanie doświadczeń i przemyśleń doświadczonych pod wpływem MDMA. Te trwające 60-90 minut sesje są kluczowe, gdyż po sesji z MDMA może nastąpić czasowe nasilenie objawów, co bez nadzoru terapeuty mogłoby prowadzić do prób samobójczych. Podczas całej terapii mają miejsce jedynie 2-3 trwające 6-8 godzin sesje z użyciem MDMA, podczas których podaje się 125 mg dawki na początku i opcjonalnie 65 mg po 2 godzinach w celu przedłużenia efektu. Pod wpływem MDMA pacjent leży często słuchając muzyki z opaską na oczach. Te chwile refleksji przeplatane są ze swobodną rozmową z terapeutą - nie jest ona nakierowywana i zachęca się jedynie pacjenta do wyrażania swoich odczuć lub podążania myślami w określonym kierunku. Z tego powodu terapia z MDMA łączy w sobie elementy różnych rodzajów terapii, m.in. psychoterapii ekspozycyjnej, gdyż pacjenci często wracają do wydarzeń traumy. Uzdrawienie ma pochodzić z samej Psyche chorego, a MDMA i psychoterapeuci jedynie pośredniczą w procesie zdrowienia^{11,21}.

4. Efektywność i bezpieczeństwo psychoterapii wspomaganiej MDMA

Pierwsze badanie eksperymentalne z użyciem MDMA przeprowadzono ponad dwie dekady po przerwaniu doświadczeń przez delegalizację związku. Wyniki były bardzo obiecujące - w grupie 20 osób z opornym na leczenie psychoterapeutyczne jak i farmakologiczne PTSD terapia wspomagana MDMA okazała się znacząco skuteczniejsza od psychoterapii z podaniem placebo (poprawa wśród 83% vs 25 %). Nie zaobserwowano również poważnych działań niepożądanych²². Poprawa utrzymała się prawie u wszystkich uczestników podczas długotrwałej obserwacji po 74 miesiącach²³. Wykazano również zależność efektu od dawki, gdzie najwyższa (125 mg) dawka miała najwyższą skuteczność²⁴. Efektywność MDMA potwierdzona została również w metaanalizie dostępnych badań²⁵. Doprowadziło to do nadania przez FDA (*Food and Drug Agency*) terapii miana przełomowej²⁶ i rozpoczęcia badań klinicznych fazy 3, po której zakończeniu oczekuje się w najbliższych latach dopuszczenia psychoterapii wspomaganiej MDMA do leczenia PTSD.

Oprócz skuteczności zastosowanie MDMA cechuje duże bezpieczeństwo. W badaniach podaje się czystą substancję, w kontrolowanych warunkach

i monitorując funkcje życiowe jak ciśnienie krwi i temperaturę. Ryzyko związane z takim stosowaniem nie jest porównywalne z rekreacyjnym stosowaniem Ecstasy podczas masowych imprez - narkotyk ten oprócz MDMA zawiera często inne substancje psychoaktywne i łączony jest z innymi używkami np. alkoholem. Warto jednak zauważyć, że nawet w nielegalnym użytku zgony wskutek Ecstasy są bardzo nieliczne^{2,21}. Bezpieczeństwo MDMA w kontrolowanych warunkach potwierdzono również na grupie 166 zdrowych badanych, gdzie nie zaobserwowano żadnych poważnych działań niepożądanych, a doświadczenie z MDMA było pozytywnie ocenione przez większość uczestników. Jednak zaobserwowano również negatywne skutki MDMA: u części podmiotów zanotowano pocenie się, palpitacje serca oraz suchość w ustach, a następnego dnia ból głowy, brak energii oraz obniżony nastrój. Ponadto MDMA podnosi ciśnienie, temperaturę i akcję serca - z tego powodu ryzyko użycia może wzrastać wśród osób z zaburzeniami układu krążenia²⁷. MDMA ma niewielki potencjał do uzależniania, a stosowanie w terapii wiąże się z bardzo małym ryzykiem późniejszego rekreacyjnego użycia^{21,23}.

5. Podsumowanie i konkluzje

Psychoterapia wspomagana MDMA jest nową metodą leczenia, w której praca z terapeutą wspomozona jest farmakologicznym działaniem MDMA. Połączenie to wykazuje wysoka skuteczność w leczeniu PTSD, także w przypadkach, w których inne, obecnie stosowane metody okazywały się niewystarczające - ten model terapii może okazać się nadzieją dla osób z PTSD nieopowiadających na leczenie. Dodatkowo jest to metoda stosunkowo bezpieczna - obserwowane negatywne działania nie przeważają zazwyczaj korzystnego działania substancji. Ponadto, ryzyko sięgania po Ecstasy w zakończeniu terapii jest bardzo małe podobnie jak szansa uzależniania. Badania nad MDMA wpisują się w ogólny trend powrotu do prac nad substancjami psychodelicznymi i podobnymi do nich. Może to okazać się szansa dla wielu pacjentów cierpiących na zaburzenia psychiatryczne, ale w ich aplikacji konieczne jest zachowanie rozwagi i bezpieczeństwa. Korzystny efekt MDMA i innych substancji psychoaktywnych w terapii nie zmienia faktu, że rekreacyjny, niekontrolowany użytek niesie ze sobą głównie negatywne konsekwencje.

Referencje

1. Nutt D. Psychedelic drugs-a new era in psychiatry?. *Dialogues Clin Neurosci.* 2019;21(2):139-147. doi:10.31887/DCNS.2019.21.2/dnutt
2. Sessa B. MDMA and PTSD treatment: "PTSD: From novel pathophysiology to innovative therapeutics". *Neurosci Lett.* 2017;649:176-180. doi:10.1016/j.neulet.2016.07.004
3. P.Gałecki, A.Szulc. *Psychiatria* 2018, Wrocław, Era Urban Partner
4. Shalev A, Liberzon I, Marmar C. Post-Traumatic Stress Disorder. *N Engl J Med.* 2017;376(25):2459-2469. doi:10.1056/NEJMr1612499
5. Yavas E, Gonzalez S, Fanselow MS. Interactions between the hippocampus, prefrontal cortex, and amygdala support complex learning and memory. *F1000Res.* 2019;8:F1000 Faculty Rev-1292. Published 2019 Jul 31. doi:10.12688/f1000research.19317.1
6. Stevens JS, Jovanovic T. Role of social cognition in post-traumatic stress disorder: A review and meta-analysis. *Genes Brain Behav.* 2019;18(1):e12518. doi:10.1111/gbb.12518
7. Watson P. PTSD as a Public Mental Health Priority. *Curr Psychiatry Rep.* 2019;21(7):61. Published 2019 Jun 26. doi:10.1007/s11920-019-1032-1
8. Miao XR, Chen QB, Wei K, Tao KM, Lu ZJ. Posttraumatic stress disorder: from diagnosis to prevention. *Mil Med Res.* 2018;5(1):32. Published 2018 Sep 28. doi:10.1186/s40779-018-0179-0
9. Schrader C, Ross A. A Review of PTSD and Current Treatment Strategies. *Mo Med.* 2021;118(6):546-551.
10. Vollenweider FX, Liechti ME, Gamma A, Greer G, Geyer M. Acute psychological and neurophysiological effects of MDMA in humans. *J Psychoactive Drugs.* 2002;34(2):171-184. doi:10.1080/02791072.2002.10399951
11. Feduccia AA, Mithoefer MC. MDMA-assisted psychotherapy for PTSD: Are memory reconsolidation and fear extinction underlying mechanisms?. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2018;84(Pt A):221-228. doi:10.1016/j.pnpbp.2018.03.003

12. Kalant H. The pharmacology and toxicology of "ecstasy" (MDMA) and related drugs. *CMAJ*. 2001;165(7):917-928.
13. Johansen PØ, Krebs TS. How could MDMA (ecstasy) help anxiety disorders? A neurobiological rationale. *J Psychopharmacol*. 2009;23(4):389-391. doi:10.1177/0269881109102787
14. Young MB, Andero R, Ressler KJ, Howell LL. 3,4-Methylenedioxyamphetamine facilitates fear extinction learning. *Transl Psychiatry*. 2015;5(9):e634. Published 2015 Sep 15. doi:10.1038/tp.2015.138
15. Quirk GJ, Mueller D. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology*. 2008;33(1):56-72. doi:10.1038/sj.npp.1301555
16. Walpola IC, Nest T, Roseman L, et al. Altered Insula Connectivity under MDMA. *Neuropsychopharmacology*. 2017;42(11):2152-2162. doi:10.1038/npp.2017.35
17. Wagner MT, Mithoefer MC, Mithoefer AT, et al. Therapeutic effect of increased openness: Investigating mechanism of action in MDMA-assisted psychotherapy. *J Psychopharmacol*. 2017;31(8):967-974. doi:10.1177/0269881117711712
18. Carhart-Harris RL, Wall MB, Erritzoe D, et al. The effect of acutely administered MDMA on subjective and BOLD-fMRI responses to favourite and worst autobiographical memories. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2014;17(4):527-540. doi:10.1017/S1461145713001405
19. Doss MK, Weafer J, Gallo DA, de Wit H. MDMA Impairs Both the Encoding and Retrieval of Emotional Recollections. *Neuropsychopharmacology*. 2018;43(4):791-800. doi:10.1038/npp.2017.171
20. Mithoefer MC, Grob CS, Brewerton TD. Novel psychopharmacological therapies for psychiatric disorders: psilocybin and MDMA. *Lancet Psychiatry*. 2016;3(5):481-488. doi:10.1016/S2215-0366(15)00576-3
21. Sessa B, Higbed L, Nutt D. A Review of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA)-Assisted Psychotherapy. *Front Psychiatry*. 2019;10:138. Published 2019 Mar 20. doi:10.3389/fpsy.2019.00138

22. Mithoefer MC, Wagner MT, Mithoefer AT, Jerome L, Doblin R. The safety and efficacy of {+/-}3,4-methylenedioxymethamphetamine-assisted psychotherapy in subjects with chronic, treatment-resistant posttraumatic stress disorder: the first randomized controlled pilot study [published correction appears in J Psychopharmacol. 2011 Jun;25(6):852]. J Psychopharmacol. 2011;25(4):439-452. doi:10.1177/0269881110378371
23. Mithoefer MC, Wagner MT, Mithoefer AT, et al. Durability of improvement in post-traumatic stress disorder symptoms and absence of harmful effects or drug dependency after 3,4-methylenedioxymethamphetamine-assisted psychotherapy: a prospective long-term follow-up study. J Psychopharmacol. 2013;27(1):28-39. doi:10.1177/0269881112456611
24. Ot'alora G M, Grigsby J, Poulter B, et al. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine-assisted psychotherapy for treatment of chronic posttraumatic stress disorder: A randomized phase 2 controlled trial. J Psychopharmacol. 2018;32(12):1295-1307. doi:10.1177/0269881118806297
25. Bahji A, Forsyth A, Groll D, Hawken ER. Efficacy of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-assisted psychotherapy for posttraumatic stress disorder: A systematic review and meta-analysis. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2020;96:109735. doi:10.1016/j.pnpbp.2019.109735
26. Feduccia AA, Jerome L, Yazar-Klosinski B, Emerson A, Mithoefer MC, Doblin R. Breakthrough for Trauma Treatment: Safety and Efficacy of MDMA-Assisted Psychotherapy Compared to Paroxetine and Sertraline. Front Psychiatry. 2019;10:650. Published 2019 Sep 12. doi:10.3389/fpsyt.2019.00650
27. Vizeli P, Liechti ME. Safety pharmacology of acute MDMA administration in healthy subjects. J Psychopharmacol. 2017;31(5):576-588. doi:10.1177/0269881117691569

ESKETAMINA - ZNANY ANESTETYK PRZEŁOMEM W TERAPII DEPRESJI LEKOOPORNEJ

**Kamila Meca¹, Szymon Mikler², Oliwia Pluta¹,
Michał Maćkowski¹, Jolanta Rudel³, Julia Piskor¹**

1. Studenckie Koło Naukowe im. Prof. Zbigniewa Religi przy Katedrze Biofizyki
2. Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Radiologii Lekarskiej i Radiodiagnostyki
3. Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Anatomii Opisowej i Topograficznej

Abstrakt:

Ketamina jest dobrze znanym i często stosowanym lekiem anestezjologicznym. Farmakologicznie ketamina jest zaliczana do antagonistów receptorów NMDA i agonistów receptorów opioidowych. Wywołuje objawy znieczulenia ogólnego z amnezją, słabym działaniem nasennym i wyraźnym działaniem przeciwbólowym. Jej zastosowanie nie ogranicza się jednak do znieczuleń przedoperacyjnych. Aż u 1/3 pacjentów stwierdza się tzw. depresję lekooporną definiowaną jako zaburzenie depresyjne u osób dorosłych, u których nie wystąpiła odpowiedź na co najmniej dwa leki przeciwdepresyjne w obecnym epizodzie depresji o stopniu nasilenia od umiarkowanego do ciężkiego. W 2019 roku Agencja Żywności i Leków dopuściła do stosowania w terapii depresji lekoopornej nowy lek, którego składnikiem aktywnym jest esketamina, będąca enancjomerem wyżej wspomnianej ketaminy. Najnowsze doniesienia informują, iż esketamina może okazać się przełomowym lekiem psychiatrycznym. Jej cechą wyróżniającą wśród pozostałych leków przeciwdepresyjnych jest praktycznie natychmiastowy efekt leczniczy. Badania wykazały, iż stosowanie esketaminy pozwala na uzyskanie długotrwałej remisji depresji wśród pacjentów chorujących na jej lekooporny podtyp. Zastosowanie tej substancji wzbudza jednak wiele wątpliwości i obaw, wśród których wymieniane są m.in. potencjał uzależniający oraz skutki uboczne w postaci zaburzeń funkcji poznawczych. Korzyści związane ze stosowaniem leku przewyższają jednak ewentualne niebezpieczeństwa. Na chwilę obecną esketamina stanowi obiecującą nową formę terapii depresji.

Słowa kluczowe: esketamina, ketamina, lekooporna, depresja

Abstract:

Ketamine is a well-known and frequently used anesthetic drug. Pharmacologically, ketamine is ranked among the NMDA receptor antagonists and opioid agonists. It causes symptoms of general anesthesia with amnesia, a weak hypnotic effect and a pronounced analgesic effect. Its use, however, is not limited to preoperative anesthesia.

As many as 1/3 of patients are diagnosed with so-called treatment-resistant depression defined

as a depressive disorder in adults, who have failed to respond to at least two antidepressants in the current episode of moderate to severe depression. In 2019, the Food and Drug Administration approved a new drug in the therapy of treatment-resistant depression, the active ingredient of which is esketamine, that is an enantiomer of the above-mentioned ketamine. The latest reports inform that esketamine may turn out to be a breakthrough psychiatric drug. Its distinguishing feature among other antidepressants is the practically immediate healing effect. Studies have shown treatment with esketamine results in long-term remission of depression among patients suffering from its drug-resistant subtype. On the other hand, use of this substance raises doubts and concerns such as its addictive potential and side effects including cognitive dysfunction. Benefits related to treatment with this drug, however, exceed possible risk. For that moment, esketamine appears to be a promising new form of depression treatment.

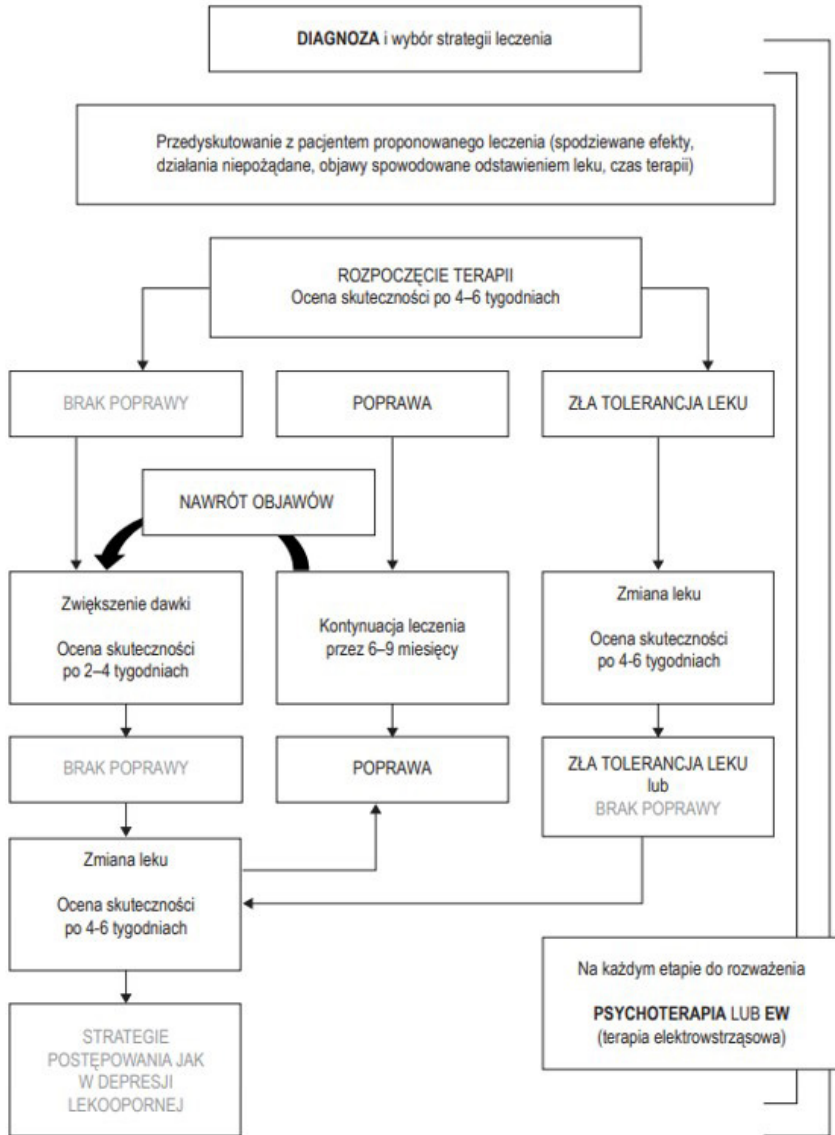
Keywords: esketamine, ketamine, treatment-resistant, depression

1. Wstęp

Depresję oporną na leczenie (*treatment-resistant depression*, TRD) definiujemy jako zaburzenia depresyjne u osób dorosłych, u których nie wystąpiła odpowiedź na co najmniej dwa różne leki przeciwdepresyjne (stosowane prawidłowo) w obecnym epizodzie depresji o stopniu nasilenia od umiarkowanego do ciężkiego. Jedyne 60–70% pacjentów z zaburzeniami depresyjnymi odpowiada na standardowe leczenie przeciwdepresyjne (pierwsza i druga linia leczenia). Niestety aż u 1/3 pacjentów można stwierdzić depresję lekooporną.

Dokładna przyczyna lekooporności nie jest poznana, jednak uważa się, że istnieje kilka czynników, które mogą przyczyniać się do braku powodzenia w farmakoterapii, a są to m. in: nieadekwatność terapii, behawioralne i zewnętrzne czynniki podtrzymujące chorobę, problemy we współpracy z pacjentem oraz niezdiagnozowane schorzenia współistniejące lub niepoprawna diagnoza (np. epizody depresyjne w przebiegu choroby afektywnej dwubiegunowej).

W przypadku niepowodzenia standardowych form terapii (rycina 1) oraz zdiagnozowania TRD, lekarz psychiatra ma do dyspozycji pięć głównych algorytmów postępowania terapeutycznego: 1) optymalizacja dawki i czasu przyjmowania leku przeciwdepresyjnego, 2) zmiana leku, 3) łączenie leków, 4) potencjalizacja (dołączenie drugiego leku, który nie jest lekiem przeciwdepresyjnym) oraz 5) terapię niefarmakologiczną np. terapia elektrowstrząsowa (EW)¹.



Rycina 1. Schemat postępowania w terapii depresji¹

2. Ketamina a esketamina

Ketaminę zsyntetyzował amerykański chemik Calvin Stevens w 1962 roku na Uniwersytecie w Michigan. W 1966 roku została ona opatentowana przez Parke-Davis, a w 1970 roku Agencja Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, FDA) zarejestrowała ją do stosowania w anestezjologii

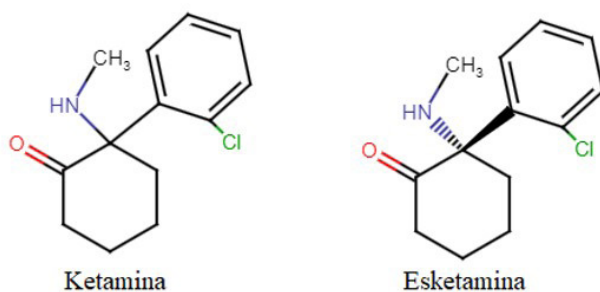
u dzieci, dorosłych i osób w podeszłym wieku. Od tego czasu ketamina służy do uzyskiwania znieczulenia ogólnego na drodze podania dożylnego. Cechą charakterystyczną wszystkich anestetyków infuzyjnych / iniekcyjnych (do których należy) jest natychmiastowe działanie oraz mała sterowalność znieczuleniem. Ich niewątpliwą zaletą jest psychiczne oszczędzanie pacjenta, gdyż w przypadku większości substancji praktycznie natychmiast traci on przytomność. Wykazują one jednak również niezwykle istotną wadę – lek raz podany za pomocą iniekcji pozostaje później poza jakąkolwiek kontrolą anestezjologa. W zakresie właściwości sama ketamina wyróżnia się wśród pozostałych dożylnych anestetyków. Jej podanie prowadzi do tzw. stanu anestezji rozszerzopionej (równoczesne stany pobudzenia i hamowania w obrębie OUN).

Farmakologicznie ketamina jest antagonistą receptorów NMDA. Ma również silne działanie analgetyczne oraz wywołuje amnezję. Wyjątkowy wśród anestetyków jest aktywujący wpływ ketaminy na układ krążenia - ciśnienie krwi i częstotliwość pracy serca zwiększają się ze względu na pobudzenie układu współczulnego. Jako działania niepożądane opisywane są nieprzyjemne marzenia senne lub omamy występujące w fazie wybudzania się. Ketamina wskazana jest do znieczulania ogólnego w przypadku krótkotrwałych i bolesnych zabiegów (np. w przypadku poparzeń), w medycynie ratunkowej oraz do znieczulania ofiar katastrof w przypadku wystąpienia urazów masowych.

S-ketamina (esketamina) jest enancjomerem ketaminy (rycina 2), który blokuje receptory NMDA 3-4 razy silniej. Doprowadziło to do wprowadzenia na rynek preparatu S-(+)-ketaminy, która pozwala na zmniejszenie dawkowania o połowę, a ponadto powoduje znacznie mniej reakcji obudzeniowych. Ten właśnie enancjomer znalazł zastosowanie w leczeniu depresji lekoopornej. Za stosowaniem ketaminy w leczeniu tego schorzenia przemawiają: szybki efekt terapeutyczny i brak konieczności codziennego zażywania. Jej działanie wciąż nie jest do końca wyjaśnione².

Teorie tłumaczące szybkie ustąpienie objawów depresji po podaniu enancjomeru ketaminy dotyczą m.in. jej hamującego wpływu na funkcję receptorów NMDA, indukcji czynnika transkrypcyjnego CREB (*c-AMP response element-binding*), jak również wzmacniania czynności receptorów AMPA. Najbardziej przekonującą propozycją wyjaśniającą przeciwdepresyjny mechanizm działania ketaminy jest tzw. hipoteza aktywacji kinazy mTOR poprzez odhamowanie uwalniania glutaminianu opublikowana po raz pierwszy w 2010 roku przez grupę amerykańskich farmakologów pod przewodnictwem Ronalda Dumana. W kolejnych latach teorie te były rozwijane, a sam Duman razem ze współpracownikami uzupełnił swoje badanie w 2020 r. Ujawniło

ono, że ketamina blokuje receptory NMDA znajdujące się na interneuronach GABA u szczurów. Ponadto fundamentem przeciwdepresyjnego działania ketaminy jest blokada interneuronalnych receptorów NMDA i następujące po niej wzmożone uwalnianie glutaminianu przez komórki piramidowe, co inicjuje dalsze molekularne i komórkowe przekształcenia, których skutkiem jest właśnie lecznicze funkcjonowanie danego leku³.



Rycina 2. Wzory strukturalne ketaminy i esketaminy [opracowanie własne]

W ostatnich latach ocena skuteczności leczenia TRD ketaminą i jej enan-cjomerem stała się wyzwaniem, jakie podjęło wielu naukowców. W dalszej części pracy podsumuję wnioski wyciągnięte przez wybrane zespoły badawcze.

Leczenie podtrzymujące ketaminą pozwala na uzyskanie długotrwałej remisji w depresji⁴

W 2010r. w czasopiśmie “Psychiatria po Dyplomie” opublikowano opis przypadku z 2008 roku. Dotyczył on 46-letniej, hospitalizowanej kobiety cierpiącej na depresję, u której trwałej remisji choroby nie uzyskano pomimo zastosowania 24 leków psychotropowych i wykonania aż 273 zabiegów EW. Podczas opisywanej hospitalizacji do znieczulenia w czasie EW zastosowano ketaminę w dawce 2 mg/kg podaną w ciągu 60s. Nie obserwowano wtedy istotnej zmiany w zakresie objawów depresji. Ze względu na opublikowane w tamtym czasie dane dotyczące szybkiego działania przeciwdepresyjnego pojedynczej dawki ketaminy u pacjentów z MDD, zaproponowano pacjentce podjęcie próby tej właśnie terapii. Już pierwsza iniekcja z ketaminy spowodowała wyraźne zmniejszenie nasilenia depresji – liczba punktów w skali depresji Becka (Beck Depression Inventory, BDI) zmniejszyła się z 22 do 6. Trzy kolejne iniekcje, podawane co drugi dzień przez kolejnych 5 dni, pozwoliły na uzyskanie remisji, która trwała 17 dni od chwili zakończenia tego etapu leczenia. W ciągu następnych 16 tygodni wykonano trzy kolejne serie po sześć iniekcji z ketaminy każda. Zastrzyki wykonywano co drugi dzień roboczy.

Po każdej serii występowała remisja. Remisje trwały odpowiednio 16, 28 i 16 dni, po czym następował nawrót objawów. Po trzech cyklach remisja/nawrót, zanim wystąpił nawrót po czwartej serii zastrzyków, rozpoczęto leczenie podtrzymujące polegające na podawaniu ketaminy w dawce 0,5 mg/kg idealnej masy ciała (*Ideal Body Weight*, IBW) odstępach trzytygodniowych. Leczenie podtrzymujące pozwoliło na uzyskanie remisji trwającej ponad 15 miesięcy. Przez cały ten czas nie stosowano żadnego innego leku, nie zaszła też potrzeba dodatkowej farmakoterapii. Podczas iniekcji kontrolowano parametry życiowe pacjentki. Ani w czasie iniekcji, ani po ich zakończeniu nie zaobserwowano objawów psychotycznych lub dysocjacyjnych. Nie stwierdzono także żadnych innych działań niepożądanych. Podtrzymujące leczenie ketaminą pozwoliło na uzyskanie długotrwałej remisji depresji. U tej pacjentki leczenie podtrzymujące okazało się ponadto skuteczniejsze niż wcześniej stosowane serie zastrzyków⁴.

W 2014r. opublikowano opis pięciu przypadków pacjentów w wieku od 26 do 60 lat, u których zdiagnozowano depresję (w tym u jednego z pacjentów w przebiegu ChAD) o długości epizodu od 6 do ponad 48 miesięcy. Każdego z pacjentów leczono wieloma konwencjonalnymi lekami przeciwdepresyjnymi oraz u czterech z nich zastosowano EW. Żadna z metod nie doprowadziła do trwałej remisji choroby. Zdecydowano o podjęciu próby terapii a pomocą ketaminy. Wlewy z ketaminy (0,5 mg/kg mc., i.v., 40 minut) wykonywano w obecności anestezjologa, monitorując zapis EKG i podstawowe parametry życiowe. Efekty terapii były oceniane z zastosowaniem skal psychometrycznych, w tym skal BDI oraz Skali Oceny Depresji Montgomery-Asberg (*Montgomery-Asperg Depression Rating Scale*, MADRS) na 2 godziny przed podaniem, po 2 godzinach po podaniu oraz po 24 i 48 godzinach. Możliwe działania niepożądane monitorowano przy użyciu *Clinician-Administered Dissociative States Scale* na 2 godziny przed podaniem, w trakcie podawania ketaminy oraz do 20 minut po podaniu. Wśród skutków ubocznych, które towarzyszyły pacjentom w trakcie terapii wymieniono: objawy dysocjacyjne, łagodne zaburzenia myślenia, uczucie derealizacji oraz parestezje. Obserwację stanu klinicznego prowadzono przez 7 dni po podaniu ketaminy. Stwierdzono krótkotrwałą poprawę stanu psychicznego każdego z pacjentów, jednakże u żadnego nie uzyskano długofalowej remisji. Prezentowane wyniki nie przemawiają więc za stosowaniem ketaminy w monoterapii w grupie pacjentów z depresją oporną na leczenie biologiczne. Jedyne z możliwych czynników, które potencjalnie przyczyniły się do niezadowolającego wyniku próby są mała liczebność i heterogenność grupy badanej⁵.

W 2021 roku nad tematem skuteczności esketaminy ponownie pochyliła się grupa naukowców. W swojej pracy zawarli oni 82 opublikowane badania, z czego 24 dotyczyły terapii depresji niezwiązanej z zaburzeniem afektywnym dwubiegunowym (ChAD), a 17 opisywało również epizody depresji w przebiegu choroby afektywnej dwubiegunowej. Przegląd takiej ilości doniesień umożliwił im wysnucie następujących wniosków⁶. Badania dowiodły szybkiego działania przeciwdepresyjnego w leczeniu pacjentów z MDD - metaanalizy, które skupiały się głównie na pojedynczych wlewach dożylnych, wykazały obniżenie nasilenia lub remisję depresji u osób, które przyjęły ketaminę w porównaniu z grupą placebo. Efekty utrzymywały się do 2 tygodni. W grupach badawczych, którym zostały podane kolejne dawki ketaminy (maksymalnie 6), obserwowano dłuższy efekt przeciwdepresyjny⁶⁻²⁸. Niektóre z opracowań miały na celu poznać stopień nasilenia efektu przeciwdepresyjnego w zależności od drogi podania ketaminy - większość z nich nie udowodniła różnic. Jedno z badań wykazuje jednak, że donosowe podanie ketaminy skutkuje największą skutecznością w terapii depresji w porównaniu z grupą placebo. Inne z kolei obrazuje, iż podanie donosowe pozwala na uzyskanie wyjątkowo szybkiej reakcji na leczenie (24h) w porównaniu do wlewów dożylnych (2-6 dni)^{7,11,12,19,21,27,28,29,30,31}. Ketamina wykazuje skuteczność zarówno w przypadku TRD, jak i w leczeniu pacjentów, którzy odpowiadali na poprzednie formy terapii^{8,20}. W przypadku epizodu depresyjnego choroby afektywnej dwubiegunowej wykazano wystąpienie szybkiego efektu terapeutycznego ketaminy, jednak w żadnym z badań nie utrzymywał się on 2 tygodnie, co było osiągalne w przypadku pacjentów z depresją niezwiązaną z ChAD. Głównym problemem, który towarzyszy rozważaniom nad stosowaniem ketaminy w przebiegu choroby afektywnej dwubiegunowej, jest ryzyko sprowokowania epizodu manii (w metaanalizach zaobserwowano wystąpienie objawów manii, ale ustępowały one po 1 do 2 h, a w opisach przypadków wykazano, że podanie ketaminy drogą inną niż dożylna jest bezpieczne u pacjentów z chorobą afektywną dwubiegunową)^{6,8,10,11,12,18,25,32-37}. Niektóre z opracowań poruszały niezwykle istotny aspekt, jakim jest skuteczność terapii ketaminą w przypadku występowania myśli samobójczych wśród pacjentów. W tym przypadku wyniki również są obiecujące. Wszystkie opracowania wykazały, że leczenie ketaminą wiązało się z dużym lub umiarkowanym spadkiem nasilenia myśli samobójczych, a efekty zauważalne były już po 4 godzinach od podania leku, a efekt utrzymywał się średnio przez 3 dni do tygodnia. U aż 85% uczestników spośród grupy, która osiągnęła remisję w ciągu 24 godzin, efekt utrzymywał się do tygodnia. Ketamina okazała się skuteczna nawet wśród grupy osób,

które zostały przyjęte do szpitala psychiatrycznego z powodu próby samobójczej lub chronicznych, nasilonych myśli samobójczych³⁸⁻⁴³. Jednoczesne działanie znieczulające i przeciwdepresyjne ketaminy sprawia, iż jest to intuicyjny wybór do stosowania w trakcie terapii EW, z nadzieją, że może wywierać działanie synergiczne. Zidentyfikowano 19 badań pacjentów z MDD, ChAD lub TRD, w których ketaminę stosowano jako środek znieczulający podczas EW (dożylnie, w dawce 0,5-2 mg/kg). W 8 badaniach wykazano, że ketamina skuteczniej zmniejszała objawy depresji w porównaniu do anestetyków takich jak propofol, metoheksital lub tiopental. Najbardziej spójne dowody określające potencjalną przewagę ketaminy nad innymi lekami znieczulającymi w trakcie terapii EW dotyczą leczenia TRD: trzy badania z podwójnie ślełą próbą, jedno badanie częściowo randomizowane, jedno badanie otwarte i jeden przegląd retrospektywny wykazały pozytywne wyniki dotyczące wpływu ketaminy na skuteczność EW w leczeniu depresji lekoopornej, podczas gdy trzy randomizowane kontrolne badania kliniczne nie wykazały różnic między ketaminą a placebo. Wyniki badań sugerują, iż w porównaniu z innymi anestetykami ketamina wiązała się z wcześniejszą i wyraźniejszą poprawą stanu psychicznego pacjentów, wyższym odsetkiem remisji, mniejszą liczbą wymaganych sesji EW i mniejszymi zaburzeniami funkcji poznawczych. Wprowadzenie pacjenta w stan anestezji ketaminą przy okazji zastosowania EW w terapii MDD oraz ChAD nie wpływa już tak znacząco na skuteczność leczenia w porównaniu z innymi środkami znieczulającymi⁴⁴⁻⁶².

3. Obawy związane z terapią przy użyciu esketaminy⁶⁴

Głównym problemem bezpieczeństwa esketaminy jest potencjalne ryzyko jej nadużywania, indukcja zaburzeń neurokognitywnych lub upośledzenie pamięci długo i krótkotrwałej (jak to występuje w przypadku ketaminy). Wśród efektów ubocznych działania leku, które mogą sprzyjać jego nadużywaniu wyróżniamy natychmiastowe uczucie ostrej dysocjacji oraz uspokojenia. Monitorowanie stanu pacjenta jest konieczne po każdej dawce esketaminy ze względu na duże ryzyko sedacji i dysocjacji. Nie ma również swego rodzaju antidotum na esketaminę.

Badania wykazują, iż esketamina podawana donosowo wydaje się być bezpieczna i dobrze tolerowana w krótkim okresie terapii. Warto zaznaczyć, iż dane stwierdzenie dotyczy ściśle tego właśnie enancjomeru. Ketamina powoduje większe upośledzenie funkcji poznawczych oraz większy spadek zdolności koncentracji i pamięci pierwotnej niż esketamina. Częste i długotrwałe

stosowanie ketaminy prowadzi również do wrzodziejącego zapalenia pęcherza i uszkodzenia wątroby, czego nie zaobserwowano w przypadku jej enancjomeru.

4. Ketamina w postaci donosowej – lek Spravato

W 2019 roku Agencja Żywności i Leków dopuściła do stosowanie w terapii TRD esketaminę (esketaminy chlorowoderek) w postaci donosowej - lek Spravato. Obecnie ta forma terapii jest wskazana u osób dorosłych z zaburzeniami depresyjnymi, które nie zareagowały na co najmniej dwie różne terapie lekami przeciwdepresyjnymi w obecnie trwającym epizodzie choroby. W przebiegu dużego zaburzenia depresyjnego opornego na leczenie wskazane jest stosowanie Spravato razem z selektywnym inhibitorem wychwyty zwrotnego serotoniny lub inhibitorem wychwyty zwrotnego serotoniny i noradrenaliny. W przypadku epizodu depresji o nasileniu umiarkowanym lub ciężkim zalecane jest stosowanie esketaminy w skojarzeniu z doustną terapią przeciwdepresyjną. W przypadku intensywnego, krótkotrwałego leczenia nagłych stanów w psychiatrii, spowodowanych występowaniem dużego zaburzenia depresyjnego, terapia przy pomocy esketaminy powinna być częścią kompleksowego postępowania klinicznego. Podanie leku Spravato może odbywać się tylko pod kontrolą pracownika ochrony zdrowia w placówkach opieki zdrowotnej. Przed zakwalifikowaniem do leczenia należy dokonać pomiaru ciśnienia krwi pacjenta, gdyż esketamina może spowodować jego krótkotrwały wzrost. Nie należy stosować produktu leczniczego Spravato, jeśli zwiększenie ciśnienia krwi lub ciśnienia śródczaszkowego stanowi poważne zagrożenie dla chorego. Jeśli pacjent choruje na istotne klinicznie lub niestabilne choroby układu krążenia lub układu oddechowego, konieczne jest zachowanie dodatkowych środków ostrożności przy okazji inhalacji. Konieczne jest podanie pacjenta obserwacji bezpośrednio po każdym podaniu leku (przez około 40 minut). W zależności od decyzji lekarza prowadzącego, jednorazowo stosuje się od 1 do 3 dozowników z aerozolem (jeden zawiera 28 mg substancji czynnej). Dawkowanie leku jest ściśle związane z wiekiem pacjenta. Zalecana częstotliwość inhalacji jest następująca:

Faza indukcji

- tygodnie 1-4: 2 razy w tygodniu

Faza podtrzymująca

- tygodnie 5-8: 1 raz w tygodniu
- od tygodnia 9: co 2 tygodnie lub raz w tygodniu

Wśród bardzo częstych działań niepożądanych występujących po podaniu leku wymieniane są: uczucie oderwania od siebie, swoich myśli, uczuć i rzeczy wokół siebie, zawroty głowy, bóle głowy, zmiana odczuwania smaku, uczucie senności, zmniejszone czucie lub wrażliwość, uczucie wirowania, wymioty, nudności^{64,65}.

5. Podsumowanie

Dotychczasowe formy farmakoterapii zaburzeń depresyjnych nie są doskonałe – aż 1/3 pacjentów nie reaguje na konwencjonalną terapię. W XXI wieku, kiedy to zaburzenia psychiczne występują coraz częściej, a sama w sobie depresja staje się chorobą cywilizacyjną, zapotrzebowanie na nowatorskie metody leczenia wzrasta.

Esketamina niewątpliwie stanowi obiecującą nową formę terapii depresji, ponadto można uznać ją za przełom w leczeniu depresji lekoopornej. Zdecydowaną przewagą tego leku w porównaniu do zarejestrowanych dotychczas form terapii jest wyjątkowo szybki czas działania, co jest bezdyskusyjnie korzystne w przypadku tak wyniszczających schorzeń jak depresja. W niedalekiej przyszłości, esketamina mogłaby być stosowana w ciężkich, nagłych stanach, gdyż pozwoliłaby na ustabilizowanie pacjenta bez konieczności długotrwałej terapii lub wielotygodniowego pobytu w szpitalu psychiatrycznym. Bardzo korzystnym aspektem jest brak konieczności codziennego stosowania leku, co przemawiałoby za jego wyborem dla pacjentów, którzy zgłaszają trudności z regularnym przyjmowaniem tabletek. Ponadto badania przemawiają za wyższością stosowania ketaminy w porównaniu do innych anestetyków w trakcie terapii EW, gdyż może działać synergistycznie do tego rodzaju terapii.

Stosowanie esketaminy w terapii depresji budzi jednak pewne obawy. Jej natychmiastowe działanie dysocjacyjne i uspokajające sprzyja nadużywaniu substancji, a skutki uboczne w postaci zaburzeń funkcji poznawczych zobowiązują medyka do krótkotrwałej obserwacji pacjenta bezpośrednio po podaniu leku. Nie są również znane skutki długotrwałej terapii esketaminą.

Na chwilę obecną badania wykazują, iż korzyści związane ze stosowaniem esketaminy przewyższają jej ewentualne działania uboczne. Konieczne są jednak dalsze badania nad działaniem danego leku aby ostatecznie sformułować pewną opinię na jego temat. Na chwilę obecną wyniki badań oraz prób terapii esketaminą są jednak obiecujące.

Referencje

1. Gałęcki, P., & Bliźniewska-Kowalska, K. (2019). Depresja oporna na leczenie–zalecenia Konsultanta Krajowego w dziedzinie psychiatrii. *Psychiatria Polska*, (158).
2. E. Mutschler, G. Gesslinger, H.K. Kroemer, P. Ruth, M. Schäfer-Korting “Mutschler Farmakologia I Toksykologia. Podręcznik”
3. Gosek, P., Chojnacka, M., Bieńkowski, P., & Świącicki, Ł. (2012). Zastosowanie antagonisty receptorów NMDA (N-metylo-D-asparaginianu)–ketaminy w leczeniu depresji lekoopornej. *Psychiatr. Pol*, 46(2), 283-294.
4. Messer, M. M., & Haller, I. V. Leczenie podtrzymujące ketaminą pozwala na uzyskanie długotrwałej remisji w depresji.
5. Gosek, P., Chojnacka, M., Bieńkowski, P., & Świącicki, Ł. (2014). Skuteczność zastosowania ketaminy u pacjentów z depresją oporną na leczenie elektrowstrząsowe lub rTMS. *Psychiatr. Pol*, 48(1), 49-58.
6. Walsh, Z., Mollaahmetoglu, O. M., Rootman, J., Golsof, S., Keeler, J., Marsh, B., ... & Morgan, C. J. (2022). Ketamine for the treatment of mental health and substance use disorders: comprehensive systematic review. *BJPsych open*, 8(1).
7. Aan Het Rot, M., Zarate Jr, C. A., Charney, D. S., & Mathew, S. J. (2012). Ketamine for depression: where do we go from here?. *Biological psychiatry*, 72(7), 537-547.
8. Serafini, G., H Howland, R., Rovedi, F., Girardi, P., & Amore, M. (2014). The role of ketamine in treatment-resistant depression: a systematic review. *Current neuropharmacology*, 12(5), 444-461.
9. Fond, G., Loundou, A., Rabu, C., Macgregor, A., Lançon, C., Brittner, M., ... & Boyer, L. (2014). Ketamine administration in depressive disorders: a systematic review and meta-analysis. *Psychopharmacology*, 231(18), 3663-3676.
10. WW Hasselmann, H. (2014). Ketamine as antidepressant? Current state and future perspectives. *Current neuropharmacology*, 12(1), 57-70.

11. Kraus, C., Rabl, U., Vanicek, T., Carlberg, L., Popovic, A., Spies, M., ... & Kasper, S. (2017). Administration of ketamine for unipolar and bipolar depression. *International journal of psychiatry in clinical practice*, 21(1), 2-12.
12. Lee, E. E., Della Selva, M. P., Liu, A., & Himelhoch, S. (2015). Ketamine as a novel treatment for major depressive disorder and bipolar depression: a systematic review and quantitative meta-analysis. *General hospital psychiatry*, 37(2), 178-184.
13. Romeo, B., Choucha, W., Fossati, P., & Rotge, J. Y. (2015). Meta-analysis of short-and mid-term efficacy of ketamine in unipolar and bipolar depression. *Psychiatry research*, 230(2), 682-688.
14. Katalinic, N., Lai, R., Somogyi, A., Mitchell, P. B., Glue, P., & Loo, C. K. (2013). Ketamine as a new treatment for depression: a review of its efficacy and adverse effects. *Australian & New Zealand Journal of Psychiatry*, 47(8), 710-727.
15. Caddy, C., Giaroli, G., White, T. P., Shergill, S. S., & Tracy, D. K. (2014). Ketamine as the prototype glutamatergic antidepressant: pharmacodynamic actions, and a systematic review and meta-analysis of efficacy. *Therapeutic advances in psychopharmacology*, 4(2), 75-99.
16. Caddy, C., Amit, B. H., McCloud, T. L., Rendell, J. M., Furukawa, T. A., McShane, R., ... & Cipriani, A. (2015). Ketamine and other glutamate receptor modulators for depression in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (9).
17. Covvey, J. R., Crawford, A. N., & Lowe, D. K. (2012). Intravenous ketamine for treatment-resistant major depressive disorder. *Annals of Pharmacotherapy*, 46(1), 117-123.
18. Coyle, C. M., & Laws, K. R. (2015). The use of ketamine as an antidepressant: a systematic review and meta-analysis. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*, 30(3), 152-163.
19. Garay, R. P., Zarate Jr, C. A., Charpeaud, T., Citrome, L., Correll, C. U., Hameg, A., & Llorca, P. M. (2017). Investigational drugs in recent clinical trials for treatment-resistant depression. *Expert review of neurotherapeutics*, 17(6), 593-609.

20. Han, Y., Chen, J., Zou, D., Zheng, P., Li, Q., Wang, H., ... & Xie, P. (2016). Efficacy of ketamine in the rapid treatment of major depressive disorder: a meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled studies. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 12, 2859.
21. Jankauskas, V., Necyk, C., Chue, J., & Chue, P. (2018). A review of ketamine's role in ECT and non-ECT settings. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 14, 1437.
22. Kishimoto, T., Chawla, J. M., Hagi, K., Zarate, C. A., Kane, J. M., Bauer, M., & Correll, C. (2016). Single-dose infusion ketamine and non-ketamine N-methyl-d-aspartate receptor antagonists for unipolar and bipolar depression: a meta-analysis of efficacy, safety and time trajectories. *Psychological medicine*, 46(7), 1459-1472.
23. Kleeblatt, J., Betzler, F., Kilarski, L. L., Bschor, T., & Koehler, S. (2017). Efficacy of off-label augmentation in unipolar depression: a systematic review of the evidence. *European Neuropsychopharmacology*, 27(5), 423-441.
24. Kolar, D. (2018). Addictive potential of novel treatments for refractory depression and anxiety. *Neuropsychiatric disease and treatment*.
25. McGirr, A., Berlim, M. T., Bond, D. J., Fleck, M. P., Yatham, L. N., & Lam, R. W. (2015). A systematic review and meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled trials of ketamine in the rapid treatment of major depressive episodes. *Psychological medicine*, 45(4), 693-704.
26. Papadimitropoulou, K., Vossen, C., Karabis, A., Donatti, C., & Kubitz, N. (2017). Comparative efficacy and tolerability of pharmacological and somatic interventions in adult patients with treatment-resistant depression: a systematic review and network meta-analysis. *Current medical research and opinion*, 33(4), 701-711.
27. Zheng, W., Cai, D. B., Xiang, Y. Q., Jiang, W. L., Sim, K., Ungvari, G. S., ... & Xiang, Y. T. (2020). Adjunctive intranasal esketamine for major depressive disorder: a systematic review of randomized double-blind controlled-placebo studies. *Journal of affective disorders*, 265, 63-70.

28. Papakostas, G. I., Salloum, N. C., Hock, R. S., Jha, M. K., Murrough, J. W., Mathew, S. J., ... & Fava, M. (2020). Efficacy of esketamine augmentation in major depressive disorder: a meta-analysis. *The Journal of clinical psychiatry*, 81(4), 6603.
29. Chilukuri, H., Reddy, N. P., Pathapati, R. M., Manu, A. N., Jollu, S., & Shaik, A. B. (2014). Acute antidepressant effects of intramuscular versus intravenous ketamine. *Indian journal of psychological medicine*, 36(1), 71-76.
30. Rosenblat, J. D., Carvalho, A. F., Li, M., Lee, Y., Subramanieapillai, M., & McIntyre, R. S. (2019). Oral ketamine for depression: a systematic review. *The Journal of clinical psychiatry*, 80(3), 13514.
31. McIntyre, R. S., Carvalho, I. P., Lui, L. M., Majeed, A., Masand, P. S., Gill, H., ... & Rosenblat, J. D. (2020). The effect of intravenous, intranasal, and oral ketamine in mood disorders: a meta-analysis. *Journal of Affective Disorders*, 276, 576-584.
32. Alberich, S., Martínez-Cengotitabengoa, M., López, P., Zorrilla, I., Núñez, N., Vieta, E., & González-Pinto, A. (2017). Efficacy and safety of ketamine in bipolar depression: A systematic review. *Revista de Psiquiatría y Salud Mental (English Edition)*, 10(2), 104-112.
33. McCloud, T. L., Caddy, C., Jochim, J., Rendell, J. M., Diamond, P. R., Shuttleworth, C., ... & Cipriani, A. (2015). Ketamine and other glutamate receptor modulators for depression in bipolar disorder in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (9).
34. Fornaro, M., Carvalho, A. F., Fusco, A., Anastasia, A., Solmi, M., Berk, M., ... & de Bartolomeis, A. (2020). The concept and management of acute episodes of treatment-resistant bipolar disorder: a systematic review and exploratory meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of affective disorders*, 276, 970-983.
35. Diazgranados, N., Ibrahim, L., Brutsche, N. E., Newberg, A., Kronstein, P., Khalife, S., ... & Zarate, C. A. (2010). A randomized add-on trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant bipolar depression. *Archives of general psychiatry*, 67(8), 793-802.
36. Zarate Jr, C. A., Brutsche, N. E., Ibrahim, L., Franco-Chaves, J., Diazgranados, N., Cravchik, A., ... & Luckenbaugh, D. A. (2012).

- Replication of ketamine's antidepressant efficacy in bipolar depression: a randomized controlled add-on trial. *Biological psychiatry*, 71(11), 939-946.
37. Dore, J., Turnipseed, B., Dwyer, S., Turnipseed, A., Andries, J., Ascani, G., ... & Wolfson, P. (2019). Ketamine assisted psychotherapy (KAP): patient demographics, clinical data and outcomes in three large practices administering ketamine with psychotherapy. *Journal of psychoactive drugs*, 51(2), 189-198.
38. Reinstatler, L., & Youssef, N. A. (2015). Ketamine as a potential treatment for suicidal ideation: a systematic review of the literature. *Drugs in R&d*, 15(1), 37-43.
39. Bartoli, F., Riboldi, I., Crocamo, C., Di Brita, C., Clerici, M., & Carra, G. (2017). Ketamine as a rapid-acting agent for suicidal ideation: a meta-analysis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 77, 232-236.
40. Wilkinson, S. T., Ballard, E. D., Bloch, M. H., Mathew, S. J., Murrough, J. W., Feder, A., ... & Sanacora, G. (2018). The effect of a single dose of intravenous ketamine on suicidal ideation: a systematic review and individual participant data meta-analysis. *American journal of psychiatry*, 175(2), 150-158.
41. D'Anci, K. E., Uhl, S., Giradi, G., & Martin, C. (2019). Treatments for the prevention and management of suicide: a systematic review. *Annals of internal medicine*, 171(5), 334-342.
42. Dadiomov, D., & Lee, K. (2019). The effects of ketamine on suicidality across various formulations and study settings. *Mental Health Clinician*, 9(1), 48-60.
43. Witt, K., Potts, J., Hubers, A., Grunebaum, M. F., Murrough, J. W., Loo, C., ... & Hawton, K. (2020). Ketamine for suicidal ideation in adults with psychiatric disorders: a systematic review and meta-analysis of treatment trials. *Australian & New Zealand Journal of Psychiatry*, 54(1), 29-45.
44. Gamble, J. J., Bi, H., Bowen, R., Weisgerber, G., Sanjanwala, R., Prasad, R., & Balbuena, L. (2018). Ketamine-based anesthesia improves electroconvulsive therapy outcomes: a randomized-controlled

- study. *Canadian Journal of Anesthesia/Journal canadien d'anesthésie*, 65(6), 636-646.
45. Kranaster, L., Kammerer-Ciernioch, J., Hoyer, C., & Sartorius, A. (2011). Clinically favourable effects of ketamine as an anaesthetic for electroconvulsive therapy: a retrospective study. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*, 261(8), 575-582.
46. Okamoto, N., Nakai, T., Sakamoto, K., Nagafusa, Y., Higuchi, T., & Nishikawa, T. (2010). Rapid antidepressant effect of ketamine anesthesia during electroconvulsive therapy of treatment-resistant depression: comparing ketamine and propofol anesthesia. *The journal of ECT*, 26(3), 223-227.
47. Wang, X., Chen, Y., Zhou, X., Liu, F., Zhang, T., & Zhang, C. (2012). Effects of propofol and ketamine as combined anesthesia for electroconvulsive therapy in patients with depressive disorder. *The journal of ECT*, 28(2), 128-132.
48. Anderson, I. M., Blamire, A., Branton, T., Clark, R., Downey, D., Dunn, G., ... & Williamson, A. (2017). Ketamine augmentation of electroconvulsive therapy to improve neuropsychological and clinical outcomes in depression (Ketamine-ECT): a multicentre, double-blind, randomised, parallel-group, superiority trial. *The Lancet Psychiatry*, 4(5), 365-377.
49. Loo, C. K., Katalinic, N., Garfield, J. B., Sainsbury, K., Hadzi-Pavlovic, D., & Mac-Pherson, R. (2012). Neuropsychological and mood effects of ketamine in electroconvulsive therapy: a randomised controlled trial. *Journal of affective disorders*, 142(1-3), 233-240.
50. Alizadeh, N. S., Maroufi, A., Nasser, K., Najafabadi, S. H. S., Taghiabad, A. M., Gharibi, F., & Esfandiari, G. R. (2015). Antidepressant effect of combined ketamine and electroconvulsive therapy on patients with major depressive disorder: a randomized trial. *Iranian journal of psychiatry and behavioral sciences*, 9(3).
51. Rybakowski, J. K., Bodnar, A., Krzywotulski, M., Chlopocka-Wozniak, M., Michalak, M., Rosada-Kurasinska, J., & Bartkowska-Sniatkowska, A. (2016). Ketamine anesthesia, efficacy of electroconvulsive therapy, and cognitive functions in treatment-resistant depression. *The Journal of ECT*, 32(3), 164-168.

52. Yoosefi, A., Sepehri, A. S., Kargar, M., Akhondzadeh, S., Sadeghi, M., Rafei, A., ... & Ghaeli, P. (2014). Comparing effects of ketamine and thiopental administration during electroconvulsive therapy in patients with major depressive disorder: a randomized, double-blind study. *The journal of ECT*, 30(1), 15-21.
53. Zhong, X., He, H., Zhang, C., Wang, Z., Jiang, M., Li, Q., ... & Huang, X. (2016). Mood and neuropsychological effects of different doses of ketamine in electroconvulsive therapy for treatment-resistant depression. *Journal of affective disorders*, 201, 124-130.
54. Carspecken, C. W., Borisovskaya, A., Lan, S. T., Heller, K., Buchholz, J., Ruskin, D., & Rozet, I. (2018). Ketamine anesthesia does not improve depression scores in electroconvulsive therapy: a randomized clinical trial. *Journal of neurosurgical anesthesiology*, 30(4), 305-313.
55. Fernie, G., Currie, J., Perrin, J. S., Stewart, C. A., Anderson, V., Bennett, D. M., ... & Reid, I. C. (2017). Ketamine as the anesthetic for electroconvulsive therapy: the KANECT randomised controlled trial. *The British Journal of Psychiatry*, 210(6), 422-428.
56. Rasmussen, K. G., Kung, S., Lapid, M. I., Oesterle, T. S., Geske, J. R., Nuttall, G. A., ... & Abenstein, J. P. (2014). A randomized comparison of ketamine versus methohexital anesthesia in electroconvulsive therapy. *Psychiatry research*, 215(2), 362-365.
57. Salehi, B., Mohammadbeigi, A., Kamali, A. R., Taheri-Nejad, M. R., & Moshiri, I. (2015). Impact comparison of ketamine and sodium thiopental on anesthesia during electroconvulsive therapy in major depression patients with drug-resistant; a double-blind randomized clinical trial. *Annals of Cardiac Anaesthesia*, 18(4), 486.
58. Zhang, M., Rosenheck, R., Lin, X., Li, Q., Zhou, Y., Xiao, Y., ... & He, H. (2018). A randomized clinical trial of adjunctive ketamine anesthesia in electro-convulsive therapy for depression. *Journal of affective disorders*, 227, 372-378.
59. Altinay, M., Karne, H., & Anand, A. (2019). Administration of sub-anesthetic dose of ketamine and electroconvulsive treatment on alternate week days in patients with treatment resistant depression: a double blind placebo controlled trial. *Psychopharmacology bulletin*, 49(1), 8.

60. Dong, J., Min, S., Qiu, H., Chen, Q., & Ren, L. (2019). Intermittent administration of low dose ketamine can shorten the course of electroconvulsive therapy for depression and reduce complications: a randomized controlled trial. *Psychiatry Research*, 281, 112573.
61. Ray-Griffith, S. L., Eads, L. A., Han, X., Golden, K., & Stowe, Z. N. (2017). A randomized pilot study comparing ketamine and methohexital anesthesia for electroconvulsive therapy in patients with depression. *The journal of ECT*, 33(4), 268.
62. Finnegan, M., Galligan, T., Ryan, K., Shanahan, E., Harkin, A., Daly, L., & McLoughlin, D. M. (2019). Ketamine versus midazolam for depression relapse prevention following successful electroconvulsive therapy: a randomized controlled pilot trial. *The Journal of ECT*, 35(2), 115-121.
63. Cichocka, A., Rozenek, E. B., Michałowska, K., Szewczak, B., & Waszkiewicz, N. (2021). Znaczenie esketaminy w leczeniu depresji lekoopornej. Czy okaże się lekiem przełomowym?. *Psychiatria*, 18(4), 289-298.
64. Rusinek, A., Rudziński, G., & Masiak, J. (2021). New drugs in psychiatry-cariprazine, lurasidone, esketamine. *Curr Probl Psychiatry*, 22(2), 2.
65. *Spravato* - ulotka dla pacjenta
66. *Spravato* – charakterystyka produktu leczniczego

“Terapie XXI w.” to zbiór rozdziałów poświęconych nowatorskim technikom leczenia chorób cywilizacyjnych, które odmieniają nierówne szanse pacjentów na pokonanie choroby.

Monografia zawiera 17 rozdziałów naukowych poświęconych szerokiej tematyce nowoczesnych metod terapeutycznych. W pierwszej części mają Państwo możliwość zapoznania się z nowymi technikami w zakresie metod mających stanowić alternatywę lub uzupełnienie dotychczasowych terapii – fizjoterapię, laseroterapię, przeszczepy mikrobioty czy zastąpienie chirurgii leczeniem farmakologicznym. W dalszej części książki poświęcamy chwilę uwagi tematyce postępu w naukach zabiegowych, by następnie przejść do najważniejszego tematu jakim są nowatorskie terapie farmakologiczne – immunoterapia, leki biologiczne i terapie komórkowe. Monografia kończy się rozdziałami o równie ważnym znaczeniu dla współczesnej medycyny, czyli nowymi zastosowaniami znanych wcześniej leków.