

INNOWACJE W MEDYCYNIE

PRZEGLĄD WYBRANYCH TECHNOLOGII XXI W.

TOM V

Redakcja
Jakub Kufel Piotr Lewandowski

ARCHAEGRAPH
Wydawnictwo Naukowe

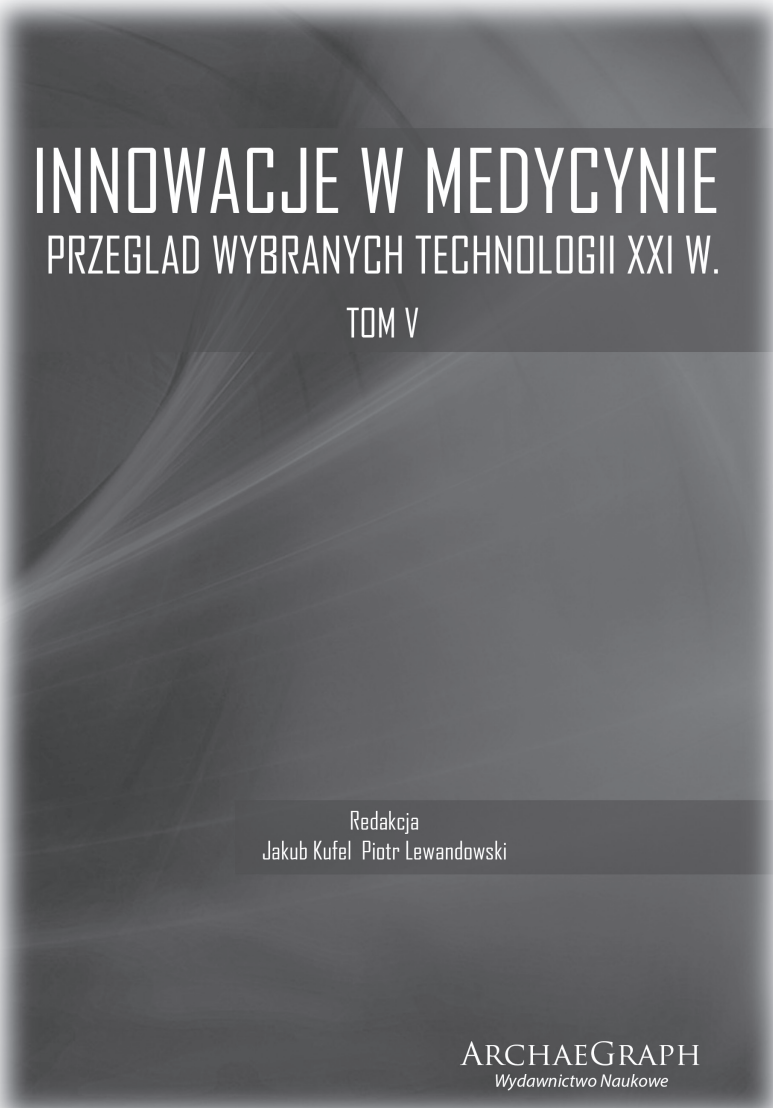
INNOWACJE W MEDYCYNIE

- PRZEGLĄD WYBRANYCH TECHNOLOGII XXI W.

TOM 5

REDAKCJA

JAKUB KUFEL
PIOTR LEWANDOWSKI



INNOWACJE W MEDYCYNIE

PRZEGLĄD WYBRANYCH TECHNOLOGII XXI W.

TOM V

Redakcja
Jakub Kufel Piotr Lewandowski

ARCHAEGRAPH
Wydawnictwo Naukowe

REDAKCJA

JAKUB KUFEL, PIOTR LEWANDOWSKI

OPIEKA NAUKOWA

DR HAB. N. MED. ZBIGNIEW NAWRAT. PROF. IPS

RECENZENCI

DR N. MED. MAŁGORZATA MITURA-LESIUK

DR INŻ. KRZYSZTOF PIETRYGA

LEK. MARIANNA ŁOSKOT

LEK. ANNA GRAŻYŃSKA

LEK. MATEUSZ OŻÓG

LEK. MICHAŁ DUDA

KOREKTA REDAKTORSKA

KAROL ŁUKOMIAK

DIANA ŁUKOMIAK

SKŁAD I PROJEKT OKŁADKI

KAROL ŁUKOMIAK

© COPYRIGHT BY AUTHORS & ARCHAEGRAPH

ISBN: 978-83-67074-09-4

WERSJA ELEKTRONICZNA DOSTĘPNA NA STRONIE INTERNETOWEJ WYDAWCY:

www.archaeograph.pl

ORAZ W REPOZYTORIUM CYFROWYM BIBLIOTEKI NARODOWEJ
I PROFILACH AUTORÓW W INTERNETOWYCH SERWISACH NAUKOWYCH

ARCHAEGRAPH
Wydawnictwo Naukowe

ŁÓDŹ

WRZESIEŃ 2021

SPIS TREŚCI

Wstęp	7
Nowe możliwości leczenia farmakologicznego wirusowego zapalenia wątroby typu C część I – nowe leki	9
Marcin Goławski, Grzegorz O. Machelski, Iwona Jabłońska, Joanna Bączyk, Jakub Słota	
Nowe możliwości leczenia farmakologicznego wirusowego zapalenia wątroby typu C część II – nowe schematy terapeutyczne	57
Marcin Goławski, Grzegorz O. Machelski, Jakub Słota, Iwona Jabłońska, Joanna Bączyk	
Nowe terapie antybiotykowe	97
Jakub Słota, Martyna Żurek, Joanna Bączyk, Iwona Jabłońska, Marcin Goławski, Grzegorz O. Machelski	
Innowacyjne metody leczenia w leishmaniozie	109
Joanna Bączyk, Marcin Goławski, Jakub Słota, Iwona Jabłońska, Grzegorz O. Machelski	
Salicylany jako nowoczesne narzędzie populacyjnej profilaktyki raka jelita grubego	121
Agnieszka Geisler, Krzysztof Feret	
Terapia genowa w chorobie Parkinsona	137
Julia Kaczmarczyk	
Terapie biologiczne w czerniaku. Przegląd dotychczasowego leczenia i nowych możliwości	151
Paulina Redel, Aneta Rasińska, Natalia Trędota, Kinga Dworak	
Zolgensma - rewolucja w leczeniu rdzeniowego zaniku mięśni (SMA) typu I	183
Iwona Jabłońska, Joanna Bączyk, Jakub Słota, Marcin Goławski, Grzegorz O. Machelski	

Diagnostyka obrazowa COVID-19	197
Emilia Słabońska, Aleksandra Szczurasyk, Dominika Majer, Robert Kasza, Piotr Limanówka	
Postępy w leczeniu COVID-19	229
Dominika Majer, Aleksandra Szczurasyk, Piotr Limanówka, Emilia Słabońska, Robert Kasza	
Powrót do zdrowia po COVID-19: rehabilitacja oddechowa	251
Aleksandra Szczurasyk, Dominika Majer, Piotr Limanówka, Emilia Słabonska, Robert Kasza	
Stan psychiczny ludzi w czasie kwarantanny	269
Robert Kasza, Dominika Majer, Piotr Limanówka, Emilia Słabonska, Aleksandra Szczurasyk	
Rdzeniowy zanik mięśni – nowa era terapii przyczynowej	285
Michał Nicze, Magdalena Wątroba, Nadia Woźniak, Aurelia Malczyk, Magdalena Świątko	
Zastosowanie symulatorów USG w edukacji medycznej	315
Julia Cieśla, Maciej Smreczak, Kinga Dworak, Natalia Trędota, Agnieszka Wiekiera-Kozińska, Agata Suleja	
Innowacje w leczeniu guzów łitych - zastosowanie terapii CAR-T	341
Magdalena Świątko, Magdalena Wątroba, Nadia Woźniak, Aurelia Malczyk, Michał Nicze	
Perspektywy wykorzystania komórek macierzystych w gojeniu ran bez powstania blizny	365
Kinga Dworak, Natalia Trędota, Julia Cieśla, Aneta Rasińska	
Materiały hydrożelowe jako szkielety oraz systemy transportu związków chemicznych w procesie regeneracji kości	385
Magdalena Lisik, Aleksandra Kwiatkowska, Magda Nowak, Martyna Żurek	
Diagnostyka histologiczna i molekularna nagłej śmierci sercowej w praktyce sądowo-lekarskiej	407
Piotr Lewandowski, Tomasz Furgoł, Oliwia Warmusz	

WSTĘP

Piąty tom monografii pt. "Innowacje w Medycynie. Przegląd wybranych technologii XXI w." poświęcony został odkryciom ze styku nauk klinicznych z biotechnologią, inżynierią materiałową i genetyczną, biologią molekularną, chemią, farmacją, lecz także informatyką oraz zdrowiem publicznym.

Opracowanie zawiera 18 rozdziałów poświęconym interdyscyplinarnym odkryciom medycznym. Wśród omawianych w książce tematów nie zabrakło metod terapii nowej generacji (CAR-T, terapia biologiczna i genetyczna), zastosowania komórek macierzystych. Dodatkowo, cztery rozdziały poświęcone zostały odkryciom, diagnostyce oraz całosciowemu wpływem COVID-19 na organizm człowieka.

Monografia stanowi cenne kompendium dla wszystkich zainteresowanych szeroko rozumianymi naukami medycznymi, w szczególności osób planujących karierę naukową.

Dziękujemy wszystkim, którzy przyczynili się do powstania monografii. Życzymy czytelnikom interesującej lektury, mając jednocześnie nadzieję, iż wzbogaci ona wiedzę na temat zagadnień w niej zaprezentowanych oraz że treść rozbudzi w nich chęć tworzenia nowych pasjonujących projektów naukowych.

Jakub Kufel
Piotr Lewandowski

NOWE MOŻLIWOŚCI LECZENIA FARMAKOLOGICZNEGO WIRUSOWEGO ZAPALENIA WĄTROBY TYPU C CZĘŚĆ I – NOWE LEKI

Marcin Goławski, Grzegorz O. Machelski, Iwona Jabłońska,
Joanna Bączyk, Jakub Słota

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

Abstrakt:

Wirusowe zapalenie wątroby typu C (WZW C) jest chorobą wywołaną przez hepatotropowy wirus zapalenia wątroby typu C (HCV). Infekcja może dotyczyć nawet 0,5% populacji Polski. Infekcje w 50-80% mają charakter chroniczny, z początku nieraz bezobjawowe prowadzą do marskości, niewydolności wątroby i raka wątrobowokomórkowego. Do 2013 roku jedynymi dostępnymi lekami w leczeniu WZW C były interferony łączone z reguły z rybawiryną oraz, dla terapii zakażenia genotypem 1 wirusa, inhibitory proteazy NS3/4: boceprevir i telaprevir. Terapia charakteryzowała się licznymi działaniami niepożądanymi i ograniczoną skutecznością. Od 2013 roku do chwili obecnej do obrotu zostało dopuszczonych kilkanaście nowych leków charakteryzujących się lepszym profilem bezpieczeństwa i wyższą skutecznością. Ze względu na działanie bezpośrednie na białka wirusowe i hamowanie jego replikacji nazywane są one lekami o bezpośrednim działaniu przeciwwirusowym (ang. *directly-acting antivirals*, DAA). Do leków nowej generacji należą inhibitory proteazy NS3/4 II generacji, inhibitory polimerazy NS5B, inhibitory NS5A.

Słowa kluczowe: HCV, WZW C, leki

Abstract:

Hepatitis C is a disease caused by hepatotropic hepatitis type C virus (HCV). Up to 0,5% of Polish population may be infected. Infections are chronic in 50-80% of the cases, initially quite often asymptomatic they frequently lead to cirrhosis, hepatic insufficiency and hepatocellular carcinoma. Until 2013 interferons usually used in conjunction with ribavirin and NS3/4 protease inhibitors: boceprevir and telaprevir in case of genotype 1 virus infection were the only therapeutic options. Such therapy was characterized by adverse reactions and limited efficacy. Since 2013 until now, several new drugs with more favorable safety profile and higher efficacy

were approved for use. As they act directly on viral proteins, they are called irectly Acting Antivirals (DAA). Those new pharmaceuticals include: second generation protease NS 3/4 inhibitors, NS5B RNA polymerase inhibitors and NS5A inhibitors.

Keywords: HCV, Hepatitis C, drugs

1. WSTĘP

W obecnych czasach temat chorób zakaźnych jest powszechnie znany. Oprócz wirusów wywołujących ostre zakażenia dróg oddechowych nie można zapominać o istnieniu wirusów wywołujących zakażenia przewlekłe.

Za odkrycie wirusa zapalenia wątroby typu C (ang. hepatitis C virus, HCV) Harvey J. Alter, Michael Houghton i Charles M. Rice otrzymali nagrodę Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii w roku 2020. [1] Niemniej leczenie wirusowego zapalenia wątroby typu C (WZW C), które on wywołuje, jeszcze jako WZW nie-A i nie-B, sięga wcześniej, niż odkrycie jego czynnika etiologicznego. [2] Pomimo tak niedawnego odkrycia, WZW C nie jest chorobą rzadką, szacuje się, że choruje na nią 71 milionów osób z czego większość stanowią zakażenia przewlekłe. [3] Od czasu opublikowania tego odkrycia w 1989 r. w leczeniu WZW C nastąpił istotny postęp. [4] W przeciągu około 30 lat opracowano metody terapii pozwalające na leczenie zakażenia każdym genotypem wirusa HCV u znakomitej większości pacjentów. Tak istotny postęp jest właściwie bezprecedensowy. [5] Kontrastuje to istotnie z zakażeniem wirusem HIV i HBV, wywołującymi odpowiednio AIDS i WZW B, które nadal są całkowicie lub w wielu przypadkach nieuleczalne. [6] Ponieważ szczepionka na WZW C nadal nie istnieje, leczenie i ograniczanie transmisji są obecnie jedynym znanym sposobem by doprowadzić do eliminacji WZW C, która wydaje się być jak najbardziej możliwa, choć prawdopodobnie odległa w czasie. [7] Z tego powodu w poniższym rozdziale oraz jego drugiej części opisano substancje i schematy stosowane w leczeniu WZW C.

2. CHARAKTERYSTYKA WIRUSA HCV I WZW C

2.1. Budowa, cykl życiowy, genetyka i klasyfikacja wirusa HCV

Klasyfikacja wirusa HCV, genotypy, quasi-gatunki

HCV jest hepatotropowym ludzkim wirusem należącym do rodziny *Flaviviridae*, rodzaju *Hepacivirus*, gatunku *Hepacivirus C*. Inne znane *Hepacivirusy* *A-B* oraz *D-N* infekują naczelne, konie, psy, gryzonie, nietoperze i bydło. [8] Wirus HCV charakteryzuje się wysoką heterogenicznością – zidentyfikowano 8 genotypów (GT) oznaczanych cyframi 1-8 i znaczną liczbę subgenotypów oznaczanych małymi literami (np.: 1a, 1b itd.). Genotypy różnią się rozmieszczeniem geograficznym i występowaniem w różnych populacjach. [9, 10] Wirus HCV występuje u pacjenta jako seria spokrewnionych ze sobą quasi-gatunków powstających w wyniku błędów w czasie replikacji RNA wirusa. Znaczna część wirionów HCV obecnych u pacjenta może być przy tym defektywna. Zróżnicowanie genetyczne wirusa u pacjenta przyczynia się do ucieczki przed swoistą odpowiedzią immunologiczną gospodarza umożliwiając przewlekłe zakażenie. Utrudnia też wytworzenie szczepionki. [15, 16]

Budowa, genom i białka wirusa HCV

Wiriony wirusa HCV mają średnicę 45-65 nm i otoczone są dwuwarstwą lipidową, w której zakotwiczone są 2 glikoproteiny. Osłonka lipidowa otacza kulisty kapsyd składający się z wielu kopii białka rdzeniowego HCV i zawierający kodujący, jednoniciowy RNA. [17]

Wiriony wirusa HCV są zasocjowane z lipoproteinami niskiej gęstości (LDL) i bardzo niskiej gęstości (VLDL) tworząc lipowirocząsteczki. Zawierają one apolipoproteinę B oraz wymienne apolipoproteiny C i E. [18]

RNA wirusa HCV ma długość około 9,6 tys. par zasad i stanowi bezpośrednią matrycę do syntezy białka wirusowego. Białka powstają jako pojedynczy łańcuch polipeptydowy podlegający hydrolizie przez proteazy gospodarza (sygnaliza, peptydaza białek sygnałowych) oraz proteazy wirusowe (NS2 i NS3/4). Białka strukturalne zawarte są w końcu aminowym polipeptydu, w czasie gdy reszta białek, czyli białka niestrukturalne (ang. *non-structural protein*, NS) powstaje z pozostałych jego części. [17]

Za inicjację translacji odpowiada wewnętrzne miejsce wiązania z rybosomem (ang. *internal ribosome entry site*, IRES). [19, 20]

Do białek strukturalnych należą: glikoproteiny E1 i E2 oraz białko rdzeniowe. Dimery glikoproteiny E1 i E2 pełnią kluczową, lecz niewyjaśnioną w pełni rolę związaną z wiązaniem z receptorami wirusowymi. [21] Glikoproteina E2 zawiera hiperzmienny, przeciwko któremu przeciwciała mają charakter neutralizujący. [18, 22, 23]

Do białek niestrukturnych należą p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B.

Białko NS2, ma zdolności do dimeryzacji, pełni funkcję autoproteolityczną, w której kofaktorem jest NS3 – dokonuje cięcia uwalniającego białko NS2 i NS3 z polipeptydu powstałego w czasie translacji. [24]

Białko NS3 pełni funkcję helikazy-NTP-azy, umożliwiając rozdzielanie nici potomnej od nici pierwotnej w czasie replikacji, rozplątywaniu drugorzędowych struktur RNA i usuwaniu białek wiążących RNA z nici. Tworzy razem ze swoim kofaktorem – białkiem NS4A – proteazę serynową. Proteaza NS3/4 odpowiada za rozdział wszystkich wiązań peptydowych między białkami niestrukturnymi wirusa, oprócz tego między NS2 i NS3, dodatkowo dokonuje proteolizy białek gospodarza MAVS (ang. *mitochondrial antiviral-signaling protein*) i TRIF (ang. *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β*), co hamuje syntezę interferonów. [25, 26] Białko NS4A jest kofaktorem białka NS3. [25]

Białko NS4B jest integralnym białkiem błonowym odpowiadającym za rearanżację siateczek śródplazmatycznych tworząc sieci i kompleksy, gdzie zachodzi skompartmentalizowana replikacja wirusa. [25]

Białko NS5A jako dimer tworzy dodatnio naładowany kanał istotny w przyłączaniu RNA w czasie replikacji. Jego domeny I i II są wymagane do replikacji HCV, domena III odpowiada za składanie wirionów. Stopień fosforylacji tego białka reguluje procesy syntezy RNA i inne etapy cyklu replikacji wirusa HCV. [25]

Białko NS5B jest replikazą (RNA-zależną polimerazą RNA) odpowiadającą za replikację wirusowego RNA. Posiada typowe dla polimeraz domeny kciuka, palców i dłoni. [25, 27]

Białko p7 tworzy kanały jonowe usprawniające tworzenie wirionów. [28]

Oprócz omówionych wyżej funkcji, u białek wirusa HCV obserwowano złożone funkcje regulacyjne, związane z interakcjami z białkami gospodarza, transportem białek wirusowych i składaniem wirionów. [28–32]

Cykl życiowy wirusa

Za początkowe łączenie się wirusa z niskim powinowactwem z komórką gospodarza odpowiadają glikozaminoglikany i receptor LDL. Następnie białko E1 oraz E2 za pomocą regionu hiperzmiennego wchodzi z interakcją z białkiem CD81 i SRB1 (receptor zmiatacz). Do wejścia do komórki niezbędne są też kładyna 1, okładyna i prawdopodobnie kładyna 6 i 9, receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu i receptor dla efryn typu A2. Łączenie z komórkami wątroby prowadzi do endocytozy z udziałem klatryn. Ten zespół receptorów niezbędny do infekowania komórki przez HCV determinuje specyficzność tkankową i gatunkową wirusa. [33] Wirus HCV wydaje się być związany z połączeniami zamykającymi, co umożliwia transmisję pomiędzy sąsiadującymi komórkami. [34]

Za uwalnianie nukleokapsydu do cytoplazmy odpowiada prawdopodobnie białko E1. Odpłaszczanie nukleokapsydu wirusa prowadzi do uwolnienia kodującego RNA podlegającego translacji na siateczce śródplazmatycznej. 10 białek wirusa powstaje w wyniku działania peptydaz wirusa i gospodarza. Replikację wirusowego RNA zachodzi w kompleksach na siateczce śródplazmatycznej. Nici kodująca jest matrycą do syntezy nici antysensownej, która jest z kolei wykorzystywana do syntezy kolejnych nici kodujących pakowanych do wirionów i będących matrycami do syntezy białek. Wirusowa polimeraza RNA – NS5B – charakteryzuje się wysoką skłonnością do powstawania błędów w replikacji, szacuje się, że błąd w replikacji dotyczy jednego na 10000 do 100000 nukleotydów, co oznacza, że właściwie każdy powstały wirion zawiera około jedną mutację w RNA. Oprócz białek wirusowych do replikacji niezbędne są białka gospodarza takie jak cyklofilina A łącząca się z NS5A i NS5B, odpowiedzialna za wywoływanie zmian konformacyjnych białek niezbędnych do replikacji wirusa. Do efektywnej replikacji wirusa i stabilizacji RNA niezbędne jest mikro RNA miR-122 specyficzne dla wątroby, które łączy się z 2 miejscami w miejscu wiązania rybosomu. Do innych szlaków i czynników biorących udział w replikacji HCV należą fosfatydyloinozytolo-4-kinaza III α i szlaki syntezy cholesterolu i kwasów tłuszczowych. Za inicjację składania wirionów odpowiada interakcja białka NS5A z genomowym RNA i białkami rdzeniowymi na cytoplazmatycznych kroplach tłuszczów. Do dalszych etapów składania i uwalniania wirus HCV wykorzystuje szlak produkcji VLDL. [25, 35–37]

2.2. Przebieg zakażenia HCV

Człowiek jest jedynym gatunkiem, u którego występuje naturalnie zakażenie HCV, możliwe jest sztuczne zakażenie szympansa, lecz u zwierząt tych choroba najczęściej ma znacznie łagodniejszy charakter. [38]

Ostre zakażenie ma zwykle przebieg bezobjawowy. Mniejsza część pacjentów wykazuje objawy takie jak żółtaczka, zmęczenie, ból i dyskomfort w prawym nadbrzuszu oraz bóle stawów. Infekcja u 75%-85% pacjentów przybiera postać chroniczną, czyli utrzymuje się dłużej, niż 6 miesięcy. W przebiegu 20-30 lat u 10-20% pacjentów dochodzi do marskości wątroby wynikającej ze stymulacji przejścia komórek gwiazdzistych do miofibroblastów, co jest skutkiem chronicznego, miejscowego zapalenia. Następstwem tego może być niewyrównana marskość wątroby i rak wątrobowokomórkowy, który występuje u 1 do 3% pacjentów w ciągu 30 lat zakażenia. Przejawem marskości wątroby mogą być: wodobrzusze, krwawienie z górnego odcinka przewodu pokarmowego, encefalopatia wątrobowa; poprzedza je nieraz: zmęczenie (w 50% przypadków), utrata masy ciała, ból mięśni i stawów, dyskomfort w prawym nadbrzuszu. Niewydolność wątroby jest wskazaniem do przeszczepu tego narządu. Wielu pacjentów jest nieświadomych choroby, aż do momentu stwierdzenia marskości wątroby. Mogą występować także pozawątrobowe powikłania: kriglobulinemia mieszana, schorzenia nerek, schorzenia sercowo-naczyniowe, liszaj płaski, choroby limfoproliferacyjne, immunologiczna płamica małopłytkowa, porfiria skórna późna, łuszczyca, cukrzyca typu II, neuropatia obwodowa, zapalenie naczyń mózgowia, zapalenie stawów, zespół Sjögrena, zespół antyfosfolipidowy, toczeń rumieniowaty układowy i inne. Genotyp wpływa na progresję choroby; GT 3 charakteryzuje się szybszym przebiegiem ze zwiększonym ryzykiem raka wątrobowokomórkowego. Choroba z reguły wykazuje mniejszy stopień progresji u dzieci. [18, 39–44]

Odpowiedź immunologiczna rzadko pozwala na samoistne wyleczenie w wypadku przewlekłego zakażenia. Wyjątkiem są dzieci, które zostały zakażone transmisją wertykalną, u których samoistne wyleczenie może dotyczyć 25-50% przypadków. Przeciwciała sporadycznie mają charakter neutralizujący, jak ma to miejsce w wypadku przeciwciał przeciw regionowi hiperzmiennemu glikoproteiny E2, a ich skuteczność ogranicza zmienność genetyczna wirusa. Odpowiedź T-komórkowa również napotyka na problem zmienności genetycznej, a w chorobie przewlekłej nabiera charakteru dysfunkcyjnego. Sugeruje się, że występowanie quasi-gatunków zapewnia zmienność epitopów niezbędną do ucieczki przed odpowiedzią swoistą gospodarza umożliwiając chroniczną

infekcję, o czym świadczy większe prawdopodobieństwo chronicznego charakteru zakażenia u pacjentów z wysokim zróżnicowaniem genetycznym wirusa.

Przebyte zakażenie nie chroni przed ponowną infekcją. [18, 22, 23, 45–50]

2.3. Epidemiologia wirusa HCV

Według estymacji WHO w 2015 roku na świecie 71 milionów ludzi było zakażonych WZW C. [3] Dostępność i jakość danych wpływa jednak na szacunki rozpowszechnienia choroby. Wirus rozprzestrzenia się poprzez kontakt krwi własnej z krwią nosiciela, zakażenia są głównie jatrogenne lub związane z używaniem narkotyków dożylnych. Transmisja drogą wertykalną i płciową ma drugorzędne znaczenie, za wyjątkiem mężczyzn uprawiających seks z mężczyznami zakażonych HIV. [18] WZW C jest dominującą przyczyną schyłkowej niewydolności wątroby, raka wątrobowokomórkowego i śmiertelności związanej z chorobami wątroby w krajach rozwiniętych. [42] Przyjmuje się, że do zakażenia dziecka w czasie ciąży i porodu dochodzi w 3-8%, karmienie piersią nie wydaje się być istotną drogą zakażenia. Dystrybucja genotypów wirusa HCV jest zróżnicowana, choć GT 1 jest dominujący, w krajach rozwijających się za ponad połowę zakażeń odpowiadają inne genotypy, co świadczy o konieczności stosowania i rozwijania terapii pangenotypowych. [51–53] Szacuje się, że w Polsce aktywnie zakażeni stanowią 0,4-0,5% populacji, a przeciwciała anti-HCV wykrywa się u mniej niż 1% w zależności od badanej populacji i metodyki badań. [14, 54] Wśród zakażonych dominuje GT1b (82%), występują też: GT3 (11,3%), GT4 (3,5%) i GT1a (3,2%). Inne genotypy występują najwyżej sporadycznie. [55]

2.4. Diagnostyka zakażenia wirusem HCV, monitorowanie leczenia i cel leczenia

Zakażenie wirusem HCV może być wykrywane za pośrednictwem testów immunoabsorpcyjnych wykrywających przeciwciała anti-HCV pojawiające się po 2-8 tygodniach od początku choroby i utrzymują się w czasie chronicznej infekcji. HCV RNA może być wykrywane i oznaczane ilościowo z wykorzystaniem RT-PCR w celu wykrywania zakażenia na wczesnym etapie (obecne po 1–3 tygodniach), w celu monitorowania przebiegu choroby i wykrywania niepowodzenia leczenia. Mniej czułą alternatywą są testy antygenowe na antygen rdzeniowy HCVcAg. [18]

Za powodzenie leczenia uznaje się brak wykrywanego HCV RNA lub HCVcAg po 12 tygodniach od zakończenia terapii – jest to tak zwana trwała odpowiedź wirusologiczna (ang. *sustained virologic response*, SVR), mierzona po 12 tygodniach oznaczana jako SVR12. Poziom detekcji stosowanego testu powinien wynosić dla HCV RNA ≤ 15 IU/ml, dla HCVcAg $\leq 3,0$ fmol/l. HCVcAg może być wykorzystany tylko, jeżeli jest wykrywany na początku terapii. W wypadku uzyskania niejednoznacznych wyników należy powtórzyć oznaczenie po 24 tygodniach od zakończenia terapii (SVR24). [14] Ponieważ SVR12 wydaje się być w większości wypadków równoznaczny z SVR24, rutynowe powtarzanie badania po 24 tygodniach wydaje się zbędne. [56, 57] Niemniej, nawrót WZW C, który należy odróżniać od reinfekcji, jest sporadycznie możliwy po osiągnięciu SVR12. [58]

Monitorowanie HCV RNA w trakcie trwania terapii, jak i w momencie jej zakończenia nie jest przydatne klinicznie, za wyjątkiem ewentualnie oceny przyjmowania leków przez pacjenta. [14]

Ostre WZW C diagnozuje się, jeżeli stwierdzi się serokonwersję pacjenta do anty-HCV dodatniego. Jeżeli przeciwciała nie występują, diagnozę można postawić na podstawie podwyższenia poziomu ALT (>10 krotność górnej granicy normy) i/lub wystąpienia żółtaczki w wypadku braku chronicznych chorób wątroby w historii pacjenta i innych prawdopodobnych przyczyn ostrego zapalenia wątroby oraz zidentyfikowania prawdopodobnego źródła zakażenia. W wypadku ostrego WZW C, HCV RNA i HCVcAg są zawsze wykrywalne, mogą jednak wykazywać fluktuację poziomów z kilkutygodniowymi okresami niewykrywalności, wyleczenie ostrego WZW C można stwierdzić powtarzając test na HCV RNA lub HCVcAg 12 i 24 tygodnie po ostatnim negatywnym teście. [57]

W celu doboru prawidłowej terapii, niezbędne jest ustalenie genotypu wirusa (oznacza się genotypy 1-6), a w wypadku GT1 także subgenotypu a lub b. Stosuje się do tego metody oparte na sekwencjonowaniu i hybrydyzacji. [18]

2.5. Inne badania i ocena parametrów klinicznych przy WZW C

Przy doborze i prowadzeniu terapii WZW C istotne parametry kliniczne dotyczą nie tylko samych parametrów bezpośrednio związanych z ilością, czy charakterystyką HCV u danego pacjenta.

Stopień włóknienia wątroby ocenia się na podstawie biopsji lub pomiarów elastograficznych. Do oceny stopnia włóknienia na podstawie oceny

mikroskopowej biopsji stosuje się pięciostopniową skalę Metavir ze stopniami F1-F4, gdzie kolejne punkty mają następujące znaczenie:

- F0 – brak oznak włóknienia;
- F1 – wrotne i okołowrotne zwłóknienie, brak przegród;
- F2 – wrotne i okołowrotne zwłóknienie, rzadkie przegrody;
- F3 – wrotne i okołowrotne zwłóknienie, liczne przegrody;
- F4 – marskość wątroby.

Skala Metavir posiada też odrębną klasyfikację do oceny zmian martwiczo-zapalnych. Do oceny włóknienia i zmian martwiczo-zapalnych w tkance wątroby stosowane są także inne skale np.: skala Scheuera, skala Ishaka, skala Knodella. Wartości graniczne dla sztywności wątroby dla poszczególnych stopni skali Metavir przedstawiono w Tabeli 1. [59–64] Włóknienie wątrobowe można ewentualnie ocenić za pomocą parametrów biochemicznych, na przykład stosunku aktywności aminotransferazy asparaginianowej do liczby płytek krwi. [14, 65, 66]

Tabela 1. Stopień w skali Metavir, a sztywność wątroby w kPa mierzona elastograficznie w zakażeniu HCV i koinfekcji HCV/HIV. Niektóre punkty odcięcia odpowiadają stadiom pośrednim w skali [60]

	F0F1	F1F2	F2	F2F3	F3	F3F4	F4
HCV	<7,1	>7,1	>8,7		>9,5	>12,5	>14,5
HCV/HIV	<7,2			>7,2		>11,9	>14,6

Kolejnym parametrem ocenianym u pacjentów zakażonych WZW C jest nasilenie niewydolności wątroby w wypadku marskości tego narządu. Stosowana jest w tym celu klasyfikacja Childa-Pugha, ustalana na podstawie sumy punktów uzyskanych przez pacjenta według kryteriów przedstawionych w Tabeli 2. Klasa A jest równoznaczna z wyrównaną marskością wątroby i dotyczy pacjentów z 5-6 punktami, klasy B i C dotyczą pacjentów o niewyrównanej marskości, przyznawane są odpowiednio w wypadku uzyskania 7-9 i 10-15 punktów. [67]

Tabela 2. Parametry i liczby punktów w klasyfikacji Child-Pugh [67]

Parametr	1 punkt	2 punkty	3 punkty
Bilirubina, $\mu\text{mol/L}$ (mg/dl)	<35 (<2)	35–50 (2–3)	>50 (>3)
Albumina, g/dl	>3,5	2,8–3,5	<2,8

Czas protrombinowy, s ponad normę	1,0–4,0	5,0–10,0	10-15
Wodobrzusze	Brak	Umiarkowane	Napięte
Encefalopatia wątrobowa	Brak	Stopień I–II	Stopień III–IV

W schyłkowej niewydolności wątroby i wskazaniach do przeszczepu w wypadku WZW C istotne może być określenie wyniku modelu dla schyłkowej niewydolności wątroby MELD (ang. *Model for End-Stage Liver Disease*; wzór przedstawiono na Rycinie 1.).

$$MELD = 9,57 \ln c_{\text{kreatynina}} \left(\frac{mg}{dL} \right) + 3,78 \ln c_{\text{bilirubina}} \left(\frac{mg}{dL} \right) + 11,2 \times \ln INR + 0,43$$

Rycina 1. Wzór służący obliczaniu wyniku w skali MELD, wynik zaokrąglany jest do liczb całkowitych [68]

Badanie USG wątroby jest niezbędne w wypadku stwierdzenia WZW C w celu diagnostyki pod kątem raka wątrobowokomórkowego. Badanie wykonuje się przed rozpoczęciem terapii i do 12 tygodni od jej zakończenia. Badanie można powtarzać co 24 tygodnie u osób z włóknieniem w niskim stopniu (F0-F2) przez 4 lata po zakończeniu terapii, jest to natomiast konieczne u osób z włóknieniem w wyższym stopniu (F3-F4), a u osób z historią raka wątrobowokomórkowego w rodzinie badanie USG należy wykonywać co 24 tygodnie przez czas nieokreślony. W wypadku wykrycia zmiany nowotworowej stosuje się badanie stężenia AFP, oraz badania obrazowe TK z kontrastem i MRI z kontrastem. Badania te stosuje się także w wypadku stwierdzenia raka wątrobowokomórkowego u pacjenta w wywiadzie by wykluczyć nawroty. [14]

Marskość wątroby jest związana z nadciśnieniem wrotnym i żylakami przełyku, w związku z tym u pacjentów z WZW C i marskością, niezbędne jest endoskopowe badanie w kierunku żylaków przełyku. [14]

Monitorowanie morfologii krwi i stężenia hemoglobiny, aktywności ALT, AST, stężenia bilirubiny pośredniej i bezpośredniej jest stosowane w celu oceny działań niepożądanych terapii i oceny funkcji wątroby. Aktywność ALT w osoczu jest podwyższone stale lub okresowo u około 70% przewlekłe chorych, podwyższona jest też poziom aktywności AST, w ciężkich przypadkach podwyższone jest także stężenie bilirubiny. Badanie HBsAg i HBV DNA ma na celu monitoring ewentualnej reaktywacji zakażenia HBV. eGFR jest wyliczany na potrzeby doboru terapii. U kobiet w wieku rozrodczym wykonuje się badanie stężenia β -hCG. Zaleca się też badania w kierunku zakażenia HIV. [44, 69]

3. MOŻLIWOŚCI LECZENIA PRZED ROKIEM 2013

3.1. Interferony

Interferony (IFN) to cytokiny produkowane przez komórki ludzkie w odpowiedzi na zakażenie wirusowe. Poprzez odpowiednie receptory indukują one przeciwwirusową odpowiedź komórek, skutkującą zmniejszeniem transkrypcji i translacji genów wirusa, dodatkowo mają one działanie immunomodulujące, zwiększając proliferację i hamując apoptozę limfocytów T, zwiększając proliferację komórek NK i dojrzewanie komórek dendrytycznych, zwiększając ekspresję białek MHC klasy I i II. [70, 71]

Użycie IFN w leczeniu WZW typu C sięga 1986 r., przed zidentyfikowaniem wirusa HCV jako przyczyny zapalenia wątroby nie-A i nie-B w roku 1989 (data publikacji odkrycia). [2, 4] Pierwszym zastosowanym IFN był IFN α -2b. Przed wprowadzeniem IFN pegylowanych (PegIFN), w lecznictwie zastosowanie miały rekombinowane IFN α -2a, α 2b, alfacon i naturalny IFN α -1n. Sekwencja IFN alfacon jest sekwencją konsensusową naturalnych IFN α . IFN α -1n produkowany jest przez linię ludzkich komórek limfoidalnych i zawiera liczne podtypy IFN α . Niepegylowane interferony nie różniły się znacząco skutecznością. Jako białka ulegające proteolizie IFN te podawane były podskórnie, 3 razy w tygodniu lub codziennie. [72, 73] Skuteczność takich terapii była ograniczona, metaanaliza wykazała, że jedynie 8% pacjentów nie wykazuje obecności HCV RNA po 6 miesiącach od zakończenia leczenia. [74]. Skuteczność znacząco wzrasta przy połączeniu z niżej opisaną rybawiryną (RBV), do 32%. [75] Znaczącym ulepszeniem, wprowadzonym w roku 2001 było wdrożenie PegIFN zmodyfikowanych poprzez dodanie łańcucha glikolu polietylenowego, to jest PegIFN α 2a i PegIFN α 2b, co pozwoliło na podskórną podaż IFN raz w tygodniu. [18, 73, 76–78]

Długość terapii PegIFN wynosi nie mniej niż 24 tygodnie. [73, 76] PegIFN stosowane w połączeniu z niżej opisaną RBV pozwalają na SVR24 w 54% przypadków. [77]

PegIFN α 2a dopuszczony jest do stosowania u dzieci i młodzieży od lat 3, a PegIFN α 2b od lat 5. [79, 80]

Terapia IFN wykazuje liczne działania niepożądane. W wypadku terapii łączonej z RBV obserwuje się: infekcje wirusowe i bakteryjne, zaburzenia czynności tarczycy, nadmierny lub obniżony apetyt, hipokalcemię, hiperurykemię, zmiany w obrazie krwi, w tym neutropenię, anemię włącznie z anemią hemolityczną, odwodnienie, depresję, bezsenność i inne zaburzenia psychiatryczne

z myślami samobójczymi włącznie, bóle i zawroty głowy, zaburzenia widzenia, zaburzenia słuchu, zaburzenia pracy serca i ciśnienia krwi, kaszel, mdłości, wymioty, biegunkę i inne dolegliwości żołądkowo-jelitowe, wysypkę i inne zmiany skórne, bóle układu kostno-stawowego, zaburzenia funkcji nerek, zaburzenia cyklu miesięcznego, zaburzenia erekcji, zmęczenie, dreszcze, gorączkę, reakcje w miejscu podania i spadek masy ciała, a u dzieci może dojść do odwracalnego lub nie zahamowania wzrostu. IFN przeciwwskazane są w: poważnych chorobach serca, poważnych i upośledzających stanach medycznych, przebytych schorzeniach autoimmunologicznych, poważnej niewydolności wątroby, niemożliwej do kontrolowania dysfunkcji tarczycy, padaczce i innych zaburzeniach neurologicznych, koinfekcji HIV przy marskości wątroby i wyniku w skali Child-Pugh ≥ 6 , ciąży i karmieniu piersią oraz w kombinacji z telbivudyną. IFN wykazują działanie poronne. U pacjentów pediatrycznych przeciwwskazaniem są też zaburzenia psychiatryczne. [79–81]

IFN są stosowane w terapii każdego genotypu wirusa HCV, aczkolwiek skuteczność terapii jest od niego zależna, GT1 jest najpowszechniej występującym, a jednocześnie najmniej podatnym na terapię IFN, co sprawiło, że na terapii tego właśnie genotypu skupiły się początkowe poszukiwania bezpośrednio działających leków przeciwwirusowych (ang. *directly-acting antivirals*, DAA). Z drugiej strony IFN są dość efektywne w terapii GT3, który jest najtrudniejszy w leczeniu lekami z grupy DAA. [77, 82]

3.2. Rybawiryna

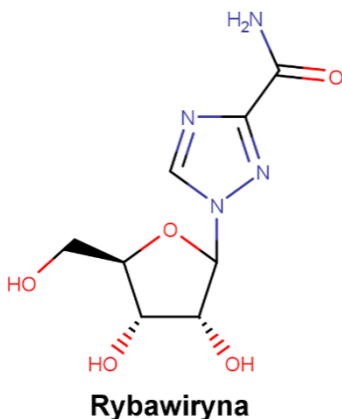
Rybawiryna (RBV) jest analogiem nukleozydu zsintezowanym po raz pierwszy w 1972 roku. Wykazuje szerokie działanie przeciwwirusowe i relatywnie niską toksyczność. Mechanizm działania nie jest jednoznacznie poznany, postuluje się, że za aktywność przeciwwirusową odpowiada zmniejszenie komórkowych stężeń GTP, inhibicja wirusowych polimeraz czy też indukcja mutagenazy w czasie replikacji RNA, sugeruje się też działanie immunomodulujące, nasilające ekspresję IFN i modyfikujące środowisko wewnątrzkomórkowe. [71, 83, 84]

RBV jest standardem w leczeniu WZW C od 1998 roku [18]. W przeciwieństwie do IFN nadal jest elementem leczenia z wyboru razem z DAA w niektórych wskazaniach, do czego przyczynia się zapewne możliwość podaży doustnej. [14, 83]

Skuteczność i działania niepożądane RBV w połączeniu z IFN omówiono wyżej. Na uwagę zasługuje zdolność do kumulacji w erytrocytach, co

odpowiada za działanie hemolityczne wiążące się z ryzykiem wystąpienia anemii hemolitycznej, a także działanie teratogenne i genotoksyczne, co sprawia, że w trakcie i po zakończeniu jej stosowania kobiety (przez 4 miesiące od zakończenia terapii) oraz mężczyźni (przez 7 miesięcy od zakończenia terapii, choć dowody na jej szkodliwość w tym wypadku są ograniczone) nią leczenia muszą stosować efektywną antykoncepcję. Partnerzy ciężarnych kobiet, zgodnie z zaleceniami, muszą stosować prezerwatywy, by ograniczyć ekspozycję ciężarnej na RBV. Nie nadaje się ona do zastosowania w monoterapii. RBV przeciwwskazana jest w ciąży, karmieniu piersią, nadwrażliwości, ciężkich chorobach serca i hemoglobinopatiach. Można ją jednak stosować u pacjentów pediatrycznych w wieku od lat 3. W celu ułatwienia stosowania u pacjentów nie mogących zażywać tabletek, dostępna jest w formie roztworu doustnego (obecnie tylko w UE). [85]

Wzór strukturalny RBV przedstawiono na Rycinie 2.



Rycina 2. Wzór szkieletowy rybawiryny (RBV) [opracowanie własne]

3.3. Inhibitory proteazy I generacji

Telaprewir i boceprewir są inhibitorami proteazy NS3/4A, które zostały dopuszczone do obrotu w 2011 roku przez FDA (ang. *Food and Drug Administration*) i EMA (ang. *European Medicines Agency*). [86–89] Stosowane były jedynie w terapii zakażenia GT1 HCV, w połączeniu z PegIFN i RBV.

Boceprewir przyjmowany był doustnie 3 razy dziennie. W badaniu klinicznym wykazano SVR u 63-66% (w zależności od konkretnego schematu leczenia) pacjentów przyjmujących go w połączeniu z RBV i PegIFN α -2b w porównaniu do 38% w grupie, która stosowała tylko RBV i PegIFN α -2b.

Inne badanie wykazało, iż 59-66% pacjentów nieskutecznie leczonych wcześniej, a leczonych boceprewirem, PegIFN α -2b i RBV uzyskało SVR. Istotnym działaniem niepożądanym boceprewiru było nasilenie anemii i innych zmian w obrazie krwi wywołanych terapią IFN i RBV. [90]

Telaprewir przyjmowany był doustnie 2 razy dziennie. Badania kliniczne pokazały, iż SVR przy terapii telaprewirem, PegIFN α -2a i RBV występuje u 74-79% nieleczonych wcześniej pacjentów, albo 65% pacjentów nieskutecznie leczonych wcześniej. Działania niepożądane telaprewiru to przede wszystkim poważne reakcje skórne: u 5,8% pacjentów wysypka obejmująca ponad połowę ciała, a u nielicznych pacjentów występowała toksyczna nekroliza naskórka, wysypka polekowa z eozynofilią i objawami układowymi oraz zespół Stevensa-Johnsona. Telaprewir nasila anemię występującą przy leczeniu IFN i RBV oraz dodatkowo wywołuje objawy niepożądane w okolicy anorektalnej (hemoroidy, dyskomfort, swędzenie). [91]

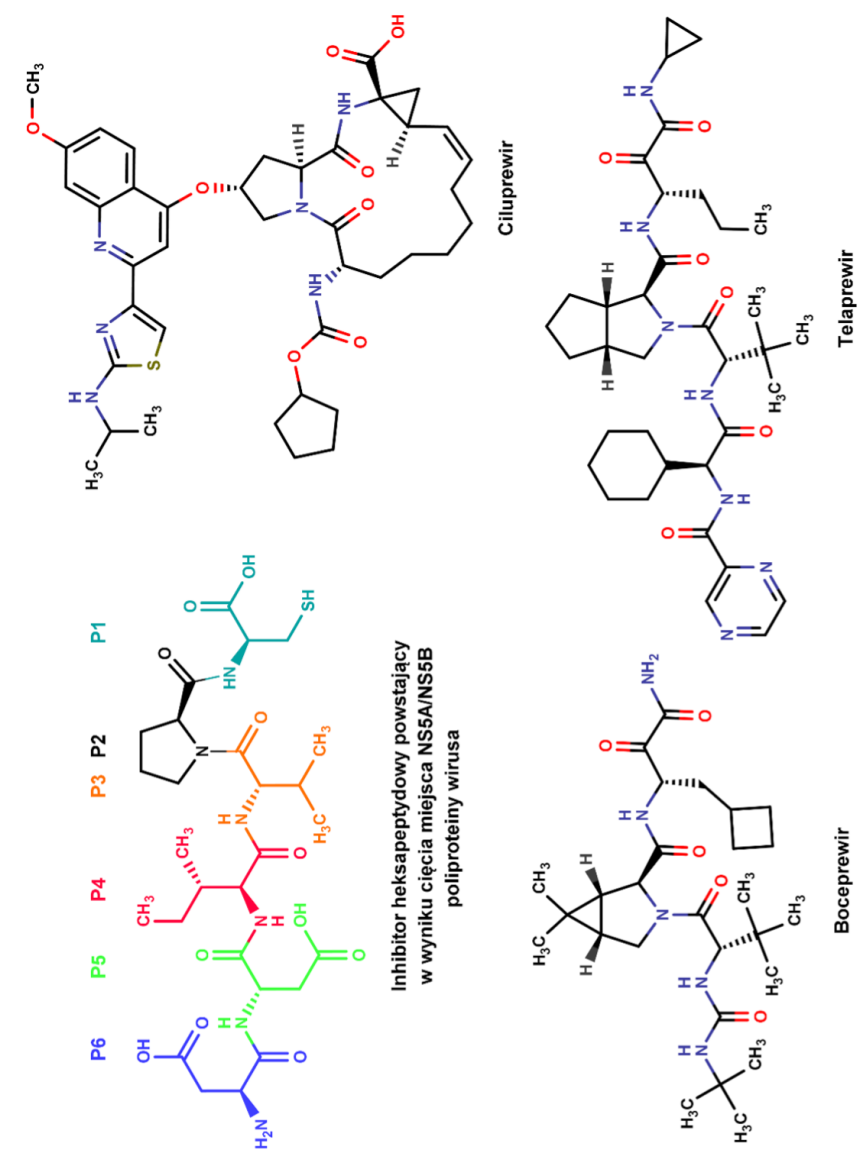
Wzory strukturalne boceprewiru i telaprewiru przedstawiono na Rycinie 3.

4. NOWE SUBSTANCJE O DZIAŁANIU PRZECIWWIRUSOWYM

Opisywane w poniższym rozdziale substancje należą do leków o bezpośrednim działaniu przeciwwirusowym (ang. *directly-acting antivirals*, DAA). Choć boceprewir, czy telaprewir należą niejako do pierwszych DAA, to dopiero dalsze odkrycia, opisane w poniższym podrozdziale, pozwoliły na eliminację interferonów z terapii WZW C. Nowe leki należą do 3 grup: inhibitorów proteazy NS3/4A, inhibitorów polimerazy RNA NS5B i inhibitorów białka NS5A.

4.1. Inhibitory proteazy II generacji

Inhibitory proteazy NS3/4A wirusa HCV należą do najstarszych opracowanych leków o bezpośrednim działaniu na białka wirusowe. Choć pierwsze bezkomórkowe testy aktywności tej proteazy opracowano już w 1995 roku, a strukturę rentgenowską opracowano pod koniec XX w., a badania kliniczne nad prototypowym inhibitorem ciluprewirem (który nie doczekał się zastosowań klinicznych z racji podejrzeń kardi toksyczności u zwierząt) zaprezentowano w 2002 roku, to telaprewir i boceprewir opisane wcześniej dopuszczono do obrotu dopiero w roku 2011. Skuteczne były one jedynie wobec GT1 wirusa i charakteryzowały się istotnymi działaniami niepożądanymi. [25, 86, 87, 92] Opracowanie inhibitora proteazy skutecznego wobec wszystkich genotypów było zadaniem trudnym z racji tego, że jedynie 47% aminokwasów



Rycina 3. Wzór szkieletowy peptydowego inhibitora proteazy NS3/4A powstającego w wyniku proteolizy miejsca NS5A/NS5B poliproteiny wirusa HCV oraz wczesnych inhibitorów proteazy NS3/4A [opracowanie własne]

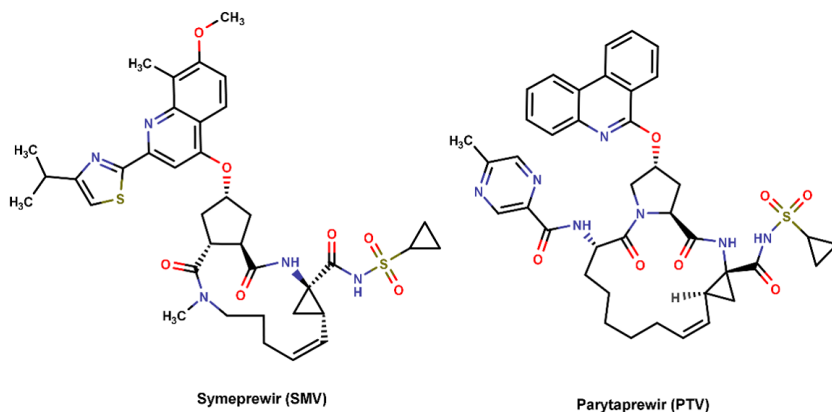
tego białka jest wspólnych dla wszystkich genotypów HCV. W niniejszej pracy telaprewir i boceprewir są zaliczane do I generacji inhibitorów, a pozostałe substancje wprowadzone na rynek do II generacji, jednak autorzy grupują te substancje w różny sposób. [93–95] Wzory strukturalne ciluprewiru, boceprewiru i telaprewiru przedstawia Rycina 3.

Punktem wyjścia w opracowywaniu inhibitorów proteazy NS3/4A była obserwacja, iż w wyniku cięcia przez proteazę miejsca NS5A/NS5B w poliproteinie wirusa powstaje heksapeptyd o właściwościach inhibitorowych dla proteazy, jego wzór strukturalny przedstawiono na Rycinie 3. [96] Dla aktywności inhibitorowej najistotniejsze są reszty aminokwasów 1–4. W inhibitorach stosuje odpowiednie analogi tych reszt (P1–P4), przy czym reszta P2 połączona jest z dużym, płaskim podstawnikiem określanym czasem jako reszta P*. [97] Struktura omawianych wcześniej boceprewiru i telaprewiru opiera się na zmodyfikowanej strukturze tego pierwotnego peptydu, gdzie na uwagę zasługuje wprowadzenie grupy α -ketoamidowej łączącej się odwracalnie kowalencyjnie z resztą seryny w miejscu aktywnym proteazy. [98, 99] Nowsze inhibitory mają strukturę makrocycliczną, w której analog P1 łączy się kowalencyjnie z P3 lub P2 łączy się kowalencyjnie z P4 poprzez P*.

Istotnym postępem było odkrycie dopuszczonego do obrotu przez FDA w 2013 roku symeprewiru (SMV), [100] którego profil bezpieczeństwa był zdecydowanie lepszy, niż wcześniejszych inhibitorów proteazy, a dodatkowo oprócz GT1 dopuszczony był także do stosowania w terapii GT4 wirusa, choć *in vitro* w pewnym stopniu działa na każdy genotyp wirusa z wyjątkiem 3. Mógł być stosowany w połączeniu z inhibitorem polimerazy NS5B sofosbuvirem (SOF) lub PegIFN i RBV. [94, 100–102] Struktura SMV zawierała w sobie analogi reszt P1–3 z analogami reszt P1 i P3 tworzącymi makrocykl. W przeciwieństwie do pozostałych inhibitorów proteazy, resztę proliny SMV zastąpiono jej bioizosterem – resztą kwasu dikarboksycyklopentanowego. [94] SMV dopuszczony był do obrotu w Unii Europejskiej w latach 2014–2018 [103, 104].

Z czasem dostępne stały się kolejne inhibitory proteazy NS3/4A. W 2014 roku dopuszczono do obrotu w Stanach Zjednoczonych preparat zawierający ombitaswir (OBV - inhibitor NS5A), rytonawir (r - wzmacniacz farmakologiczny), które zostały omówione dalej i nowy inhibitor proteazy: parytaprewir (PTV), pakowany razem z tabletkami zawierającymi dazabuwir (DSV - nienukleotydowy inhibitor polimerazy NS5B). Kombinacja ta dopuszczona była do leczenia zakażenia GT1. [105] Analogicznie do SMV, PTV jest strukturalnym analogiem inhibitorowego heksapeptydu, w którym występują reszty P1–3,

a P1 i P3 złączone razem tworzą makrocykl. Powodem, dla którego PTV stosowany jest w połączeniu z rytonawirem jest szybki metabolizm PTV przez CYP3A4. Zastosowanie inhibitora CYP3A4 rytonawiru pozwala zmniejszyć znacząco metabolizm i uzyskać wystarczające do zastosowań klinicznych parametry farmakokinetyczne. Okres półtrwania PTV w osoczu to jedynie 3h, jednak wzmocnienie rytonawirem wydłuża go do 5-8 h i zwiększa pole pod krzywą wykresu osoczowych stężeń PTV 30 razy. [97, 106] Kombinacja niezawierająca dazabuwiru dopuszczona była w leczeniu zakażenia GT4 w roku 2014 w Unii Europejskiej i w 2015 w Stanach Zjednoczonych. [107–109] Dużą aktywność *in vitro*, nie uwzględnioną w zastosowaniach klinicznych, PTV wykazuje także wobec GT6 wirusa (przy czym aktywność *in vitro* OBV wobec tego genotypu jest najmniejsza). [97, 110] Wzory strukturalne SMV i PTV przedstawiono na Rycinie 4.



Rycina 4. Wzory szkieletowe dopuszczonych do obrotu makrocyklicznych inhibitorów proteazy NS3/4A z makrocyklem typu P1-P3 [opracowanie własne]

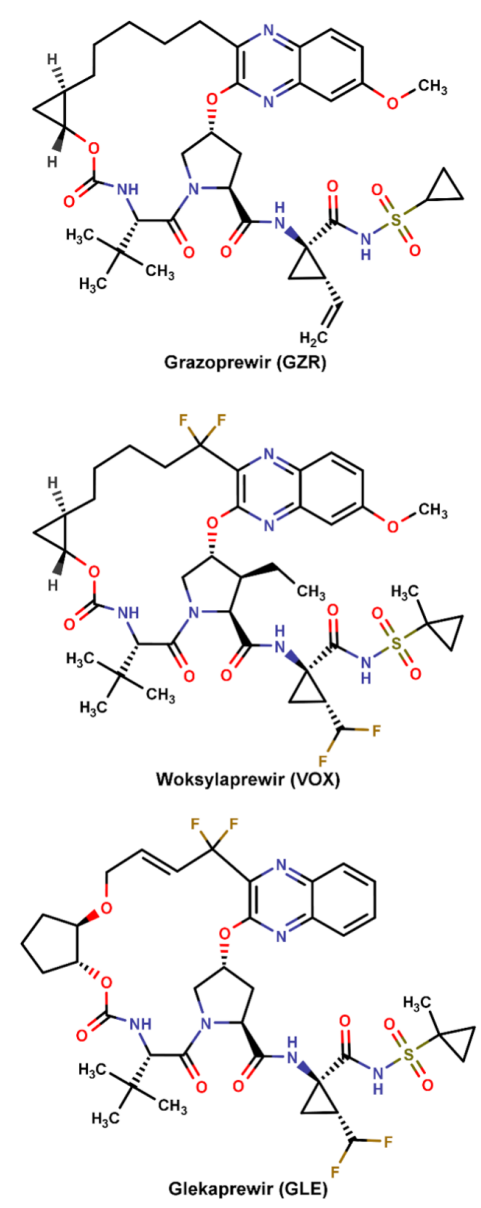
Następnym inhibitorem proteazy, który trafił na rynek Amerykański w 2015 roku był grazoprewir (GZR) w kombinacji z elbaswirem (EBR) (inhibitorem NS5A). [111] W przeciwieństwie do poprzednich rozwiązań, struktura leku zawiera makrocykl łączący reszty aminokwasowe P2 i P4. Jednym z powodów dla którego opracowano GZR było poszukiwanie inhibitorów proteazy aktywnych wobec GT3 wirusa, którego proteaza była mało wrażliwa na inhibicję znanymi dotychczas związkami. Otrzymano tym samym inhibitor o aktywności *in vitro* właściwie pangenotypowej i mniej podatny na mutacje wywołujące oporność. Szeroka aktywność GZR nie została uwzględniona w zastosowaniach klinicznych, dopuszczenie do obrotu preparatu z EBR

w USA oraz to wydane przez Europejską Agencję Leków z 2016 uwzględnia stosowanie jedynie w terapii GT1 oraz 4 (wynika to z pewnych wad EBR opisanych dalej). [111–115]

Woksylaprewir (VOX) jest inhibitorem proteazy NS3/4a dopuszczonym do obrotu przez FDA w 2017 roku w połączeniu z sofosbuwirem (SOF - inhibitor polimerazy NS5B) oraz welpataswirem (VEL - inhibitor NS5A). VOX został opracowany jako rozszerzenie aktywnej wobec wszystkich genotypów terapii VEL i SOF, pozwalające na terapię trudniejszych do wyleczenia przypadków i krótszą terapię w pozostałych wypadkach. VOX został opracowany na podstawie struktury GZR. W celu zmniejszenia hepatotoksyczności wiążącej się z tworzeniem reaktywnych metabolitów, grupę winylową P1 została zastąpiona grupą difluorometylową, a pozycje benzytowe we fragmencie łączącym P2 i P4 zostały fluorowane. Struktura cząsteczki VOX w dużej mierze opiera się na strukturze GZR z niewielkimi modyfikacjami. Kombinacja VOX, VEL i SOF została dopuszczona do obrotu w Unii Europejskiej przez EMA w 2017 roku. [116–120]

Ostatnim dopuszczonym do obrotu przez FDA i EMA w 2017 roku inhibitorem proteazy NS3/4a jest glekaprewir (GLE), dostępny w połączeniu z pibrentaswirem (PIB – inhibitor NS5A). Podobnie jak VOX stosowany jest w terapii każdego z genotypów wirusa HCV i tak samo cechuje go zmniejszona podatność na mutacje wywołujące oporność. Choć nie powstał w oparciu o GLE lub VOX, to posiada bardzo podobną budowę, wyróżniając się brakiem grupy metoksylowej w P* i resztą cyklopentylową w łączniku między P2 i P4. [121–124] Wzory strukturalne GZR, VOX i GLE przedstawiono na Rycinie 5.

Poza Europą i USA dopuszczone są 3 inne inhibitory proteazy NS3/4. Pierwszym jest ketoamidowy inhibitor narlaprewir dopuszczony do obrotu w Rosji. Drugim jest asunaprewir – niecykliczny inhibitor o budowie podobnej do SMV, stosowany w Japonii w połączeniu z daklataswirem (DCV – inhibitor NS5A) w terapii zakażenia GT1a oraz z DCV i beklabuwirem (inhibitor nienukleotydowy NS5B) w terapii zakażenia GT1b. [95, 125, 126] Trzecim zaś, waniprewir, również dostępny w Japonii, zawierający makrocykl P2-P4, stosowany w terapii z PegIFN i RBV. [95, 127, 128]



Rycina 5. Wzory szkieletowe dopuszczonych do obrotu makrocyklicznych inhibitorów proteazy NS3/4A z makrocyklem typu P2-P4 [opracowanie własne]

4.2. Inhibitory polimerazy NS5B

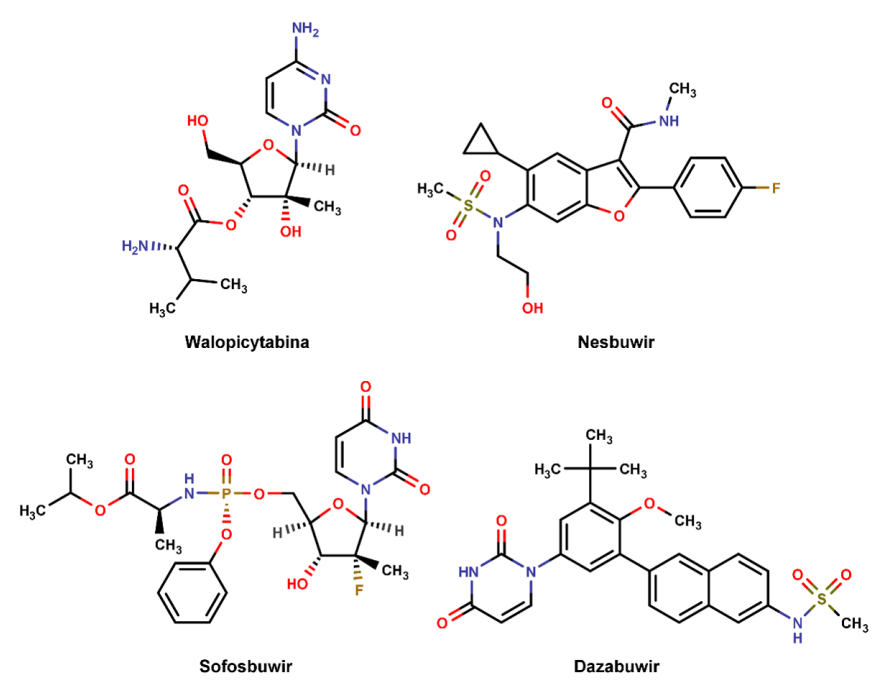
Kolejną grupą leków przeciwwirusowych wprowadzoną do użytku w klinice były inhibitory polimerazy RNA NS5B wirusa HCV. Bezkomórkowe testy aktywności tej polimerazy powstały w 1996 roku, a strukturę rentgenowską opublikowano w 1999 roku. Pierwszy nukleozydowy inhibitor tego enzymu – walopicytabinę – wprowadzono do badań klinicznych w 2004 roku, a inhibitor nienukleozydowy – nesbuwir – w roku 2006. [25, 129] Substancji tych nie wprowadzono do użytku w klinice z racji działań niepożądanych, a w wypadku walopicytabiny także ograniczonej skuteczności. [27, 130] Wzory strukturalne wspomnianych inhibitorów polimerazy NS5B przedstawia Rycina 6.

Charakterystycznymi cechami nukleozydowych i nukleotydowych inhibitorów polimerazy NS5B jest wysoka skuteczność i pangenotypowa aktywność wobec konserwowanego miejsca aktywnego u wszystkich genotypów. Wiele nukleozydowych i nukleotydowych inhibitorów białka NS5B, w szczególności analogów puryn, charakteryzuje się nieakceptowalną toksycznością u człowieka, prawdopodobnie z racji toksyczności mitochondrialnej, co ogranicza liczbę substancji w tej grupie o potencjalnych zastosowaniach klinicznych. [25, 131]

Nukleozydowe i nukleotydowe inhibitory charakteryzują się koniecznością enzymatycznej aktywacji. Nukleozydowe analogi podlegają fosforylacji do monofosforanów przez kinazę rybonukleotydową, następnie kolejna grupa fosforanowa dołączana jest przez kinazę monofosforanów nukleozydów, a ostatnia grupa fosforanowa przyłączana jest przez kinazę difosforanów nukleozydów. Analogi nukleotydowe posiadają już jedną grupę fosforanową, co pozwala pominąć pierwszy etap aktywacji. Aktywne metabolity leków tej klasy włączane są do łańcucha RNA w czasie replikacji materiału genetycznego HCV i prowadzą do przerwania replikacji ze względu na związanie się z miejscem aktywnym NS5B. Ze względu na ograniczone przenikanie przez błony biologiczne, analogi nukleozydów i szczególnie nukleotydów muszą być stosowane jako bardziej lipofilne proleki. [131]

Jedynym dopuszczonym do obrotu nukleotydowym inhibitorem polimerazy NS5B jest sofosbuwir (SOF), w Stanach Zjednoczonych i Unii Europejskiej dostępny jest od 2013. [132, 133] Jego wzór strukturalny przedstawia Rycina 6. SOF wykazuje bardzo dobry profil bezpieczeństwa oraz charakteryzuje się wysoką skutecznością w terapii każdego genotypu wirusa. SOF jest prolekiem związku PSI-7409, który powstaje w wyniku: [134]

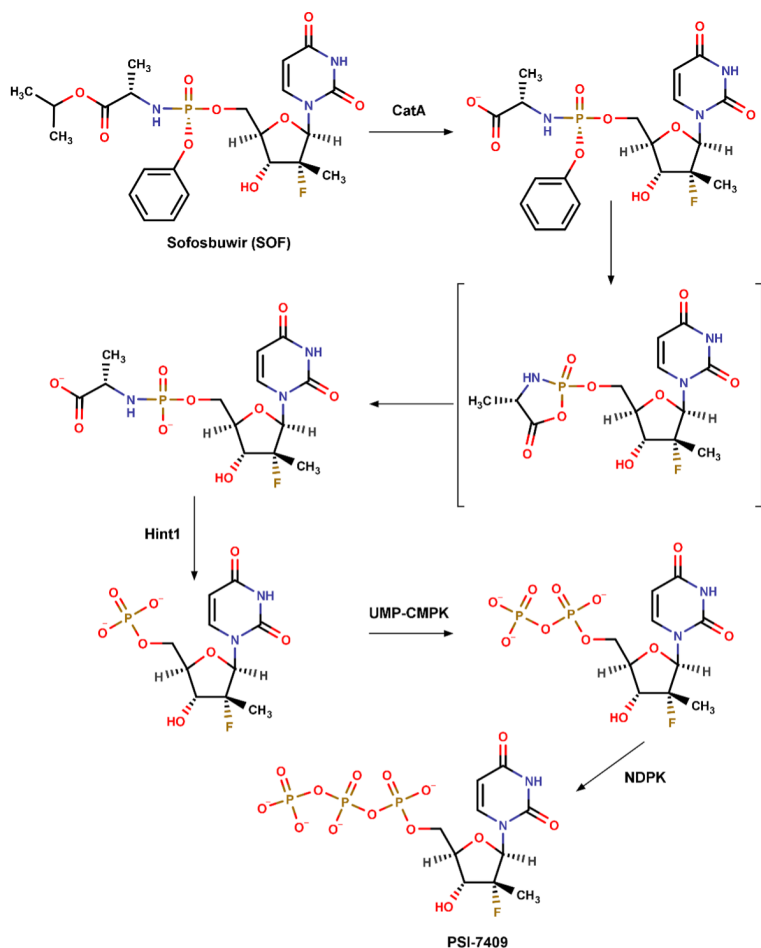
- hydrolizy grupy estrowej przez katepsynę A (w mniejszym stopniu karboksyestrazę 1),
- spontanicznej hydrolizy estru fosforanowego fenolu,
- hydrolizy wiązania fosforamidowego przez białko Hint1 (ang. *histidine triad nucleotide-binding protein 1*),
- fosforylacji przez kinazę CMP/UMP,
- fosforylacji przez kinazę difosforanów nukleotydów.



Rycina 6. Wzory szkieletowe omawianych inhibitorów polimerazy NS5B [opracowanie własne]

Proces aktywacji SOF przedstawiono na Rycinie 7. SOF wykazuje wysokie powinowactwo do tkanki wątrobowej i nie jest wykrywalny w osoczu po podaniu. Mutacje niosące oporność mają znikome znaczenie kliniczne, próg oporności uznawany jest za wysoki. [135, 136] Choć możliwe jest skuteczne stosowanie SOF w monoterapii lub z RBV albo z RBV i pegyłowymi IFN, to jeszcze wyższą skuteczność wykazują jego połączenia z innymi DAA, np.: daklataswirem (DCV – inhibitor NS5A) albo SMV. Obecnie dostępne są jednotabletkowe połączenia z ledypaswirem (LDV – inhibitor NS5A), z welpataswirem (VEL) i z VEL/VOX. [135, 137, 138]

Powodów, dla których SOF jest jedynym nukleotydowym inhibitorem NS5B dopuszczonym do obrotu można dopatrywać się w wyjątkowej skuteczności, dobrym profilu bezpieczeństwa oraz pozornym braku możliwości poprawy jakichkolwiek parametrów działania tego leku w wyniku modyfikacji strukturalnych. [135]



Rycina 7. Schemat aktywacji enzymatycznej SOF do PSI-7409. CatA – katepsyna A; Hint1 – *histidine triad nucleotide-binding protein 1*; UMP-CMPK – kinaza CMP/UMP; NDPK – kinaza difosforanów nukleotydów [opracowanie własne]

Nienukleotydowe inhibitory polimerazy NS5B oddziałują poza miejscem aktywnym polimerazy. W przeciwieństwie do odwrotnej transkryptazy HIV, gdzie odnaleziono jedno miejsce wiązania allosterycznych inhibitorów,

screeningi potencjalnych inhibitorów polimerazy NS5B wykazały istnienie w niej kilku miejsc, gdzie wiązać się mogą działające allosterycznie inhibitory, a mianowicie dwa miejsca w domenie kciuka i dwa miejsca w domenie dłoni. Nienukleotydowe inhibitory polimerazy w przeciwieństwie do nukleotydowych wykazują ograniczoną aktywność, wymuszającą stosowanie w kombinacji z innymi DAA i wąski zakres działania wobec różnych genotypów wirusa, ze względu na wysoką zmienność miejsc allosterycznych – szeroki zakres aktywności osiągnięto jedynie dla inhibitorów miejsca II dłoni. Postępy w opracowywaniu pangenotypowych leków z grupy inhibitorów NS5A, NS3/4A oraz wynalezienie SOF sprawiły, że nienukleotydowe inhibitory NS5B nie mają obecnie zbyt istotnego znaczenia. [27]

Jedynym dopuszczonym przez EMA i FDA lekiem z kategorii nienukleotydowych inhibitorów polimerazy NS5B jest dazabuwir (DSV). Jego wzór strukturalny przedstawia Rycina 6. W Unii Europejskiej dopuszczenie z 2015 roku było niezależne od innych leków DAA (choć wskazanie do stosowania dotyczy jedynie schematu terapeutycznego DSV+OBV/PTV/r), zaś w Stanach Zjednoczonych lek ten dostępny był w tabletkach pakowanych razem z jednotabletkowym połączeniem OBV/PTV/r od 2014 roku oraz w jednotabletkowym połączeniu o przedłużonym uwalnianiu z OBV/PTV/r w latach 2016–2019. Do leczenia w określonych sytuacjach klinicznych włącza się RBV. [105, 139–141] DSV stosowany jest jedynie w terapii zakażenia GT1 wirusa. Łączy się w miejscu allosterycznym dłoni I. Uważa się, że DSV hamuje inicjację syntezy RNA przez tworzenie trzeciorzędowego kompleksu z RNA i enzymem. [27, 142]

Można dodać, że w Japonii dopuszczony został inny nienukleotydowy inhibitor polimerazy NS5B – beklabuwir, łączący się w miejscu kciuka I, dostępny jest w kombinacji z daklataswirem (DCV) i asunaprewirem. [143]

4.3. Inhibitory NS5A

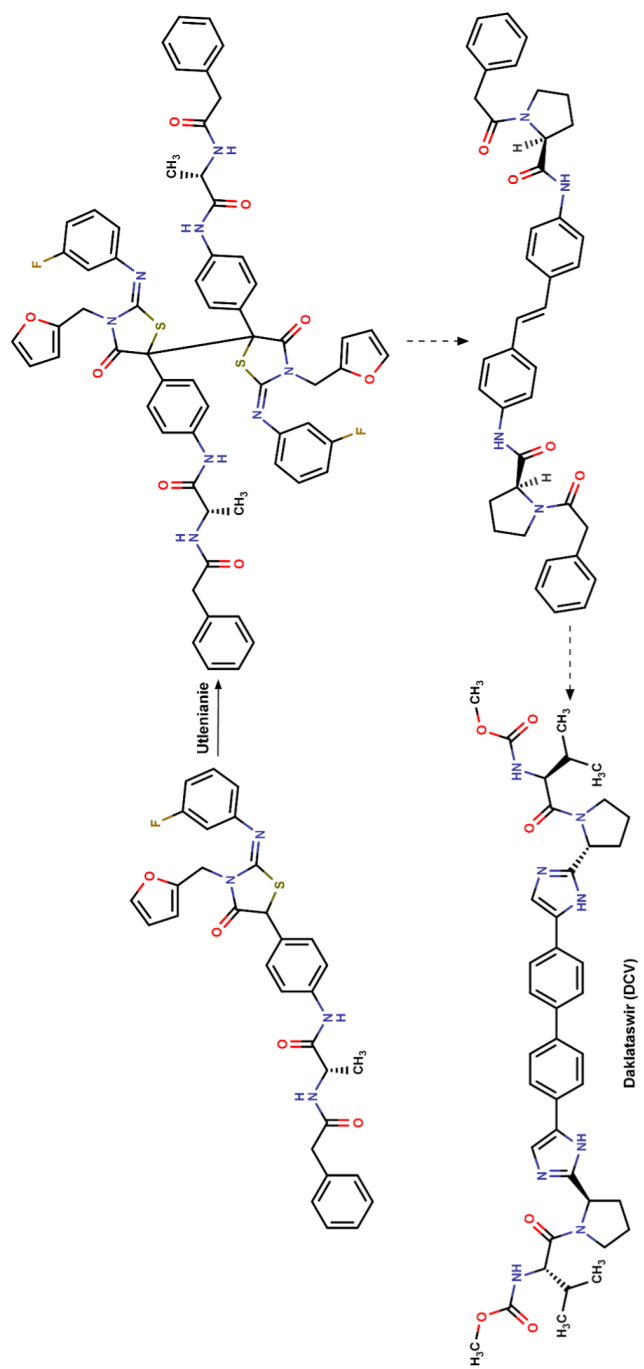
Inhibitory białka NS5A są najsilniejszymi lekami przeciwwirusowymi stosowanymi w terapii WZW C. Pierwsze cząsteczki tego typu przedstawiono w 2009 roku. [144] Wysoka siła działania (obserwowana *in vitro* już w stężeniach pikomolowych i gdy liczba cząsteczek NS5A przewyższa stężenie inhibitora), zdolność do szybkiej redukcji wirerii, pangenotypowa aktywność, szeroki indeks terapeutyczny i niewielkie działania niepożądane sprawiły, że inhibitory NS5A są obecnie kluczowym elementem terapii zakażenia HCV, pomimo tego, że jako białko pozbawione funkcji enzymatycznych, NS5A

nie jest typowym celem leków przeciwwirusowych. Brak aktywności enzymatycznej utrudniał znacząco ustalenie mechanizmu działania tej grupy leków i rozróżnienie działania na białko oraz jego ludzkie kinazy, których inhibicja mogłaby wiązać się z działaniami niepożądanymi. Jednocześnie, utrudniało to samo odkrycie leków, bowiem badanie aktywności tych substancji musiało być prowadzone w układach zawierających komórki. Działanie inhibitorów NS5A może być związane z tworzeniem wielocząsteczkowych agregatów tego białka i uniemożliwieniem tworzenia nowych kompleksów replikacyjnych, zmianą wewnątrzkomórkowej dystrybucji tego białka, modulacją fosforylacji, blokowaniem tworzenia centrów replikacji wirusa i blokowaniem transferu RNA wirusa do wirionów. Najistotniejszą wadą większości inhibitorów NS5A jest relatywna łatwość powstawania mutacji niosących oporność na tę grupę leków, co wymusza stosowanie w terapii łączonej. [145, 146]

Pierwszym wprowadzonym do obrotu inhibitorem NS5A był daklataswir (DCV). EMA dopuściła go do obrotu w 2014 roku, a FDA w 2015 roku. [147] W Stanach Zjednoczonych dopuszczenie dotyczyło terapii GT1 i GT3 wirusa, w Unii Europejskiej dodatkowo GT4. [147–149] Mimo to, aktywność *in vitro* DCV wykazuje wobec wszystkich genotypów wirusa. Zrezygnowano z przedłużenie dopuszczenia z racji powstania bardziej efektywnych terapii. [150] Symetryczna struktura DCV i innych związków z rodziny inhibitorów NS5A wiąże się z obserwacją, iż aktywność jednego z pierwszych badanych inhibitorów NS5A wiązała się w dużej mierze z oksydacyjną dimeryzacją. Dalsza optymalizacja struktury związku doprowadziła do powstania typowego dla każdego innego inhibitora NS5A planu budowy cząsteczki: [146, 151, 152]

- rdzeń cząsteczki złożony głównie z płaskich aromatycznych pierścieni,
- prolina lub fragment będący jej analogiem połączony wiązaniem peptydowym lub jego izosterem (ugrupowanie imidazolowe) z rdzeniem,
- walina lub jej analog połączona wiązaniem peptydowym z analogiem proliny,
- ugrupowanie metylokarbamidowe na grupie aminowej waliny lub jej analogu.

Najistotniejsze kroki prowadzące do odkrycia DCV przedstawiono na Rycinie 8. Badania kliniczne wykazały, iż choć odpowiedź mierzona w liczbie kopii RNA wirusa w ml krwi na DCV jest szybka, to w przeciągu tygodnia następuje wzrost stężenia wirusowego RNA w wyniku powstawania mutacji niosących oporność. Z tego powodu w UE i USA DCV stosowany był z SOF i, w niektórych wskazaniach, z RBV. [146, 147, 149, 151]

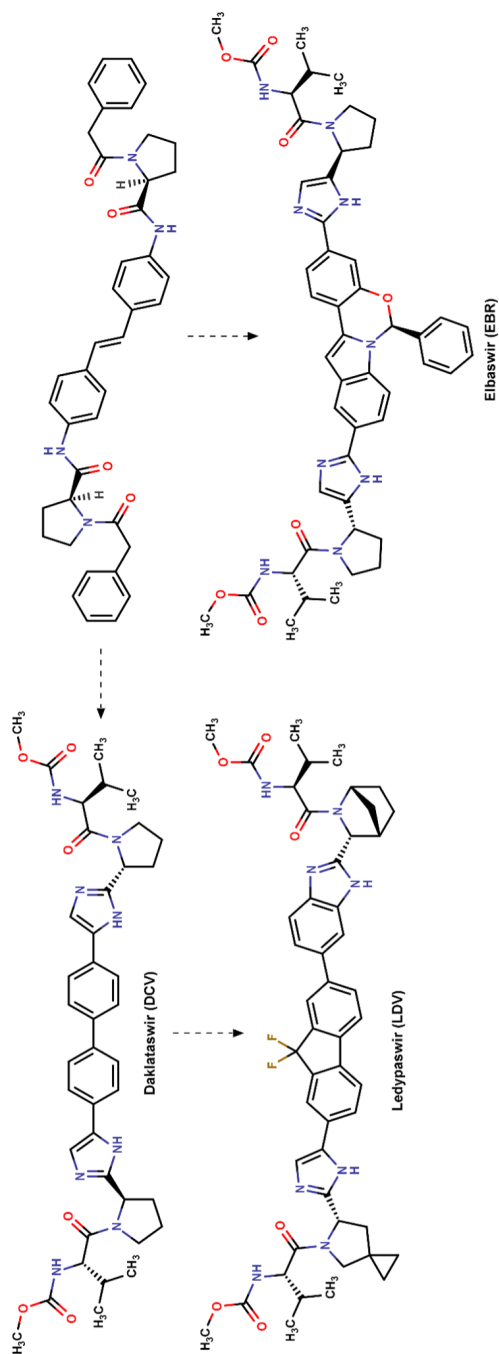


Rycina 8. Najistotniejsze etapy prowadzące do odkrycia daklataswiru (DCV) [opracowanie własne]

Kolejnym dopuszczonym do obrotu lekiem z kategorii inhibitorów NS5A był ledypaswir (LDV). Kombinację z SOF EMA i FDA zatwierdziły w roku 2014. Było to pierwsze jednotabletkowe połączenie leków do stosowania w WZW C, obecny zakres wskazań obejmuje terapię GT1, 4, 5 i 6, wynika bezpośrednio ze skuteczności LDV ograniczonej do tych genotypów. Do leczenia włącza się RBV w niektórych wskazaniach. Niemniej, połączenie jest wskazane do leczenia zakażenia genotypem 3 w Unii Europejskiej, w tym wypadku skuteczność była podobna do terapii samym SOF. [153–156] LDV jest efektem optymalizacji powinowactwa inhibitorów podobnych do DCV do białka NS5A, elementem badań było otrzymani częściowo asymetrycznych cząsteczek, z których jedną był LDV. Wzór strukturalny LDV przedstawia Rycina 8. Skoncentrowanie w czasie badań nad terapią GT1a i 1b doprowadziło do powstania inhibitora bardziej aktywnego, lecz wobec mniejszego zakresu genotypów. [157, 158]

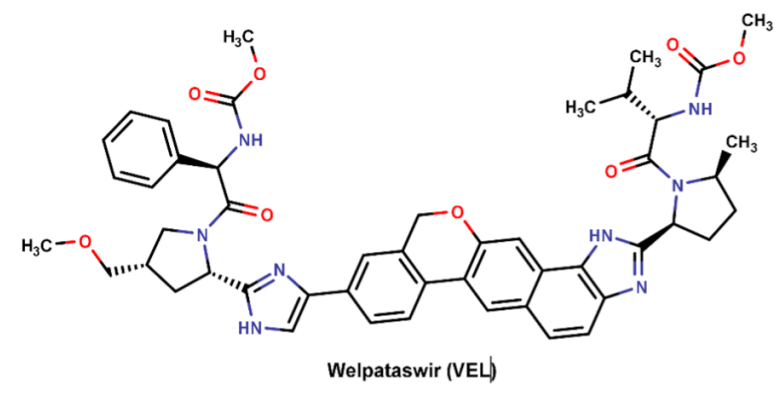
W 2014 roku FDA, a w 2015 roku EMA dopuściły do obrotu jednotabletkowe połączenie PTV/r z kolejnym inhibitorem NS5A – ombitaswirem (OBV). W Stanach Zjednoczonych było ono pakowane i sprzedawane razem z tabletkami zawierającymi DSV, w latach 2016–2019 dostępne było połączenie wszystkich tych leków w tabletkach o przedłużonym uwalnianiu, a w latach 2015–2019 jednotabletkowe połączenie OBV/PTV/r bez DSV. We wskazaniach klinicznych OBV/PTV/r uwzględniono terapię GT1 i 4, DSV był przy tym stosowany w terapii GT1, a w niektórych sytuacjach włączano także RBV. [105, 107–109] OBV wykazuje aktywność *in vitro* wobec wszystkich genotypów z jedynie słabszą aktywnością wobec GT6, zastosowania kliniczne w wypadku innych genotypów ogranicza wąski zakres aktywności genotypowej PTV. OBV ma strukturę symetryczną analogicznie do DCV, asymetrycznym punktem wyjścia była pochodna naftyrydyny, którą przekształcono w związek symetryczny ze względu na odkrycie wysokiej skuteczności symetrycznych inhibitorów. Najistotniejsze etapy prowadzące do opracowania OBV przedstawia Rycina 9. [110, 159]

Elbaswir (EBR) jest inhibitorem NS5A stosowanym w jednotabletkowym połączeniu z inhibitorem proteazy NS3/4A GZR. Dopuszczenie do obrotu przez FDA i przez EMA miało miejsce w 2016 i dotyczy stosowania w terapii GT1 i 4. [111–113] *In vitro* aktywność EBR wykazano wobec GT1–4 wirusa (aktywność *in vitro* GZR jest pangenotypowa). Priorytetem w trakcie opracowywania EBR było uzyskanie inhibitora NS5A o zmniejszonej podatności na mutacje wywołujące oporność. Struktura cząsteczki EBR opiera się na modyfikacji struktury jednego z prototypów DCV, grupę winylową



Rycina 9. Pochodzenie struktur ledypaswiru (LDV) i elbaswiru (EBR) [opracowanie własne]

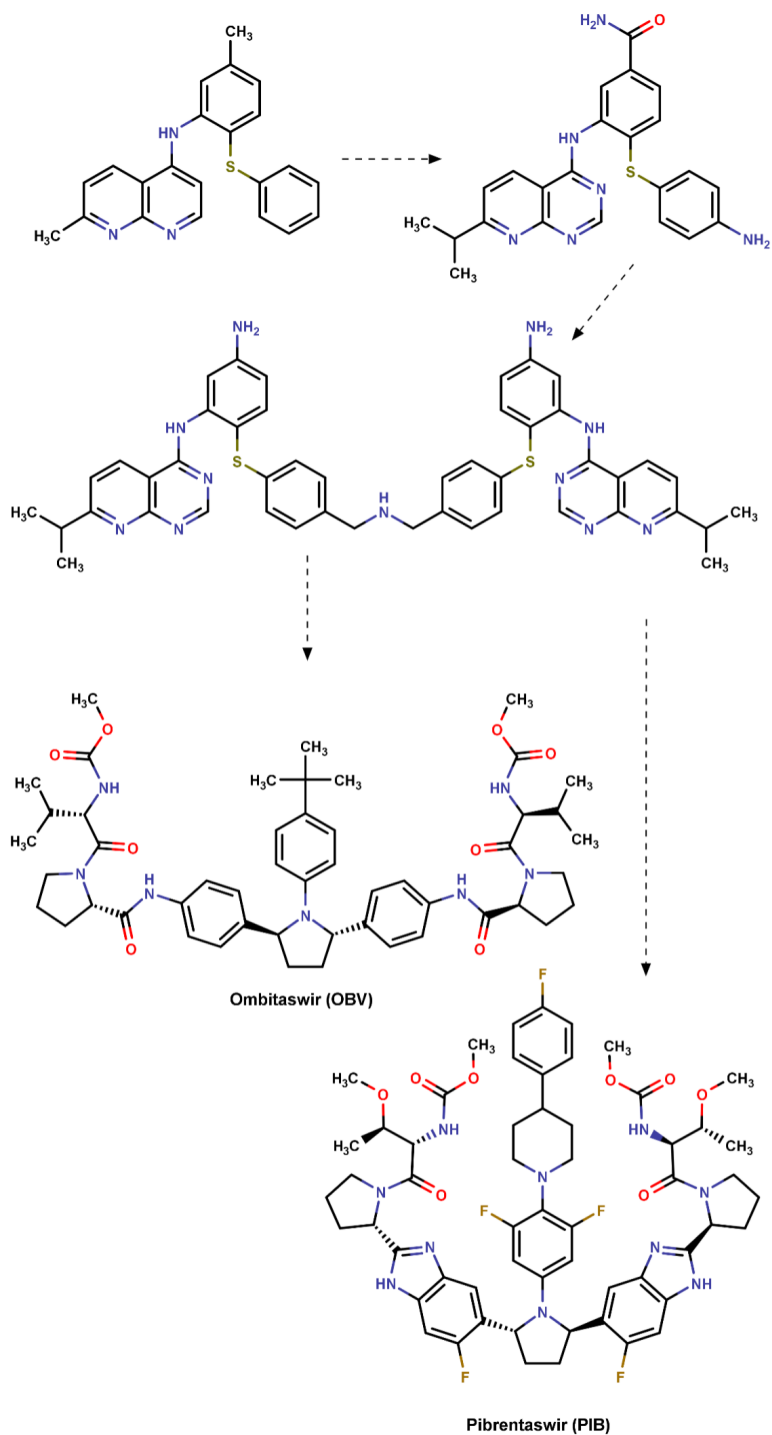
i pierścień aromatyczny zastąpiono ugrupowaniem indolowym, które połączone jest mostkiem wyposażonym w grupę fenylową z drugim pierścieniem aromatycznym. Zostało to przedstawione na Rycinie 9. razem z wzorem strukturalnym EBR. Badania kliniczne wykazały pewne wady EBR, takie jak oporność wariantu 31M genotypu 2 na lek, niska skuteczność w wypadku GT5 i 6 oraz niektórych wariantów genotypu 1, co ogranicza potencjalne zastosowania w leczeniu WZW C. [115, 160, 161]



Rycina 10. Wzór strukturalny welpataswiru (VEL) [opracowanie własne]

FDA i EMA dopuściła do obrotu w 2016 roku kolejny inhibitor NS5A – welpataswir (VEL), w jednotabletkowym połączeniu z SOF. [162, 163] Jednotabletkowe połączenie SOF/VEL/VOX zostało przez te agencje dopuszczone do obrotu w 2017 roku. Kombinacja SOF/VEL stosowana jest w leczeniu zakażeń wszystkimi genotypami wirusa, w niektórych wskazaniach łączona ona jest z RBV. Wskazania do stosowania SOF/VEL/VOX w Unii Europejskiej są podobne, lecz Stanach Zjednoczonych kombinacja z VOX jest stosowana do reterapii osób z nawrotem choroby wszystkich genotypów, jeżeli poprzednie leczenie wykorzystywało inhibitor NS5A, lub GT1a i 3, jeżeli poprzednie leczenie wykorzystywało SOF bez inhibitora NS5A. [71–73] VEL wykazuje pangenotypową aktywność i niższą podatność na mutacje warunkujące oporność. Wzór strukturalny VEL przedstawia Rycina 10. [164, 165]

Ostatnim dopuszczonym do obrotu przez EMA i FDA w 2017 roku inhibitorem NS5A w kombinacji z inhibitorem proteazy NS3/4 GLE był pibrentaswir (PIB). [121, 123] Dopuszczony jest on w terapii i reterapii każdego genotypu wirusa. [121, 122] PIB powstał w wyniku modyfikacji struktury jednego z analogów OBV, jego wzór strukturalny przedstawia Rycina 11. [110] Charakteryzuje się najlepszym profilem odporności na mutacje wywołujące oporność ze wszystkich inhibitorów NS5A. [145, 166]



Rycina 11. Najistotniejsze etapy prowadzące do odkrycia ombitaswiru (OBV) i pibrentaswiru (PIB) [opracowanie własne]

REFERENCJE

1. All 2020 Nobel Prizes - NobelPrize.org. Dostęp: 8.04.2021. <https://www.nobelprize.org/all-2020-nobel-prizes-drawings/>
2. Hoofnagle JH, Mullen KD, Jones DB i in. Treatment of Chronic Non-A, Non-B Hepatitis with Recombinant Human Alpha Interferon. *N Engl J Med.* 1986;315(25):1575–1578. doi:10.1056/NEJM198612183152503
3. Ozaras R, Leblebicioglu H. Global Epidemiology of Chronic Hepatitis C Virus Infection BT - Viral Hepatitis: Chronic Hepatitis C. W: Ozaras R, Salmon-Ceron D, red. Springer International Publishing; 2019:1–24. doi:10.1007/978-3-030-03757-4_1
4. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science (80-)*. 1989;244(4902):359 LP – 362. doi:10.1126/science.2523562
5. Sofia MJ. Perspectives on HCV Cure BT - HCV: The Journey from Discovery to a Cure: Volume II. W: Sofia MJ, red. Springer International Publishing; 2019:491–495. doi:10.1007/7355_2019_65
6. Flisiak R, Halota W, Jaroszewicz J i in. Zalecenia Polskiej Grupy Ekspertów HBV dotyczące leczenia przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu B w 2018 roku. *Hepatologia.* 2018;18:10–21. doi:10.5114/hepatologia.2018.75975
7. Scott N, Wilson DP, Thompson AJ i in. The case for a universal hepatitis C vaccine to achieve hepatitis C elimination. *BMC Med.* 2019;17(1):175. doi:10.1186/s12916-019-1411-9
8. Genus: Hepacivirus - Flaviviridae - Positive-sense RNA Viruses - ICTV. Dostęp: 20.02.2021. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/362/genus-hepacivirus
9. Simmonds P. The Origin of Hepatitis C Virus BT - Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy. W: Bartenschlager R, red. Springer Berlin Heidelberg; 2013:1–15. doi:10.1007/978-3-642-27340-7_1

10. Hedskog C, Parhy B, Chang S i in. Identification of 19 Novel Hepatitis C Virus Subtypes—Further Expanding HCV Classification. *Open Forum Infect Dis.* 2019;6(3). doi:10.1093/ofid/ofz076
11. Roffi L, Redaelli A, Colloredo G i in. Outcome of liver disease in a large cohort of histologically proven chronic hepatitis C: influence of HCV genotype. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2001;13(5):501–506. Dostęp: 20.02.2021. <https://ovidsp.dc2.ovid.com/ovid-b/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=fulltext&D=ovft&AN=00042737=200105000-00007-&CHANNEL-CrossRef>
12. Ripoli M, Paziienza V. Impact of HCV genetic differences on pathobiology of disease. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011;9(9):747–759. doi:10.1586/eri.11.94
13. Bukh J, Miller RRH, Purcell RHR. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: Quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis.* 1995;15(1):41–63. doi:10.1055/s-2007-1007262
14. Halota W, Flisiak R, Juszczyk J i in. Recommendations for the treatment of viral hepatitis C in 2019 by Polish Group of Experts for HCV. *Zakazenia XXI wieku.* 2019;2019(2):61–69. doi:10.31350/zakazenia/2019/2/z2019014
15. Martell M, Esteban JI, Quer J i in. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol.* 1992;66(5):3225 LP – 3229. <http://jvi.asm.org/content/66/5/3225.abstract>
16. Bailey JR, Barnes E, Cox AL. Approaches, Progress, and Challenges to Hepatitis C Vaccine Development. *Gastroenterology.* 2019;156(2):418–430. doi:<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.08.060>
17. Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky J-M. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology.* 2004;39(1):5–19. doi:<https://doi.org/10.1002/hep.20032>
18. Manns MP, Buti M, Gane E i in. Hepatitis C virus infection. *Nat Rev Dis Prim.* 2017;3(1):17006. doi:10.1038/nrdp.2017.6

19. Honda M, Beard MR, Ping L-H, Lemon SM. A Phylogenetically Conserved Stem-Loop Structure at the 5' Border of the Internal Ribosome Entry Site of Hepatitis C Virus Is Required for Cap-Independent Viral Translation. *J Virol.* 1999;73(2):1165 LP – 1174. doi:10.1128/JVI.73.2.1165-1174.1999
20. Moradpour D, Penin F. Hepatitis C Virus Proteins: From Structure to Function BT - Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy. W: Bartenschlager R, red. Springer Berlin Heidelberg; 2013:113–142. doi:10.1007/978-3-642-27340-7_5
21. Douam F, Lavillette D, Cosset F-L. Chapter Three - The Mechanism of HCV Entry into Host Cells. W: Klasse PJBT-P in MB and TS, red. *The Molecular Basis of Viral Infection*. T 129. Academic Press; 2015:63–107. doi:https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2014.10.003
22. Neumann-Haefelin C, Thimme R. Adaptive Immune Responses in Hepatitis C Virus Infection BT - Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy. W: Bartenschlager R, red. Springer Berlin Heidelberg; 2013:243–262. doi:10.1007/978-3-642-27340-7_10
23. Sabo MC, Luca VC, Prentoe J i in. Neutralizing Monoclonal Antibodies against Hepatitis C Virus E2 Protein Bind Discontinuous Epitopes and Inhibit Infection at a Postattachment Step. *J Virol.* 2011;85(14):7005 LP – 7019. doi:10.1128/JVI.00586-11
24. Schregel V, Jacobi S, Penin F, Tautz N. Hepatitis C virus NS2 is a protease stimulated by cofactor domains in NS3. *Proc Natl Acad Sci.* Opublikowano online 11 marzec 2009;pnas.0810950106. doi:10.1073/pnas.0810950106
25. Scheel TKH, Rice CM. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nat Med.* 2013;19(7):837–849. doi:10.1038/nm.3248
26. Sorbo MC, Cento V, Di Maio VC i in. Hepatitis C virus drug resistance associated substitutions and their clinical relevance: Update 2018. *Drug Resist Updat.* 2018;37:17–39. doi:https://doi.org/10.1016/j.drug.2018.01.004
27. Watkins WJ. Evolution of HCV NS5B Non-nucleoside Inhibitors BT - HCV: The Journey from Discovery to a Cure: Volume I. W: Sofia MJ, red. Springer International Publishing; 2019:171–191. doi:10.1007/978-3-319-7355-2_35

28. Atoom AM, Taylor NGA, Russell RS. The elusive function of the hepatitis C virus p7 protein. *Virology*. 2014;462–463:377–387. doi:<https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.04.018>
29. Popescu C-I, Callens N, Trinel D i in. NS2 Protein of Hepatitis C Virus Interacts with Structural and Non-Structural Proteins towards Virus Assembly. Opublikowano online 2011. doi:10.1371/journal.ppat.1001278
30. Xiao F, Wang S, Barouch-Bentov R i in. Interactions between the Hepatitis C Virus Nonstructural 2 Protein and Host Adaptor Proteins 1 and 4 Orchestrate Virus Release. Pietschmann Diane E. TG, red. *MBio*. 2018;9(2):e02233-17. doi:10.1128/mBio.02233-17
31. Ma Y, Anantpadma M, Timpe JM i in. Hepatitis C Virus NS2 Protein Serves as a Scaffold for Virus Assembly by Interacting with both Structural and Nonstructural Proteins. *J Virol*. 2011;85(1):86 LP – 97. doi:10.1128/JVI.01070-10
32. Tripathi LP, Kambara H, Chen Y-A i in. Understanding the Biological Context of NS5A–Host Interactions in HCV Infection: A Network-Based Approach. *J Proteome Res*. 2013;12(6):2537–2551. doi:10.1021/pr3011217
33. Zeisel MB, Felmler DJ, Baumert TF. Hepatitis C Virus Entry BT - Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy. W: Bartenschlager R, red. Springer Berlin Heidelberg; 2013:87–112. doi:10.1007/978-3-642-27340-7_4
34. Timpe JM, Stamatakis Z, Jennings A i in. Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. *Hepatology*. 2008;47(1):17–24. doi:<https://doi.org/10.1002/hep.21959>
35. Lindenbach BD. Virion Assembly and Release BT - Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy. W: Bartenschlager R, red. Springer Berlin Heidelberg; 2013:199–218. doi:10.1007/978-3-642-27340-7_8
36. Lohmann V. Hepatitis C Virus RNA Replication BT - Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy. W: Bartenschlager R, red. Springer Berlin Heidelberg; 2013:167–198. doi:10.1007/978-3-642-27340-7_7
37. Pawlotsky J-M. Hepatitis C virus genetic variability: pathogenic and clinical implications. *Clin Liver Dis*. 2003;7(1):45–66. doi:[https://doi.org/10.1016/S1089-3261\(02\)00065-X](https://doi.org/10.1016/S1089-3261(02)00065-X)

38. Saeed M, Billerbeck E, Rice CM. HCV Molecular Virology and Animal Models BT - HCV: The Journey from Discovery to a Cure: Volume I. W: Sofia MJ, red. Springer International Publishing; 2019:29–68. doi:10.1007/7355_2018_51
39. Jonas MM. Children with hepatitis C. *Hepatology*. 2002;36(5B):s173–s178. doi:<https://doi.org/10.1053/jhep.2002.36799>
40. Goodman ZD, Makhoulf HR, Liu L i in. Pathology of chronic hepatitis C in children: Liver biopsy findings in the Peds-C Trial. *Hepatology*. 2008;47(3):836–843. doi:<https://doi.org/10.1002/hep.22094>
41. Network TEPHCV. Three Broad Modalities in the Natural History of Vertically Acquired Hepatitis C Virus Infection. *Clin Infect Dis*. 2005;41(1):45–51. doi:10.1086/430601
42. Westbrook RH, Dusheiko G. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol*. 2014;61(1):S58–S68. doi:10.1016/j.jhep.2014.07.012
43. van der Meer AJ, Berenguer M. Reversion of disease manifestations after HCV eradication. *J Hepatol*. 2016;65(1, Supplement):S95–S108. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.07.039>
44. Przewlekłe WZW typu C - Choroby wątroby - Choroby - Podręcznik Interna. Dostęp: 8.04.2021. <https://www.mp.pl/interna/chapter/B16.II.7.3>.
45. Farci P, Shimoda A, Coiana A i in. The Outcome of Acute Hepatitis C Predicted by the Evolution of the Viral Quasispecies. *Science (80-)*. 2000;288(5464):339 LP – 344. doi:10.1126/science.288.5464.339
46. Ceci O, Margiotta M, Marelllo F i in. Vertical Transmission of Hepatitis C Virus in a Cohort of 2,447 HIV-Seronegative Pregnant Women: A 24-Month Prospective Study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2001;33(5). https://journals.lww.com/jpgn/Fulltext/2001/11000/Vertical_Transmission_of_Hepatitis_C_Virus_in_a.11.aspx
47. Mast EE, Hwang L-Y, Seto DSY i in. Risk Factors for Perinatal Transmission of Hepatitis C Virus (HCV) and the Natural History of HCV Infection Acquired in Infancy. *J Infect Dis*. 2005;192(11):1880–1889. doi:10.1086/497701

48. Shebl FM, El-Kamary SS, Saleh DA i in. Prospective cohort study of mother-to-infant infection and clearance of hepatitis C in rural Egyptian villages. *J Med Virol.* 2009;81(6):1024–1031. doi:<https://doi.org/10.1002/jmv.21480>
49. Padula D, Rodella A, Spandrio M, Rossini A, Cariani E. Spontaneous Recovery from Perinatal Infection Due to Hepatitis C Virus. *Clin Infect Dis.* 1999;28(1):141–142. doi:10.1086/517177
50. Terilli RR, Cox AL. Immunity and Hepatitis C: A Review. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2013;10(1):51–58. doi:10.1007/s11904-012-0146-4
51. Gower E, Estes C, Blach S, Razavi-Shearer K, Razavi H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J Hepatol.* 2014;61(1):S45–S57. doi:10.1016/j.jhep.2014.07.027
52. Jhaveri R, Swamy G. Hepatitis C virus in pregnancy and Early Childhood: Current understanding and knowledge deficits. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2014;3(SUPPL1):13–18. doi:10.1093/jpids/piu045
53. Zanetti AR, Tanzi E, Semprini AE. Hepatitis C in Pregnancy and Mother-to-Infant Transmission of HCV. W: Mushahwar IKB-T-P in MV, red. *Congenital and Other Related Infectious Diseases of the Newborn.* T 13. Elsevier; 2006:153–171. doi:[https://doi.org/10.1016/S0168-7069\(06\)13009-8](https://doi.org/10.1016/S0168-7069(06)13009-8)
54. Flisiak R, Halota W, Tomasiewicz K, Kostrzevska K, Razavi HA, Gower EE. Forecasting the disease burden of chronic hepatitis C virus in Poland. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2015;27(1). https://journals.lww.com/eurojgh/Fulltext/2015/01000/Forecasting_the_disease_burden_of_chronic.11.aspx
55. Flisiak R, Zarębska-Michaluk D, Janczewska E i in. Treatment of HCV infection in Poland at the beginning of the interferon-free era—the EpiTer-2 study. *J Viral Hepat.* 2018;25(6):661–669. doi:<https://doi.org/10.1111/jvh.12861>
56. Martinot-Peignoux M, Stern C, Maylin S i in. Twelve weeks post-treatment follow-up is as relevant as 24 weeks to determine the sustained virologic response in patients with hepatitis C virus receiving pegylated interferon and ribavirin. *Hepatology.* 2010;51(4):1122–1126. doi:<https://doi.org/10.1002/hep.23444>

57. Pawlowsky JM, Negro F, Aghemo A i in. EASL recommendations on treatment of hepatitis C: Final update of the series☆. *J Hepatol.* 2020;73(5):1170–1218. doi:10.1016/j.jhep.2020.08.018
58. Sarrazin C, Isakov V, Svarovskaia ES i in. Late Relapse Versus Hepatitis C Virus Reinfection in Patients With Sustained Virologic Response After Sofosbuvir-Based Therapies. *Clin Infect Dis.* 2017;64(1):44–52. doi:10.1093/cid/ciw676
59. Milkiewicz Piotr. Elastografia wątroby w codziennej praktyce klinicznej. *Gastroenterol Klin.* 2017;9(1):1–6. Dostęp: 6.04.2021. https://journals.viamedica.pl/gastroenterologia_kliniczna/article/view/55067
60. de Lédinghen V, Vergniol J. Transient elastography (FibroScan). *Gastroentérologie Clin Biol.* 2008;32(6, Supplement 1):58–67. doi:[https://doi.org/10.1016/S0399-8320\(08\)73994-0](https://doi.org/10.1016/S0399-8320(08)73994-0)
61. The French METAVIR Cooperative Study Group, Bedossa P. Intraobserver and Interobserver Variations in Liver Biopsy Interpretation in Patients with Chronic Hepatitis C. *Hepatology.* 1994;20(1):15–20. doi:<https://doi.org/10.1002/hep.1840200104>
62. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 1996;24(2):289–293. doi:<https://doi.org/10.1002/hep.510240201>
63. Standish RA, Cholongitas E, Dhillon A, Burroughs AK, Dhillon AP. An appraisal of the histopathological assessment of liver fibrosis. *Gut.* 2006;55(4):569 LP – 578. doi:10.1136/gut.2005.084475
64. Mannan R, Misra V, Misra SP, Singh PA, Dwivedi M. A Comparative Evaluation of Scoring Systems for Assessing Necro-Inflammatory Activity and Fibrosis in Liver Biopsies of Patients with Chronic Viral Hepatitis. *J Clin Diagnostic Res.* 2014;8(8). doi:10.7860/JCDR/2014/8704.4718
65. Holmberg SD, Lu M, Rupp LB i in. Noninvasive Serum Fibrosis Markers for Screening and Staging Chronic Hepatitis C Virus Patients in a Large US Cohort. *Clin Infect Dis.* 2013;57(2):240–246. doi:10.1093/cid/cit245
66. Lackner C, Struber G, Liegl B i in. Comparison and validation of simple noninvasive tests for prediction of fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2005;41(6):1376–1382. doi:<https://doi.org/10.1002/hep.20717>

67. Klasyfikacja Childa (zmodyfikowana przez Pugh'a) - Skale - Gastrologia - Medycyna Praktyczna dla lekarzy. Dostęp: 8.04.2021. <https://www.mp.pl/gastrologia/skale/201722,klasyfikacja-childa-zmodyfikowana-przez-pugh'a-niewydolnosci-watroby>
68. Kamath PS, Kim WR. The model for end-stage liver disease (MELD). *Hepatology*. 2007;45(3):797–805. doi:<https://doi.org/10.1002/hep.21563>
69. HCV Guidance: Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C. Opublikowano online 21 styczeń 2021. Dostęp: 4.03.2021. https://www.hcvguidelines.org/sites/default/files/full-guidance-pdf/AASLD-IDSA_HCVGuidance_January_21_2021.pdf
70. De Andrea M, Ravera R, Gioia D, Gariglio M, Landolfo S. The interferon system: an overview. *Eur J Paediatr Neurol*. 2002;6:A41–A46. doi:<https://doi.org/10.1053/ejpn.2002.0573>
71. Feld JJ, Hoofnagle JH. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature*. 2005;436(7053):967–972. doi:10.1038/nature04082
72. Malnick SDH, Beergabel M, Lurie Y. Treatment of Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Ann Pharmacother*. 2000;34(10):1156–1164. doi:10.1345/aph.10017
73. Simon K, Juszczyk J, Halota W. Konsensus dotyczący leczenia wirusowego zapalenia wątroby typu C Zakopane, 18 maja 2007 r. Opublikowano online 18 maj 2007. Dostęp: 20.02.2021. http://www.pasl.pl/wp-content/uploads/2014/10/konsensus_hcv.pdf
74. Carithers Jr RL, Emerson SS. Therapy of hepatitis C: Meta-analysis of interferon alfa-2b trials. *Hepatology*. 1997;26(S3):83S–88S. doi:<https://doi.org/10.1002/hep.510260715>
75. Schalm SW, Hansen BE, Chemello L i in. Ribavirin enhances the efficacy but not the adverse effects of interferon in chronic hepatitis C: Meta-analysis of individual patient data from European centers. *J Hepatol*. 1997;26(5):961–966. doi:[https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(97\)80103-1](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(97)80103-1)
76. Neukam K, Macías J, Mira JA, Pineda JA. A review of current anti-HCV treatment regimens and possible future strategies. *Expert Opin Pharmacother*. 2009;10(3):417–433. doi:10.1517/14656560802694481

77. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC i in. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet*. 2001;358(9286):958–965. doi:10.1016/S0140-6736(01)06102-5
78. Zeuzem S, Feinman SV, Rasenack J i in. Peginterferon Alfa-2a in Patients with Chronic Hepatitis C. *N Engl J Med*. 2000;343(23):1666–1672. doi:10.1056/NEJM200012073432301
79. Annex I Summary of Product Characteristics (ViraferonPeg). Opublikowano online 22 styczeń 2021. Dostęp: 21.02.2021. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/viraferonpeg-epar-product-information_en.pdf
80. Annex I Summary of Product Characteristics (Pegasys). Opublikowano online 22 grudzień 2020. Dostęp: 21.02.2021. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/pegasys-epar-product-information_en.pdf
81. Annex I Summary of Product Characteristics (IntronA). Opublikowano online 11 marzec 2020. Dostęp: 21.02.2021. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/introna-epar-product-information_en.pdf
82. Zarębska-Michaluk D. Genotype 3-hepatitis C virus' last line of defense. *World J Gastroenterol*. 2021;27(11):1006–1021. doi:10.3748/wjg.v27.i11.1006
83. Snell NJC. Ribavirin - current status of a broad spectrum antiviral agent. *Expert Opin Pharmacother*. 2001;2(8):1317–1324. doi:10.1517/14656566.2.8.1317
84. Paeshuyse J, Dallmeier K, Neyts J. Ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C virus infection: a review of the proposed mechanisms of action. *Curr Opin Virol*. 2011;1(6):590–598. doi:https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.10.030
85. Annex I Summary of Product Characteristics (Rebetol). Opublikowano online 12 listopad 2019. Dostęp: 21.02.2021. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/rebetol-epar-product-information_en.pdf
86. Label (Incivek-Telaprevir). Opublikowano online 28 październik 2013. Dostęp: 21.02.2021. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/201917s012lbl.pdf

87. Label(Victrelis-Boceprevir). Opublikowano online 30 stycznia 2017. Dostęp: 21.02.2021. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/202258s016lbl.pdf
88. Incivo. Dostęp: 6.03.2021. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/incivo>
89. Victrelis | European Medicines Agency. Dostęp: 6.03.2021. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/victrelis>
90. Annex I Summary of Products Characteristics (Victrelis-Boceprevir). Opublikowano online 31 lipiec 2018. Dostęp: 21.02.2021. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/victrelis-epar-product-information_en.pdf
91. Annex I Summary of Products Characteristics (Incivo-Telaprevir). Opublikowano online 6 październik 2016. Dostęp: 21.02.2021. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/incivo-epar-product-information_en.pdf
92. Georgopapadakou N. Discontinued drugs in 2005: anti-infectives. *Expert Opin Investig Drugs*. 2007;16(1):1–10. doi:10.1517/13543784.16.1.1
93. Mak L-Y, Seto W-K, Lai C-L, Yuen M-F. An update on the toxicological considerations for protease inhibitors used for hepatitis C infection. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2018;14(5):483–491. doi:10.1080/17425255.2018.1472236
94. Rosenquist A, Samuelsson B, Johansson P-OPOP-O i in. Discovery and development of simeprevir (TMC435), a HCV NS3/4A protease inhibitor. *J Med Chem*. 2014;57(5):1673–1693. doi:10.1021/jm401507s
95. Liverton NJ. Evolution of HCV NS3/4a Protease Inhibitors BT - HCV: The Journey from Discovery to a Cure: Volume I. W: Sofia MJ, red. T 10. Springer International Publishing; 2019:231–259. doi:10.1007/7355_2018_39
96. Llinàs-Brunet M, Bailey M, Fazal G i in. Peptide-based inhibitors of the hepatitis C virus serine protease. *Bioorg Med Chem Lett*. 1998;8(13):1713–1718. doi:[https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(98\)00299-6](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(98)00299-6)

97. McDaniel KF, Ku Y-Y, Sun Y i in. The Discovery and Development of HCV NS3 Protease Inhibitor Paritaprevir BT - HCV: The Journey from Discovery to a Cure: Volume I. W: Sofia MJ, red. Springer International Publishing; 2019:389–413. doi:10.1007/7355_2018_42
98. Venkatraman S. Discovery of boceprevir, a direct-acting NS3/4A protease inhibitor for treatment of chronic hepatitis C infections. *Trends Pharmacol Sci.* 2012;33(5):289–294. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.03.012>
99. Kwong AD, Kauffman RS, Hurter P, Mueller P. Discovery and development of telaprevir: an NS3-4A protease inhibitor for treating genotype 1 chronic hepatitis C virus. *Nat Biotechnol.* 2011;29(11):993–1003. doi:10.1038/nbt.2020
100. Label (Olysio-Simeprevir). Opublikowano online 11 wrzesień 2016. Dostęp: 6.03.2021. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/205123s014lbl.pdf
101. Annex I Summary of Product Characteristics (Olysio-Simeprevir). Opublikowano online 23 maj 2018. Dostęp: 22.02.2021. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/olysio-epar-product-information_en.pdf
102. Barrio Gascón C Del, Buti M. The potential role of simeprevir for the treatment of hepatitis C. *Future Virol.* 2015;10(2):67–75. doi:10.2217/fvl.14.108
103. Olysio | European Medicines Agency. Dostęp: 22.02.2021. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/olysio>
104. OLYSIO - Public statement - Withdrawal of the marketing authorisation in the European Union. Opublikowano online 18 maj 2018. Dostęp: 22.02.2021. https://www.ema.europa.eu/en/documents/public-statement/public-statement-olysio-withdrawal-marketing-authorisation-european-union_en.pdf
105. Label (Viekira Pak-ombitasvir/paritaprevir/ritonavir+dasabuvir). Opublikowano online 6 grudzień 2019. Dostęp: 6.03.2021. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/206619s020lbl.pdf
106. Menon RM, Polepally AR, Khatri A, Awni WM, Dutta S. Clinical Pharmacokinetics of Paritaprevir. *Clin Pharmacokinet.* 2017;56(10):1125–1137. doi:10.1007/s40262-017-0520-x

107. Viekirax | European Medicines Agency. Dostęp: 6.03.2021. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/viekirax>
108. Summary of Product Characteristics (Viekirax-Ombitasvir/Paritaprevir/Ritonavir). Opublikowano online 20 październik 2020. Dostęp: 6.03.2021. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/viekirax-epar-product-information_en.pdf
109. Label (Technivie-ombitasvir/paritaprevir/ritonavir). Opublikowano online 6 grudzień 2019. Dostęp: 6.03.2021. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/207931s013lbl.pdf
110. Wagner R, DeGoey DA, Randolph JT, Krueger AC, Matulenko MA, Kati WM. HCV NS5A as an Antiviral Therapeutic Target: From Validation to the Discovery and Development of Ombitasvir and Pibrentasvir as Components of IFN-Sparing HCV Curative Treatments. W: *Topics in Medicinal Chemistry*. T 32. Springer; 2019:133–156. doi:10.1007/7355_2018_50
111. Label (Zepatier-Elbasvir/Grazoprevir). Opublikowano online 11 grudzień 2019. Dostęp: 6.03.2021. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/208261s006lbl.pdf
112. Summary of Product Characteristics (Zepatier-Grazoprevir/Elbasvir). Opublikowano online 8 grudzień 2020. Dostęp: 6.03.2021. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zepatier-epar-product-information_en.pdf
113. Zepatier | European Medicines Agency. Dostęp: 6.03.2021. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/zepatier>
114. McCauley JA, Rudd MT. The Invention of Grazoprevir: An HCV NS3/4a Protease Inhibitor. W: *Topics in Medicinal Chemistry*. T 31. Springer; 2019:355–387. doi:10.1007/7355_2018_41
115. Coburn C. Discovery of Elbasvir. W: *Topics in Medicinal Chemistry*. T 32. Springer; 2019:111–131. doi:10.1007/7355_2018_44
116. Summary of Product Characteristics (Vosevi-Sofosbuvir/Velpatasvir/Voxilaprevir). EMA; 2020. Dostęp: 6.03.2021. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/vosevi-epar-product-information_en.pdf
117. Vosevi | European Medicines Agency. Dostęp: 6.03.2021. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/vosevi>

118. Label (Vosevi-Sofosbuvir/Velpatasvir/Voxilaprevir). Opublikowano online 15 listopad 2019. Dostęp: 6.03.2021. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/209195s003lbl.pdf
119. Taylor JG. Discovery of Voxilaprevir (GS-9857): The Pan-Genotypic Hepatitis C Virus NS3/4A Protease Inhibitor Utilized as a Component of Vosevi® BT - HCV: The Journey from Discovery to a Cure: Volume I. W: Sofia MJ, red. *Topics in Medicinal Chemistry*. T 31. Springer International Publishing; 2019:441–457. doi:10.1007/7355_2018_61
120. Taylor JG, Zipfel S, Ramey K i in. Discovery of the pan-genotypic hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitor voxilaprevir (GS-9857): A component of Vosevi®. *Bioorg Med Chem Lett*. 2019;29(16):2428–2436. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.03.037>
121. Label (Mavyret-Glecaprevir/Pibrentasvir). Opublikowano online 4 październik 2019. Dostęp: 6.03.2021. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2020/209394s010lbl.pdf
122. Summary of Product Characteristics (Maviret-Glecaprevir/Pibrentasvir). Opublikowano online 3 marzec 2021. Dostęp: 6.03.2021. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/maviret-epar-product-information_en.pdf
123. Maviret | European Medicines Agency. Dostęp: 6.03.2021. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/maviret>
124. Wang G, Ma J, Jiang LJL-J i in. Discovery and Development of the Next-Generation HCV NS3 Protease Inhibitor Glecaprevir. W: *Topics in Medicinal Chemistry*. T 31. Springer; 2019:415–440. doi:10.1007/7355_2018_55
125. Arasappan A, Bennett F, Bogen SL i in. Discovery of Narlaprevir (SCH 900518): A Potent, Second Generation HCV NS3 Serine Protease Inhibitor. *ACS Med Chem Lett*. 2010;1(2):64–69. doi:10.1021/ml9000276
126. Meanwell NA, Rajamani R, Scola PM, Sun L-Q. The Discovery and Early Clinical Evaluation of the HCV NS3/4A Protease Inhibitor Asunaprevir (BMS-650032) BT - HCV: The Journey from Discovery to a Cure: Volume I. W: Sofia MJ, red. Springer International Publishing; 2019:317–354. doi:10.1007/7355_2018_58

127. McCauley JA, McIntyre CJ, Rudd MT i in. Discovery of Vaniprevir (MK-7009), a Macrocyclic Hepatitis C Virus NS3/4a Protease Inhibitor. *J Med Chem.* 2010;53(6):2443–2463. doi:10.1021/jm9015526
128. Lawitz E, Sulkowski M, Jacobson I i in. Characterization of vaniprevir, a hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitor, in patients with HCV genotype 1 infection: Safety, antiviral activity, resistance, and pharmacokinetics. *Antiviral Res.* 2013;99(3):214–220. doi:https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.05.015
129. Kneteman NM, Howe AYM, Gao T i in. HCV796: A selective non-structural protein 5B polymerase inhibitor with potent anti-hepatitis C virus activity In Vitro, in mice with chimeric human livers, and in humans infected with hepatitis C virus. *Hepatology.* 2009;49(3):745–752. doi:https://doi.org/10.1002/hep.22717
130. Gentile I, Buonomo AR, Zappulo E, Borgia G. Discontinued drugs in 2012 – 2013: hepatitis C virus infection. *Expert Opin Investig Drugs.* 2015;24(2):239–251. doi:10.1517/13543784.2015.982274
131. Cho A. Evolution of HCV NS5B Nucleoside and Nucleotide Inhibitors BT - HCV: The Journey from Discovery to a Cure: Volume I. W: Sofia MJ, red. Springer International Publishing; 2019:117–139. doi:10.1007/7355_2018_36
132. Sovaldi | European Medicines Agency. Dostęp: 22.02.2021. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/sovaldi>
133. Label (Sovaldi-Sofosbuvir). Opublikowano online 5 marzec 2021. Dostęp: 7.03.2021. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2020/204671s017,212480s002lbl.pdf
134. Murakami E, Tolstykh T, Bao H i in. Mechanism of Activation of PSI-7851 and Its Diastereoisomer PSI-7977. *J Biol Chem.* 2010;285(45):34337–34347. doi:https://doi.org/10.1074/jbc.M110.161802
135. Sofia MJ, Furman PA. The Discovery of Sofosbuvir: A Liver-Targeted Nucleotide Prodrug for the Treatment and Cure of HCV BT - HCV: The Journey from Discovery to a Cure: Volume I. W: Sofia MJ, red. Springer International Publishing; 2019:141–169. doi:10.1007/7355_2018_37

136. Gentile I, Maraolo AE, Buonomo AR, Zappulo E, Borgia G. The discovery of sofosbuvir: a revolution for therapy of chronic hepatitis C. *Expert Opin Drug Discov.* 2015;10(12):1363–1377. doi:10.1517/17460441.2015.1094051
137. Gane EJ, Stedman CA, Hyland RH i in. Nucleotide Polymerase Inhibitor Sofosbuvir plus Ribavirin for Hepatitis C. *N Engl J Med.* 2013;368(1):34–44. doi:10.1056/NEJMoa1208953
138. Odpowiednie Summary of Product Information opublikowane przez EMA i Label opublikowane przez FDA dla zbyt wielu leków, by cytować je indywidualnie.
139. Label (Viekira XR-Dasabuvir/Ombitasvir/Paritaprevir/Ritonavir). Opublikowano online 6 grudzień 2019. Dostęp: 7.03.2021. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/208624s008lbl.pdf
140. Summary of Product Characteristics (Exviera - Dasabuvir). Opublikowano online 13 październik 2020. Dostęp: 7.03.2021. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/exviera-epar-product-information_en.pdf
141. Exviera | European Medicines Agency. Dostęp: 7.03.2021. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/exviera>
142. El Kassas M, Elbaz T, Hafez E, Wifi MN, Esmat G. Discovery and preclinical development of dasabuvir for the treatment of hepatitis C infection. *Expert Opin Drug Discov.* 2017;12(6):635–642. doi:10.1080/17460441.2017.1322955
143. Gentles RG. Discovery of Beclabuvir: A Potent Allosteric Inhibitor of the Hepatitis C Virus Polymerase BT - HCV: The Journey from Discovery to a Cure: Volume I. W: Sofia MJ, red. Springer International Publishing; 2019:193–228. doi:10.1007/7355_2018_38
144. Lemm JA, O’Boyle D, Liu M i in. Identification of Hepatitis C Virus NS5A Inhibitors. *J Virol.* Opublikowano online 7 październik 2009. doi:10.1128/JVI.01360-09
145. O’Boyle DR, Gao M. NS5A as a Target for HCV Drug Discovery BT - HCV: The Journey from Discovery to a Cure: Volume II. W: Sofia MJ, red. Springer International Publishing; 2019:3–25. doi:10.1007/7355_2018_45

146. Meanwell NA, Belema M. The Discovery and Development of Daclatasvir: An Inhibitor of the Hepatitis C Virus NS5A Replication Complex BT - HCV: The Journey from Discovery to a Cure: Volume II. W: Sofia MJ, red. Springer International Publishing; 2019:27–55. doi:10.1007/7355_2018_47
147. Label (Daklinza-Daclatasvir). Opublikowano online 16 październik 2019. Dostęp: 20.03.2021. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/206843s008lbl.pdf
148. Daklinza | European Medicines Agency. Dostęp: 22.02.2021. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/daklinza>
149. Annex I Summary of Product Characteristics (Daklinza - Daclatasvir). Opublikowano online 22 sierpień 2019. Dostęp: 22.02.2021. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/daklinza-epar-product-information_en.pdf
150. Important information about the discontinuation of Daklinza. Bristol Myers Squibb. <https://www.bms.com/patient-and-caregivers/our-medicines/discontinuation-of-daklinza.html>
151. Belema M, Nguyen VN, Bachand C i in. Hepatitis C Virus NS5A Replication Complex Inhibitors: The Discovery of Daclatasvir. *J Med Chem.* 2014;57(5):2013–2032. doi:10.1021/jm401836p
152. Belema M, Meanwell NA. Discovery of Daclatasvir, a Pan-Genotypic Hepatitis C Virus NS5A Replication Complex Inhibitor with Potent Clinical Effect. *J Med Chem.* 2014;57(12):5057–5071. doi:10.1021/jm500335h
153. Summary of Product Characteristics (Harvoni-Sofosbuvir/Ledipasvir). Opublikowano online 29 lipiec 2020. Dostęp: 7.03.2021. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/harvoni-epar-product-information_en.pdf
154. Summary of opinion (initial authorisation) [Harvoni-Sofosbuvir/Ledipasvir]. Opublikowano online 26 wrzesień 2014. Dostęp: 7.03.2021. https://www.ema.europa.eu/en/documents/smop-initial/chmp-summary-positive-opinion-harvoni_en.pdf
155. Harvoni | European Medicines Agency. Dostęp: 7.03.2021. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/harvoni>

156. Label (Harvoni-Sofosbuvir/Ledipasvir). Opublikowano online 5 marzec 2020. Dostęp: 7.03.2021. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2020/205834s032,212477s003lbl.pdf
157. Link JO. The Discovery of Ledipasvir (GS-5885): The Potent Once-Daily Oral HCV NS5A Inhibitor in the Single-Tablet Regimen Harvoni® BT - HCV: The Journey from Discovery to a Cure: Volume II. W: Sofia MJ, red. Springer International Publishing; 2019:57–80. doi:10.1007/7355_2019_66
158. Link JO, Taylor JG, Xu L i in. Discovery of Ledipasvir (GS-5885): A Potent, Once-Daily Oral NS5A Inhibitor for the Treatment of Hepatitis C Virus Infection. *J Med Chem.* 2014;57(5):2033–2046. doi:10.1021/jm401499g
159. Stirnimann G. Ombitasvir (ABT-267), a novel NS5A inhibitor for the treatment of hepatitis C. *Expert Opin Pharmacother.* 2014;15(17):2609–2622. doi:10.1517/14656566.2014.972364
160. Brown A, Hézode C, Zuckerman E i in. Efficacy and safety of 12 weeks of elbasvir ± grazoprevir ± ribavirin in participants with hepatitis C virus genotype 2, 4, 5 or 6 infection: The C-SCAPE study. *J Viral Hepat.* 2018;25(5):457–464. doi:<https://doi.org/10.1111/jvh.12801>
161. Landaverde C, Wells J, Hamner R, Goldstein JL. Dual therapy of grazoprevir and elbasvir for the treatment of hepatitis C infection. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2016;10(4):419–429. doi:10.1586/17474124.2016.1147346
162. Epclusa | European Medicines Agency. Dostęp: 7.03.2021. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/epclusa>
163. Label (Epclusa-Sofosbuvir/Velpatasvir). Opublikowano online 14 sierpień 2020. Dostęp: 7.03.2021. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2020/208341s015lbl.pdf
164. Link JO, Taylor JG, Trejo-Martin A i in. Discovery of velpatasvir (GS-5816): A potent pan-genotypic HCV NS5A inhibitor in the single-tablet regimens Vosevi® and Epclusa®. *Bioorg Med Chem Lett.* 2019;29(16):2415–2427. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.04.027>

165. Link JO. The Discovery of Velpatasvir (GS-5816): The Potent Pan-Genotypic Once-Daily Oral HCV NS5A Inhibitor in the Single-Tablet Regimens Epclusa and Vosevi® BT - HCV: The Journey from Discovery to a Cure: Volume II. W: Sofia MJ, red. Springer International Publishing; 2019:81–110. doi:10.1007/7355_2019_67
166. Ng TI, Krishnan P, Pilot-matias T i in. In vitro Antiviral Activity and Resistance Profile of the Next-Generation Hepatitis C Virus NS5A Inhibitor Pibrentasvir. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(5):e02558-16. doi:10.1128/AAC.02558-16

NOWE MOŻLIWOŚCI LECZENIA FARMAKOLOGICZNEGO WIRUSOWEGO ZAPALENIA WĄTROBY TYPU C CZĘŚĆ II – NOWE SCHEMATY TERAPEUTYCZNE

Marcin Goławski, Grzegorz O. Machelski, Jakub Słota, Iwona Jabłońska, Joanna Bączyk

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

Abstrakt:

W leczeniu WZW C nastąpił w ostatnich latach istotny postęp dzięki wprowadzeniu leków z grupy DAA (ang. *directly acting antivirals*). Nowe schematy leczenia pozwalają na krótszą terapię przy zakażeniu każdym genotypem wirusa i szybko stały się leczeniem z wyboru we wszystkich przypadkach zakażenia, zastępując długie leczenie interferonami charakteryzujące się nieakceptowalnymi działaniami niepożądanymi. Ich skuteczność jest bezprecedensowa, aczkolwiek liczba dostępnych opcji terapeutycznych komplikuje dobór terapii. Niejasny profil bezpieczeństwa w niektórych sytuacjach oraz ograniczona dostępność nadal stoją na przeszkodzie w ich najszerszym możliwym stosowaniu. W perspektywie braku szczepionki, DAA są jednym z najistotniejszych czynników, które mogą pozwolić na eliminację WZW C w przyszłości.

Słowa kluczowe: HCV, WZW C, leki

Abstract:

In recent years, significant progress has been made in the treatment of hepatitis C due to the introduction of DAA (directly-acting antivirals). The new treatments allow for shorter therapy of infection with any viral genotype and have quickly become the treatment of choice in all cases of infection replacing lengthy interferon-based therapies characterized by unacceptable side effects. Their efficacy is unprecedented but the number of available treatment options complicates the choice of a particular treatment. An unclear safety profile in some situations and limited availability continue to hinder their widest possible use. In the absence of a vaccine, DAAs are one of the most important factors that may allow for the elimination of hepatitis C in the future.

Keywords: HCV, Hepatitis C, drugs

1. NOWE SCHEMATY LECZENIA PRZEWLEKŁEGO WZW C

Pojawienie się nowych możliwości terapeutycznych zawierających leki omówione w poprzednim rozdziale sprawiło, że dobór terapii przewlekłego WZW C stał się znacznie bardziej skomplikowany. W niniejszym podrozdziale przedstawiono wskazania, w których omawiane preparaty zarejestrowane są w Unii Europejskiej przez Europejską Agencję Leków (ang. *European Medicines Agency*, EMA) i w Stanach Zjednoczonych przez Agencję Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, FDA) uzupełniając je o rekomendacje Polskiej Grupy Ekspertów HCV.

Zgodnie z rekomendacjami Polskiej Grupy Ekspertów HCV, leczeniu powinien podlegać każdy zakażony pacjent, z wyjątkiem pacjentów o małym potencjale życiowym. [1]

W poprzednim rozdziale stosowano następujące skróty: SMV – symeprewir; PTV – parytaprewir; r – rytonawir; GZR – grazoprewir; VOX – woksylaprewir; GLE – glekaprewir; SOF – sofosbuwir; DSV – dazabuwir; DCV – daklataswir; LDV – ledypaswir; EBR – elbaswir; VEL – welpataswir; PIB – pibrentaswir; RBV – rybawiryna; GT – genotyp; SVR12 – trwała odpowiedź wirusologiczna po 12 tygodniach; DAA – leki o bezpośrednim działaniu przeciwwirusowym (ang. *directly-acting antivirals*).

1.1. Preparaty dostępne na rynku

W chwili obecnej na rynku Europejskim i Amerykańskim dostępnych jest łącznie 14 substancji stosowanych doustnie w leczeniu przewlekłego WZW C. Czterech z nich w połączeniach jednotabletkowych. Zestawienie leków z tej kategorii przedstawiono w Tabeli 1. Z racji tego, że DCV został wycofany z obrotu, a SMV nie jest już dostępny w UE, w dalszej części rozdziału omówienie leków DAA będzie je w większości pomijać. Pominięte zostało też wskazanie do stosowania SOF/LDV w zakażeniu GT3 w UE z racji skuteczności podobnej do samego SOF. Należy też zaznaczyć, że terapia z wykorzystaniem SOF+RBV nie jest obecnie zalecana przez Polską Grupę Ekspertów HCV. [1, 2]

Tabela 1. Leki stosowane w leczeniu WZW C dostępne w momencie pisania rozdziału na rynku Europejskim/Amerykańskim. EU – preparat dostępny w Unii Europejskiej, US – preparat dostępny w Stanach Zjednoczonych; EU* – preparat wycofany z obrotu w Unii Europejskiej; US* – preparat wycofany z obrotu w Stanach Zjednoczonych; †dawka w tabletkie dostępna jedynie w Stanach Zjednoczonych; jeśli nie podano inaczej, preparat dostępny jest w formie tabletek [2]

Substancje czynne preparatu	Dostępność	Dostępne dawki w tabletkie/kapsułce/saszetce/ml
SOF	EU/US	200 mg; 400 mg
SOF (granulki)	EU/US	150 mg; 200 mg
SOF/LDV	EU/US	200 mg/45 mg; 400 mg/90 mg
SOF/LDV (granulki)	EU/US	33,75 mg/150 mg; 200 mg/45 mg
SOF/VEL	EU/US	200 mg/50 mg; 400 mg/100 mg
SOF/VEL/VOX	EU/US	400 mg/ 100 mg/ 100 mg
DSV	EU	250 mg
OBV/PTV/r	EU/US*	12,5 mg/75 mg/50 mg
OBV/PTV/r + DSV	US	12,5 mg/75 mg/50 mg + 250 mg
OBV/PTV/DSV/r (tabletki o przedłużonym uwalnianiu)	US*	8,33 mg/50 mg/33,33 mg/200 mg
GLE/PIB	EU/US	100 mg/ 40 mg
GZR/EBR	EU/US	100 mg/ 50 mg
SMV (kapsułki)	EU*/US	150 mg
DCV	EU*/US*	30 mg/60 mg/90 mg†
RBV (kapsułki, w US też tabletki)	EU/US	200 mg
RBV (roztwór doustny)	EU/US*	40 mg/ml

1.2. Dawkowanie

Dziennie dawki substancji dostępnych na rynku przyjmowane u dorosłej populacji przedstawiono w Tabeli 2. Liczbę przyjmowanych tabletek oraz zależność ich przyjmowania od posiłku przedstawiono w Tabeli 3. [2]

Tabela 2. Dzielne dawki substancji dla populacji dorosłej bez wskazań do zmiany dawki. m.c – masa ciała; *schemat dawkowania w lekach wycofanych z obrotu [2]

Substancje czynne preparatu	Dawka dobową	Dzienna liczba dawek
Glekaprewir (GLE)	300 mg/dzień	1
Grazoprewir (GZR)	100 mg/dzień	1
Parytaprewir (PTV)	150 mg/dzień	1
Woksylaprewir (VOX)	100 mg/dzień	1
Sofosbuwir (SOF)	400 mg/dzień	1
Dazabuwir (DSV)	500 mg/dzień 800 mg/dzień*	2 1 o przedłużonym uwalnianiu*
Elbaswir (EBR)	50 mg/dzień	1
Ledypaswir (LDV)	90 mg/dzień	1
Ombitaswir (OBV)	25 mg/dzień	1
Pibrentaswir (PTV) + rytonawir (r)	120 mg/dzień + 50 mg/dzień	1
Welpataswir (VEL)	100 mg/dzień	1
Rybawiryna (RBV)	1000 mg/dzień przy m.c. <75 kg 1200 mg/dzień przy m.c. >75kg	2

Tabela 3. Porównanie dziennej liczby tabletek (zakładając, iż stosowane są tabletki o najwyższej dostępnej zawartości substancji czynnej) i zależności ich przyjmowania od posiłku różnych schematów terapeutycznych w populacji dorosłej w standardowych schematach. m.c – masa ciała [2]

Schemat terapeutyczny	Dzienna liczba tabletek	Przyjmowanie tabletek
SOF/LDV	1	niezależnie od posiłku
SOF/VEL	1	niezależnie od posiłku
SOF/VEL/VOX	1	z posiłkiem
OBV/PTV/r	2	z posiłkiem
OBV/PTV/r+DSV	4	z posiłkiem (DSV niezależnie od posiłku)
GLE/PIB	3	z posiłkiem
GRV/EBR	1	niezależnie od posiłku
RBV (dodawana do niektórych schematów)	5 przy m.c.<75kg 6 przy m.c.>75kg	z posiłkiem

Dawkowanie RBV należy modyfikować w wypadku nietolerancji objawiającej się obniżeniem poziomu hemoglobiny lub podwyższeniu poziomów bilirubiny pośredniej, co przedstawiono w Tabeli 4. W wypadku poprawy parametrów po odstawieniu RBV można wznowić terapię zaczynając od dawki 600 mg/dzień. Dawki RBV we wskazaniach do stosowania razem z DAA są odmienne od tych we wskazaniach do stosowania z IFN w USA. [3–5]

Tabela 4. Zalecenia dotyczące redukcji dawki RBV w zależności od stężenia hemoglobiny u pacjenta we krwi [120, 126, 149]

	Redukcja do 600 mg/dzień	Zaprzestanie podawania RBV
Hemoglobina		
U pacjentów bez choroby serca	<10 g/dl	< 8,5 g/dl
U pacjentów ze stabilną chorobą serca	spadek o ≥ 4 g/dl w ciągu 4 tygodni	< 12 g/dl mimo 4 tygodni terapii zmniejszoną dawką
Bilirubina pośrednia		
	> 5mg/dl	> 4 mg/dl

1.3. Czynniki wpływające na wybór terapii

W wypadku terapii przewlekłego WZW C w trakcie doboru terapii należy podjąć następujące decyzje: [1, 2]

- o wyborze określonego połączenia leków DAA,
- o włączeniu RBV do schematu leczenia,
- o długości leczenia,
- w niektórych wypadkach o dawkowaniu leków.

Czynniki, na podstawie, których dokonuje się wyboru leczenia są: [1, 2]

- genotyp wirusa (1-6), w wypadku GT1 subgenotyp (a lub b),
- poprzednie leczenie – czy pacjent nie był leczony wcześniej interferonami lub lekami DAA, jeżeli tak, to jakie klasy leków zawierał schemat,
- stopień włóknienia wątroby,
- wynik w skali MELD w wypadku biorców przeszczepów,
- występowanie marskości wątroby wyrównanej lub niewyrównanej,
- liczba kopii HCV RNA we krwi,
- wiek chorego,
- eGFR chorego,

- oporność HCV na DAA,
- dostępność i cena DAA.

1.4. Leczenie dorosłych pacjentów nieleczonych wcześniej, bez marskości

Nieleczeni wcześniej pacjenci bez marskości wątroby są najłatwiejszą do wyleczenia grupą, u której stosuje się najkrótsze schematy terapeutyczne. W Tabeli 6. zaprezentowano długości bezinterferonowych schematów w leczeniu różnych genotypów zawierających dostępne obecnie połączenia DAA według wskazań obowiązujących w Europie i Stanach Zjednoczonych. Dopuszczenie do leczenia genotypów innych niż 2 i 3 połączeniem SOF+RBV ma miejsce tylko w Europie i tylko w wypadku nietolerancji IFN. Połączenie SOF/LDV może być skutecznie stosowane w wypadku GT1 przez 8 tygodni, w USA warunkiem jest poziom HCV RNA we krwi <6000000 IU/ml. Schemat SOF/VEL/VOX jest dopuszczony do zastosowania jako pierwsza terapia tylko w UE. Schemat OBV/PTV/r bez RBV można rozważyć u pacjentów nie mogących jej przyjmować według wskazań w USA w terapii GT4. W terapii GT1b z co najwyżej umiarkowanym włóknieniem wątroby wskazania obowiązujące w UE dopuszczają stosowanie schematu OBV/PTV/r+DSV przez 8 tygodni. Według wskazań obowiązujących w USA GZR/EBR należy stosować przez 16 tygodni i dołączyć RBV, gdy wirus o GT1a ma polimorfizmy w pozycjach 28, 30, 31 i 93 białka NS5A. Schemat GZR/EBR według wskazań obowiązujących w UE należy stosować przez 16 tygodni w wypadku GT1a i 4, jeżeli liczba kopii HCV RNA przekracza 800000 IU/ml, a w wypadku GT1a także, jeżeli występują polimorfizmy NS5A skutkujące co najmniej 5-krotnie wyższym EC_{50} *in vitro* dla EBR. [2]

Tabela 6. Schematy leczenia stosowane w leczeniu dorosłych pacjentów nieleczonych wcześniej lekami z grupy DAA bez marskości wątroby. Długość terapii w tygodniach. RBV – włączać RBV do leczenia. * - patrz tekst

Schemat	GT1a	GT1b	GT2	GT3	GT4	GT5	GT6
SOF*	24RBV	24RBV	12RBV	24RBV	24RBV	24RBV	24RBV
SOF/LDV	12*	12*	-	-	12	12	12
SOF/VEL	12	12	12	12	12	12	12
SOF/VEL/VOX*	8	8	8	8	8	8	8
OBV/PTV/r	-	-	-	-	12RBV*	-	-

OBV/PTV/ r + DSV	12RBV	12*	-	-	-	-	-
GLE/PIB	8*	8*	8*	8*	8*	8*	8*
GZR/EBR	12*	12	-	-	12*	-	-

1.5. Leczenie dorosłych pacjentów nieleczonych wcześniej, ze skompensowaną marskością

Leczenie pacjentów ze skompensowaną marskością wątroby (A w klasyfikacji Childa–Pugha) w większości przypomina leczenie pacjentów bez marskości. W Tabeli 7. zaprezentowano długości bezinterferonowych schematów w leczeniu różnych genotypów zawierające dostępne obecnie połączenia DAA według wskazań obowiązujących w Europie i Stanach Zjednoczonych. W wypadku schematu SOF/LDV według wskazań Amerykańskich należy stosować terapię trwającą 12 tygodni, a według wskazań Europejskich można ją prowadzić 12 tygodni z RBV lub też 24 tygodnie bez włączenia RBV, ewentualnie 12 tygodni, gdy ryzyko progresji choroby jest niskie. Według wskazań obowiązujących w EU do schematu SOF/VEL można rozważyć dołączenie RBV w wypadku GT3, a w schemacie SOF/VEL/VOX skrócenie terapii do 8 tygodni. Schemat SOF/VEL/VOX jest dopuszczony do stosowania jako pierwsza terapia tylko w UE. Schemat GZR/EBR według wskazań obowiązujących w UE należy stosować przez 16 tygodni w wypadku GT1a i 4, jeżeli liczba kopii HCV RNA przekracza 800000 IU/ml, a w wypadku GT1a także, jeżeli występują polimorfizmy NS5A skutkujące co najmniej 5-krotnie wyższym EC_{50} *in vitro* EBR. Według zaleceń obowiązujących w USA schemat GZR/EBR należy stosować przez 16 tygodni i dołączyć RBV, gdy wirus GT1a ma polimorfizmy w pozycjach 28, 30, 31 i 93 białka NS5A. [2]

Tabela 7. Schematy leczenia stosowane w leczeniu dorosłych pacjentów nieleczonych wcześniej lekami z grupy DAA ze wyrównaną marskością wątroby. Długość terapii w tygodniach. RBV –włączać RBV do leczenia. * - patrz tekst [2]

Schemat	GT1a	GT1b	GT2	GT3	GT4	GT5	GT6
SOF*	24RBV	24RBV	12RBV	24RBV	24RBV	24RBV	24RBV
SOF/LDV	12(RBV)/ 24*	12(RBV)/ 24*	-	-	12	12	12
SOF/VEL	12	12	12	12*	12	12	12

SOF/VEL/VOX*	12	12	12	12*	12	12	12
OBV/PTV/r	-	-	-	-	12RBV	-	-
OBV/PTV/ r + DSV	24RBV	12	-	-	-	-	-
GLE/PIB	8*	8*	8*	8*	8*	8*	8*
GZR/EBR	12*	12	-	-	12*	-	-

1.6. Leczenie dorosłych pacjentów nieleczonych wcześniej, z niewyrównaną marskością

Możliwości terapeutyczne są węższe w leczeniu pacjentów ze niewyrównaną marskością wątroby (B i C w klasyfikacji Childa-Pugha). Wynika to z przeciwwskazania do stosowania inhibitorów proteazy u tych pacjentów związanego ze zwiększonym ryzykiem śmierci. Schematy leczenia są ponadto dłuższe i zawsze wykorzystują RBV. SOF może być stosowany w wypadku niewyrównanej marskości wątroby jedynie według wskazań obowiązujących w UE, jego skuteczność nie została określona u tej grupy pacjentów. Schemat SOF/LDV w USA dopuszczony jest jedynie w terapii GT1 u pacjentów z niewyrównaną marskością wątroby, w Europie dopuszcza się stosowanie go przez 24 tygodnie bez RBV, gdy pacjent nie toleruje lub nie może jej przyjmować. [2]

Tabela 8. Schematy leczenia stosowane w leczeniu dorosłych pacjentów nieleczonych wcześniej lekami z grupy DAA z niewyrównaną marskością wątroby. Długość terapii w tygodniach. RBV – włączać RBV do leczenia. * - patrz tekst [2]

Schemat	GT1a	GT1b	GT2	GT3	GT4	GT5	GT6
SOF*	24RBV	24RBV	12RBV	24RBV	24RBV	24RBV	24RBV
SOF/LDV	12RBV*	12RBV*	-	-	12RBV*	12RBV*	12RBV*
SOF/VEL	12RBV	12RBV	12RBV	12RBV	12RBV	12RBV	12RBV

W wypadku niewyrównanej marskości (w Europie C w klasyfikacji Childa-Pugha) dawkowanie RBV należy zacząć od 600mg, można je stopniowo podnieść do 1000/1200mg w wypadku dobrej tolerancji i obniżyć w wypadku działań niepożądanych. [2]

1.7. Leczenie dorosłych pacjentów będących biorcami przeszczepu wątroby

Schemat SOF+RBV może być stosowany w leczeniu oczekujących na przeszczep wątroby, aż do samego przeszczepu (w USA wskazana długość takiej terapii to do 48 tygodni). Wskazania w Europie dotyczą także terapii 24 tygodnie po przeszczepie. [2]

Wskazania do stosowania leków DAA zasadniczo są podobne dla biorców przeszczepów wątroby. Tak samo stosuje się schemat SOF/VEL. OMB/PTV/r+DSV należy stosować przez 24 tygodnie. GLE/PIB należy stosować przez 12 tygodni. SOF/LDV należy według wskazań obowiązujących w Europie stosować w połączeniu z RBV, gdy nie można jej zastosować, terapię u pacjentów po przeszczepie wątroby ze skompensowaną marskością wydłuża się do 24 tygodni. Brak zaś wystarczających badań schematów GZR/EBR oraz SOF/VEL/VOX.

RBV u biorców przeszczepu wątroby w Europie z niewyrównaną marskością należy dawkować zaczynając od 600 mg/dzień i dostosowując dawkę do tolerancji tego leku przez pacjenta także w wypadku marskości sklasyfikowanej jako B w klasyfikacji Childa-Pugha. [2]

Zgodnie z rekomendacjami Polskiej Grupy Ekspertów HCV leczenie DAA należy wdrożyć u oczekujących na przeszczep ze skompensowaną niewydolnością wątroby i wynikiem w skali MELD $\leq$ 20. Leczenie może odroczyć konieczność przeszczepu. Terapię w wypadku zaawansowanej niewydolności wątroby (Child-Pugh B i C) należy poprzedzić przeszczepem wątroby, leczenie poprzedza się badaniem HCV RNA i rozpoczyna w ciągu miesiąca od zabiegu. Optymalnymi schematami są GLE/PIB i SOF/VEL. Ze względu na interakcje lekowe, należy monitorować stężenie inhibitorów kalcyneuryny. [1]

1.8. Leczenie pacjentów z niewydolnością nerek

Istnieje niewiele informacji odnośnie bezpieczeństwa stosowania SOF u pacjentów z ciężką (eGFR<30 mL/min/1,73 m²) i schyłkową niewydolnością (wymagającą dializ) nerek. Według wskazań obowiązujących w USA schemat SOF/LDV, SOF/VEL, SOF/VEL/VOX może być stosowany u takich pacjentów bez zmiany dawkowania, lecz w UE schematy te wskazane są w takiej sytuacji najwyżej, gdy brak innych opcji terapeutycznych. [2]

Schematy OBV/PTV/r+DSV, EBR/GZR, GLE/PIB mogą być stosowane bez zmian dawki u pacjentów z jakimkolwiek stopniem niewydolności nerek. [2]

RBV jest przeciwwskazana u pacjentów z $eGFR < 50 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ w USA, w Europie stosuje się redukcję dawki do 200mg dziennie u pacjentów dializowanych i z $eGFR < 30 \text{ mL/min/1,73 m}^2$, a u pacjentów z $eGFR = 30-50 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ stosuje się naprzemiennie dawkę 200 i 400mg w kolejnych dniach terapii. [5, 6]

1.9. Zastosowanie leków DAA w populacji pediatrycznej

We wskazaniach SOF obowiązujących w UE i USA znajduje się terapia pacjentów w wieku od 3 lat w wypadku zakażeń GT2 i 3 w takim samym schemacie jak u dorosłych. W wypadku preparatu SOF/LDV wskazania dla pacjentów starszych, niż 3 lata również są identyczne jak dla pacjentów dorosłych. W celu ułatwienia podaży pacjentom niemogącym zażywać tabletek z racji wieku, preparaty te zarejestrowane są także w formie granulek, które mogą być spożywane zmieszane z jedzeniem. [3, 7–9]

Ponadto, SOF/VEL zarejestrowany jest w terapii pacjentów od 6 roku życia (w USA alternatywnie wających $\geq 17 \text{ kg}$), a GLE/PIB w terapii pacjentów od 12 roku życia (w USA alternatywnie $\geq 45 \text{ kg}$).

Dawkowanie leków u pacjentów pediatrycznych różni się od tego u populacji dorosłej. Przedstawiono je w tabeli 9. [2]

Tabela 9. Zalecane dawkowanie leków DAA stosowanych w leczeniu pacjentów poniżej 18 roku życia według masy ciała. * - w USA alternatywnym warunkiem kwalifikacji do leczenia jest osiągnięcie odpowiedniej masy ciała [2]

Schemat	Minimalny wiek (lata)	<17 kg	17 – 30 kg	17 – 35 kg	$\geq 30 \text{ kg}$	$\geq 35 \text{ kg}$	$\geq 45 \text{ kg}$
SOF	3	150 mg		200 mg		400 mg	
SOF/LDV	3	150/ 33,75 mg		200/ 45 mg		400/ 90 mg	
SOF/VEL	6*		200/ 50 mg		400/ 100 mg		
GLE/PIB	12*						300/ 120 mg

Dawkowanie RBV jest także odmienne dla populacji pediatrycznej, co zostało przedstawione w tabeli 6. W Europie jest obecnie dostępny roztwór doustnych dla pacjentów niemogących przyjmować kapsułek.

Tabela 10. Dawkowanie RBV u pacjentów pediatrycznych [6, 9]

Masa ciała	Dawka dzienna
<47 kg	należy stosować roztwór doustny według odpowiednich wskazań
47 – 49 kg	600 mg
50-65 kg	800 mg
> 65 kg	jak u dorosłych

1.10. Zastosowanie leków DAA w ciąży i w czasie karmienia piersią

Istnieją bardzo ograniczone dane odnośnie stosowania leków z grupy DAA w ciąży i w czasie karmienia piersią, niemniej, nie obserwowano istotnego wpływu tych leków na przebieg ciąży, badania wpływu tych leków na rozród zwierząt również nie wykazały negatywnego działania. Ze względu na relatywnie niskie ryzyko wertykalnej transmisji choroby, dość częste samoistne wyleczenia u dzieci i łagodną progresję choroby oraz ostatecznie możliwość wdrożenia leczenia lekami DAA w późniejszym terminie, wyleczenie ciężarnej w wypadku WZW C nie jest bezwzględnie konieczne. Niemniej, zakażenie wirusem HCV ciężarnej może się wiązać z większym ryzykiem niskiej masy urodzeniowej, przedwczesnego porodu i wad wrodzonych. Niektórzy utrzymują, że leczenie ciężarnych mogłoby przynieść korzyści związane z redukcją transmisji wertykalnej, efektywniejszą eradykacją WZW C i wcześniejszym rozpoczęciem leczenia. [2, 10–13].

Należy podkreślić przy tym, że RBV jest ściśle przeciwwskazana w czasie ciąży. [5, 6]

1.11. Ostre WZW C

Doświadczenia dotyczące leczenia ostrego WZW C są istotnie ograniczone. Niemniej terapia lekami DAA jest skuteczna także w ich wypadku i chociaż leki te nie są zarejestrowane w leczeniu ostrego zakażenia HCV, to Polska Grupa Ekspertów HCV zaleca leczenie ostrego WZW C z wykorzystaniem DAA. [1, 14]

1.12. Reterapia przewlekłego WZW C

W Tabeli 11. przedstawiono wskazania obowiązujące w Europie i USA do stosowania poszczególnych połączeń lekowych w reterapii WZW C. W Europie połączenie SOF/VEL+RBV stosowane przez 24 tygodnie może być rozważone u pacjentów bez innych opcji terapeutycznych. [2]

Tabela 11. Reterapia ostrego WZW C. Długość terapii w tygodniach. RBV – włączać RBV do leczenia. † - wskazanie obowiązujące tylko w Europie; ‡ - wskazanie obowiązujące tylko w USA [2]

Schemat	Poprzednie leczenie	GT	Stan kliniczny pacjenta	Długość terapii
SOF/LDV‡	PegIFN±RBV±inhibitor NS3/4A	1	Bez marskości	12
SOF/LDV‡	PegIFN±RBV±inhibitor NS3/4A	1	Marskość wyrównana	24/12RBV
SOF/LDV‡	PegIFN±RBV±inhibitor NS3/4A	1	Marskość niewyrównana	12RBV
GZR/EBR‡	PegIFN+RBV	1	Jak pacjenci nieleczeni	
GZR/EBR‡	PegIFN±RBV±inhibitor NS3/4A	1	Dowolny	12RBV
GZR/EBR‡	PegIFN+RBV	4	Dowolny	16RBV
SOF/VEL‡	PegIFN+RBV±inhibitor NS3/4A	Jak pacjenci nieleczeni		
OBV/PTV/ r+DSV‡	Interferony	Jak pacjenci nieleczeni		
GLE/PIB‡	Inhibitor NS3/4A bez inhibitora NS5A	1	Dowolny	12
GLE/PIB‡	Inhibitory NS5A+NS3/4A	1	Dowolny	16
GLE/PIB	PegIFN+RBV, SOF+RBV, PegIFN+RBV+SOF	1, 2, 4-6	Bez marskości	8
GLE/PIB	PegIFN+RBV, SOF+RBV, PegIFN+RBV+SOF	1, 2, 4-6	Marskość	12
GLE/PIB	PegIFN+RBV, SOF+RBV, PegIFN+RBV+SOF	3	Dowolny	16
SOF/VEL/ VOX†	Kombinacja DAA	1-6	Dowolny	12
SOF/VEL/ VOX‡	Inhibitor NS5A	1-6	Dowolny	12
SOF/VEL/ VOX‡	SOF bez inhibitora NS5A	1a, 3	Dowolny	12

Polska Grupa Ekspertów HCV zaleca, by chorzy nieskutecznie leczeni IFN i RBV, wliczając w to schematy zawierające też SOF lub inhibitor proteazy, leczeni byli tak jak chorzy nieleczeni wcześniej. Wyjątkiem są pacjenci nieskutecznie leczeni PegIFN+RBV+SOF zakażeni GT3, których podobnie jak pacjentów zakażonych GT3 leczonych SOF+RBV należy poddać terapii schematem pangenotypowym. W wypadku niepowodzenia terapii schematem zawierającym DAA, Polska Grupa Ekspertów HCV zaleca stosowanie SOF/VEL/VOX+RBV przez 24 tygodnie, w wypadku niedostępności można zastosować pozarejestrowany schemat SOF+GLE/PIB+RBV przez 24 tygodnie, ewentualnie dowolny inny schemat niestosowany wcześniej z włączeniem RBV przez 24 tygodnie. Wyjątkiem są chorzy z niewyrównaną marskością wątroby, gdzie rekomenduje się stosowanie SOF/VEL+RBV przez 24 tygodnie. [6] Łącząc leki o wysokim progu oporności, to właśnie schemat SOF+GLE/PIB+RBV stosowany był w szczególnie złożonych przypadkach poprzednich niepowodzeń leczenia z pewnymi sukcesami. [15–17]

2. DZIAŁANIA NIEPOŻĄDANE TERAPII DAA

Obecnie stosowane DAA są z reguły dobrze tolerowane przez pacjentów. Ponieważ leki te stosowane są niemal zawsze w kombinacji, nie zawsze można jednoznacznie ustalić, która substancja odpowiada za obserwowane działanie niepożądane, szczególnie gdy połączenie leków stosowane jest z RBV.

SOF, SOF/LDV, SOF/VEL najczęściej wywołuje zmęczenie, ból głowy, mdłości i bezsenność. Schemat zawierający SOF/VEL/VOX najczęściej wywołuje ból głowy, zmęczenie, biegunkę i nudności. Terapia GLE/PIB najczęściej wykazuje działania niepożądane takie jak ból głowy, zmęczenie i nudności. W wypadku terapii OBV/PTV/r±DSV odnotowuje się zmęczenie, nudności, pokrzywkę i inne reakcje skórne, bezsenność i astenię. Terapia GZR/EBR wywołuje bardzo niewiele działań niepożądanych, z których najczęstsze to zmęczenie i ból głowy. W wypadku terapii pacjentów z marskością wątroby albo zakażonych także wirusem HIV odnotowuje się więcej działań niepożądanych. [2]

Ponadto bezobjawowo podwyższone poziomy ALT i bilirubiny w osoczu odnotowuje się w wypadku terapii OBV/PTV/r±DSV, GZR/EBR, bezobjawowe podwyższenie poziomu bilirubiny u pacjentów leczonych SOF/VEL/VOX oraz GLE/PIB. [2]

2.1. Reaktywacja zakażenia WZW B

Odnotowano śmiertelne przypadki reaktywacji chronicznego zakażenia wirusem HBV o piorunującym przebiegu u pacjentów leczonych lekami DAA przeciwko HCV. Sprawia to, że niezbędne jest oznaczanie HBsAg przed rozpoczęciem terapii, a u pacjentów z ograniczoną funkcją układu odpornościowego (immunosupresja, zakażenie HIV) także anty-HBc-total. W wypadku dodatniego wyniku któregoś z wymienionych testów, niezbędne jest oznaczenie HBV DNA w osoczu przed rozpoczęciem terapii i monitorowanie aktywności ALT w osoczu w czasie jej trwania co 2-4 tygodnie. W wypadku stwierdzenia HBV DNA przed rozpoczęciem terapii, braku spadku ALT i obecności HBV DNA w trakcie terapii, podwyższenia ALT (jeszcze przed wykryciem HBV DNA!) w trakcie terapii do leczenia należy włączyć entekawir lub prolek tenofowiru, jako inhibitory odwrotnej transkryptazy HBV. [1, 18–21].

2.2. Stosowanie inhibitorów NS3/4A u pacjentów z marskością wątroby

Jak już pisano wcześniej, stosowanie inhibitorów proteazy NS3/4A jest przeciwwskazane u pacjentów z niewyrównaną marskością wątroby (B i C w klasyfikacji Child–Pugh). [2] Powodem, występowania działań niepożądanych w marskości jest wątrobowy metabolizm, który w wypadku niewystarczającej aktywności izoenzymów CYP450 prowadzi do zwiększonych stężeń leku w organizmie i hepatotoksyczności. [22] Odnotowywano pogorszenie niewydolności wątroby w wypadku stosowania SMV, prawdopodobnie związane z blokadą transporterów OATP1B1 i MRP2. [23] W wypadku innych inhibitorów NS3/4A nowej generacji również stwierdzono zwiększone ryzyko pogłębienia niewydolności wątroby lub jej zdekompensowania, zwiększona jest też częstość działań niepożądanych. [24] Zasadność tego przeciwwskazania jest jednak kwestionowana. Niektórzy sugerują, że obserwowane działania niepożądane i dekompensacja niewydolności wątroby związane są w dużej mierze z naturalną progresją marskości. [25]

2.3. Rak wątrobowokomórkowy jako konsekwencja stosowania DAA

Według pewnych raportów terapia z wykorzystaniem DAA mogła wywoływać wystąpienie raka wątrobowokomórkowego. Niemniej, dalsze badania wykluczyły taką możliwość i ryzyko wystąpienia raka wątrobowokomórkowego może być niższe po zakończeniu terapii. Leczenie DAA może jednak

zwiększać ryzyko nawrotu raka wątrobowokomórkowego o nasilonej dynamice. [1, 26–29].

2.4. Interakcje lekowe DAA

W Tabeli 12. opisano metabolizm poszczególnych leków stosowanych w terapii WZW C.

Tabela 12. Metabolizm leków stosowanych w terapii WZW C. *BSEP – pompa eksportująca sole kwasów żółciowych. **Enzymy odpowiedzialne za aktywację SOF: CatA – katepsyna A, CES1 – karboksyesteraza 1, HINT1 - *histidine triad nucleotide-binding protein 1*, UMP-CMPK – kinaza CMP/UMP, NDPK – kinaza difosforanów nukleotydów; ***-metabolizm przez hydrolizę wiązań amidowych [2]

Lek	Substrat	Inhibitor
PTV	CYP3A4, słabo: CYP3A5	P-gp, BCRP, UGT1A1, OATP1B1, OATP2B1, OATP1B3
r	OCT1, CYP3A4, słaby: CYP2D6	CYP3A, BCRP, P-gp, UGT1A1, OATP2B1
GZR	OAT1B1, OATP1B3, P-gp, CYP3A	BCRP, słaby: CYP3A
VOX	P-gp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3, CYP3A4, słaby: CYP1A2, CYP2C8	P-gp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3
GLE	słaby: CYP3A, UGT1A1,	P-gp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3, BSEP*
SOF	P-gp, BCRP, CatA, CES1, HINT1, UMP-CMPK, NDPK**	-
DSV	CYP2C8, słaby: CYP3A	P-gp, BCRP, UGT1A1
LDV	P-gp, BCRP	P-gp, BCRP
OBV	***	-
EBR	P-gp, CYP3A	BCRP, słaby: P-gp
VEL	P-gp, BCRP, słaby: CYP2B6, CYP2C8, CYP3A4, OATP1B1, OATP1B3	P-gp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1
PIB	słaby: CYP3A, UGT1A1	P-gp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3, BSEP*

W wypadku terapii SOF obserwowano zagrażające życiu przypadki bradykardii i bloków przewodnictwa przy jednoczesnym podaniu z amiodaronem. [2]

Leki podwyższające pH żołądka negatywnie wpływają na rozpuszczalność LDV i VEL i zmniejszają ich biodostępność. Stosowane dawki antagonistów receptorów H_2 nie mogą przekraczać ekwiwalentu 40 mg famotydyny 2 razy dziennie, a w wypadku inhibitorów pompy protonowej 20 mg omeprazolu.

Według niektórych wytycznych GLE/PIB również nie powinien być łączony z lekami wpływającymi na kwasność soku żołądkowego. OBV/PTV/r zwiększają metabolizm substratów CYP2C9 i CYP1A2. [2]

W czasie leczenia WZW C, konieczne może być dostosowanie dawek blokerów receptora α_1 (prazosyny, silodosyny), leków antyarytmicznych (chinidyna, digoksyna i, gdy nie jest przeciwwskazany, amiodaron), antykoagulantów (apiksaban, dabigatran, edoksaban, riwaroksaban, tikagrelor). Nie należy przy tym w ogóle podawać dabigatranu z GLE/PIB i SOF/VEL/VOX, a edoksabanu z SOF/VEL/VOX. Interakcje lekowe są też powodem, dla którego przeciwwskazana jest podaż leków przeciwpadaczkowych takich jak: amobarbital, karbamazepina, eslikarbazyna, fenobarbital, fenytoina, prymidon i rufinamid, z tym, że rufinamid może być podawany razem z EBR/GZR i GLE/PIB przy odpowiednim monitorowaniu leczenia. Należy zachować ostrożność stosując niektóre leki przeciwnadciśnieniowe z DAA, np.: amlodypinę z LDV/SOF, enalapril z GLE/PIB i SOF/VEL/VOX, olmesartan i telmisartan z GLE/PIB i SOF/VEL/VOX. Aliskiren nie może być stosowany z GLE/PIB. Pimozyd nie może być stosowany z LDV/SOF, EBR/GZR, GLE/PIB. Posakonazol może wchodzić w interakcje z GLE/PIB. Leki immunosupresyjne należy stosować ostrożnie z DAA, cyklosporyna nie może być podawana z EBR/GZR i SOF/VEL/VOX, stężenia takrolimusu muszą być ostrożnie monitorowane w terapii EBR/GZR, SOF/VEL/VOX i GLE/PIB. Stosowanie statyn w czasie terapii DAA może prowadzić do wystąpienia działań niepożądanych związanych ze zmniejszonym metabolizmem pierwszego przejścia w wątrobie, niektóre statyny są przeciwwskazane, np.: rosuwastatyna w terapii SOF/LDV i SOF/VEL/VOX. Etynyloestradiolu nie należy podawać przy stosowaniu GLE/PIB i SOF/VEL/VOX. Bosentan nie może być podawany z EBR/GZR, SOF/VEL, GLE/PIB i SOF/VEL/VOX. W czasie terapii nie można stosować preparatów dziurawca. Ostatecznie, ryfampicyna, ryfabutyna i ryfapentyna także nie mogą być stosowane z DAA. [2, 30]

Poprawa wydolności wątroby w wyniku terapii może skutkować nasileniem metabolizmu leków. Może też skutkować skróceniem INR w czasie terapii antagonistami witaminy K. Obserwuje się też poprawę glikemii u pacjentów z cukrzycą, co może skutkować hipoglikemią po podaniu insuliny lub leków przeciwcukrzycowych. [2]

3. SKUTECZNOŚĆ TERAPII

Skuteczność leku osiągana w badaniach klinicznych z reguły jest wyższa, niż ta odnotowywana później przy zastosowaniu w praktyce klinicznej. Niemniej, skuteczność leków DAA w praktyce okazała się równie wysoka, co w badaniach, które były podstawą do ich rejestracji. [31] W wypadku leków DAA najczęściej raportowanym wskaźnikiem skuteczności jest odsetek pacjentów uzyskujący SVR12.

Dokładne omówienie skuteczności DAA w każdej możliwej sytuacji klinicznej wykracza poza zakres tego rozdziału. Jednoznaczne określenie skuteczności kombinacji lekowych utrudnia fakt, że niejednokrotnie badania kliniczne odbywają się bez grupy nieaktywnego placebo i brak też niejednokrotnie przydatnych porównań *head-to-head* (porównanie jednego schematu terapeutycznego względem innego stosowanego schematu). [32] Dodatkowo, wysoka skuteczność właściwie wszystkich schematów wewnątrz ich odpowiednich wskazań sprawia, że porównywanie ich nastręcza trudności, ponieważ przedziały ufności dla wartości odsetków SVR12 osiągniętych przez pacjentów otrzymywane w analizach i metaanalizach są istotnie szersze, niż różnice między skutecznościami poszczególnych terapii.

Biorąc pod uwagę powyższe trudności, w Tabeli 13. przedstawiono wyniki wybranych metaanaliz. Jak można zauważyć skuteczność leczenia jest niemal zawsze większa, niż 90%, a nawet 95%. Wpływ mutacji warunkujących oporność na leki DAA omówiono w dalszej części pracy. W wypadku ich występowania skuteczność terapii jest niestety znacząco niższa.

Tabela 13. Skuteczność terapii opartych na DAA chronicznego WZW C na podstawie wybranych metaanaliz i przeglądów systematycznych. Nie rozróżniano stosowania RBV

Genotyp(y)	Schemat(y)	Stan kliniczny pacjentów	Wcześniejsze leczenie	% SVR12	Źródło
1, 2, 4	SOF+DCV, SOF/LDV, SOF/VEL, GLE/PIB	-	-	94%	[33]
3	SOF/DCV, SOF/VEL	-	-	89%	[33]
3	GLE/PIB	-	-	95%	[33]
1	SOF/LDV	Marskość	-	97%	[33]
3	SOF/VEL	Marskość	Nie	97%	[33]
3	SOF/VEL	Marskość	Tak	90%	[33]
1	SOF/LDV	HIV	-	96%	[33]

6	SOF/LDV, SOF+DCV, SOF/VEL, GZR/EBR, SOF/VEL/VOX	-	-	95%	[34]
1-6	GZR/EBR, GLE/PIB, OBV/PTV/r±DSV, SOF+DCV, SOF+LDV, SOF	<18 r. życia	-	100%	[35]
1-6	SOF/VEL	-	-	99%	[36]
1	SOF/VEL	Brak marskości	-	99%	[36]
1	SOF/VEL	Marskość	-	98%	[36]
3	SOF/VEL	-	-	95%	[36]
3	SOF/VEL	Marskość	-	91%	[36]
3	SOF/VEL	-	Tak	94%	[36]
1-6	GLE/PIB	-	Tak (DAA)	97%	[37]
1a	GLE/PIB	-	Tak (DAA)	90%	[37]
1-4	GLE/PIB	-	-	97%	[38]
3	GLE/PIB	-	-	99%	[38]
1-4	GLE/PIB	Marskość wyrównana	-	98%	[38]
1-4	GLE/PIB	-	Tak	98%	[38]
1	GZR/EBR	-	-	97%	[39]
1a	GZR/EBR	-	-	96%	[39]

3.1. Efekty terapii

SVR12 i eliminacja wirusa nie oznacza eliminacji wszystkich możliwych konsekwencji WZW C. [40] Ponieważ wprowadzenie DAA do leczenia miało miejsce relatywnie niedawno, brak długoterminowych danych, które w pełni pozwoliłyby ocenić skutki terapii lekami DAA. Jednocześnie, w badaniach tego typu brak grupy kontrolnej, której stan kliniczny można by oceniać w porównaniu do pacjentów poddawanych terapii. [41] Istnieją opracowania dotyczące terapii zawierającej IFN, lecz nie można jednoznacznie określić, czy długoterminowe wyniki takiej terapii są identyczne jak dla DAA. [42]

Udane leczenie DAA (wystąpienie SVR12) jest powiązane z poprawą stanu klinicznego pacjentów z marskością wątroby, obserwuje się poprawę w klasyfikacji Childa-Pugha oraz zaprzestanie spełniania kryteriów kwalifikacji do przeszczepu wątroby. Przeżywalność pacjentów z zaawansowanym włóknieniem i wyrównaną marskością jest bardzo dobra po zakończeniu leczenia,

lecz w wypadku pacjentów z niewyrównaną marskością nadal można spodziewać się istotnej śmiertelności (5,3% w wypadku badania z medianą długości obserwacji 66 tygodni). Obserwuje się poprawę stopnia włóknienia wątroby mierzonego elastograficznie. Wpływ leczenia DAA na występowanie raka wątrobowokomórkowego nie jest jasny. [27, 41, 43–46]

3.2. Niepowodzenie terapii

Niepowodzenie terapii może nastąpić w następujące sposoby:

- brak odpowiedzi – miano HCV RNA nie spada pod wpływem leczenia;
- słaba odpowiedź – miano HCV RNA spada nieznacznie pod wpływem leczenia;
- przełom wirusologiczny – miano HCV RNA wzrasta istotnie jeszcze w trakcie terapii;
- nawrót – miano HCV RNA wzrasta po zakończeniu terapii.

Bardzo częstym powodem niepowodzenia terapii są substytucje związane z opornością (ang. *resistance-associated substitutions*, RAS), które mogą powstać w trakcie terapii lub występować już przed nią. W wypadku samego tylko białka NS5A, RAS wykrywane są w ok. 90% przypadków niepowodzenia terapii, jeżeli stosuje się inhibitor NS5A. [47] RAS zostały omówione w dalszej części rozdziału.

Zdarzają się sytuacje, gdy genotyp jest nieprawidłowo określony, co skutkuje niewłaściwym doбором schematu terapeutycznego. [48, 49]. Terapię DAA jest dobrze tolerowana przez pacjentów, więc zaprzestanie leczenia z powodu działań niepożądanych ma miejsce bardzo rzadko, co kontrastuje z terapią wykorzystującą IFN. [2, 50].

Innymi czynnikami, powiązanymi z niepowodzeniem terapii są: niepowodzenie wcześniejszej terapii, stosowanie nieoptymalnego schematu terapeutycznego (przede wszystkim SOF+RBV), wysokie miano HCV RNA na początku terapii, GT3 wirusa, nieprzyjmowanie przypisanych leków DAA, aktywny i przeżyty nowotwór wątrobowokomórkowy, marskość wątroby oraz wysoki stopień jej zaawansowania, wysoka masa ciała, przyjmowanie innych leków, płeć męska, nadciśnienie tętnicze. [25, 51–53].

4. OPORNOŚĆ PRZECIWKO DAA

Mutacje i polimorfizmy w genach białek NS3, NS5A i NS5B mogą przyczyniać się do zmniejszonej wrażliwości wirusa HCV na leki z grupy DAA. Łatwość powstawania (próg) oporności zależy m.in. od genotypu wirusa i stosowanych leków. Za oporność odpowiadają tzw. substytucje związane z opornością (ang. *resistance-associated substitutions*, RAS) i występują naturalnie lub mogą pojawić się w trakcie leczenia. Zdarza się, że stosuje się odmienną terminologię w zależności od okoliczności wystąpienia wariantu i zakresu oporności, który wywołuje, nie jest to jednak powszechnie stosowane. [54–56] Ponieważ wirus HCV występuje u chorego jako zbiór quasi-gatunków, możliwe jest występowanie RAS tylko u części z nich. Znaczenie kliniczne mają RAS występujące w >15% quasigatunków. [57] Obecność kilku RAS w jednym białku może znacząco zmniejszać podatność wirusa na daną klasę leków. [57] Jednocześnie RAS mogą wystąpić w więcej niż jednym białku, w jednym z badań RAS dla wielu klas leków stwierdzono u 44,3% nieskutecznie leczonych pacjentów. [47]

W chwili obecnej nie stosuje się rutynowo badania lekooporności wirusa HCV. [1] Ograniczone znaczenie oporności w wypadku terapii WZW C można tłumaczyć skończonym czasem leczenia, co skutkuje niskim ryzykiem transmisji opornych wariantów, oraz brakiem trwałego rezerwuaru wirusowego DNA, co sprawia, że pewne quasi-gatunki z RAS, ale o niskiej zdolności do replikacji wypierane są przez te replikujące skuteczniej, lecz podatne. Wyraźnie kontrastuje to z charakterystyką HIV i jego terapii. Ze względu na częstość występowania GT1a, 1b i 3, znacznie więcej wiadomo o ich oporności w porównaniu do innych genotypów. [54]

4.1. Oporność przeciwko inhibitorom proteazy NS3/4A

Oporność na inhibitory proteazy ma niewielkie znaczenie kliniczne. Wypadku terapii SMV oraz IFN i RBV mutacja Q80K dla GT1a przyczynia się do skuteczności terapii podobnej jak samych IFN i RBV. [58] Było to istotne z racji częstego występowania tej mutacji już przed leczeniem (ok. 40%). Negatywny wpływ jest także widoczny w wypadku terapii 12-tygodniowej pacjentów z marskością SMV z SOF lub 8-tygodniowej terapii pacjentów bez marskości. [59] Nie są i nie były to jednak rekomendowane schematy leczenia. Mutacja Q80K nie wydaje się mieć obecnie dużego znaczenia klinicznego, choć odnotowano gorsze wyniki terapii SOF/VEL/VOX u pacjentów

zakażonych wirusem z tą mutacją. Co ciekawe, nie wywołuje ona istotnej oporności na VOX *in vitro*. [60] RAS R155K (występująca przed leczeniem u 0,5-1% pacjentów) GT1a zmniejsza aktywność *in vitro* SMV 90 razy, PTV 40 razy, GZR 3 razy, lecz nie ma istotnego wpływu na siłę działania VOX i GLE. [61–67] RAS R155G/W zmniejszają podatność na VOX, lecz ze względu na małą zdolność do replikacji mutantów nie ma ona znaczenia klinicznego. [66, 68, 69] RAS w pozycji 156 przyczyniają się do szerokiej oporności, lecz niska zdolność do replikacji takich mutantów sprawia, że są one wypierane w momencie zaprzestania terapii. [67, 68, 70] RAS w pozycji D168 GT1 wywołują znaczną oporność na większość inhibitorów proteazy, mniejszą jedynie dla VOX, GLE i do pewnego stopnia GZR. Pojawiają się jedynie w momencie leczenia i są wypierane po jego zaprzestaniu. [63, 64, 67, 68, 71] Dziko występujące polimorfizmy w miejscu 168 prawdopodobnie przyczyniają się do ograniczonej skuteczności wczesnych inhibitorów proteazy (innych niż GZR, VOX, GLE) wobec genotypów innych niż 1, szczególnie GT3. [72] RAS takie jak R123T, I132L dodatkowo zmniejszają skuteczność inhibitorów proteazy w terapii GT3. [57]

Dodatkowo, po niepowodzeniu terapii RAS wykrywane są często także w pozycjach 36, 56. Niepowodzenie terapii SMV mogło się wiązać z wystąpieniem RAS także w pozycjach 43 i 122, a najwyższą oporność wywoływała kombinacja RAS Q80K/R+R155K. Kombinacje RAS w pozycjach 56+168, 89+156, 156+168 wywołują wysoki poziom oporności na GLE. W wypadku GZR kombinacje mutacji w pozycjach 36+156 i 56+168 GT1a wykazują duży poziom oporności *in vitro*. W wypadku PTV wykrywano substytucje w pozycjach 36+80+155 oraz 56+168. [57]

4.2. Oporność przeciwko inhibitorom polimerazy NS5B

SOF charakteryzuje się bardzo wysokim progiem rozwoju oporności. RAS w pozycji S282T zmniejsza 10 razy siłę działania SOF *in vitro*, lecz zdolność do replikacji takich mutantów jest znikoma. Mutacja ta przyczynia się jedynie do 1% niepowodzeń w leczeniu SOF, a przerwanie terapii prowadzi do wyparcia mutantów przez warianty skuteczniej replikujące. Reterapia SOF zwiększa szansę wystąpienia tego RAS. U pacjentów zakażonych GT1 i 3 obserwuje się czasem powstanie RAS L159F wraz z innymi mutacjami, które nie są związane ze zmniejszoną podatnością na SOF *in vitro*. [57, 73–75]

Oporność przeciwko DSV ma małe znaczenie kliniczne, ponieważ jest to lek stosowany tylko w jednym schemacie terapeutycznym. Występuje przy

tym dość łatwo. W wypadku terapii OMB/PTV/r+DSV najczęściej obserwowanymi mutacjami w NS5B są M414T i S556G dla GT1a i S556G w GT1b. [22, 54, 71]

4.3. Oporność przeciwko inhibitorom NS5A

Istotność RAS przeciwko inhibitorom NS5A jest zdecydowanie większa, niż tych przeciwko innym klasom leków stosowanych w zakażeniu HCV.

Po pierwsze, relatywnie często występują one u pacjentów jeszcze przed leczeniem. Szacuje się, że RAS warunkujące oporność $\geq 15\%$ całej puli quasi-gatunków wirusa występują u 13% pacjentów zakażonych GT1a i 18% zakażonych GT1b. W wypadku GT3 oporność może dotyczyć 9-13% pacjentów [76, 77]. GT2 w niemal połowie przypadków wykazuje polimorfizm L31M warunkujący oporność na EBR, co wyklucza schemat zawierający tę substancję z leczenia zakażenia tym genotypem. [77–79] Subgenotypy GT3 inne, niż 3a, naturalnie wykazują RAS warunkujące oporność na wszystkie znane inhibitory NS5A. [80] GT4r często wykazuje naturalnie występujące RAS w białku NS5A, co ogranicza SVR12 uzyskiwany po 12-tygodniowej terapii SOF/LDV do 56% pacjentów. [81] GT6e, nie uwzględniany w zaleceniach, wykazuje oporność na LDV stosowany w terapii GT6. [82]

Po drugie, próg oporności jest niski dla większości inhibitorów NS5A. [70, 83] Po trzecie, odporne mutanty z reguły nie wykazują znacząco obniżonej zdolności do replikacji i nie są wypierane po zaprzestaniu leczenia w wypadku niepowodzenia terapii. [47, 83] Po czwarte, inhibitory NS5A ze względu na zdolność do szybkiej supresji wirerii są komponentą każdego zalecanego obecnie schematu leczenia. [47]

RAS M28A/G/T/V są najczęściej spotykanymi RAS w wypadku GT1a, występują często jeszcze przed leczeniem. Zmniejszają one siłę działania *in vitro* większości inhibitorów NS5A o 10-100 razy, z wyjątkiem EBR (jedynie dla M28T: 7,5 razy), VEL (przykładowo: M28T zmniejsza ją 7,5 razy) oraz PIB (wszystkie zmniejszają ją < 3 razy). [67, 69, 71, 84–86] Warianty w pozycji Q30 wywołują oporność na wiele inhibitorów NS5A, RAS Q30R/H występują u około 3% pacjentów z GT1a. Wariant Q30H wywołuje oporność na DCV, LDV, a Q30R dodatkowo na OBV i EBR. W połączeniu z mutacjami w pozycji L31 i Y93 są często spotykane po niepowodzeniu terapii. [67, 71, 83, 84, 86–90] Polimorfizm A30K występuje w 3-5% przypadkach zakażenia GT3, zmniejsza podatność *in vitro* na VEL 50 razy i występuje u pacjentów nieskutecznie leczonych GLE/PIB, gdzie zmniejsza skuteczność leczenia.

Prawdopodobnie wynika to z tego, że mutanty A30K+Y93H wykazują *in vitro* EC_{50} dla PIB o 70 razy wyższe, niż typ dziki. [67, 77, 90, 91] Polimorfizm L31M występuje u 3% izolatów GT1a i 4-5% izolatów GT1b. Wywołuje on oporność na DCV, EBR, LDV i w mniejszym stopniu na VEL. Występuje też u GT2 z ograniczonym znaczeniem klinicznym (jest powodem, dla którego EBR nie ma zastosowania w terapii tego genotypu). Często jest wykrywany po niepowodzeniu terapii razem z innymi RAS. [67, 70, 79, 84, 86, 88, 90] RAS w pozycji Y93 (szczególnie Y93H) warunkują wysoki poziom oporności GT1a i 3 na wszystkie inhibitory NS5A oprócz PIB, a w wypadku GT1b wysoki lub średni poziom oporności na wszystkie inhibitory NS5A oprócz VEL i PIB. Warianty te występują u 10% pacjentów zakażonych GT1b, 8-10% pacjentów zakażonych GT3, ale <1% w wypadku GT1a. Po niepowodzeniu terapii mutacja Y93H lub N może pojawić w wypadku GT1a, niepowodzenie terapii GT1b i 3 najczęściej związane jest z mutacją Y93H. [67, 76, 77, 84, 86–88, 90]

Inne RAS obserwowane przy niepowodzeniu leczenia występują w pozycjach 24, 32, 58, 92. Niektóre kombinacje kilku RAS w białku NS5A przyczyniają się do zmniejszenia siły działania inhibitorów NS5A o kilka do kilkudziesięciu tysięcy razy (w tym także PIB o wysokiej barierze powstawania oporności). Znaczenie kliniczne rzadziej występujących polimorfizmów i substytucji w sekwencji aminokwasów białka NS5A nie są jasne. [54, 57] Wpływ RAS na EC_{50} *in vitro* poszczególnych inhibitorów NS5A przedstawiono w Tabeli 14.

Tabela 14. Wpływ wybranych RAS na *in vitro* EC_{50} poszczególnych inhibitorów NS5A, dana substytucja zwiększa EC_{50} leku co najmniej lub co najwyżej tyle razy ile podano w tabeli; BD – brak danych [47, 92]

RAS	LDV	VEL	EBR	PIB	OBV
GT1a					
M28T	>x10	<x10	>x1000	<x10	>x1000
M28V	<x10	BD	>x100	<x10	>x10
Q30E	>x1000	<x10	BD	<x10	BD
Q30H	>x100	<x10	<x10	<x10	<x10
Q30K	>x100	<x10	>x10	<x10	>x100
Q30R	>x100	<x10	>x100	<x10	>x100
L31M	>x100	<x10	>x10	<x10	<x10
L31V	>x100	>x10	>x100	<x10	>x100

H58D	>×1000	<×10	>×10	<×10	>×10
Y93C	>×1000	<×10	>×10	<×10	>×100
Y93H	>×1000	>×100	>×100	<×10	>×1000
Y93N	>×1000	>×1000	>×1000	<×10	>×1000
Q30H+Y93H	>×1000	>×1000	BD	>×10	BD
Q30R+Y93H	>×1000	>×10	BD	>×10	>×1000
GT1b					
L31F	<×10	>×10	>×10	<×10	<×10
L31V	BD	<×10	<×10	BD	<×10
Y93H	>×1000	<×10	>×10	<×10	>×10
L31F+Y93H	BD	>×10	BD	<×10	>×1000
L31V+Y93H	>×100	>×100	BD	<×10	>×1000
GT2a					
L31M	>×10	<×10	>×100	<×10	>×10
T24A	BD	BD	BD	<×10	>×10
F28S	BD	BD	BD	<×10	BD
GT3a					
M28T	>×10	<×10	>×10	<×10	>×1000
A30K	BD	>×10	>×10	<×10	BD
L31F	<×10	>×10	>×100	<×10	<×10
Y93H	>×1000	>×100	>×100	<×10	>×1000
GT4a					
L28V	BD	BD	BD	<×10	<×10
GT5a					
L28I	BD	BD	BD	<×10	>×10
L31V	>×100	>×10	>×10	<×10	>×10
L31F	<×10	>×10	>×10	<×10	>×10
GT6a					
L31M	<×10	<×10	<×10	<×10	<×10
L31V	>×100	>×10	>×10	<×10	>×100

4.4. Wpływ początkowej oporności na wynik leczenia

Połączenie EBR/GZR charakteryzuje się bardzo zmienną skutecznością ze względu na występowanie RAS. SVR12 w wypadku 12-tygodniowej terapii nieleczonych wcześniej pacjentów z GT1a bez RBV uzyskano w 98% pacjentów bez RAS dla EBV i tylko 58% pacjentów z RAS takimi jak: M28A/G/T, Q30R/H, L31M/V, Y93C/H/N/S. W wypadku reterapii różnica jest jeszcze

większa (97% vs. 29%). [85, 89].

Wykazano niższą skuteczność połączenia SOF/LDV u pacjentów zakażonych GT1 z RAS dla LDV. Najwyższa różnica dotyczyła pacjentów bez marskości z GT1a poddawanych reterapii bez RBV leczonych 12 tygodni (98% bez RAS, 75% z RAS) oraz u pacjentów z marskością leczonych 12 do 24 tygodni z lub bez RBV (96% vs. 77%). Badania dotyczyły jednak niewielkiej grupy pacjentów z RAS. [87]

Połączenie SOF/VEL bez RBV charakteryzuje się niższą skutecznością w wypadku wystąpienia RAS białka NS5A GT3 (SVR12 w 97% vs. 88% przypadków) u pacjentów leczonych 12 tygodni z marskością lub poddawanych reterapii, ale bez marskości. [93]

GLE/PIB stosowany przez 16 tygodni pozwala na SVR12 u 96% pacjentów z RAS przeciwko inhibitorom NS5A, lecz jedynie u 56% pacjentów z RAS przeciwko zarówno inhibitorom NS5A, jak i inhibitorom proteazy. [94] GLE/PIB stosowany przez 8 tygodni pozwolił na osiągnięcie SVR12 u 98% pacjentów zainfekowanych GT3 bez marskości bez RAS w NS5A, lecz SVR12 osiągnięto tylko w 75% u tych pacjentów z RAS A30K i 91% pacjentów z jakimkolwiek RAS NS5A. W wypadku polimorfizmów białka NS3 GLE/PIB stosowany przez 8 tygodni odznaczał się SVR12 rzędu 86%, lecz w wypadku terapii trwającej 12 tygodni nie było istotnej różnicy pomiędzy skutecznością w grupie pacjentów z RAS w NS3 i bez nich. [95]

Wysokie poziomy trwałej odpowiedzi (97%) wirusologicznej osiągnięto po 12 tygodniach terapii SOF/VEL/VOX w populacji charakteryzującej się nieskutecznym uprzednim leczeniem, gdzie RAS dla NS5A i NS3/4A wykryto u 83% pacjentów. [96]

4.5. Postępowanie w wypadku oporności

Dostępność do badań diagnostycznych pozwalających na badanie oporności na leki wirusa HCV jest ograniczona. W chwili obecnej istnieje tylko jeden komercyjny semiautomatyczny test przeznaczony w tym celu, aczkolwiek istnieją metody opracowane przez indywidualne laboratoria oparte na sekwencjonowaniu lub transfekcji hodowli komórkowych. [97, 98] Z tego powodu dobór terapii na podstawie profilu oporności nie jest uwzględniony w rekomendacjach Polskiej Grupy Ekspertów HCV, a w wypadku niepowodzenia terapii zaleca się postępowanie opisane wcześniej. [1]

Czytelników zainteresowanych tematem leczenia HCV w wypadku oporności poleca się rekomendacje American Association for the Study of Liver

Diseases, Public Health England HCV Resistance Group oraz European Association for the Study of the Liver. [30, 97, 98]

5. DOSTĘPNOŚĆ LEKÓW NOWEJ GENERACJI W POLSCE I NA ŚWIECIE

Istotnym problemem w szerokim stosowaniu leków DAA w Polsce i na świecie jest ich cena, która doprowadza do ograniczenia refundacji leczenia, a co za tym idzie: dostępności. Dzieje się tak, ponieważ DAA podlegają nadal ochronie patentowej. [99]

W Polsce nieodpłatne leczenie przewlekłego WZW C odbywa się na podstawie programu lekowego „Leczenie przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C terapią bezinterferonową”. W ramach niego dostępne są leki SOF/LDV, SOF/VEL, GZR/EBR, GLE/PIB, SOF/VEL/VOX, a także rybawiryna. SOF/LDV może być w ramach programu stosowany jedynie w terapii GT1, a SOF/VEL/VOX w ramach reterapii po niepowodzeniu leczenia z wykorzystaniem inhibitora NS5A. Oprócz oczywistych przeciwwskazań, w ramach programu leczenia mogą być tylko pełnoletni pacjenci, ze stwierdzonym włóknieniem wątroby, niezależni od alkoholu i środków odurzających. Nie są to ograniczenia zgodne z rekomendacjami Polskiej Grupy Ekspertów HCV. Koszt terapii w 2017 opłacany przez NFZ wynosił około kilkudziesięciu tysięcy złotych (np.: 50 771 zł dla SOF/LDV). [1, 100, 101]

Koszt terapii sięgający kilkudziesięciu tysięcy dolarów jest powszechny w krajach rozwiniętych (np.: 19015\$ za terapię GLE/PIB w USA albo 28584\$ za terapię SOF/VEL w Chorwacji). Sprawia to, że dostępność do leczenia jest w wielu miejscach ograniczona. Niemniej, wykazano, że zniesienie ograniczeń w refundacji leczenia DAA przynosi korzyści ekonomiczne. Za pocieszający można uznać fakt, iż w niektórych krajach rozwijających się dostępne są generyczne wersje leków produkowane za zgodą właścicieli nadal obowiązujących patentów, dla których koszt terapii wynosi kilkadziesiąt dolarów. [99, 102–104]

6. PODSUMOWANIE

Choć obecnie dostępne DAA pozwalają na wyleczenie większości pacjentów zakażonych wirusem HCV, oczywiste jest, że powstawanie, selekcja i transmisja wariantów wykazujących oporność, szczególnie przeciwko inhibitorom NS5A, sprawia, że konieczne mogą być nowe strategie leczenia

WZW C. [47, 105, 106] Zbadania wymaga też możliwość stosowania DAA u ciężarnych. [11]. Za niesatysfakcjonujący można uznać fakt, iż PIB (inhibitor NS5A o najwyższym progu oporności) i SOF (lek o bardzo wysokim progu oporności) nie są dostępne w połączeniu jednotabletkowym. [107, 108]

„Strategia globalnego sektora zdrowia w sprawie wirusowego zapalenia wątroby” przyjęta w 2016 r. przez WHO ma na celu sprawienie, że WZW C przestanie być istotnym problemem zdrowotnym i zakłada, iż do 2020 r. 3 miliony osób powinno otrzymać leczenie WZW C, a do 2030 r. 80% kwalifikujących się pacjentów powinno otrzymać leczenie. Optymistycznym jest to, że do końca 2017 r. już 5 milionów osób otrzymało leczenie. [109, 110] Niemniej eliminacja WZW C do roku 2030 lub nawet 2050 jest prawdopodobna tylko w kilkunastu najbardziej rozwiniętych krajach. [111]

Pomimo obecnych problemów z dostępnością leczenia i niejasności, co do terapii, które zostaną rozwiane dopiero w przyszłości, postęp jaki osiągnięto w leczeniu WZW C jest godny odnotowania. [112]

REFERENCJE

1. Halota W, Flisiak R, Juszczak J i in. Recommendations for the treatment of viral hepatitis C in 2019 by Polish Group of Experts for HCV. *Zakazenia XXI wieku*. 2019;2019(2):61–69. doi:10.31350/zakazenia/2019/2/z2019014
2. Odpowiednie Summary of Product Information opublikowane przez EMA i Label opublikowane przez FDA dla zbyt wielu leków, by cytować je indywidualnie.
3. Summary of Product Characteristics (Harvoni-Sofosbuvir/Ledipasvir). Opublikowano online 29 lipiec 2020. Dostęp: 7.03.2021. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/harvoni-epar-product-information_en.pdf
4. Summary of Product Characteristics (Epclusa-Sofosbuvir/Velpatasvir). Opublikowano online 11 grudzień 2020. Dostęp: 7.03.2021. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/epclusa-epar-product-information_en.pdf
5. Label (Rebetol-Ribavirin). Opublikowano online 28 styczeń 2020. Dostęp: 20.03.2021. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2020/020903s056,021546s012lbl.pdf

6. Annex I Summary of Product Characteristics (Rebetol). Opublikowano online 12 listopad 2019. Dostęp: 21.02.2021. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/rebetol-epar-product-information_en.pdf
7. Annex I Summary of Product Characteristics (Sovaldi - Sofosbuvir). Opublikowano online 14 sierpień 2020. Dostęp: 22.02.2021. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/sovaldi-epar-product-information_en.pdf
8. Label (Sovaldi-Sofosbuvir). Opublikowano online 5 marzec 2021. Dostęp: 7.03.2021. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2020/204671s017,212480s002lbl.pdf
9. Label (Harvoni-Sofosbuvir/Ledipasvir). Opublikowano online 5 marzec 2020. Dostęp: 7.03.2021. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2020/205834s032,212477s003lbl.pdf
10. Hughes BL, Page CM, Kuller JA. Hepatitis C in pregnancy: screening, treatment, and management. *Am J Obstet Gynecol.* 2017;217(5):B2–B12. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.07.039>
11. Barritt AS, Jhaveri R. Treatment of Hepatitis C during Pregnancy-Weighing the Risks and Benefits in Contrast to HIV. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2018;15(2):155–161. doi:10.1007/s11904-018-0386-z
12. Mandimika C, Ogbuagu O. Successful sofosbuvir lead-in monotherapy for the treatment of hepatitis C virus (HCV) infection in a pregnant woman living with HIV. *BMJ Case Rep.* 2019;12(10):e230529. doi:10.1136/bcr-2019-230529
13. Chappell CA, Scarsi KK, Kirby BJ i in. Ledipasvir plus sofosbuvir in pregnant women with hepatitis C virus infection: a phase 1 pharmacokinetic study. *The Lancet Microbe.* 2020;1(5):e200–e208. doi:10.1016/S2666-5247(20)30062-8
14. Basu PP, Shah NJ, John N, Aloysius M, Brown RJ. Sofosbuvir and Ledipasvir Versus Sofosbuvir and Simeprevir Combination Therapy in the Management of Acute Hepatitis C: A Randomized Open Label Prospective Clinical Pilot Study. SLAM C Study, Interim Data: 2192. *Off J Am Coll Gastroenterol | ACG.* 2015;110. https://journals.lww.com/ajg/Fulltext/2015/10001/Sofosbuvir_and_Ledipasvir_Versus_Sofosbuvir_and.2192.aspx

15. Dietz J, Di Maio VC, de Salazar A i in. Failure on voxilaprevir, velpatasvir, sofosbuvir and efficacy of rescue therapy. *J Hepatol.* 2021;74(4):801–810. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.11.017>
16. Alimohammadi A, Conway B, Yamamoto L. Glecaprevir/pibrentasvir+sofosbuvir: an optimal retreatment strategy in the setting of HCV NS5A resistance. *BMJ Case Rep.* 2020;13(2):e233098. doi:10.1136/bcr-2019-233098
17. Martin MT, Patel S, Kulik L, Chan C. Glecaprevir/pibrentasvir + sofosbuvir + ribavirin offers high cure rate for hepatitis C virus retreatment in real-world settings. *J Hepatol.* Opublikowano online 2021. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.02.024>
18. Ende AR, Kim NH, Yeh MM, Harper J, Landis CS. Fulminant hepatitis B reactivation leading to liver transplantation in a patient with chronic hepatitis C treated with simeprevir and sofosbuvir: a case report. *J Med Case Rep.* 2015;9(1):164. doi:10.1186/s13256-015-0630-8
19. Bersoff-Matcha SJ, Cao K, Jason M i in. Hepatitis B Virus Reactivation Associated With Direct-Acting Antiviral Therapy for Chronic Hepatitis C Virus: A Review of Cases Reported to the U.S. Food and Drug Administration Adverse Event Reporting System. *Ann Intern Med.* 2017;166(11):792–798. doi:10.7326/M17-0377
20. Collins JM, Raphael KL, Terry C i in. Hepatitis B Virus Reactivation During Successful Treatment of Hepatitis C Virus With Sofosbuvir and Simeprevir. *Clin Infect Dis.* 2015;61(8):1304–1306. doi:10.1093/cid/civ474
21. Vionnet J, Pascual M, Testoni B i in. Late hepatitis B reactivation following direct-acting antiviral-based treatment of recurrent hepatitis C in an anti-HBc-positive liver transplant recipient. *Hepatology.* 2018;67(2):791–793. doi:<https://doi.org/10.1002/hep.29528>
22. Mak L-Y, Seto W-K, Lai C-L, Yuen M-F. An update on the toxicological considerations for protease inhibitors used for hepatitis C infection. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2018;14(5):483–491. doi:10.1080/17425255.2018.1472236
23. Stine JG, Intagliata N, Shah NL i in. Hepatic Decompensation Likely Attributable to Simeprevir in Patients with Advanced Cirrhosis. *Dig Dis Sci.* 2015;60(4):1031–1035. doi:10.1007/s10620-014-3422-x

24. Maan R, van Tilborg M, Deterding K i in. Safety and Effectiveness of Direct-Acting Antiviral Agents for Treatment of Patients With Chronic Hepatitis C Virus Infection and Cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2016;14(12):1821–1830.e6. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cgh.2016.07.001>
25. Berkan-Kawińska A, Piekarska A, Janczewska E i in. Real-world effectiveness and safety of direct-acting antivirals in patients with cirrhosis and history of hepatic decompensation: Epi-Ter2 Study. *Liver Int*. 2021;n/a(January):1–13. doi:<https://doi.org/10.1111/liv.14858>
26. Reig M, Mariño Z, Perelló C i in. Unexpected high rate of early tumor recurrence in patients with HCV-related HCC undergoing interferon-free therapy. *J Hepatol*. 2016;65(4):719–726. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.04.008>
27. Kobayashi M, Suzuki F, Fujiyama S i in. Sustained virologic response by direct antiviral agents reduces the incidence of hepatocellular carcinoma in patients with HCV infection. *J Med Virol*. 2017;89(3):476–483. doi:<https://doi.org/10.1002/jmv.24663>
28. Nault J-C, Colombo M. Hepatocellular carcinoma and direct acting antiviral treatments: Controversy after the revolution. *J Hepatol*. 2016;65(4):663–665. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.07.004>
29. Lack of evidence of an effect of direct-acting antivirals on the recurrence of hepatocellular carcinoma: Data from three ANRS cohorts. *J Hepatol*. 2016;65(4):734–740. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.05.045>
30. HCV Guidance: Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C. Opublikowano online 21 styczeń 2021. Dostęp: 4.03.2021. https://www.hcvguidelines.org/sites/default/files/full-guidance-pdf/AASLD-IDSA_HCVGuidance_January_21_2021.pdf
31. D'Ambrosio R, Degasperis E, Colombo M, Aghemo A. Direct-acting antivirals: the endgame for hepatitis C? *Curr Opin Virol*. 2017;24:31–37. doi:<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.03.017>
32. Zhu G-Q, Zou Z-L, Zheng J-N i in. Systematic Review and Network Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials: Comparative Effectiveness and Safety of Direct-Acting Antiviral Agents for Treatment-Naive Hepatitis C Genotype 1. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(9). https://journals.lww.com/md-journal/Fulltext/2016/03010/Systematic_Review_and_Network_Meta_Analysis_of.78.aspx

33. Zoratti MJ, Siddiqua A, Morassut RE i in. Pangenotypic direct acting antivirals for the treatment of chronic hepatitis C virus infection: A systematic literature review and meta-analysis. *EClinicalMedicine*. 2020;18. doi:10.1016/j.eclinm.2019.12.007
34. Luo A, Xu P, Wang J i in. Efficacy and safety of direct-acting antiviral therapy for chronic hepatitis C genotype 6: A meta-analysis. *Med (United States)*. 2019;98(20). doi:10.1097/MD.00000000000015626
35. Indolfi G, Giometto S, Serranti D i in. Systematic review with meta-analysis: the efficacy and safety of direct-acting antivirals in children and adolescents with chronic hepatitis C virus infection. *Aliment Pharmacol Ther*. 2020;52(7):1125–1133. doi:10.1111/apt.16037
36. Ahmed H, Abushouk AI, Attia A i in. Safety and efficacy of sofosbuvir plus velpatasvir with or without ribavirin for chronic hepatitis C virus infection: A systematic review and meta-analysis. *J Infect Public Health*. 2018;11(2):156–164. doi:https://doi.org/10.1016/j.jiph.2017.09.004
37. Shen C, Fan H, Ge Z i in. Efficacy and Safety of Glecaprevir/Pibrentasvir in HCV Patients With Previous Direct-Acting Antiviral Therapy Failures: A Meta-Analysis. *Front Med*. 2020;7:931. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmed.2020.592472
38. Lampertico P, Carrión JA, Curry M i in. Real-world effectiveness and safety of glecaprevir/pibrentasvir for the treatment of patients with chronic HCV infection: A meta-analysis. *J Hepatol*. 2020;72(6):1112–1121. doi:https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.01.025
39. Ahmed H, Abushouk AI, Menshawy A i in. Meta-Analysis of Grazoprevir plus Elbasvir for Treatment of Hepatitis C Virus Genotype 1 Infection. *Ann Hepatol*. 2018;17(1):18–32. doi:https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.7532
40. Innes H, McDonald S, Hayes P i in. Mortality in hepatitis C patients who achieve a sustained viral response compared to the general population. *J Hepatol*. 2017;66(1):19–27. doi:https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.08.004
41. Kozbial K, Moser S, Al-Zoairy R i in. Follow-up of sustained virological responders with hepatitis C and advanced liver disease after interferon/ribavirin-free treatment. *Liver Int*. 2018;38(6):1028–1035. doi:https://doi.org/10.1111/liv.13629

42. van der Meer AJ, Berenguer M. Reversion of disease manifestations after HCV eradication. *J Hepatol.* 2016;65(1, Supplement):S95–S108. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.07.039>
43. Giannini EG, Crespi M, Demarzo M i in. Improvement in hepatitis C virus patients with advanced, compensated liver disease after sustained virological response to direct acting antivirals. *Eur J Clin Invest.* 2019;49(3):e13056. doi:<https://doi.org/10.1111/eci.13056>
44. Ravaioli F, Conti F, Brillanti S i in. Hepatocellular carcinoma risk assessment by the measurement of liver stiffness variations in HCV cirrhotics treated with direct acting antivirals. *Dig Liver Dis.* 2018;50(6):573–579. doi:<https://doi.org/10.1016/j.dld.2018.02.010>
45. Zavaglia C, Okolicsanyi S, Cesarini L i in. Is the risk of neoplastic recurrence increased after prescribing direct-acting antivirals for HCV patients whose HCC was previously cured? *J Hepatol.* 2017;66(1):236–237. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.08.016>
46. Cammà C, Cabibbo G, Craxì A. Direct antiviral agents and risk for HCC early recurrence: Much ado about nothing. *J Hepatol.* 2016;65(4):861–862. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.04.033>
47. Ceccherini-Silberstein F, Cento V, Di Maio VC, Perno CF, Craxì A. Viral resistance in HCV infection. *Curr Opin Virol.* 2018;32:115–127. doi:<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.10.005>
48. Paolucci S, Premoli M, Ludovisi S, Mondelli MU, Baldanti F. HCV intergenotype 2k/1b recombinant detected in a DAA-treated patient in Italy. *Antivir Ther.* 2017;22(4):365–368. doi:10.3851/IMP3130
49. Dietz J, Susser S, Vermehren J i in. Patterns of Resistance-Associated Substitutions in Patients With Chronic HCV Infection Following Treatment With Direct-Acting Antivirals. *Gastroenterology.* 2018;154(4):976-988.e4. doi:<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.11.007>
50. Ogawa E, Furusyo N, Kajiwar E i in. Evaluation of the adverse effect of premature discontinuation of pegylated interferon α -2b and ribavirin treatment for chronic hepatitis C virus infection: Results from Kyushu University Liver Disease Study. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012;27(7):1233–1240. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2011.06965.x>

51. Chen C-Y, Huang C-F, Cheng P-N i in. Factors associated with treatment failure of direct-acting antivirals for chronic hepatitis C: A real-world nationwide hepatitis C virus registry programme in Taiwan. *Liver Int.* 2021;n/a(n/a). doi:<https://doi.org/10.1111/liv.14849>
52. Calleja JL, Crespo J, Rincón D i in. Effectiveness, safety and clinical outcomes of direct-acting antiviral therapy in HCV genotype 1 infection: Results from a Spanish real-world cohort. *J Hepatol.* 2017;66(6):1138–1148. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.01.028>
53. D'Ambrosio R, Pasulo L, Puoti M i in. Real-world effectiveness and safety of glecaprevir/pibrentasvir in 723 patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2019;70(3):379–387. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.11.011>
54. Wyles DL. Resistance to DAAs: When to Look and When It Matters. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2017;14(6):229–237. doi:10.1007/s11904-017-0369-5
55. Palanisamy N, Kalaghatgi P, Akaberi D i in. Worldwide prevalence of baseline resistance-associated polymorphisms and resistance mutations in HCV against current direct-acting antivirals. *Antivir Ther.* 2018;23(6):485–493. doi:10.3851/IMP3237
56. Kjellin M, Kileng H, Akaberi D i in. Effect of the baseline Y93H resistance-associated substitution in HCV genotype 3 for direct-acting antiviral treatment: real-life experience from a multicenter study in Sweden and Norway. *Scand J Gastroenterol.* 2019;54(8):1042–1050. doi:10.1080/00365521.2019.1652846
57. Sorbo MC, Cento V, Di Maio VC i in. Hepatitis C virus drug resistance associated substitutions and their clinical relevance: Update 2018. *Drug Resist Updat.* 2018;37:17–39. doi:<https://doi.org/10.1016/j.drug.2018.01.004>
58. Jacobson IM, Dore GJ, Foster GR i in. Simeprevir with pegylated interferon alfa 2a plus ribavirin in treatment-naïve patients with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection (QUEST-1): A phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2014;384(9941):403–413. doi:10.1016/S0140-6736(14)60494-3
59. Kwo P, Gitlin N, Nahass R i in. Simeprevir plus sofosbuvir (12 and 8 weeks) in hepatitis C virus genotype 1-infected patients without cirrhosis: OP-TIMIST-1, a phase 3, randomized study. *Hepatology.* 2016;64(2):370–380. doi:10.1002/hep.28467

60. Jacobson IM, Lawitz E, Gan E i in. Efficacy of 8 Weeks of Sofosbuvir, Velpatasvir, and Voxilaprevir in Patients With Chronic HCV Infection: 2 Phase 3 Randomized Trials. *Gastroenterology*. 2017;153(1):113–122. doi:10.1053/j.gastro.2017.03.047
61. Chen Z-W, Li H, Ren H, Hu P. Global prevalence of pre-existing HCV variants resistant to direct-acting antiviral agents (DAAs): Mining the GenBank HCV genome data. *Sci Rep*. 2016;6. doi:10.1038/srep20310
62. Kuntzen T, Timm J, Berical A i in. Naturally occurring dominant resistance mutations to hepatitis C virus protease and polymerase inhibitors in treatment-naïve patients. *Hepatology*. 2008;48(6):1769–1778. doi:10.1002/hep.22549
63. Lenz O, Verbinen T, Lin T-I i in. In vitro resistance profile of the hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitor TMC435. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(5):1878–1887. doi:10.1128/AAC.01452-09
64. Lahser FC, Bystol K, Curry S i in. The combination of grazoprevir, a hepatitis C virus (HCV) NS3/4A protease inhibitor, and elbasvir, an HCV NS5A inhibitor, demonstrates a high genetic barrier to resistance in HCV genotype 1a replicons. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(5):2954–2964. doi:10.1128/AAC.00051-16
65. Pilot-Matias T, Tripathi R, Cohen D i in. In vitro and in vivo antiviral activity and resistance profile of the hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitor ABT-450. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(2):988–997. doi:10.1128/AAC.04227-14
66. Wyles D, Thompson A, Lawitz E i in. No impact of RASs on the high efficacy of SOF/VEL/VOX for 8 weeks in DAA-naïve patients: an integrated resistance analysis of the POLARIS-2 and POLARIS-3 studies. *J Hepatol*. 2017;66(1):S303. doi:10.1016/s0168-8278(17)30924-8
67. Ng T, Lu L, Reisch T i in. Resistance selection using glecaprevir and pibrentasvir in replicons of major hepatitis C virus genotypes. *J Hepatol*. 2017;66(1):S324. doi:10.1016/s0168-8278(17)30972-8
68. Lawitz E, Yang JC, Stamm LM i in. Characterization of HCV resistance from a 3-day monotherapy study of voxilaprevir, a novel pangenotypic NS3/4A protease inhibitor. *Antivir Ther*. 2017;23(4):325–334. doi:10.3851/IMP3202

69. Sarrazin C, Cooper CL, Manns MP i in. No impact of RASs on the high efficacy of SOF/VEL/VOX for 12 weeks in DAA-experienced patients: an integrated resistance analysis of the POLARIS-1 and POLARIS-4 studies. *J Hepatol.* 2017;66(1):S299. doi:10.1016/s0168-8278(17)30915-7
70. Lahser F, Galloway A, Hwang P i in. Interim analysis of a 3-year follow-up study of NS5A and NS3 resistance-associated substitutions after treatment with grazoprevir-containing regimens in participants with chronic HCV infection. *Antivir Ther.* 2018;23(7):593–603. doi:10.3851/IMP3253
71. Smith MA, Lim A. Profile of paritaprevir/ritonavir/ombitasvir plus dasabuvir in the treatment of chronic hepatitis C virus genotype 1 infection. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:6083–6094. doi:10.2147/DDDT.S80226
72. Soumana DI, Kurt Yilmaz N, Ali A, Prachanronarong KL, Schiffer CA. Molecular and Dynamic Mechanism Underlying Drug Resistance in Genotype 3 Hepatitis C NS3/4A Protease. *J Am Chem Soc.* 2016;138(36):11850–11859. doi:10.1021/jacs.6b06454
73. Svarovskaia ES, Dvory Sobol H, Parkin N i in. Infrequent development of resistance in genotype 1-6 hepatitis c virus-infected subjects treated with sofosbuvir in phase 2 and 3 clinical trials. *Clin Infect Dis.* 2014;59(12):1666–1674. doi:10.1093/cid/ciu697
74. Xu S, Doehle B, Rajyaguru S i in. In vitro selection of resistance to sofosbuvir in HCV replicons of genotype-1 to -6. *Antivir Ther.* 2017;22(7):587–597. doi:10.3851/IMP3149
75. Hedskog C, Dvory-Sobol H, Gontcharova V i in. Evolution of the HCV viral population from a patient with S282T detected at relapse after sofosbuvir monotherapy. *J Viral Hepat.* 2015;22(11):871–881. doi:10.1111/jvh.12405
76. Nelson DRDR, Cooper JN, Lalezari JPJP i in. All-oral 12-week treatment with daclatasvir plus sofosbuvir in patients with hepatitis C virus genotype 3 infection: ALLY-3 phase III study. *Hepatology.* 2015;61(4):1127–1135. doi:10.1002/hep.27726
77. Foster GR, Afdhal N, Roberts SK i in. Sofosbuvir and Velpatasvir for HCV Genotype 2 and 3 Infection. *N Engl J Med.* 2015;373(27):2608–2617. doi:10.1056/nejmoa1512612

78. Kwo PYPY, Poordad F, Asatryan A i in. Glecaprevir and pibrentasvir yield high response rates in patients with HCV genotype 1–6 without cirrhosis. *J Hepatol.* 2017;67(2):263–271. doi:10.1016/j.jhep.2017.03.039
79. Brown A, Hézode C, Zuckerman E i in. Efficacy and safety of 12 weeks of elbasvir ± grazoprevir ± ribavirin in participants with hepatitis C virus genotype 2, 4, 5 or 6 infection: The C-SCAPE study. *J Viral Hepat.* 2018;25(5):457–464. doi:https://doi.org/10.1111/jvh.12801
80. Smith D, Magri A, Bonsall D i in. Resistance analysis of genotype 3 hepatitis C virus indicates subtypes inherently resistant to nonstructural protein 5A inhibitors. *Hepatology.* 2019;69(5):1861–1872. doi:https://doi.org/10.1002/hep.29837
81. Shumbusho F, Liu AF, Kateera F i in. Risk factors for difficult-to-treat hepatitis C virus genotype 4r in Rwanda and implications for elimination in sub-Saharan Africa. *J Viral Hepat.* 2021;28(4):682–686. doi:https://doi.org/10.1111/jvh.13467
82. Cheng G, Tian Y, Doehle B i in. In vitro antiviral activity and resistance profile characterization of the hepatitis C virus NS5A inhibitor ledipasvir. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(3):1847–1853. doi:10.1128/AAC.02524-15
83. Wyles D, Mangia A, Cheng W i in. Long-term persistence of HCV NS5A resistance-associated substitutions after treatment with the HCV NS5A inhibitor, ledipasvir, without sofosbuvir. *Antivir Ther.* 2018;23(3):229–238. doi:10.3851/IMP3181
84. Wyles D, Dvory-Sobol H, Svarovskaia ES i in. Post-treatment resistance analysis of hepatitis C virus from phase II and III clinical trials of ledipasvir/sofosbuvir. *J Hepatol.* 2017;66(4):703–710. doi:10.1016/j.jhep.2016.11.022
85. Jules Levin. Prevalence and Impact of Baseline NS5A Resistance-Associated Variants (RAVs) on the Efficacy of Elbasvir/Grazoprevir (EBR/GZR) Against GT1a Infection - 16 Weeks vs 12 weeks. W: *Prevalence and Impact of Baseline NS5A Resistance-Associated Variants (RAVs) on the Efficacy of Elbasvir/Grazoprevir (EBR/GZR) Against GT1a Infection - 16 Weeks vs 12 weeks* . ; 2016. Dostęp: 6.03.2021. https://www.natap.org/2015/AASLD/AASLD_47.htm

86. Wang C, Huang H, Valera L i in. Hepatitis C virus RNA elimination and development of resistance in replicon cells treated with BMS-790052. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(3):1350–1358. doi:10.1128/AAC.05977-11
87. Zeuzem S, Mizokami M, Pianko S i in. NS5A resistance-associated substitutions in patients with genotype 1 hepatitis C virus: Prevalence and effect on treatment outcome. *J Hepatol.* 2017;66(5):910–918. doi:10.1016/j.jhep.2017.01.007
88. Krishnan P, Beyer J, Mistry N i in. In vitro and in vivo antiviral activity and resistance profile of ombitasvir, an inhibitor of hepatitis C virus NS5A. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(2):979–987. doi:10.1128/AAC.04226-14
89. Komatsu TE, Boyd S, Sherwat A i in. Regulatory Analysis of Effects of Hepatitis C Virus NS5A Polymorphisms on Efficacy of Elbasvir and Grazoprevir. *Gastroenterology.* 2017;152(3):586–597. doi:10.1053/j.gastro.2016.10.017
90. Lawitz EJ, Dvory-Sobol H, Doehle BP i in. Clinical resistance to velpatasvir (GS-5816), a novel pan-genotypic inhibitor of the hepatitis C virus NS5A protein. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(9):5368–5378. doi:10.1128/AAC.00763-16
91. Krishnan P, Pilot-Matias T, Schnell G i in. Pooled Resistance Analysis in Patients with Hepatitis C Virus Genotype 1 to 6 Infection Treated with Glecaprevir-Pibrentasvir in Phase 2 and 3 Clinical Trials. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(10):e01249-18. doi:10.1128/AAC.01249-18
92. O’Boyle DR, Gao M. NS5A as a Target for HCV Drug Discovery BT - HCV: The Journey from Discovery to a Cure: Volume II. W: Sofia MJ, red. Springer International Publishing; 2019:3–25. doi:10.1007/7355_2018_45
93. Hezode C, Reau N, Svarovskaia ES i in. Resistance analysis in patients with genotype 1–6 HCV infection treated with sofosbuvir/velpatasvir in the phase III studies. *J Hepatol.* 2018;68(5):895–903. doi:https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.11.032
94. Pilot-Matias T, Krishnan P, Schnell G i in. SAT-204 - Resistance analysis in the MAGELLAN-1 Study (Part 2): glecaprevir/pibrentasvir therapy in HCV-infected patients who had failed prior DAA regimens containing NS3/4A protease and/or NS5A inhibitors. *J*

Hepatol. 2017;66(1, Supplement):S708–S709. doi:[https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(17\)31898-6](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(17)31898-6)

95. Zeuzem S, Foster GR, Wang S i in. Glecaprevir–Pibrentasvir for 8 or 12 Weeks in HCV Genotype 1 or 3 Infection. *N Engl J Med.* 2018;378(4):354–369. doi:10.1056/NEJMoa1702417

96. Bourlière M, Gordon SC, Flamm SL i in. Sofosbuvir, velpat-asvir, and voxilaprevir for previously treated HCV infection. *N Engl J Med.* 2017;376(22):2134–2146. doi:10.1056/NEJMoa1613512

97. Pawlotsky JM, Negro F, Aghemo A i in. EASL recommendations on treatment of hepatitis C: Final update of the series☆. *J Hepatol.* 2020;73(5):1170–1218. doi:10.1016/j.jhep.2020.08.018

98. Bradshaw D, Mbisa JL, Geretti AM i in. Consensus recommendations for resistance testing in the management of chronic hepatitis C virus infection: Public Health England HCV Resistance Group. *J Infect.* 2019;79(6):503–512. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2019.10.007>

99. Grillon C, Krishtel PR, Mellouk O i in. Treatment advocate tactics to expand access to antiviral therapy for HIV and viral hepatitis C in low-to high-income settings: making sure no one is left behind. *J Int AIDS Soc.* 2018;21(S2):e25060. doi:<https://doi.org/10.1002/jia2.25060>

100. *Analiza wpływu na Budżet. Maviret® w leczeniu dorosłych pacjentów z przewlekłym WZW C zakażonych HCV o genotypach 1-6;* 2017. Dostęp: 8.04.2021. https://bipold.aotm.gov.pl/assets/files/zlecenia_mz/2017/170/AW/170_AW_OT_4331_9_MAVIRET_WZW_C_BIA_29.12.2017.pdf

101. Choroby nieonkologiczne - Ministerstwo Zdrowia - Portal Gov.pl. Dostęp: 30.05.2021. <https://www.gov.pl/web/zdrowie/choroby-nieonkologiczne>

102. Barber MJ, Gotham D, Khwairakpam G, Hill A. Price of a hepatitis C cure: Cost of production and current prices for direct-acting antivirals in 50 countries. *J Virus Erad.* 2020;6(3):100001. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jve.2020.06.001>

103. Marshall AD, Pawlotsky J-M, Lazarus J V, Aghemo A, Dore GJ, Grebely J. The removal of DAA restrictions in Europe – One step closer to eliminating HCV as a major public health threat. *J Hepatol.* 2018;69(5):1188–1196. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.06.016>

104. Mennini FS, Marcellusi A, Robbins Scott S i in. The impact of direct acting antivirals on hepatitis C virus disease burden and associated costs in four european countries. *Liver Int.* 2021;n/a(n/a). doi:<https://doi.org/10.1111/liv.14808>
105. Popping S, Verwijs R, Cuypers L i in. Transmission of NS5A-Inhibitor Resistance-Associated Substitutions Among Men Who Have Sex With Men Recently Infected with Hepatitis C Virus Genotype 1a. *Clin Infect Dis.* 2020;71(8):e215–e217. doi:10.1093/cid/ciaa145
106. Abravanel F, Métivier S, Chauveau M, Péron J-M, Izopet J. Transmission of HCV NS5A Inhibitor-Resistant Variants among HIV-Infected Men Who Have Sex with Men. *Clin Infect Dis.* 2016;63(9):1271–1272. doi:10.1093/cid/ciw554
107. Sofia MJ, Furman PA. The Discovery of Sofosbuvir: A Liver-Targeted Nucleotide Prodrug for the Treatment and Cure of HCV BT - HCV: The Journey from Discovery to a Cure: Volume I. W: Sofia MJ, red. Springer International Publishing; 2019:141–169. doi:10.1007/7355_2018_37
108. Wagner R, DeGoey DA, Randolph JT, Krueger AC, Matulenko MA, Kati WM. HCV NS5A as an Antiviral Therapeutic Target: From Validation to the Discovery and Development of Ombitasvir and Pibrentasvir as Components of IFN-Sparing HCV Curative Treatments. W: *Topics in Medicinal Chemistry*. T 32. Springer; 2019:133–156. doi:10.1007/7355_2018_50
109. *Progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections, 2019.*; 2020. Dostęp: 4.04.2021. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/324797/WHO-CDS-HIV-19.7-eng.pdf?ua=1>
110. WHO. Global health sector strategy on viral hepatitis 2016-2021 towards ending viral hepatitis. Opublikowano online czerwiec 2016. Dostęp: 4.04.2021. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246177/WHO-HIV-2016.06-eng.pdf?jsessionid=22DCC9F02940F4B57882878A06D02402?sequence=1>
111. Kondili LA, Craxi A, Aghemo A. Absolute targets for HCV elimination and national health policy paradigms: Foreseeing future requirements. *Liver Int.* 2021;41(4):649–655. doi:<https://doi.org/10.1111/liv.14796>
112. Sofia MJ. Perspectives on HCV Cure BT - HCV: The Journey from Discovery to a Cure: Volume II. W: Sofia MJ, red. Springer International Publishing; 2019:491–495. doi:10.1007/7355_2019_65

NOWE TERAPIE ANTYBIOTYKOWE

Jakub Słota, Martyna Żurek, Joanna Bączyk, Iwona Jabłońska,
Marcin Goławski, Grzegorz O. Machelski

Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Klinice Neurochirurgii w Katowicach,
Wydział Nauk Medycznych w Katowicach, Śląski, Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Abstrakt:

Syntetyczne antybiotyki stosowane są klinicznie w leczeniu chorób o podłożu bakteryjnym już od ponad stu lat. W 1910 roku właśnie została użyta pierwsza substancja, Salwarsan (arsfena-mina). Prawdziwą rewolucję w medycynie zapoczątkowała Penicylina wynaleziona w 1928 r., a na rozkwit i złoty okres omawianych specyfików przyjmuje się lata 50. i 60. XX wieku. Dzięki antybiotykowi umieralność na choroby zakaźne wyraźnie zmalała (z około 46% wszystkich zgonów na początku XX w., do zaledwie 4,5% w 1997). Niestety drobnoustroje zaczynają wykazywać coraz większą oporność na antybiotyki, poprzez zastosowanie różnych, swoistych mechanizmów. Zjawisko to jest widoczne szczególnie u pacjentów przebywających w szpitalach (zakażenia szpitalne). Poznanie i analizowanie tych mechanizmów jest kluczowe w procesie tworzenia i wprowadzania nowych substancji o charakterze bakteriobójczym. Od 2015 roku zostało wprowadzonych na rynek kilka nowych medykamentów (wszystkie wymienione leki zostały zatwierdzone przez European Medicines Agency, EMA): (I) ZAVICEFTA (ceftazydim + awibaktam), lek przeznaczony dla dorosłych i dzieci pow. trzeciego mies. życia przy powikłanych zakażeniach w obrębie jamy brzusznej [cIAI], powikłanych zakażeniach układu moczowego [cUTI] oraz przy szpitalnym zapaleniu płuc [HAP] (w tym respiratorowym zapaleniu płuc [VAP]). Podobne działanie wykazuje (II) VABOREM (meropenem + waborbaktam), jednakże medykament ten przeznaczony jest wyłącznie dla dorosłych. (III) QUOFENIX (delafloksacyna) to antybiotyk dla dorosłych i używany przy ostrych bakteryjnych zakażeniach skóry i tkanek miękkich [ABSSSI]. (IV) XERAVA (erawacyklina) jest farmaceutykiem stosowanym przez dorosłych przy cIAI. (V) XENLETA (lefamulina) stosowana jest w celach leczenia pozaszpitalnego zapalenia płuc u osób dorosłych [CAP]. (VI) RECARBRIO (imipenem + cylastatyna + relebaktam) oraz (VII) FETCROJA (cefiderokol) mają podobne zastosowanie, ponieważ oba antybiotyki stosuje się przy zakażeniach wywołanych przez tlenowe bakterie Gram-ujemne, u osób dorosłych. (VIII) DOVPRELA (pretomanid) w połączeniu z bedakiliną oraz linezolidem używany jest w leczeniu gruźlicy płuc o rozszerzonej oporności na leki [XDR] lub wielolekoopornej [MDR] u osób dorosłych.

Słowa kluczowe: antybiotyki, bakterie, powikłane zakażenia, leczenie

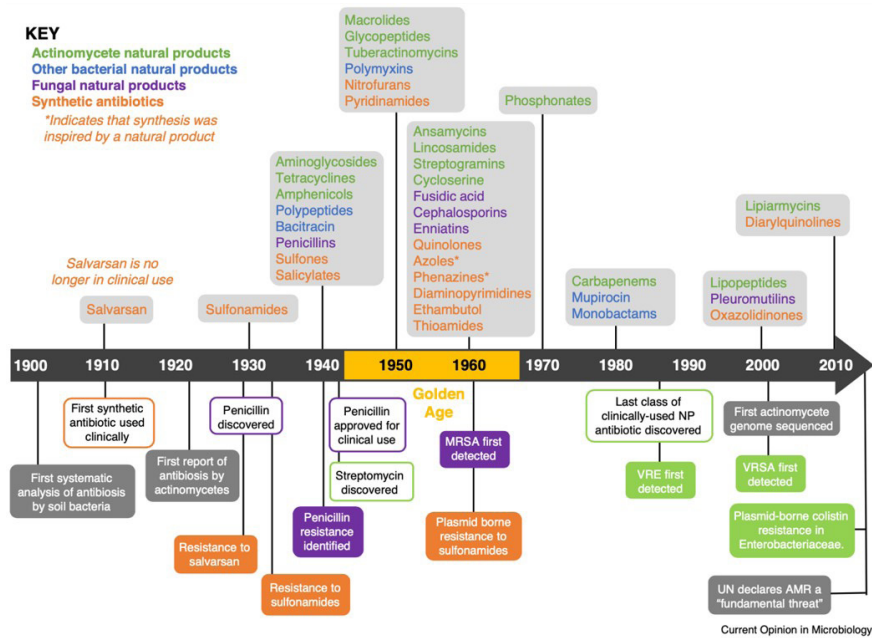
Abstract:

Synthetic antibiotics have been used clinically in the treatment of bacterial diseases for over a hundred years. In 1910 the first substance, Salvarsan (arsphenamine), was used. The real revolution in medicine was initiated by Penicillin, invented in 1928, and the heyday and golden age of these drugs were the 1950s and 1960s. Thanks to antibiotics, mortality from infectious diseases has significantly decreased (from around 46% of all deaths at the beginning of the 20th century, to just 4.5% in 1997). Unfortunately, microbes are beginning to show increasing resistance to antibiotics through the use of various specific mechanisms. This phenomenon is especially visible in patients staying in hospitals (hospital-acquired infections). Understanding and analyzing these mechanisms is crucial in the process of developing and introducing new bactericidal substances. Since 2015, several new medicaments have been introduced to the market (all these drugs have been approved by the European Medicines Agency, EMA): (I) ZAVICE-FTA (ceftazidime + avibactam), a drug intended for adults and children over in the third month of life with complicated intra-abdominal infections [cIAI], complicated urinary tract infections [cUTI] and hospital-acquired pneumonia [HAP] (including ventilator-associated pneumonia [VAP]). A similar effect is shown by (II) VABOREM (meropenem + vaborbactam), however, this medicament is intended only for adults. (III) QUOFENIX (delafoxacin) is an antibiotic for adults and used in acute bacterial skin and skin structure infections [ABSSI]. (IV) XERAVA (eravacycline) is a pharmaceutical used by adults for cIAI. (V) XENLETA (Lefamulin) is used to treat community-acquired pneumonia in adults [CAP]. (VI) RECARBRIO (imipenem + cilastatin + relebactam) and (VII) FETCROJA (cefiderocol) are of similar use as both antibiotics are used in infections caused by aerobic Gram-negative bacteria in adults. (VIII) DOVPRELA (pretomanide) in combination with bedaquiline and linezolid is used to treat extended drug resistance [XDR] or multi-drug resistant [MDR] pulmonary tuberculosis in adults.

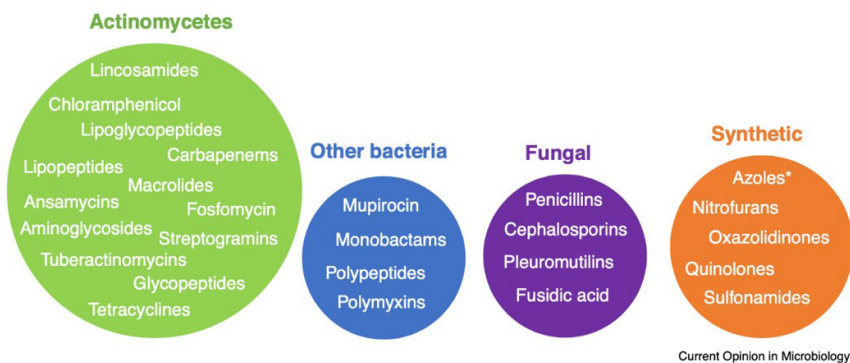
Keywords: antibiotics, bacteria, complicated infections, treatment

1. WSTĘP

Antybiotyki w XX wieku uczyniły prawdziwą rewolucję w walce z chorobami zakaźnymi o podłożu bakteryjnym. Salvarsan, czyli arsfenamina, został wprowadzony jako lek przeciwko kile [1] już w 1910 roku, czyniąc go pierwszą substancją przeciwbakteryjną w historii. Przełomu dokonał Aleksander Fleming i jego przypadkowe odkrycie penicyliny w 1928, które było swoistym prekursorem w badaniach i rozwoju przyszłych farmaceutyków. Leki przeciwbakteryjne swój największy udział w leczeniu klinicznym miały w latach 50. oraz 60. XX wieku, a wspomniany okres czasu nazywany jest „złotym okresem antybiotyków”. [2] Wpływ tych leków na przestrzeni lat jest dobrze widoczny, gdy poddamy analizie odsetek przyczyn zgonów ludzi. Na początku XX wieku, w Stanach Zjednoczonych umieralność na choroby zakaźne w skali wszystkich zgonów wynosił około 46%, podczas gdy w 1997 wynosił on już tylko 4,5% [3, 4]. Dokładną historię tworzenia substancji przeciwbakteryjnych przedstawia rycina 1., natomiast podział antybiotyków na klasy zaprezentowane zostały na rycinie 2.



Rycina 1. Schemat powstawania antybiotyków w czasie (lata 1990-2010) [2]

Rycina 2. Główne klasy antybiotyków pod względem klinicznym. Są to: bakterie rzędu *Actinomycetes*, inne bakterie, grzyby, związki otrzymane syntetycznie [2]

2. NOWE ANTYBIOTYKI

Głównym tematem tej publikacji jest przedstawienie i omówienie nowych terapii antybiotykowych, które zostały zaakceptowane przez European Medicines Agency [EMA] i stosowane są klinicznie. Pod uwagę zostały wzięte medykamenty wyłącznie powstałe w okresie czasu 2015-2019 rok [5]. Są to:

Zavicefta [6-13], Vaborem [14-17], Quofenix [18-21], Xerava [22-25], Xenleta [26-27], Recabrio [28-29], Fetcroja [30-32] oraz Dovprela [33-34].

2.1. Zavicefta

W 2015 roku dopuszczone zostało połączenie dwóch substancji czynnych (ceftazydymu oraz awibaktamu) w postaci leku o nazwie handlowej Zavicefta. Ceftazydym to antybiotyk z grupy cefalosporyn (trzecia generacja), którego mechanizm działania polega na hamowaniu syntezy peptoglikanowej ściany komórkowej bakterii poprzez wiązanie się z białkami wiążącymi penicyliny [PBPs], co prowadzi do lizy komórki drobnoustroju. Awibaktam natomiast to nowo wynaleziony inhibitor beta-laktamazy, który tworząc kowalencyjne, stabilne i odporne na hydrolizę kompleksy z enzymami mikroorganizmu, wspomaga działanie omówionego antybiotyku. Lek Zavicefta stosowany jest przede wszystkim przy: (I) powikłanych zakażeniach w obrębie jamy brzusznej [cIAI] (bakterie Gram-ujemne: *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*), (II) powikłanych zakażeniach układu moczowego [cUTI] (bakterie Gram-ujemne: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*), (III) szpitalnych zapalenieniach płuc [HAP], w tym respiratorowych zapaleniach płuc [VAP] (bakterie Gram-ujemne: *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*) oraz (IV) zakażeniach spowodowanych przez bakterie niewrażliwe na działanie innych leków. Lek podaje się dożylnie w proporcjach ceftazydymu awibaktam 4:1 (standardowa dawka dla osoby dorosłej to 2g + 0,5g podawana co 8 godzin, dla dzieci indywidualnie dawkę ustala lekarz). Zavicefta przeznaczony jest dla osób dorosłych oraz dzieci powyżej 3 miesiąca (brak badań o skutkach i efektywności u dzieci młodszych). W testach (fazie III) lek ceftazydym-awibaktam wykazywał dużą skuteczność oraz był dobrze tolerowany przez pacjentów, co stanowi dobrą metodę walki z poważnymi i trudnymi do wyleczenia zakażeniami bakteryjnymi.

2.2 Vaborem

Dwa lata po dopuszczeniu omawianego wyżej połączenia ceftazydymu oraz awibaktamu do użytku wszedł bardzo podobny charakterem lek, mianowicie połączenie innych substancji czynnych: meropenemu oraz waborbaktamu pod nazwą handlową Vaborem (lub Vabomere). Meropenem to substancja

analogiczna działaniem do ceftazydymu (hamuje syntezę ściany komórkowej poprzez wiązanie się z PBP), a waborbaktam to inhibitor serynowych beta-laktamaz klasy A i C, w tym karbapenemazy *Klebsiella pneumoniae* [KPC]. Warto nadmienić, że inhibitor ten nie hamuje enzymów bakterii klasy B i D oraz sam w sobie nie ma właściwości przeciwbakteryjnych. Vaborem stosowany jest głównie przy: (I) cUTI, w tym odmiedniczkowym zapaleniu nerek (bakterie Gram-ujemne: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* complex), (II) cIAIs, (III) HAP, w tym VAP. Lek meropenem-waborbaktam podawany jest dożylnie w postaci infuzji (proporcje 1:1, dawka dla osoby dorosłej to 2g + 2g podawana co 8 godzin). W opozycji do zavicefty, omawiany antybiotyk nie jest wskazany do stosowania u osób poniżej 18 roku życia. Obecnie trwają badania i spekulacje na temat równoczesnego podawania Zavicefty i Vaboremu w walce z wymienionymi powikłanymi zakażeniami bakteryjnymi.

2.3. Quofenix

W tym samym 2017 roku zaakceptowany został również inny medykament, czyli delafloksacyna pod europejską nazwą handlową Quofenix (amerykański odpowiednik to Baxdella). Delafloksacyna to substancja należąca do fluorochinolonów, która hamuje enzymy drobnoustrojów (topoizomeraza typu IV oraz gyraza DNA) niezbędne do podstawowych procesów genetycznych (replikacja, transkrypcja, naprawa, rekombinacja prokariotycznego DNA) mikrobów. Lek stosuje się w walce z ostrymi bakteryjnymi zakażeniami skóry i tkanek miękkich [ABSSSI], powodowanych przez zarówno bakterie Gram-dodatnie (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*) oraz Gram-ujemne (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*). Na szczególną uwagę zasługuje fakt, iż gdy mowa jest *Staphylococcus aureus*, to delafloksacyna działa również na szczepy oporne na metycylinę [MRSA]. Quofenix stosuje się wyłącznie u osób dorosłych i podaje się go dożylnie (w jednej dawce obecne jest 300 mg substancji czynnej). Leczenie wprowadza się w momencie, gdy powszechnie zalecane antybiotyki uważane są za nieskuteczne.

2.4. Xerava

Rok później do użytku dopuszczony został środek Xerava, który w swoim składzie zawiera erawacyklinę. Antybiotyk ten należy do tetracyklin i mechanizm jego działania polega na przyłączaniu się do podjednostki 30S rybosomów bakteryjnych, co blokuje mechanizm dołączania kolejnych aminokwasów podczas wydłużania łańcucha w biosyntezie białek. W konsekwencji mikroorganizmy ulegają lizie. Xeravę stosuje się w głównej mierze przy leczeniu powikłanych zakażeń wewnątrzbrzusznych, wywołanych przez drobnoustroje (takie jak: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Viridans Streptococcus spp.*). Erawacyklinę podaje się doustnie, jedna fiolka Xerawy zawiera 50 mg substancji przeciwbakteryjnej. Zalecana dawka dla osób dorosłych to 1 mg na kilogram masy ciała, podawane co 12 godzin w okresie od 4 do 14 dni. Lek nie jest zalecany do stosowania u dzieci.

2.5. Xenleta

2019 rok rozpoczyna się omówieniem lefamuliny, czyli najważniejszego składnika antybiotyku o nazwie handlowej Xenleta. Lefamulina to farmaceutyk z grupy pleuromutylin, jego główny cel to uniemożliwienie prawidłowego pozycjonowania tRNA w procesie translacji u *Procarvota*. Umożliwia to mechanizm leku, który polega na hamowaniu syntezy białek bakteryjnych poprzez interakcję z miejscami A i P centrum peptydylotransferazowego [PTC] środkowej części domeny V w cząsteczce 23S rRNA rybosomalnej podjednostki 50S. Xenleta jako medykament stosowany jest przy zakażeniach bakteryjnych układu oddechowego, konkretnie przy poszpitalnym zapaleniu płuc [CAP]. Lek działa na bakterie: (I) Gram-ujemne (*Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*), (II) Gram-dodatnie (*Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*), (III) oraz inne bakterie (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*). Lefamuflinę podaje się wyłącznie pacjentom dorosłym, w tabletkach zawierających 600 mg wspomnianej substancji. Najpowszechniejsze dawkowanie leku to 2 tabletki na dzień (podawane co 12 godzin) przez okres 5 dni.

2.6. Recabrio

Kolejnym preparatem, który pojawił się w 2019 roku był Recabrio, czyli połączenie aż trzech substancji: imipenemu, cylastatyny, relebaktamu.

Działanie imipenemu jest analogiczne do opisanych wcześniej ceftazydymu oraz meropenemu, czyli antybiotyku ten hamuje białka wiążące penicylinę, przez co zostaje hamowana synteza peptydoglikanów ściany komórkowej mikrobów. Cyłastyna zmniejsza metabolizm nerkowy imipenemu, natomiast relebaktam jest nie-beta-laktomowym inhibitorem beta-laktamaz klasy A i C. Ostatnie dwie substancje nie wykazują właściwości bakteriobójczych. Spektrum zastosowania Recabrio jest szerokie i przez to wskazane jest stosowanie leku przy: (I) szpitalnym zapaleniu płuc oraz respiratorowym zapaleniu płuc, (II) bakteriemii (w powiązaniu z HAP lub VAP), (III) w leczeniu innych zakażeń wywołane przez bakterie: tlenowe Gram-ujemne (*Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex, *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*), beztlenowe Gram-ujemne (*Bacteroides* spp., *Fusobacterium* spp., *Prevotella* spp.) lub tlenowe Gram-dodatnie (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* (wyłącznie te, które są wrażliwe na metycylinę), *Streptococcus viridans*). Recarbrio podaje się dożylnie, jedna fiolka zawiera substancje imipenem:cyłastyna:relebaktam w proporcjach 1:1:0,5; najczęściej w ilości 500:500:250 mg. Infuzje podaje się osobom dorosłym, nie ma wystarczających informacji i badań o stosowaniu Recarbrio u dzieci i młodzieży poniżej 18 roku życia.

2.7. Fetcroja

Innym opisywanym antybiotykiem jest Fetcroja, lek oparty na substancji o nazwie cefiderokol. Jest to cefalosporyna sideforowa, która wiąże się z pozakomórkowym żelazem, co umożliwia aktywny transport do przestrzeni plazmatycznych jednokomórkowców. Następnie cefiderokol wiąże się z PBP, hamując przy tym syntezę peptydoglikanowej ściany komórkowej, przez co komórka ulega lizie. Opisywany lek stosuje się przy różnych zakażeniach tlenowymi bakteriami Gram-ujemnymi (*Achromobacter* spp., *Acinetobacter baumannii* complex, *Burkholderia cepacia* complex, *Citrobacter freundii* complex, *Citrobacter koseri*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* complex, *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Providencia rettgeri*, *Serratia* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*). Cefiderokol powinien być stosowany wyłącznie u osób dorosłych, w postaci infuzji dożylniej. Każda fiolka zawiera farmaceutyku Fetcroja zawiera 1 g substancji czynnej i zalecana dawka wynosi 2g co 8 godzin.

2.8. Dovprela

Ostatnim opisywanym środkiem przeciwbakteryjnym jest Dovprela, który zawierający w swoim składzie pretomanid. Wspomniana substancja ma działanie dualistyczne, w warunkach tlenowych antybiotyk hamuje syntezę lipidów w ścianie komórkowej, natomiast w warunkach beztlenowych generuje reaktywne formy tlenu. Lek Dovprela stosuje się w leczeniu gruźlicy płuc o rozszerzonej oporności na leki [XDR] lub wielolekoopornej [MDR] wywoływanej przez prątek gruźlicy (*Mycobacterium tuberculosis*). Należy nadmienić, że w leczeniu stosuje się dwie dodatkowe substancje: bedakilinę oraz linezolid (dwa inne antybiotyki stosowane w celu walki z gruźlicą). Lek Dovprela stosuje się wyłącznie u osób dorosłych, zalecana dawka to jedna tabletka (zawierająca 200 mg pretomanidu) dziennie przez okres 26 tygodni.

3. PODSUMOWANIE I DYSKUSJA

Wybrane cechy omówionych powyżej antybiotyków zostały zebrane i ujęte w tabeli 1.

Tabela 1. Wybrane cechy omówionych antybiotyków [opracowanie własne]

Nazwa leku	Substancje czynne	Wskazania do użycia	Bakterie wrażliwe	Sposób podania	Stosowanie u dzieci
Zavicefta	ceftazydim awibaktam	cIAIs cUTIs HAP, VAP inne zakażenia	Gram-ujemne	dożylnie	tak (dzieci powyżej 3 miesiąca życia)
Vaborem	meropenem waborbaktam	cUTIs cIAIs HAP, VAP	Gram-ujemne	dożylnie	nie
Quofenix	delafloksacyna	ABSSSIs	Gram-ujemne Gram-dodatnie (w tym MRSA)	dożylnie	nie
Xerava	erawacyklina	cIAI	Gram-ujemne	dożylnie	nie
Xenleta	lefamulina	zakażenia układu oddechowego (głównie CAP)	Gram-ujemne Gram-dodatnie inne bakterie	tabletki	nie
Recabrio	imipenem cylastyna relebaktam	HAP, VAP bakteriemia inne zakażenia	Gram-ujemne (tlenowe i beztlenowe) Gram-dodatnie	dożylnie	nie
Fetcroja	cefiderokol	różne zakażenia	tlenowe Gram-ujemne	dożylnie	nie
Dovprela	pretomanid	MDR XDR	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	tabletki	nie

Warto również powiedzieć parę słów o rosnącej oporności bakterii na leki. Zgodnie ze zdaniem „przetrwają tylko te organizmy, które będą w stanie adaptować się do zmieniających warunków” te mikroorganizmy, które przetrwają w kontakcie z antybiotykiem, będą w stanie przekazać geny oporności kolejnym pokoleniom przy rozmnażaniu. Poznanie mechanizmów, które drobnoustroje stosują przy uzyskiwaniu oporności jest kluczowe przy syntezie i wprowadzaniu nowych środków przeciwbakteryjnych oraz walce z wieloopornością na leki [MDR] [35]. Równie ważna powinna być świadomość pacjentów, że antybiotyki działają wyłącznie na choroby o podłożu bakteryjnym i należy brać je ściśle pod zaleceniem osoby wykwalifikowanej medycznie.

REFERENCJE

1. Gibaud S, Jaouen G. Arsenic-Based Drugs: From Fowler's Solution to Modern Anticancer Chemotherapy. In: Topics in Organometallic Chemistry. Springer Berlin Heidelberg; 2010:1-20. doi:10.1007/978-3-642-13185-1_1
2. Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future. Current Opinion in Microbiology. 2019;51:72-80. doi:10.1016/j.mib.2019.10.008
3. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm4829a1.htm>
4. Dodds DR. Antibiotic resistance: A current epilogue. Biochemical Pharmacology. 2017;134:139-146. doi:10.1016/j.bcp.2016.12.005
5. <https://www.pewtrusts.org/en/research-and-analysis/data-visualizations/2019/five-year-analysis-shows-continued-deficiencies-in-antibiotic-development>
6. https://www.pfizerpro.com.pl/sites/default/files/zavicefta_ll_lpd_approved_11.02.2021.pdf
7. https://www.pfizerpro.com.pl/sites/default/files/zavicefta_lld_approved_11.02.2021.pdf
8. Shirley M. Ceftazidime-Avibactam: A Review in the Treatment of Serious Gram-Negative Bacterial Infections. Drugs. 2018;78(6):675-692. doi:10.1007/s40265-018-0902-x

9. Zasowski EJ, Rybak JM, Rybak MJ. The β -Lactams Strike Back: Cef-tazidime-Avibactam. *Pharmacotherapy*. 2015;35(8):755-770. doi:10.1002/phar.1622
10. Sharma R, Park TE, Moy S. Ceftazidime-Avibactam: A Novel Cephalosporin/ β -Lactamase Inhibitor Combination for the Treatment of Resistant Gram-negative Organisms. *Clinical Therapeutics*. 2016;38(3):431-444. doi:10.1016/j.clinthera.2016.01.018
11. Falcone M, Paterson D. Spotlight on ceftazidime/avibactam: a new option for MDR Gram-negative infections. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71(10):2713-2722. doi:10.1093/jac/dkw239
12. Buckman SA, Krekel T, Muller AE, Mazuski JE. Ceftazidime-avibactam for the treatment of complicated intra-abdominal infections. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2016;17(17):2341-2349. doi:10.1080/14656566.2016.1249847
13. Santevecchi BA, Smith TT, MacVane SH. Clinical experience with ceftazidime/avibactam for treatment of antibiotic-resistant organisms other than *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2018;51(4):629-635. doi:10.1016/j.ijantimicag.2018.01.016
14. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/vaborem-epar-product-information_pl.pdf
15. Pogue JM, Bonomo RA, Kaye KS. Ceftazidime/Avibactam, Meropenem/Vaborbactam, or Both? Clinical and Formulary Considerations. *Clinical Infectious Diseases*. 2018;68(3):519-524. doi:10.1093/cid/ciy576
16. Dhillon S. Meropenem/Vaborbactam: A Review in Complicated Urinary Tract Infections. *Drugs*. 2018;78(12):1259-1270. doi:10.1007/s40265-018-0966-7
17. Lee Y, Kim J, Trinh S. Meropenem-Vaborbactam (VabomereTM): Another Option for Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *P T*. 2019 Mar;44(3):110-113. PMID: 30828230; PMCID: PMC6385729.
18. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/quofenix-epar-product-information_pl.pdf
19. Scott LJ. Delafloxacin: A Review in Acute Bacterial Skin and Skin Structure Infections. *Drugs*. 2020;80(12):1247-1258. doi:10.1007/s40265-020-01358-0

20. Mogle BT, Steele JM, Thomas SJ, Bohan KH, Kufel WD. Clinical review of delafloxacin: a novel anionic fluoroquinolone. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018;73(6):1439-1451. doi:10.1093/jac/dkx543
21. 1. Righi E, Cernelutti A, Vena A, Bassetti M. Emerging treatment options for acute bacterial skin and skin structure infections: focus on intravenous delafloxacin. *IDR*. 2018;Volume 11:479-488. doi:10.2147/idr.s142140
22. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/xerava-epar-product-information_en.pdf
23. https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/xerava-epar-medicine-overview_pl.pdf
24. Scott LJ. Eravacycline: A Review in Complicated Intra-Abdominal Infections. *Drugs*. 2019;79(3):315-324. doi:10.1007/s40265-019-01067-3
25. 1. Veve MP, Wagner JL. Lefamulin: Review of a Promising Novel Pleuromutilin Antibiotic. *Pharmacotherapy*. 2018;38(9):935-946. doi:10.1002/phar.2166
26. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/xenleta-epar-product-information_pl.pdf
27. Eraikhuemen N, Julien D, Kelly A, Lindsay T, Lazaridis D. Treatment of Community-Acquired Pneumonia: A Focus on Lefamulin. *Infect Dis Ther*. 2021;10(1):149-163. doi:10.1007/s40121-020-00378-3
28. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/recarbrio-epar-product-information_pl.pdf
29. Doi Y. Treatment Options for Carbapenem-resistant Gram-negative Bacterial Infections. *Clinical Infectious Diseases*. 2019;69(Supplement_7):S565-S575. doi:10.1093/cid/ciz830
30. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/fetcroja-epar-product-information_pl.pdf
31. Choi JJ, McCarthy MW. Cefiderocol: a novel siderophore cephalosporin. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2018;27(2):193-197. doi:10.1080/13543784.2018.1426745

32. Zhanel GG, Golden AR, Zelenitsky S, et al. Cefiderocol: A siderophore Cephalosporin with Activity Against Carbapenem-Resistant and Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli. *Drugs*. 2019;79(3):271-289. doi:10.1007/s40265-019-1055-2
33. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/dovprela-epar-product-information_pl.pdf
34. 1. Keam SJ. Pretomanid: First Approval. *Drugs*. 2019;79(16):1797-1803. doi:10.1007/s40265-019-01207-9
35. 1. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*. 2016;4(2). doi:10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015

INNOWACYJNE METODY LECZENIA W LEISZMANIOZIE

Joanna Bączyk, Marcin Goławski, Jakub Słota, Iwona Jabłońska, Grzegorz O. Machelski

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

Abstrakt

Leiszmanioza jest tropikalną chorobą wywołaną przez pierwotniaki z rodzaju *Leishmania*, charakteryzującą się różnorodnymi formami – od samoograniczających się postaci skórnych, przez śluzówkowo-skórne, aż do śmiertelnej choroby narządowej. Zgodnie z danymi WHO obecnie leiszmanioza występuje w 98 krajach, na terenach endemicznego występowania żyje 350 milionów ludzi, natomiast liczbę chorych ocenia się na 0,7-12 milionów. Celem tego rozdziału jest przegląd nowoczesnych metod leczenia leiszmaniozy: leczenie farmakologiczne skojarzone, immunomodulacja, zmiana przeznaczenia dotychczas stosowanych leków oraz możliwość opracowania szczepionek. Istotnym aspektem zawartym w badaniach o nowoczesnych metodach leczenia leiszmaniozy jest pilna potrzeba czułego i precyzyjnego wykrywania patogenu. W ramach tych badań opracowano nową metodę optycznego biosensowania sekwencji *Leishmania spp.*. Kolejną, ale nie mniej ważną opisaną innowacyjną metodą są nanostrukturalne nośniki lipidowe (NLC) stanowiące obiecujące podejście ze względu na kontrolowane profile uwalniania leku oraz doskonałą stabilność. Zwalczanie leiszmaniozy nie jest łatwe przez pojawienie się szczepów opornych na konwencjonalne leki oraz przez wąski arsenał terapeutyczny, który jest poważnie ograniczony ze względu na wysokie koszty i toksyczność. Ze względu na fakt, że zdaniem WHO leiszmanioza jest jedną z najbardziej podatnych chorób na wywołanie epidemii bardzo ważne jest poszukiwanie nowych, innowacyjnych strategii zwalczania i kontrolowania niedocenianej choroby, a także zmniejszenie luki w bezpieczeństwie i skuteczności leków stosowanych obecnie.

Słowa kluczowe: leiszmanioza, innowacje, szczepionki, chitosan, auranofina

Abstract

Leishmaniasis is a tropical disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*, characterized by a variety of forms - from self-limiting cutaneous, mucocutaneous, and fatal organ disease. According to WHO data, leishmaniasis currently occurs in 98 countries, 350 million people live in endemic areas, while the number of patients is estimated at 0.7-12 million. The aim of this chapter is to review modern methods of treating leishmaniasis: combined pharmacological treatment, immunomodulation, changing the intended use of the drugs used so far, and the possibility of developing vaccines. An important aspect included in the research on modern methods of leishmaniasis treatment is the urgent need for precise detection of the pathogen.

As part of this research, a new method for the optical biosensing of *Leishmania* spp sequences was developed. Another, but not less important, innovative method described are nanostructured lipid carriers (NLC), which have a promising approach due to controlled drug release profiles and excellent stability. Fighting leishmaniasis is not easy due to the emergence of strains resistant to conventional drugs and a narrow therapeutic arsenal that is severely limited due to its high cost and toxicity. According to the WHO, leishmaniasis is one of the most susceptible disease causing epidemics and due to this fact is it very important to search for new, innovative strategies to combat and control the underestimated disease, as well as to reduce the safety and efficacy gap in the drugs used today.

Keywords: leishmaniasis, innovation, vaccines, chitosan, auranofin

1. WSTĘP

Leiszmanioza jest tropikalną chorobą odzwierzęcą, wywołaną przez wewnątrzkomórkowe pierwotniaki z rodzaju *Leishmania*. Do tej pory na świecie zidentyfikowano ponad 20 gatunków *Leishmania*. Po raz pierwszy została opisana przez szkockiego patologa Williama Booga Leishmana, który w 1901 roku zidentyfikował obce organizmy w śledzionach osób zmarłych z powodu „gorączki z Dum-Dum”. Występowanie geograficzne jest zróżnicowane w zależności od gatunku *Leishmania*. Chociaż większość zachorowań odnotowuje się w biednych krajach, leiszmanioza występuje również endemicznie w kilku krajach Europy Południowej. Rozmieszczenie geograficzne gatunków pierwotniaków *Leishmania* odpowiada za zróżnicowany obraz choroby – od samoograniczających się postaci skórnych lub śluzówkowo-skrórných, do zagrażającej życiu postaci narządowej. Rezerwuarem *Leishmania* są ludzie i zwierzęta domowe i dziko żyjące: gryzonie, bydło, psy i koty, a wektorem przenoszącym pasożyta komary z rodzaju *Phlebotomus* i *Lutzomyia* [1, 2].

Do zarażenia człowieka dochodzi najczęściej w wyniku ukłucia przez komara lub roznamięcenia i wtarcia komara do rany, możliwa jest też transmisja pierwotniaka poprzez transfuzję krwi lub narkotyki dożylnie, a także drogą wertykalną z matki na płód. Nasilenie choroby zależy od złożonej interakcji między rodzajem zakażonego gatunku a odpowiedzią immunologiczną żywiciela. Zakażenie może przebiegać bezobjawowo lub objawiać się chorobą skóry (CL - *cutaneous leishmaniasis*, biały trąd, owrzodzenie z Aleppo), chorobą błon śluzowych i skóry (MCL - *mucocutaneous leishmaniasis*, pendynka) lub postacią trzewną (VL - *visceral leishmaniasis*, choroba kala-azar, czarna febra, gorączka dum-dum), która, jeśli nie jest leczona, może być śmiertelna [3]. Zgodnie z danymi WHO obecnie leiszmanioza występuje w 98 krajach, na terenach endemicznego występowania żyje 350 milionów ludzi, natomiast

liczbę chorych ocenia się na 0,7-12 milionów. Każdego roku odnotowuje się 1,3 miliona nowych przypadków, a choroba powoduje śmierć ponad 30 000 osób rocznie [4, 5].

Leishmanioza skórna najczęstsza postać choroby, rocznie na całym świecie występuje około 600 000 do 1 000 000 nowych przypadków. CL jest wywoływana przez *Leishmania major* i *Leishmania tropica* na Bliskim Wschodzie i w Azji Środkowej oraz przez *Leishmania braziliensis* i *Leishmania mexicana* w Amerykach. Na terenie Europy ogniska leishmaniozy skórnej występują lokalnie w Portugalii, Hiszpanii, południowej Francji, we Włoszech, na Sycylii, w Bułgarii, Turcji, Grecji, na Krecie, na obszarze dawnej Jugosławii i w południowej części Rosji. Leishmanioza trzewna jest wywoływana przez *Leishmania infantum*, *Leishmania chagasi* i *Leishmania donovani*, największą śmiertelność odnotowuje się w Brazylii i Indiach. Rocznie na całym świecie występuje około 50 000 do 90 000 nowych przypadków trzewnej postaci choroby. MCL jest ciężką i przewlekłą infekcją śluzówkowo-skórną, najczęściej dotyka mieszkańców Ameryki Południowej (Boliwia, Brazylia i Peru). Czynnikiem etiologicznym są głównie podgatunek *Viannia* oraz *Leishmania mexicana complex* [1, 2, 4, 6]. We wszystkich postaciach klinicznych występuje ten sam cykl rozwojowy pasożyta. Przy ukłuciu przez muchówkę chorego człowieka pierwotniak dostaje się do organizmu owada wraz z zassaną krwią. Z kolei przy ukłuciu zdrowych ludzi przez zarażone muchówki wraz ze śliną wektora zarażenia do naczyń krwionośnych człowieka dostają się pierwotniaki *Leishmania*, i w ten sposób cykl się zamyka. Człowiek podczas ukłucia muchówki zostaje zarażony formą promastigota pasożytów, który atakują krążące w układzie krwionośnym makrofagi i namnażają się w nich w postaci amastigota. Makrofagi giną, amastigota uwalnia się do krwiobiegu i zarażają kolejne krążące lub osiadłe komórki układu odpornościowego. Postać kliniczna leishmaniozy zależy od pierwotnej lokalizacji zarażonych makrofagów (skóra, narządy wewnętrzne). Do czynników ryzyka mających wpływ na transmisję choroby należą migracje ludności (uchodźcy, przesiedleńcy), przeludnienie, niedożywienie, brak gospodarki komunalnej, ograniczony dostęp do służby zdrowia, zmiany środowiskowe (pustynnienie gleby), wzrost populacji zwierząt (gryzoni, bezdomnych psów) [7]. Dlatego też zgodnie z doniesieniami Maia-Elkhoury, zwiększoną liczbę przypadków można wiązać ze zmianami behawioralnymi i środowiskowymi, które są zdeterminowane przez warunki klimatyczne, społeczne i ekonomiczne, mające wpływ na transmisję *Leishmania* [8, 9].

2. POSTACIE KLINICZNE CHOROBY

Leiszmanioza trzewna (VL), jest najgroźniejszą postacią choroby. Prowadzi do uszkodzenia narządów wewnętrznych i szpiku odzwierciedla rozprzestrzenianie się pasożytów *Leishmania* w układzie siateczkowo-śródbłonkowym. Okres inkubacji choroby wynosi 3–6 miesięcy. Objawem typowym jest długotrwała gorączka do 40°C, charakteryzująca się dwoma szczytami w ciągu doby, którym towarzyszy utrata masy ciała, powiększenie wątroby, śledziony i węzłów chłonnych, pancytopenia. Występują zmiany skórne, w okolicy twarzy i rąk (złuszczenie naskórka, łamliwość włosów i paznokci, ciemne zabarwienie skóry wokół ust, na policzkach, stopach, rękach i w linii środkowej brzucha). VL różnicuje się w okresie ostrym choroby z malarią i dudem brzuszynym; w stanach przewlekłych z gruźlicą płuc, brucelozą, mononukleozą, ziarnicą złośliwą, sarkoidozą, trypanosomozą i schistosomatozą. VL jest oportunistyczną infekcją u osób z HIV / AIDS, u osób z obniżoną odpornością po przeszczepieniu narządu, u osób z nowotworami limfatyczno-hematologicznymi lub u osób poddawanych leczeniu immunosupresyjnemu. [5, 7, 10]. Leiszmanioza skórna, okres inkubacji choroby wnosi od kilku tygodni do kilku lat. W miejscu ukłucia przez zarażonego owada (odkryte części ciała), pojawia się najczęściej niebolesna grudka, powiększająca się do rozmiarów guzka, który ulega owrzodzeniu. Większość przypadków klinicznych CL ustępuje samoistnie z pozostawieniem szpecących, zanikowych blizn. U niektórych pacjentów zmiany skórne mogą być bolesne, zwłaszcza gdy ulegają wtórnemu zakażeniu lub znajdują się blisko stawów. Biały trąd różnicuje się z rakiem skóry, czyrakiem, gruźlicą skóry, infekcjami grzybiczymi, kłykcinami kończystymi, blastomykozą, kiłą, sarkoidozą [11]. Leiszmanioza skórno-śluzówkowa występuje w dwóch postaciach klinicznych: espundia (zmiany w obrębie błon śluzowych jamy ustnej i nosowej) i w postaci skórnej. Uszkodzenia skóry, błon śluzowych, struktur chrzęstnych i kostnych nosa, podniebienia oraz krtani powodują trudności w oddychaniu i połykaniu [5, 7, 12, 13].

3. ROKOWANIE

W postaci skórnej samoistne wygojenie się zmian obserwuje się u 90% chorych w ciągu roku. Rozsiana postać skórna i postać z zajęciem błon śluzowych mogą powodować trwałe oszpecenia i wiązać się z zagrażającymi życiu nadkażeniami bakteryjnymi. Leiszmanioza trzewna jest chorobą przewlekłą, postępującą, nieleczona prowadzi do zgonu u 95% chorych w ciągu 2 lat.

4. ROZPOZNANIE LEISZMANIOZY

Rozpoznanie stawiamy na podstawie wywiadu (pobyt w rejonach endemicznych choroby), badania przedmiotowego oraz stwierdzeniu obecności pasożytów w materiale (szpik kostny, biopiat wątroby, śledziony lub węzłów chłonnych) badanym pod mikroskopem oraz podczas badania krwi na obecność przeciwciał (odczyn serologiczny). W badaniu przedmiotowym stwierdza się umiarkowaną hepatomegalię, znaczną splenomegalię i uogólnione powiększenie węzłów chłonnych. Długo trwający proces chorobowy i uszkodzenie wielonarządowe prowadzą zwykle do wystąpienia obrzęków, wodobrzusza i skazy krwotocznej. W badaniach laboratoryjnych ujawnia się: leukopenię, anemię, trombocytopenię, hipoalbuminemię oraz hipergammaglobulinemię. Leiszmaniozie trzewnej często towarzyszą wtórne zakażenia bakteryjne płuc i przewodu pokarmowego, posocznice oraz gruźlica, które są najczęstszą przyczyną zgonu. Diagnostyka parazytologiczna umożliwia wykrycie postaci amastigota *Leishmania* w rozmazie, barwienie metodą Giemzy; postaci promastigota *Leishmania* w hodowli – podłoże Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) z krwią; izolacji DNA pasożyta metodą PCR (ang. polimerase chain reaction), badania histopatologiczne wycinka ze zmiany skórnej (CL), diagnostyka immunologiczna: testy rK39, rKE16 wykorzystujące rekombinowany antygen VL w celu wykrycia przeciwciał anty-Leishmania. Obecnie testy te (m.in. Kalazar DetectTM, DiaMed-IT LEISH) są podstawową metodą diagnostyczną postaci trzewnej leiszmaniozy w warunkach polowych. Główną zaletę stanowi ich stabilność przechowywania w temperaturach do 30°C oraz wysoka swoistość (> 90%), podczas gdy czułość może być różna dla poszczególnych obszarów geograficznych (66-97%) Uniwersalna metoda PCR umożliwiła jednocześnie rozróżnienie *Leishmania major*, *Leishmania tropica* i *Leishmania infantum* przy użyciu jednej pary starterów w jednej reakcji. Jest również możliwość zastosowania testu PCR amplifikującego wewnętrzną transkrybowaną sekwencję przerywnika 2 genu rybosomalnego RNA (ITS2). Test ten wykazuje 100% czułości i 100% swoistości do identyfikacji gatunku w próbkach biopsyjnych pacjentów z CL, jest w stanie z powodzeniem amplifikować zaledwie 0,01-0,1 pg DNA *Leishmania* z hodowanych promastigotów [14, 15]. Innowacyjną metodą wykrywania jednoniciowego DNA *Leishmania* może okazać się test z wykorzystaniem nanocząsteczki srebra pokrytej cytrynianem. Daje możliwość szybkiego (2 minuty) i czułego rozpoznania choroby, może okazać się alternatywą dla tradycyjnych technik diagnostyki klinicznej chorób zakaźnych [16].

5. ZAPOBIEGANIE I LECZENIE LEISZMANIOZY

Jak dotąd nie ma jednej skutecznej metody leczenia leishmaniozy. Podstawowymi celami terapii VL i CL, ML jest zapobieganie odpowiednio śmiertelności i chorobowości. Stosowanie profilaktyki jest jednym z najważniejszych czynników mających na celu opanowanie choroby. Obejmuje zmniejszenie narażenia na wektor transmisji pasożyta, zmniejszenie roli nosicieli i rezerwuarów w przenoszeniu pasożytów, świadomość i edukację populacji zagrożonej chorobą, dostępność do podstawowej opieki zdrowotnej oraz monitorowanie rozprzestrzeniania się choroby i zachorowalności. Podstawą profilaktyki zachorowań na leishmaniozę jest ochrona ciała przed kontaktem z komarami, stosowanie odzieży ochronnej, repelentów, moskitier. Najwięcej trudności w opracowaniu skutecznych terapii stanowi środowisko wewnątrzkomórkowe stadium amastigota *Leishmanii*, ponieważ leki muszą gromadzić się w przedziale fagolizosomalnym makrofagów żywiciela i selektywnie zabijać pasożyta bez działania cytotoksycznego. Obecnie nie ma zatwierdzonej szczepionki przeciwko zakażeniom *Leishmania* u ludzi; w związku z czym zwalczanie choroby opiera się na terapiach lekowych, które wiążą się z występowaniem ewentualnych działań niepożądanych, trudnościami w ich podawaniu, pojawieniem się nawrotów i oporności, a także wysokimi kosztami leczenia[17]. Większość przypadków leishmaniozy skóry nie wymaga leczenia ogólnoustrojowego, natomiast jest ono niezbędne w zarażeniach *Leishmania braziliensis*, w przypadku zajęcia węzłów chłonnych oraz występowania zmian mnogich. Leishmanioza błon śluzowych oraz trzewna powinny być leczone parenteralnie. Chemioterapia jest najbardziej praktycznym i skutecznym sposobem terapii wszystkich trzech głównych postaci leishmaniozy. Lekami pierwszego rzutu są stosowane w leczeniu leishmaniozy trzewnej, od lat czterdziestych XX wieku związki antymonu pięciowartościowego (antymonian megluminy i antymonoglukonian sodu). Leczenie jest długotrwałe (20-40 dni) i może wymagać kilku cykli. Skuteczność podania 1-3 cykli szacuje się na 90-97%. Wykazują dużą skuteczność, ale poza Indiami, gdzie występuje wysoki poziom odporności na te leki. Jako leki drugiego rzutu stosowane są liposomalna amfoterycyna B (L-AmB), paromomycyna stosowana pozajelitowo. L-AmB stosowana przez 1 do 5 dni i.v., jej skuteczność jest wysoka, również przy podaniu jednorazowym (do 96%). Wyniki badań i doświadczenie kliniczne potwierdzają stosowanie L-AmB jako leczenia pierwszego rzutu leishmaniozy skórnej i trzewnej, chociaż większość danych pochodzi z badań regionu śródziemnomorskiego. Wieloośrodkowe włoskie badanie ponad 100 pacjentów wykazało dobrą skuteczność

i bezpieczeństwo w praktyce klinicznej. Z drugiej strony opublikowane dane dotyczące skuteczności L-AmB w leczeniu leishmaniozy trzewnej w Brazylii są ograniczone [18]. Miltefozyna (skuteczność 82-95%), jako terapia trzeciego rzutu, lek przeciwnowotworowy jedyny stosowany doustnie została zarejestrowana do leczenia VL i CL. Większość z tych leków ma ograniczenia związane z wysokimi kosztami, znaczącymi działaniami niepożądanymi, zmienną skutecznością i lekoopornością. Dlatego istnieje rzeczywiste zapotrzebowanie na bezpieczne, skuteczne, niedrogie, krótkie, doustne i przystosowane do użytku w terenie leki do leczenia leishmaniozy. Wydaje się, że terapia skojarzona różnymi lekami mogłaby być bardziej skuteczna, a także miałaby krótszy czas trwania leczenia i mniej skutków ubocznych. Aktualnie prowadzone są badania dotyczące skuteczności oraz bezpieczeństwa terapii skojarzonych (amfoterycyny B, miltefozyny oraz paromomycyny). W Indiach zalecono już w 2002 roku połączenie amfoterycyny B z miltefozyną w celu powstrzymania oporności na antymon. Mimo, że znane są od niespełna osiemdziesięciu lat leki stosowane w terapii leishmaniozy to jednak farmakoterapia nie może całkowicie wyeliminować tej choroby [19]. Do innowacyjnych metod leczenia leishmaniozy można zaliczyć opracowanie systemów dostarczania leków do wnętrza komórki. Może to prowadzić do zwiększenia skuteczności i zmniejszenia toksyczności znanych i szeroko stosowanych leków poprzez modulację ich właściwości farmakokinetycznych i umożliwienie kierowania ich do miejsc zakażenia. Przykładowo nanocząsteczki chitozanu zyskały uznanie w medycynie, ponieważ są biodegradowalne i biokompatybilne z opisanymi działaniami przeciwdrobnoustrojowymi jak również przeciw leishmaniozie. Nanocząsteczki chitozanu obciążone AmB wykazały *in vitro* aktywność przeciwko wewnątrzkomórkowym amastigotom *Leishmania*, z podobną aktywnością do AmB, ale ze znacznie mniejszą toksycznością [20]. Coraz większe zainteresowanie budzi zastosowanie roślin leczniczych, które są obiecującymi źródłami substancji bioaktywnych, a ich stosowanie w leczeniu chorób pasożytniczych było badane od dawna. Metabolity wtórne związków naturalnych, takie jak alkaloidy, aldehydy, chalkony, flawonoidy, wykazały w badaniach *in vitro* znaczną aktywność przeciwpasożytniczą przeciwko gatunkom *Leishmania*. Przeprowadzono badania oceniające skuteczność *in vivo* nanoemulsji (stabilny kinetycznie układ koloidalny dwóch niemieszających się cieczy) zawierającej oleożywicę Sucupira w miejscowym leczeniu CL, które dały obiecujące wyniki [21]. Celem przyspieszania badań nad nowymi lekami na leishmaniozy, coraz częściej wykorzystuje się zintegrowane platformy do badań przesiewowych *in vitro* i *in vivo*, które obejmują różne cykle życiowe pierwotniaków. Dzięki

czemu zidentyfikowano auranofinę, jako silny środek cytotoksyczny przeciw leishmanii [22].

6. SZCZEPIENIA

Stosowanie szczepień jest najbardziej ekonomiczną metodą zapobiegania chorobom zakaźnym. Badania nad szczepionkami pierwszej generacji przeciwko leishmaniozie (szczepionki z całych zabitych pasożytów) oraz nad szczepionkami drugiej generacji (szczepionki modyfikowane genetycznie, w których wyeliminowano niezbędne geny, takie jak syntaza tymidylanowa, reduktaza dihydrofolianowa, proteinaza cysteinowa i / lub transporter biopertyny) wskazuje, że istnieje możliwość wytworzenia odpowiedzi immunologicznej przeciwko żywym patogenom zawierającym specjalne antygeny. Szczepionki trzeciej generacji oparte na DNA są znacznie bardziej stabilne niż szczepionki z rekombinowanym białkiem. Badania nad szczepionkami DNA przeprowadzono w fazie I i II badań klinicznych (badania na zwierzętach). W najbliższej przyszłości planowane jest przeprowadzenie badań i prób klinicznych w fazie III. Nowe podejście do szczepień obejmuje badania nad kationowymi lipidowymi nanocząsteczkami dostarczającymi antygen (cSLN). Główne właściwości cSLN to stabilność chemiczna oraz odporność na utlenianie. Nanocząsteczki cSLN stosowane jako nośnik antygenów *Leishmania* mogą wzmacniać odpowiedź immunologiczną i mogą okazać się skuteczne przeciwko VL. Inną badaną substancją dostarczającą antygen leishmanii jest alginian liniowy polisacharyd rozpuszczalny w wodzie, zawiera kwas β -D-mannuronowy i α -L-kwas guluronowy. Alginian jako system dostarczania antygeny, może okazać się bardzo skuteczny ze względu na swoje właściwości i możliwość indukcji odporności komórkowej [19].

7. PODSUMOWANIE

Leishmanioza jest tropikalną chorobą wywoływaną przez pierwotniaki z rodzaju *Leishmania*, charakteryzującą różnorodnymi formami – od samoo ograniczających się postaci skórnych, przez śluzówkowo-skinne, aż do śmiertelnej choroby narządowej.

Pozajelitowe podawanie pięciowartościowych związków antymonu jest leczeniem z wyboru w leczeniu leishmaniozy. Inne leki alternatywne to amfoterycyna B, pentamidyna i paromomycyna, jednak ich stosowanie jest ograniczone wysoką toksycznością, niską skutecznością lub kosztami. Dodatkowo

występowanie oporności pasożytów wymaga większych dawek leków i / lub wydłużenia czasu leczenia. Wysoka zapadalność na chorobę, brak szczepionki i niedobór środków terapeutycznych motywują do poszukiwania nowych molekuł do leczenia. Obecnie nie ma zatwierdzonej szczepionki przeciwko zakażeniom *Leishmania* u ludzi; zatem kontrola choroby opiera się na ograniczonej liczbie terapii lekowych, z których wszystkie są wadliwe, w tym koszty, długotrwałe i bolesne sposoby podawania, toksyczność oraz pojawienie się nawrotów i oporności. Chociaż farmakoterapia umożliwia leczenie infekcji, szczepienia nie tylko zapewniają długotrwałą ochronę przed chorobą, ale także działają na rezerwuary zakażenia, zmniejszając przenoszenie leishmaniozy. Dlatego potrzebne są bardziej intensywne wysiłki w celu wyprodukowania profilaktycznych szczepionek terapeutycznych. [19, 23, 24, 25].

REFERENCJE

1. de Vries HJ, et al.: Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. *Am J Clin Dermatol.* 2015;16(2):99–109.
2. Czepiel J., et al.: Cutaneous leishmaniasis in a patient returning from Morocco. *Przegl Dermatol* 2010, 97, 260-263
3. Pace D. et al.: Leishmaniasis. *J Infect.* 2014 Nov;69 Suppl 1:S10-8.
4. Savoia D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries.* 2015;9(6): 588–596.
5. Mina J., et al.: Antileishmanial Chemotherapy through Clemastine Fumarate Mediated Inhibition of the *Leishmania* Inositol Phosphorylceramide Synthase. *ACS Infect Dis.* 2021 Jan 8; 7(1): 47–63.
6. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) Leiszmanioza. Dostępne w: (2020) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> Google Scholar
7. Korzeniewski K.: Leiszmaniozy. <https://medycynatropikalna.pl/choroba/leiszmaniozy>
8. Maia-Elkhoury A. N. S. et al. Exploring spatial and temporal distribution of cutaneous leishmaniasis in the Americas, 2001-2011. *PLoS Neglected Tropical Diseases.* 2016.
9. Áurea G., et al.: Cutaneous Leishmaniasis: The Complexity of Host's Effective Immune Response against a Polymorphic Parasitic Disease. *J Immunol Res.* 2019; 2019: 2603730.

10. Zijlstra E. E. et al.: Post-kala-azar dermal leishmaniasis in the Indian subcontinent: A threat to the South-East Asia Region Kala-azar Elimination Programme (2017). *PLoS Neglected Trop. Dis.* 11, e0005877.10.1371/journal.pntd.0005877.
11. . Borghi SM et al. Leishmania infection: painful or painless? *Parasitol Res.* 2017 Feb; 116(2):465-475.
12. Bailey F.: (2019) Neglected Tropical Diseases and Mental Health: Progress, Partnerships, and Integration. *Trends Parasitol.* 35, 23–31.
13. Atypical presentations of cutaneous leishmaniasis: A systematic review. Meireles CB, Maia LC, Soares GC, Teodoro IPP, Gadelha MDSV, da Silva CGL, de Lima MAP *Acta Trop.* 2017 Aug; 172():240-254.
14. Moreira OC et al. The applicability of real-time PCR in the diagnostic of cutaneous leishmaniasis and parasite quantification for clinical management: Current status and perspectives. *Acta Trop.* 2018 Aug; 184:29-37.
15. Rostami M. N. Performance of a universal PCR assay to identify different Leishmania species causative of Old World cutaneous leishmaniasis. *Parasit Vectors.* 2020; 13: 431.
16. Mehri P. et al. An innovative genosensor for the monitoring of Leishmania spp sequence using binding of pDNA to cDNA based on Cit-AgNPs. *Heliyon.* 2020;6(8):e04638. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e04638
17. Mina J. Antileishmanial Chemotherapy through Clemastine Fumarate Mediated Inhibition of the Leishmania Inositol Phosphorylceramide Synthase. *ACS Infect Dis.* 2021 Jan 8;7(1):47-63.
18. Copeland N. K., Aronson N. E. Leishmaniasis: treatment updates and clinical practice guidelines review. *Curr Opin Infect Dis.* 2015 Oct;28(5):426-37.
19. Ghorbani M., Farhoudi R. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? *Drug Des Devel Ther.* 2018; 12: 25–40.
20. Loiseau PM, Pomel S, Croft SL. Chitosan Contribution to Therapeutic and Vaccinal Approaches for the Control of Leishmaniasis. *Molecules.* 2020;25(18):4123. doi:10.3390/molecules25184123
21. Kawakami MYM, Zamora LO, Araújo RS, et al. Efficacy of nanoemulsion with Pterodon emarginatus Vogel oleoresin for topical treatment of cutaneous leishmaniasis. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2021;134:111109.

22. Ilari A. et al. A gold-containing drug against parasitic polyamine metabolism: the X-ray structure of trypanothione reductase from *Leishmania infantum* in complex with auranofin reveals a dual mechanism of enzyme inhibition. *Amino Acids*. 2012 Feb;42(2-3):803-11. doi: 10.1007/s00726-011-0997-9. Epub 2011 Aug 11.
23. Gillespie P.M. et al. Status of vaccine research and development of vaccines for leishmaniasis *Vaccine*, 34 (2016), pp. 2992-2995, 10.1016/j.vaccine.2015.12.071
24. Sangshetti J. N et al. (2015) Antileishmanial drug discovery: comprehensive review of the last 10 years. *RSC Adv.* 5, 32376–32415.
25. Souza M. L., et al.: Recent strategies for the development of oral medicines for the treatment of visceral leishmaniasis. *Drug Dev Res.* 2020;81(7):803-814.

SALICYLANY JAKO NOWOCZESNE NARZĘDZIE POPULACYJNEJ PROFILAKTYKI RAKA JELITA GRUBEGO

Agnieszka Geisler, Krzysztof Feret

Studenckie Koło Naukowe im. Prof. Zbigniewa Religii
przy Katedrze Biofizyki, Wydział Nauk Medycznych w Zabrze

Abstrakt:

W Polsce i na świecie rak jelita grubego jest trzecim najczęściej diagnozowanym nowotworem złośliwym i drugą przyczyną zgonów onkogennych. W ostatnich latach badania potwierdziły, że salicylany i jego związki mają działanie chemoprewencyjne w procesie nowotworzenia w jelicie grubym. Nie do końca poznane są mechanizmy działania kwasu acetylosalicylowego (ASA) na zahamowanie rozwoju nowotworu jelita grubego. Można wyróżnić działanie bezpośrednie na błonę śluzową jelita grubego jak i pośrednie poprzez płytki krwi. Należy zwrócić uwagę, że ASA wykazuje działanie przeciwzapalne i stymuluje odporność przeciwnowotworową organizmu. Liczne badania potwierdzają, że codzienne stosowanie małych dawek ASA zmniejsza prawdopodobieństwo wystąpienia raka jelita grubego, a ponadto działa pozytywnie w postdiagnostyce. Obserwuje się zredukowane prawdopodobieństwo na wystąpienie przerzutów. Ponadto włączenie kwasu acetylosalicylowego w leczeniu neoadiutantowym poprawia rokowanie pacjenta.

Słowa kluczowe: rak jelita grubego, salicylany, chemoprewencja

Abstract:

In Poland and in the world, colorectal cancer is the third most frequently diagnosed malignant neoplasm and the second cause of oncogenic deaths. In recent years, studies have confirmed that salicylates and its compounds have a chemopreventive effect in the process of cancer developing in the large intestine. The mechanisms of the action of acetylsalicylic acid (ASA) on the inhibition of colorectal cancer growth are not fully understood. There is a direct effect on the mucosa of the large intestine and an indirect effect through platelets. It should be noted that ASA has an anti-inflammatory effect and stimulates the body's anti-cancer resistance. Numerous studies confirm that the daily use of low doses of ASA reduces the probability of colorectal cancer, and also has a positive effect in post-diagnosis. There is a reduced chance of metastases occurring. In addition, the inclusion of aspirin in neoadjuvant therapy improves the patient's prognosis.

Keywords: colorectal cancer, salicylates, chemoprevention

1. WSTĘP

Na świecie na raka jelita grubego choruje około 1,3 miliona osób, a powoduje on około 600 tysięcy zgonów rocznie.[1] W samej Polsce, w roku 2018 na raka jelita grubego zachorowało około 19,000 osób, a zmarło 12 434 (6,988 mężczyzn, 5,446 kobiet). Jest trzecią przyczyną zgonów związanych z nowotworami u kobiet - tuż po nowotworze płuc i piersi, a u mężczyzn drugą - po nowotworze płuc.[2] Prognozy sugerują dalszy wzrost zachorowań na raka jelita grubego. Spowodowane jest to głównie zmianami demograficznymi zachodzącymi w Polsce, czyli wzrostem liczby osób starszych oraz wydłużaniem się średniej długości życia. [3,4,5] Działanie protekcyjne kwasu acetylosalicylowego w zachorowaniu na raka jelita grubego jest znane od lat, a badania potwierdzają zmniejszenie śmiertelności jak i ograniczenie przerzutów u pacjentów z tą zmianą.[6] Dyskusyjna jest kwestia profilaktycznego stosowania kwasu acetylosalicylowego w prewencji nowotworzenia jelita grubego.

2. RAK JELITA GRUBEGO

Rak jelita grubego jest zmianą pojawiającą się w obrębie okrężnicy, zgięcia esiczo-odbytniczego, odbytnicy i odbytu. Badania wskazują, że na jego rozwój może być związany z przewlekłym stanem zapalnym.[7] Z tego powodu osoby z nieswoistymi lub wrzodziejącymi zapaleniami jelita czy chorobą Leśniowskiego-Crohna są w grupie szczególnego ryzyka. Powyższe dolegliwości zwiększają szansę na wystąpienia nowotworu nawet trzykrotnie.[8,9] Do grupy zwiększonego ryzyka na zachorowanie należą również osoby cierpiące na rodzinny zespół polipowatości, zespół Lyncha lub są obciążone wywiadem rodzinnym. W przypadku, gdy rak jest zdiagnozowany u bliskich krewnych (np. rodzice, dzieci) poniżej 60 roku życia szansa na zachorowanie wzrasta dwukrotnie.[10]

Rak zazwyczaj powstaje z gruczolaków, rzadziej z polipów. Przebieg zmiany z łagodnej do złośliwej zajmuje zazwyczaj 10-15 lat. [11] Rak jelita grubego przez długi czas nie daje żadnych objawów. W związku z tym, że pacjent nie odczuwa początkowych symptomów, zmiana nowotworowa jest wykrywana późno. Zapobiec sytuacji można poprzez regularne wykonywania badań przesiewowych. W Polsce zaleca się wykonywanie testu na wykrycie krwi utajonej w kale. [12]

3. SALICYLANY – CHARAKTERYSTYKA

Salicylany w grupie farmakologicznej niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) są pochodnymi kwasów karboksylowych. Są to organiczne związki chemiczne będące estrami lub solami kwasu salicylowego. W naturze występują głównie w produktach roślinnych. Spożywając warzywa, owoce, przyprawy i pijąc kawę czy herbatę dostarczamy je organizmowi w wystarczających ilościach. [13,14,15] Salicylany są powszechnie wykorzystywane w leczeniu. Największe zastosowanie znalazły w nim takie związki jak: kwas salicylowy, salicylan sodu i kwas acetylosalicylowy. Preparaty na bazie kwasu salicylowego dzięki swoim właściwości przeciwzapalnym, przeciwbólowym i przeciwgorączkowo były znane i stosowane od wieków. W dziejach historii Sumerowie wykorzystywali korę wierzby i innych roślin bogatych w salicylany do sporządzania wywarów.[16] Papirusy Embersa są egipskim zbiorem wiedzy zioła leczniczej z 1543 p.n.e. Wspominają one o użyciu mirtu i wierzby do leczenia przeciwgorączkowego i przeciwbólowego. [17]

Prawdziwym przełomem było wprowadzenie kwasu acetylosalicylowego na rynek pod nazwą „Aspiryna” w 1899 przez firmę Bayer. Lek dzięki swoim właściwości i dostępności zdobył ogromną popularność, roczne spożycie na świecie jest szacowane na ok. 40 ton rocznie. [18]

3.1. Wpływ kwasu acetylosalicylowego na działanie COX

Działanie kwasu acetylosalicylowego został opisany w 1971 r. przez John’a Vane’a. [19] Podstawowym mechanizmem ASA jest zahamowanie działania cyklooksygenazy (COX). COX jest enzymem obecnym w prawie całym organizmie człowieka. W 1990 roku zostało zidentyfikowane, że cyklooksygenaza występuje w dwóch izoformach - COX-1, COX-2. W 2002 r. odkryto trzecią izoformę - analogicznie została nazwana COX-3.

COX-1 jest enzymem konstytutywnym, występuje w całym organizmie, z wyłączeniem dojrzałych erytrocytów. Uczestniczy w syntezie prostanoidów, np. w trombocytach, żołądku, nerkach i śródbłonku naczyń. Do grupy prostanoidów należą prostaglandyny, tromboksany i leukotrieny. Enzym ten jest odpowiedzialny za utrzymanie homeostazy. [20] Pełni również niezwykle ważną funkcję - chroni błonę śluzową żołądka. [21]

COX-2 ma charakter enzymu o szybkiej i mocnej indukcji. Ujawnia się w przebiegu zapalenia, reakcji bólowych lub uszkodzenia tkanki, którym towarzyszy powstawanie mediatorów zapalnych takich jak: cytokiny, endotoksyny,

czynniki wzrostu. [22] Enzym jest częstą odpowiedzią na sytuacje stresowe. Nie należy go utożsamiać jednak jedynie ze stanami patologicznymi - występuje fizjologicznie w wielu narządach. Stężenie COX-2 może się zmieniać w przeciągu paru godzin nawet po pojedynczej stymulacji. [23] COX-2 uczestniczy również w proliferacji komórek i kancerogenezie. [24]

COX-3 jest enzymem, którego obecność odkryto najpóźniej. Jego obecność jest charakterystyczna dla układu nerwowego i krwionośnego. Występuje w tkance kory mózgowej i w sercu - konkretnie w ścianie aorty. [25,26,27]

Izoenzymy COX są obecne w wielu układach naszego organizmu, np. w układzie krążenia, pokarmowym czy moczowym. Świadczy to o dużym znaczeniu tych związków w utrzymaniu homeostazy. Na przykładzie układu krążenia wykazano, że stała ekspresja COX jest niezbędna do utrzymania prawidłowego przepływu krwi. W warunkach fizjologicznych ekspresja COX-1 w śródbłonku jest niewielka. Aktywność COX-1 zapewnia syntezę TXA_2 , który zwiększa agregację płytek i aktywuje czynniki synergistyczne. Dodatnie fluktuacje świadczą o uszkodzeniu ściany naczynia, jak o rozpoczęciu procesów miażdżycowych. [28]

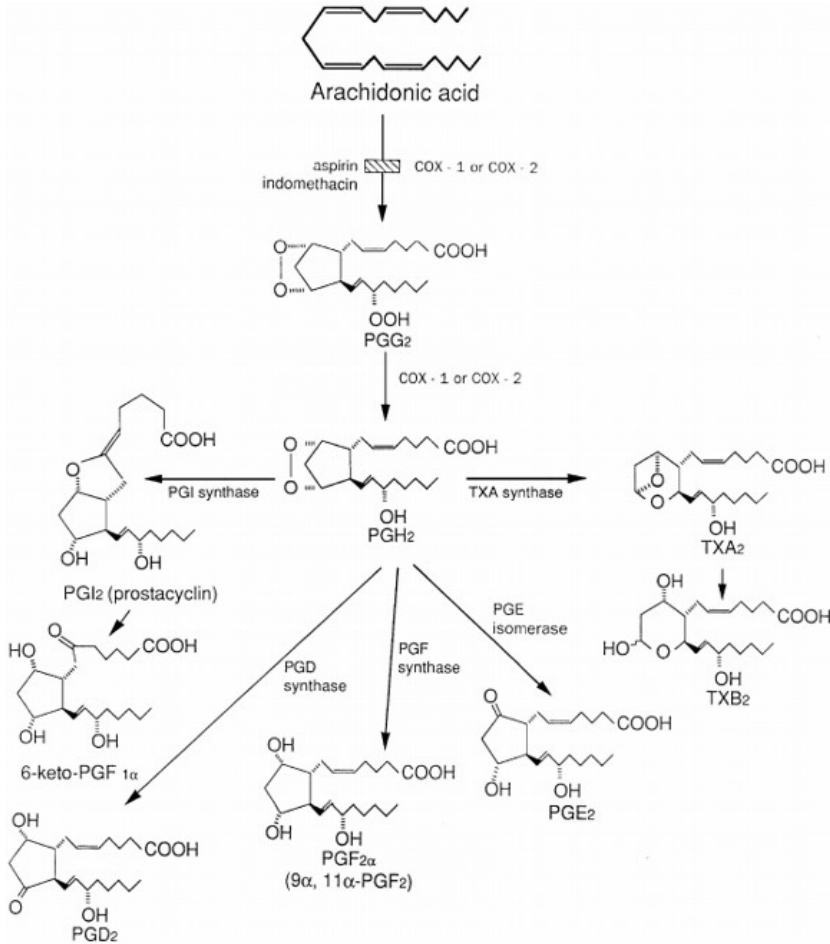
W układzie moczowym COX-1 występuje w śródbłonku, mięśniach gładkich tętnic i żył, w komórkach nabłonkowych kanalików zbiorczych, a także w komórkach śródmiąższowych kory i rdzenia nerki. COX-2 występuje podocytach. [29] Prostaglandyny, które powstają dzięki obecności COX-1 mają wpływ przykładowo na homeostazę nerek i obniżanie oporu naczyniowego. Natomiast COX-2 pozwala na powstanie PG, które są odpowiedzialne za efekt natriuretyczny i diurezę. [30]

Natomiast w przewodzie pokarmowym fizjologiczna ekspresja COX-1 występuje na całej długości jego błony śluzowej. [31] Pełni tam funkcję cytoprotekcyjną. Synteza COX-2 ma miejsce przeważnie w zmianach patologicznych takich jak: gruczolaki i raki gruczołowe jelit. [32] W nawiązaniu do rozwoju zmian nowotworowych w jelicie grubym - zostało potwierdzone, że długotrwałe stosowanie blokerów COX zmniejsza ryzyko ich rozwoju. [33] W warunkach fizjologicznych ekspresja COX-2 w błonie śluzowej żołądków u ludzi jest bardzo mała. [34,35,36]

Molekularne działanie kwasu acetylosalicylowego

Cyklooksygenaza jest enzymem odpowiedzialnym za katalizowanie dwóch etapów syntezy prostaglandyn (PG). Synteza zachodzi z kwasu arachidonowego (KA). Początkowo dochodzi do przekształcenia KA do nadtlenu

prostaglandynowego (PGG_2). Następnie PGG_2 jest metabolizowany do prostaglandyny H_2 (PGH_2). PGH_2 jest związkiem o krótkim czasie półtrwania. Z tej prostaglandyny dochodzi do dalszych przemian. Jej metabolitami są prostaglandyny takie jak PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGD_2 , prostacyklina PGI_2 , i tromboksan TXA_2 (ryc. 2).



Ryc. 1 Kaskada kwasu arachidynowego Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1998.38:97-120.

Aktywne prostanoidy działają na komórki docelowe poprzez swoje receptory. [37]

Prostaglandyny E (PGE_{1-3}) oddziałują rozkurczowo na mięśniówkę naczyń tętniczych, a skurczowo na mięśniówkę naczyń żylnych. Hamują także aktywność układu immunologicznego, poprzez zahamowanie neutrofili, limfocytów T i makrofagów. PGE_1 pobudza receptory PGI odpowiedzialne za hamowanie agregacji płytek. PGE_2 blokuje sekrecję kwasu solnego i pepsyny. Dodatkowo działa cytoprotekcyjnie na błonę śluzową żołądka. [31,38]

Prostaglandyny G i H stymulują agregację płytek i skurcz mięśniówki gładkiej naczyń. [25,39]

Funkcja $\text{PGF}_{1\alpha}$ nie jest znana, natomiast $\text{PGF}_{2\alpha}$ pobudza skurcz mięśni gładkich oskrzeli, naczyń i macicy. [32] PGJ_2 nasila proliferację komórek, zwłaszcza tkanki tłuszczowej.

Tromboksan TXA_2 pobudza agregację płytek krwi. Zwiększenie stężenia cAMP PGI_2 hamuje uwalnianie z płytek TXA_2 działa też cytoprotekcyjnie, przeciwmiażdżycowo i rozkurczowo na mięśniówkę naczyń. [31,40]

4. STOSOWANIE KWASU ACETYLOSALICYLOWEGO W PROFILAKTYCE

Działania profilaktyczne można podzielić na pierwotne i wtórne. Profilaktyka pierwotna to zapobieganie nowotworom. Opiera się ona na przestrzeganiu zasad zdrowego trybu życia, czyli przykładowo na spożywaniu prawidłowo zbilansowanej diety, przesypianiu odpowiedniej ilości godzin i regularnym uprawianiu sportu. Natomiast profilaktyka wtórna w kontekście chorób nowotworowych ma na celu jak najwcześniejsze wykrywanie zmian patologicznych.

W obecnych czasach najczęściej stosowanym salicylanem jest kwas acetylosalicylowy. Zastosowanie ASA w profilaktyce pierwotnej raka jelita grubego budzi wiele kontrowersji.

Kwas acetylosalicylowy ma działanie między innymi antyzakrzepowe. Jego aktywność opiera się na trwałym zahamowaniu aktywności enzymu COX-1 w danej płytce krwi. W takiej sytuacji nie dochodzi do produkcji tromboksanu, który jest niezbędny podczas agregacji płytek krwi, a następnie tworzenia się skrzepin. Zmniejszona zdolność do krzepnięcia jest utrzymana do momentu, w którym płytki z zahamowaną aktywnością COX-1 nie zostaną zastąpione przez nowe. Do takiej wymiany dochodzi po 7-10 dniach - właśnie tyle krąży w krwiobiegu trombocyt. [9] Ta funkcja ASA wysuwa się na pierwsze

miejsce, ponieważ kwas wykazuje o wiele większe powinowactwo do COX-1 niż do COX-2. COX-1 jest w głównej mierze odpowiedzialny za wytwarzanie tromboksanu, a COX-2 za stymulowanie reakcji zapalnej. W związku z tym przy stosunkowo niewielkiej dawce szybko otrzymamy efekt antyzakrzepowy, a przy dawce większej przeciwbólowy i przeciwzapalny. W odniesieniu do profilaktyki raka jelita grubego kwas acetylosalicylowy wpływa hamująco na syntezę enzymu COX-1 w płytkach krwi. COX-1 między innymi stymuluje syntezę enzymu COX-2 w komórkach nabłonkowych jelita grubego. Enzym ten odgrywa dużą rolę w wytworzeniu stanu zapalnego. Zablokowany enzym nie może indukować syntezy COX-2, co powoduje zmniejszenie stanu zapalnego i zmniejsza szansę na rozwój nowotworu. Natomiast istotną wadą codziennego stosowania ASA jest możliwość pojawienia się poważnych krwawień do światła przewodu pokarmowego czy wewnątrzczaszkowych. Właśnie z tego powodu Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne (ESC, European Society of Cardiology) nie rekomenduje stosowania ASA jako prewencji pierwotnej raka jelita grubego.

Wykorzystanie ASA w profilaktyce wtórnej wielu chorób przynosi wiele pozytywnych efektów. Kwas acetylosalicylowy stosuje się powszechnie w celu zmniejszenia powikłań incydentów sercowo-naczyniowych. Znalazł zastosowanie w leczeniu ostrych i przewlekłych zespołów wieńcowych [41]. Jedną z przyczyn powyższych stanów jest zakrzep, który powstał w wyniku pęknięcia blaszki miażdżycowej. Stosując ASA dochodzi do redukcji ryzyka powstania skrzepiny. U pacjentów chorujących na raka jelita grubego stwierdzono również zwiększone prawdopodobieństwo na wystąpienie żylnej choroby zakrzepowo-zatorowej. Podsumowując spożywanie ASA przez pacjentów onkologicznych zmniejsza prawdopodobieństwa trombofilii

4.1. Stan zapalny – charakterystyka

Kwas acetylosalicylowy oprócz działania antyzakrzepowego wyróżnia się działaniem przeciwbólowym, przeciwgorączkowym i przeciwzapalnym. Wykorzystując ASA w profilaktyce nowotworów warto zwrócić szczególną uwagę na jego właściwości przeciwzapalne.

W indukcji stanu zapalnego bierze udział wiele komórek, np.: neutrofile, makrofagi, fibroblasty i komórki nabłonka. Na powyższe komórki mają wpływ mediatory takie jak czynnik NF-kappa-B, mieloperoksydaza, interleukina 17 i 23, protektyny, leukotrieny. [42]. Makrofagi są komórkami, które wykazują dwa stany polaryzacji. Można je podzielić na dwa typy - M1 i M2.

M1 są komórkami, które mają na celu fagocytozę bakterii, komórek zmienionych nowotworowo oraz wytwarzanie mediatorów prozapalnych. Synteza tych cytokin prowadzi do indukcji i podtrzymania stanu zapalnego. [43,44] Natomiast makrofagi M2 wykazują działanie przeciwzapalne. Oprócz tego są niezbędne podczas rozwoju nowotworów. Podczas tworzenia się zmian pierwotnych M2 wydzielają w nowo powstałej tkance czynnik wzrostu naczyń (VEGF, vascular endothelial growth factor), który stymuluje proces angiogenezy. [45] Typowanie makrofagów jako M1 i M2 jest umowne - charakteryzują się one dużą zmiennością, przez co może dochodzić do wzajemnej zamiany z M1 do M2 i odwrotnie. [46] Działanie makrofagów opiera się na wydzielaniu interleukin, których nagromadzenie powoduje napływ neutrofilów. Zadaniem neutrofilu jest fagocytoza patogenów. Po zakończeniu ulegają apoptozie, a następnie same są fagocytowane przez makrofagi. Ich liczba ulega redukcji, zmniejsza to wydzielnie interleukin. Prowadzi to do wyciszenia reakcji zapalnej.

W sytuacji, gdy powyższa regulacja zawodzi może dojść do ciągłej pracy makrofagów prowadzącej do utrzymywania się wysokiego stężenia mediatorów zapalnych i neutrofilu. Wynikiem stanie się obecność przewlekłego stanu zapalnego, który może prowadzić do rozwoju zmiany nowotworowej. [47] W obszarze objętym stanem zapalnym występuje duża liczba neutrofilu. Komórki te ulegają apoptozie, ale nie są usuwane przez makrofagi. Zalegając mogą uwolnić na zewnątrz substancje zgromadzone w ziarnistościach wewnątrzkomórkowych. Prowadzi to do uszkodzenia innych komórek, tkanki i utraty kontroli nad nimi. [48] Dodatkowo udowodniono, że podczas przewlekłego stanu zapalnego dochodzi do ciągłego namnażania się komórek macierzystych nabłonka jelita grubego. Taka ciągła proliferacja może prowadzić nad utraceniem kontroli nad komórkami, a tym samym do rozwoju zmiany nowotworowej. [48] Stosując odpowiednie dawki ASA w dochodzi do zmniejszenia stężenia mediatorów prozapalnych - interleukin. W rezultacie dochodzi do zmniejszenia szansy na rozwój zmiany nowotworowej.

Mając na uwadze powyższy opis można wywnioskować, że podczas trwania stanu zapalnego tworzy się mikrośrodowisko, w którym jednocześnie zachodzi wiele szlaków metabolicznych. Takie miejsce dodatkowo charakteryzuje się ogromną liczbą między innymi cytokin prozapalnych, komórek oraz wytworzeniem środowiska beztlenowego. Takie warunki sprzyjają uszkodzeniom DNA, co może prowadzić do rozwoju zmiany nowotworowej. [42]

4.2. Działanie przeciwzapalne kwasu acetylosalicylowego

Kwas acetylosalicylowy hamując aktywność enzymu COX uniemożliwia powstania prostaglandyn z kwasu arachidonowego. Wykazano, że właśnie prostaglandyny (szczególnie PGE₂) mogą mieć istotny wpływ na rozwój raka jelita grubego. [49] Działanie PGE₂ ma zalety, ale niestety też wady. Istotną wadą jest podtrzymywanie stanu zapalnego. Dzieje się tak poprzez zbyt duże wytwarzanie wolnych rodników, co prowadzi do stresu oksydacyjnego. Wyżej wspomniany przewlekły stan zapalny może indukować zmiany nowotworowe, ale tutaj dodatkowo występujący stres ma znaczenie przy uszkodzeniach DNA. [50]. Uważa się, że wolne rodniki stymulują proces angiogenezy - niezbędny dla rozwoju nowotworu. Badania sugerują również, że zwiększona synteza COX-2, a przy tym większa ilość PGE₂ sprzyja między innymi niekontrolowanej proliferacji komórek, zahamowaniu apoptozy i zwiększonej szansy wystąpienia przerzutów. [51]

4.3. Badania przedkliniczne potwierdzające skuteczność kwasu acetylosalicylowego

Powyższe stwierdzenia o słuszności stosowania kwasu acetylosalicylowego znalazły potwierdzenie w badaniu przeprowadzonym przez Polarda i Lucketa. Badacze w swoim doświadczeniu zaindukowali raka jelita grubego u myszy. Dokonali tego poprzez wszczepienie im komórek gruczolakoraka. Podczas badania grupie badawczej został podawany kwas acetylosalicylowy. Zanotowano u nich zmiany nowotworowe w mniejszej ilości i o mniejszych rozmiarach. [52,53,54]

4.4. Badania kliniczne potwierdzające skuteczność kwasu acetylosalicylowego

U 15-20% pacjentów chorujących na raka jelita grubego stwierdzono mutacje kinazy fosfatydyl-3-inozytolu (PIK3CA) w komórkach zmienionych nowotworowych. [55] PIK3CA jest genem, który jest niezbędny do syntezy białka P110 α . Białko to jest podjednostką enzymu PI3K - kinazy lipidowej. PI3K jest niezbędne podczas wzrostu komórek, ich proliferacji i rozwoju. [56] Mutacja genu powoduje nieprawidłowe działanie kinaz, co może prowadzić do rozwoju zmiany nowotworowej. Zaobserwowano, że osoby, u których stwierdzono mutację i systematycznie stosują ASA mogą wydłużyć czas swojego

życia (w analizie wieloczynnikowej HR 0,18, 95% CI 0,06–0,61, $p < 0,00$). W badaniach wykazano, że kwas acetylosalicylowy zmniejsza aktywność PI3K, co hamuje wzrost komórek nowotworowych i powoduje ich apoptozę. [57]

Ochronny wpływ ASA potwierdziły badania kliniczne przeprowadzane w grupie ponad 1400 osób. Wykazano, że regularne spożywanie kwasu acetylosalicylowego zmniejszało śmiertelność i prawdopodobieństwo na zachorowanie na raka jelita grubego. Przy takim spożyciu zanalizowano względne ryzyko zgonu - u mężczyzn wyniosło 0,62 (95% CI 0,40–0,89) oraz u kobiet 0,58 (95% CI 0,37–0,90) [58]. Kolejną zaletą systematycznego stosowania ASA jest zmniejszenie szansy na wystąpienie polipów gruczolakowych - zauważalna redukcja występuje po stosowaniu ASA minimalnie 5 lat. [58]

Algra i Rothwell opublikowali w 2012 metaanalizę badań kliniczno-kontrolnych i kohortowych uwzględniającą 330 tysięcy chorych. Badania te były przeprowadzone pomiędzy 1950 a 2011 i wykazano w nich związek pomiędzy stosowaniem ASA, a zmniejszonym ryzykiem wystąpienia raka jelita grubego. Zebrane dane zostały stratyfikowane według czasu przyjmowania (mniej lub co najmniej 5 lat), dawki (mniej niż 100 mg, 100–299 mg, co najmniej 300 mg), częstości stosowania (codziennie, 3–6 razy w tygodniu, mniej niż 2 razy w tygodniu). W analizie 6 badań z randomizacją wykazano zmniejszenie 20-letniego prawdopodobieństwa zgonu na raka jelita grubego o 42% (OR = 0,58, 95% CI 0,44–0,78). W 26 badaniach kliniczno-kontrolnych przyjmowanie dowolnej ilości zmniejsza ryzyko zapadnięcia na raka jelita grubego o 33% (OR = 0,67, 95% CI 0,60–0,74). W 17 badaniach przy przyjmowaniu regularnym ASA ryzyko spadło o 38% (OR = 0,62, 95% CI 0,58–0,67). Również wykazano, że stosowanie ASA zmniejszyło ilość chorych z rozsiewem nowotworu jelita grubego o 66% [59]

5. PODSUMOWANIE

Kwas Acetylosalicylowy jest lekiem o wielu zastosowaniach. W przeszłości był wykorzystywany jako jeden z pierwszych leków przeciwzapalnych, przeciwgorączkowych i przeciwbólowych. Dziś jest stosowany w prewencji chorób naczyniowo-sercowych, a nowe badania potwierdzają jego zastosowania w profilaktyce nowotworów jelita grubego. [60] ASA zapobiega polipom jelita [61], a jednocześnie zmniejsza prawdopodobieństwo zachorowania na raka jelita grubego [62] i raka jelita grubego w zespole Lyncha. [63] Badania te ponadto wskazują, że przy stosowaniu ASA zmniejsza się całkowita umieralność na ten typ nowotworu.

REFERENCJE

1. Douaiher J, Ravipati A, Grams B, Chowdhury S, Alatis O, Are C. Colorectal cancer-global burden, trends, and geographical variations. *J Surg Oncol.* 2017;115(5):619-630. doi:10.1002/jso.24578
2. Strona główna | KRN. Strona główna | KRN. Dostęp 23.09.2021. <http://onkologia.org.pl/>
3. Prognoza Ludności Na Lata 2008-2035. Warszawa: Zakład Wydawnictwo Statystycznych; 2009.
4. Tuchowska P, Worach-Kardas H, Marcinkowski JT. Najczęstsze nowotwory złośliwe w Polsce - główne czynniki ryzyka i możliwości optymalizacji działań profilaktycznych. *Problemy Higieny i Epidemiologii.* 2013;94(2):166-171.
5. Didkowska J, Wojciechowska U, Zatoński W. Prognozy zachorowalności i umieralności na nowotwory złośliwe w Polsce. Centrum Onkologii – Instytut, Warszawa 2009: 23-27.
6. Thun MJ, Namboodiri MM, Heath CW Jr. Aspirin Use and Reduced Risk of Fatal Colon Cancer. *N Engl J Med.* 1991;325(23):1593-1596. doi:10.1056/nejm199112053252301
7. Ma X, Aoki T, Tsuruyama T, Narumiya S. Definition of Prostaglandin E2–EP2 Signals in the Colon Tumor Microenvironment That Amplify Inflammation and Tumor Growth. *Cancer Res.* 2015;75(14):2822-2832. doi:10.1158/0008-5472.can-15-0125
8. Sengupta N, Yee E, Feuerstein JD. Colorectal Cancer Screening in Inflammatory Bowel Disease. *Dig Dis Sci.* 2015;61(4):980-989. doi:10.1007/s10620-015-3979-z
9. Johnson CM, Wei C, Ensor JE, i in. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer Causes Control.* 2013;24(6):1207-1222. doi:10.1007/s10552-013-0201-5
10. Lowery JT, Ahnen DJ, Schroy PC III, i in. Understanding the contribution of family history to colorectal cancer risk and its clinical implications: A state-of-the-science review. *Cancer.* 2016;122(17):2633-2645. doi:10.1002/cncr.30080

11. Wronkowski Z, Szymon B. Nowotwory jelita grubego. PZWL Wydawnictwo Lekarskie; 2008.
12. Starzyńska T, Deptała A, Królicki L i in. Nowotwory neuroendokryne jelita grubego — zasady postępowania (rekomendowane przez Polską Sieć Guzów Neuroendokrynych). *Endokrynologia Polska*. 2014;64(6):494-504. doi:10.5603/ep.2013.0032
13. Swain AR, Dutton SP, Truswell AS. Salicylates in foods. *J Am Diet Assoc* 1985, 85: 950-60.
14. Scooter MJ, Roberts DPT, Wilson LA, et al. Free salicylic acid and acetyl salicylic acid content of foods using gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chem* 2007, 105: 273-279.
15. Wood A, Baxter G, Thies F, Kyle J, Duthie G. A systematic review of salicylates in foods: Estimated daily intake of a Scottish population. *Mol Nutr Food Res*. 2011;55(S1):S7-S14. doi:10.1002/mnfr.201000408
16. Goldberg, Daniel R. (Summer 2009). "Aspirin: Turn of the Century Miracle Drug". *Chemical Heritage Magazine*. 27 (2): 26–30. Archived from the original on 20 March 2018. Retrieved 24 March 2018.
17. Nunn JF. Ancient Egyptian medicine. *Trans Med Soc Lond*. 1996;113:57-68.
18. Warner TD, Mitchell JA. Cyclooxygenase-3 (COX-3): Filling in the gaps toward a COX continuum? *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(21):13371-13373. doi:10.1073/pnas.222543099
19. Botting RM. Vane's discovery of the mechanism of action of aspirin changed our understanding of its clinical pharmacology. *Pharmacological Reports*. 2010;62(3):518-525. doi:10.1016/s1734-1140(10)70308-x
20. LaValle JB. *The COX-2 Connection: NATURAL BREAK-THROUGH Treatment FOR Arthritis, Alzheimer's, and Cancer*. Rochester, VT: Healing Arts Press; 2001.
21. Morrow JD, Roberts L. Lipid-derived autacoids. W: Hardman J, Limbird L (red). *The pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGraw-Hill 2001; 669–685.
22. Szymański F.M. Kwas acetylosalicylowy w gabinecie lekarza praktyka. Wydawnictwo ITEM Publishing, Warszawa 2014.

23. Otto JC, Smith WL. The orientation of prostaglandin endoperoxide synthase-1 in the endoplasmic reticulum of transiently transfected cos-1 cells. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.* 1995;23:29-34.
24. Herschman HR. Prostaglandin synthase 2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism.* 1996;1299(1):125-140. doi:10.1016/0005-2760(95)00194-8
25. Botting R. COX-1 and COX-3 inhibitors. *Thrombosis Research.* 2003;110(5-6):269-272. doi:10.1016/s0049-3848(03)00411-0
26. Botting R, Ayoub SS. COX-3 and the mechanism of action of paracetamol/acetaminophen. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* 2005;72(2):85-87. doi:10.1016/j.plefa.2004.10.005
27. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KLT, i in. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2002;99(21):13926-13931. doi:10.1073/pnas.162468699
28. Schönbeck U, Sukhova GK, Graber P, Coulter S, Libby P. Augmented Expression of Cyclooxygenase-2 in Human Atherosclerotic Lesions. *The American Journal of Pathology.* 1999;155(4):1281-1291. doi:10.1016/s0002-9440(10)65230-3
29. Komhoff M, Grone HJ, Klein T, Seyberth HW, Nusing RM. Localization of cyclooxygenase-1 and -2 in adult and fetal human kidney: implication for renal function. *American Journal of Physiology-Renal Physiology.* 1997;272(4):F460-F468. doi:10.1152/ajprenal.1997.272.4.f460
30. DeMaria AN, Weir MR. Coxibs—Beyond the GI Tract. *Journal of Pain and Symptom Management.* 2003;25(2):41-49. doi:10.1016/s0885-3924(02)00630-9
31. Botting JH, Vane JR. *Selective COX-2 INHIBITORS: Pharmacology, Clinical Effects and Therapeutic Potential.* Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic; 1998.
32. Fux R. Cyclooxygenase-2 Expression in Human Colorectal Cancer Is Unrelated to Overall Patient Survival. *Clinical Cancer Research.* 2005;11(13):4754-4760. doi:10.1158/1078-0432.ccr-04-2586

33. Thun MJ, Henley SJ, Patrono C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:252–66.
34. Khan KNM, Stanfield KM, Dannenberg A, i in. Cyclooxygenase-2 Expression in the Developing Human Kidney. *Pediatric and Developmental Pathology*. 2001;4(5):461-466. doi:10.1007/s10024001-0041-2
35. Jackson LM. Cyclooxygenase (COX) 1 and 2 in normal, inflamed, and ulcerated human gastric mucosa. *Gut*. 2000;47(6):762-770. doi:10.1136/gut.47.6.762
36. Kargman S, Charleson S, Cartwright M, i in. Characterization of Prostaglandin G/H Synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts. *Gastroenterology*. 1996;111(2):445-454. doi:10.1053/gast.1996.v111.pm8690211
37. Warner TD, Mitchell JA. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *FASEB j*. 2004;18(7):790-804. doi:10.1096/fj.03-0645rev
38. Schror K., Smith E.F.: Dictionary of prostaglandins and related compounds. Medikon Verlag, Munchen 1990
39. Baranowski W, Jakowicki J, Rechberger T. Prostaglandyny We Współczesnej Ginekologii I Położnictwie. Lublin: BiFolium; 1998.
40. Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1975;72(8):2994-2998. doi:10.1073/pnas.72.8.2994
41. McCowan C, Munro AJ, Donnan PT, Steele RJC. Use of aspirin post-diagnosis in a cohort of patients with colorectal cancer and its association with all-cause and colorectal cancer specific mortality. *European Journal of Cancer*. 2013;49(5):1049-1057. doi:10.1016/j.ejca.2012.10.024
42. Rothwell PM, Wilson M, Elwin C-E, i in. Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *The Lancet*. 2010;376(9754):1741-1750. doi:10.1016/s0140-6736(10)61543-7

43. Liu Y-C, Zou X-B, Chai Y-F, Yao Y-M. Macrophage Polarization in Inflammatory Diseases. *Int J Biol Sci.* 2014;10(5):520-529. doi:10.7150/ijbs.8879
44. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest.* 2012;122(3):787-795. doi:10.1172/jci59643
45. He H, Xu J, Warren CM, i in. Endothelial cells provide an instructive niche for the differentiation and functional polarization of M2-like macrophages. *Blood.* 2012;120(15):3152-3162. doi:10.1182/blood-2012-04-422758
46. Talieri M, Papadopoulou S, Scorilas A, i in. Cathepsin B and cathepsin D expression in the progression of colorectal adenoma to carcinoma. *Cancer Letters.* 2004;205(1):97-106. doi:10.1016/j.canlet.2003.09.033
47. McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ. Understanding the IL-23–IL-17 immune pathway. *Trends in Immunology.* 2006;27(1):17-23. doi:10.1016/j.it.2005.10.003
48. Roncucci L, Mora E, Mariani F, i in. Myeloperoxidase-Positive Cell Infiltration in Colorectal Carcinogenesis as Indicator of Colorectal Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(9):2291-2297. doi:10.1158/1055-9965.epi-08-0224
49. Montrose DC, Nakanishi M, Murphy RC, et al. The role of PGE2 in intestinal inflammation and tumorigenesis. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators.* 2015;116-117:26-36. doi:10.1016/j.prostaglandins.2014.10.002
50. Mutoh M, Watanabe K, Kitamura T, et al. Involvement of prostaglandin E receptor subtype EP(4) in colon carcinogenesis. *Cancer Res.* 2002;62(1):28-32.
51. Arber N. Cyclooxygenase-2 Inhibitors in Colorectal Cancer Prevention: Point: Figure 1. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(8):1852-1857. doi:10.1158/1055-9965.epi-08-0167
52. Hial V, Horakova Z, Shaff RE, Beaven MA. Alteration of tumor growth by aspirin and indomethacin: Studies with two transplantable tumors in mouse. *European Journal of Pharmacology.* 1976;37(2):367-376. doi:10.1016/0014-2999(76)90044-3
53. Ross DS, Bitzer D, Roy T, Murphy JE. Piroxicam inhibits the growth of an adenocarcinoma isograft in Fischer rats. *Journal of Surgical Research.* 1988;45(3):249-253. doi:10.1016/0022-4804(88)90071-6

54. Pollard M, Luckert PH, Schmidt MA. The suppressive effect of piroxicam on autochthonous intestinal tumors in the rat. *Cancer Letters*. 1983;21(1):57-61. doi:10.1016/0304-3835(83)90082-4
55. Liao X, Morikawa T, Lochhead P, i in. Prognostic Role of PIK3CA Mutation in Colorectal Cancer: Cohort Study and Literature Review. *Clin Cancer Res*. 2012;18(8):2257-2268. doi:10.1158/1078-0432.ccr-11-2410
56. Samuels Y. High Frequency of Mutations of the PIK3CA Gene in Human Cancers. *Science*. 2004;304(5670):554-554. doi:10.1126/science.1096502
57. Uddin S, Ahmed M, Hussain A, i in. Cyclooxygenase-2 inhibition inhibits PI3K/AKT kinase activity in epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer*. 2010;126(2):382-394. doi:10.1002/ijc.24757
58. Martínez ME, McPherson RS, Levin B, Annegers JF. Aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of colorectal adenomatous polyps among endoscoped individuals. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1995;4(7):703-707.
59. Algra AM, Rothwell PM. Effects of regular aspirin on long-term cancer incidence and metastasis: a systematic comparison of evidence from observational studies versus randomised trials. *The Lancet Oncology*. 2012;13(5):518-527. doi:10.1016/s1470-2045(12)70112-2
60. Cole BF, Logan RF, Halabi S, i in. Aspirin for the Chemoprevention of Colorectal Adenomas: Meta-analysis of the Randomized Trials. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2009;101(4):256-266. doi:10.1093/jnci/djn485
61. Rothwell PM, Wilson M, Elwin CE, et al. Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet* 2010; 376: 1741–50.
62. Flossmann E, Rothwell PM. Effect of aspirin on long-term risk of colorectal cancer: consistent evidence from randomised and observational studies. *The Lancet*. 2007;369(9573):1603-1613. doi:10.1016/s0140-6736(07)60747-8
63. Burn J, Gerdes A-M, Macrae F, i in. Long-term effect of aspirin on cancer risk in carriers of hereditary colorectal cancer: an analysis from the CAPP2 randomised controlled trial. *The Lancet*. 2011;378(9809):2081-2087. doi:10.1016/s0140-6736(11)61049-0

TERAPIA GENOWA W CHOROBY PARKINSONA

Julia Kaczmarczyk

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

Abstrakt:

Choroba Parkinsona jest zaliczana do chorób neurodegeneracyjnych i dotyka ośrodkowego układu nerwowego. U jej podstaw leży utrata bądź zmiany zwyrodnieniowe neuronów dopaminergicznych istoty czarnej śródmózgowia. Prowadzi to do upośledzenia wydzielania przez nie dopaminy, która jest istotnym neuroprzekaźnikiem. Niedobór dopaminy u osób z chorobą Parkinsona objawia się drżeniem spoczynkowym, sztywnością i spowolnieniem ruchów (bradykinezja) oraz utrudnieniami w poruszaniu się i inicjacji ruchu (akinezja). Dotychczasowe leczenie prowadzone było między innymi z wykorzystaniem wlewów lewodopy, które przynosiły częściowe korzyści, jednak taka terapia nie była wolna od skutków ubocznych, a jej efektywność mogłaby być znacznie wyższa. Stąd w ostatnich latach badania w tym zakresie opierały się na poszukiwaniu zarówno nowych metod leczenia jak i na ulepszeniu metod już stosowanych. Podstawą nowych rozwiązań stały się szerokie możliwości terapii genowej. W terapii, która w ostatnich latach przeszła pierwszą fazę badań klinicznych i znalazła skuteczne zastosowanie wśród pacjentów, wykorzystuje się AAV2 (*adeno-associated viral vector serotype-2*), zawierające komplementarne fragmenty DNA, kodujące enzym hAADC (*L-amino acid decarboxylase*), który ma możliwość przekształcenia lewodopy w dopaminę. Aby zwiększyć precyzję przeprowadzanego leczenia i umożliwić dostarczenie kompleksu AAV2-hAADC w rejonu mózgu, w których doszło do zwyrodnień w wyniku choroby, użyto przy wykonywanym zabiegu rezonansu magnetycznego. U pacjentów, którzy poddali się tej terapii, zanotowano znaczny wzrost efektywności kuracji lewodopą i złagodzenie objawów choroby. Ponadto możliwe było zmniejszenie dawek leków przeciwparkinsonowskich.

Słowa kluczowe: choroba, Parkinsona, terapia, genowa, AAV2-hAADC

Abstract:

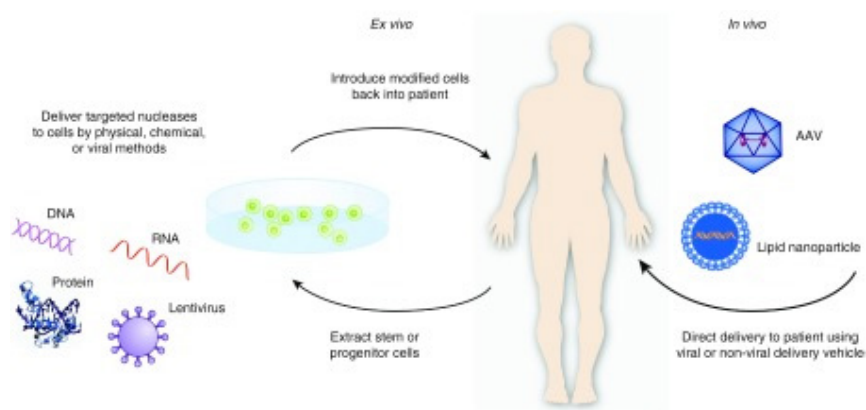
Parkinson's disease is classified as a neurodegenerative disease and affects the central nervous system. It is based on the loss or degenerative changes in dopaminergic neurons in the substantia nigra of the midbrain. This leads to the impaired secretion of dopamine, which is an extremely important neurotransmitter. Dopamine deficiency in patients with Parkinson's disease manifests itself as tremor at rest, stiffness, and slowness of movements (bradykinesia), difficulties in movements and initiation of movement (akinesia). Previous treatment was carried out with the

use of levodopa infusions, which brought partial benefits, but such therapy was not free from side effects, and its effectiveness could be much higher. Therefore, in recent years, research in this field has been based on both the research for new methods of treatment and the improvement of the methods already being used. The wide range of possibilities offered by gene therapy came to the rescue. In the therapy, which in recent years has passed the first phase in clinical trials and has found effective application among patients, the AAV2 (adeno-associated viral vector serotype-2) is used, containing complementary DNA fragments encoding the hAADC (L-amino acid decarboxylase) enzyme, which can convert levodopa into dopamine. Magnetic resonance imaging was used to increase the precision of the therapy and to enable the delivery of the AAV2-hAADC complex to the regions of the brain where degeneration occurred because of the disease. Patients who experienced this therapy showed a significant increase in the effectiveness of levodopa treatment, alleviation of the symptoms of the disease, it was also possible for them to reduce the doses of anti-Parkinsonian drugs.

Keywords: Parkinson's, disease, gene, therapy, AAV2-hAADC

1. WPROWADZENIE

W ostatnich dekadach nastąpił znaczący rozwój inżynierii genetycznej oraz związanych z nią wszelkich technik biomedycznych. Podejmowano się wielu prób wynalezienia nowych metod leczenia bądź ulepszenia już obecnych. Jedną z metod, w której dokonano wielkiego postępu jest szeroko pojęta terapia genowa (TG). [1,2] TG niesie ze sobą wiele możliwości i zastosowań w leczeniu zarówno chorób dziedzicznych jak i przewlekłych o różnym podłożu oraz daje perspektywy na skuteczniejsze i bardziej specyficzne prowadzenie terapii [3]. TG w głównej mierze opiera się na wprowadzeniu do organizmu przy pomocy wektora, obcego lub własnego (ale zmodyfikowanego) materiału genetycznego, w celu naprawy uszkodzonego genu, uzupełnienia pewnych obszarów w organizmie, które uległy degeneracji czy też nadaniu pewnym komórkom czy tkankom zupełnie nowej funkcji [4]. Jednym z najważniejszych aspektów TG jest obranie odpowiedniej strategii jej przeprowadzenia, to jest wybranie konkretnego modelu (in vivo, ex vivo), (Ryc. 1) oraz wektora (za pomocą którego odpowiednie kwasy nukleinowe będą dostarczane do wymagających tego komórek) na podstawie mechanizmu i przyczyn choroby. Obecnie stanowi to największe wyzwanie TG [5, 6, 7].



Rycina 1. Po lewej stronie przedstawiony jest schemat TG ex vivo z wyizolowaniem komórek z organizmu, po prawej stronie ilustracji przedstawiona jest TG in vivo z bezpośrednim wprowadzeniem materiału genetycznego za pomocą wektora do organizmu pacjenta [8]

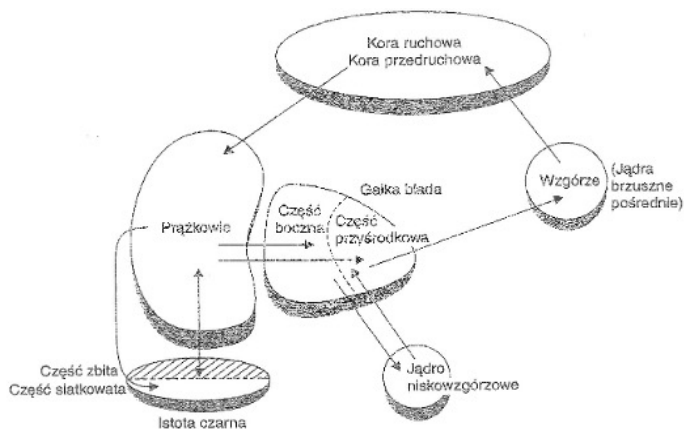
Ten rozdział poświęcony będzie TG in vivo w chorobie Parkinsona (PD z ang. *Parkinson's Disease*), jej przebiegowi, możliwościom leczenia, skutkom i rokowaniom na przyszłość.

2. PRZYCZYNY, MECHANIZM I OBJAWY CHOROBY PARKINSONA JAKO KLUCZ DO CELU I ZROZUMIENIA WYKORZYSTYWANEJ TERAPII GENOWEJ

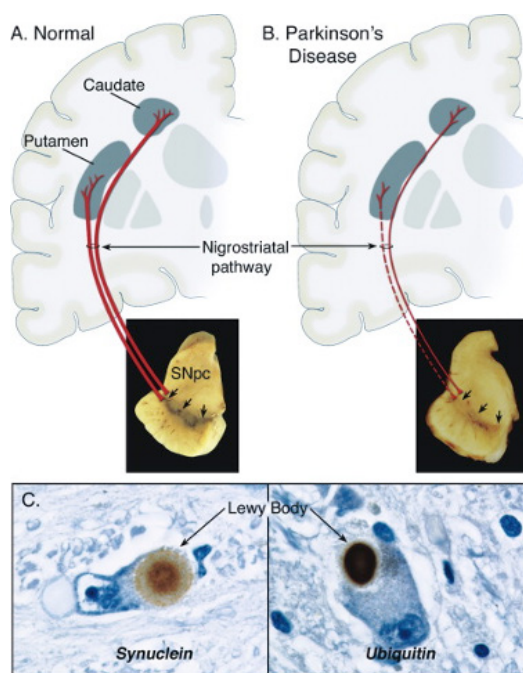
Choroba Parkinsona jest schorzeniem neurodegeneracyjnym, a zatem wiążącym się z uszkodzeniem neuronów. W tym przypadku są to neurony należące do ośrodkowego układu nerwowego chorego. W PD degeneracji ulegają neurony dopaminergiczne, znajdujące się w istocie czarnej części zbitej śródmózgowia i rzutujące zarówno do skorupy jak i jądra ogoniastego, razem zwanymi prążkowiem (Ryc. 2), skutkując w tych obszarach niedoborem dopaminy. Przyczyny tego zjawiska wciąż nie są do końca wyjaśnione [9].

Obecnie na ten temat funkcjonują głównie dwie teorie, pierwsza dotycząca patologii ciałek Lewy'ego (LB z ang. *Lewy bodies*) oraz druga mówiąca o nieprawidłowym pofałdowaniu i nagromadzeniu w agregatach białka alfa-synukleiny (a-Syn), spowodowanym jej oksydacyjnym uszkodzeniem [10, 11]. Można powiedzieć, że przedstawione teorie korelują ze sobą, ponieważ LB są to inkluzje (wtręty) białkowe, które zawierają złoża białka ubikwityny jak i wspomnianej wcześniej a-Syn, która z kolei pełni ważną rolę

w komunikacji pomiędzy neuronami a transportem pęcherzyków neuroprzeźników [12] (Ryc. 3).



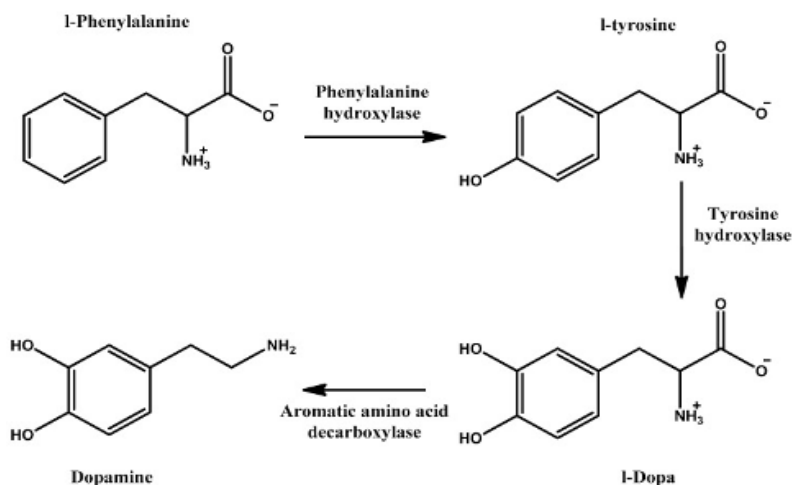
Rycina 2. Schemat układu pozapiramidowego wraz z pętlami neuronalnymi, umożliwiającymi regulację czynności ruchowych. Na rycinie widoczna jest zależność pomiędzy istotą czarną śródmózgowia a prążkowiem [10]



Rycina 3. Pod literą A widoczny jest prawidłowy obraz szlaku dopaminergicznego wraz z widoczną istotą czarną, pod literą B z kolei widoczna jest już degeneracja neuronów. Na rysunku C widoczne są LB zawierające a-Syn i ubikwitynę [13]

2.1. Szlak dopaminergiczny oraz skutki jego zaburzeń w chorobie Parkinsona

Dopamina jest bardzo istotnym neuroprzekaźnikiem dla prawidłowego funkcjonowania całego organizmu. Syntetyzowana jest w kilku etapach. Pierwszym z nich jest hydroksylacja tyrozyny, w której efekcie powstaje bezpośredni prekursor dopaminy – lewodopa (L-DOPA). L-DOPA z kolei ulega dekarboksylacji z udziałem DOPA-dekarboksylazy (dekarboksylaza L-amino-kwasów aromatycznych, AADC), przekształcając się w dopaminę (Ryc. 4).



Rycina 4. Schemat syntezy dopaminy [14]

Proces ten zachodzi w neuronach dopaminergicznych, które tworzą szlak pomiędzy istotą czarną śródmózgowia a prądkowiem, odpowiadającym za prawidłowe funkcje motoryczne. U osób z PD w wyniku utraty neuronów dopaminergicznych, a co za tym idzie niedoborem dopaminy w prądkowiu, dochodzi do licznych nieprawidłowości związanych z układem ruchu. Wśród nich, w zależności od stopnia zaawansowania choroby, wyróżniamy: drżenie spoczynkowe kończyn, spowolnienie ruchów i trudności w ich inicjacji, pochyloną postawę ciała (zgięcie w stawie krzyżowo-biodrowym), stawianie drobnych, szurających kroków oraz sztywność mięśni [15, 16, 17].

3. DOTYCHCZASOWE LECZENIE I SZUKANIE NOWYCH ROZWIĄZAŃ

Po poznaniu mechanizmu postępowania PD oczywistym wydawałoby się uzupełnienie u pacjenta niedoborów dopaminy w taki sposób, aby dotarła do tych obszarów mózgu, w których zwiększyło się na nią zapotrzebowanie ze względu na śmierć neuronów dopaminergicznych. Jednakże dopamina nie jest w stanie przekroczyć tak zwanej bariery krew-mózg. Okazuje się jednak, że barierę tę jest w stanie przejść jej prekursor L-DOPA. W ostatnich latach stała się więc ona jedną z podstawowych metod leczenia PD. Pacjentom L-DOPA podawana jest za pomocą wlewów dojelitowych bądź dożylnych i przynosi niemal natychmiastowe polepszenie stanu pacjenta i widoczne efekty. Niestety nie jest to terapia pozbawiona wad, ze względu na występowanie skutków ubocznych wynikających ze stałego przyjmowania L-DOPY, takich jak polineuropatia oraz towarzyszący dyskomfort związany z obecnością przezskórnej gastrostomii. Kolejną metodą, uważaną za wielkie osiągnięcie w leczeniu PD jest głęboka stymulacja mózgu (z ang. *deep brain stimulation*, DBS), która przynosi poprawę na dłuższy okres, szacowany nawet na około 10 lat [18]. U pacjentów zostaje wszczepiony generator impulsów z elektrodami, który poprzez prąd elektryczny stymuluje pewne obszary mózgu, takie jak jądro podwzgórza. Elektrody są umieszczane operacyjnie poprzez niewielkie otwory w czaszce i kierowane na właściwe sobie miejsce pod stałą kontrolą, przy użyciu obrazowania w postaci rezonansu magnetycznego. Jest to tylko jedna z wykorzystywanych metod operacyjnych, dobieranych w zależności od pacjenta. [19] DBS posiada jednak również pewne ograniczenia, wynikające między innymi ze stanu pacjenta, w związku z tym tylko kilkadziesiąt procent ze skierowanych do zabiegu zostaje do niego zakwalifikowanych. Każda operacja niesie ze sobą ryzyko pewnych powikłań czy niepowodzenia. Sama implementowana aparatura może z kolei ulec zniszczeniu bądź wyłączeniu, na przykład pod wpływem silnego pola magnetycznego, co stanowi utrudnienie przy podejmowanej diagnostyce i czynnościach medycznych w przyszłości [20]. Obie z przedstawionych powyżej metod leczą jedynie symptomy, natomiast nie są w stanie zahamować postępu choroby. Mogą zatem zostać jeszcze ulepszone bądź zastąpione przez terapię bardziej skuteczną. Dlatego na przestrzeni ostatnich lat powstało wiele prac i badań nad nowym rozwiązaniem, którym może być TG [21].

4. TERAPIA GENOWA Z WYKORZYSTANIEM AAV2

Możliwość wykorzystania TG w PD była tematem wielu rozważań i badań naukowych w ostatnich latach. Po dokładnym poznaniu mechanizmu choroby i przyczyn wywołujących jej symptomy można było zacząć prowadzić dyskusje, zastanawiając się w jaki sposób taka terapia miałaby przebiegać, w którym miejscu na szlaku powstawania i rozwoju choroby powinna znaleźć swoje zastosowanie, jaki materiał genetyczny należałoby zastosować i w końcu, jak wybrany materiał dostarczyć w odpowiednie miejsce, jednocześnie unikając skutków ubocznych? Powstanie oraz skuteczność TG bezwzględnie zależy od odpowiedzi na zadane wyżej pytania i stanowi obecnie jej największe wyzwanie [22].

4.1. Szlak syntezy dopaminy kierunkiem terapii genowej

Jako jeden z kierunków TG w PD obrano szlak syntezy dopaminy z L-DOPY. W wyniku przeprowadzanych badań, między innymi na zwierzęcych modelach PD oraz na pośmiertnie pobranych tkankach mózgu chorych na PD, wykazano ogromny spadek poziomu enzymu AADC przy występowaniu PD. Jak wynika z wcześniejszych części rozdziału, AADC odpowiada za przemianę L-DOPY w dopaminę. Przeprowadzenie zatem TG, która skupiałaby się na doprowadzeniu genu kodującego ten enzym pomogłoby znacznie podnieść skuteczność terapii z użyciem L-DOPY w wyniku intensywniejszego jej przekształcania w dopaminę [23].

4.2. Wirusy towarzyszące adenowirusom jako wektory w terapii genowej

Znalezienie odpowiedniego wektora do przeprowadzenia TG również stanowiło przedmiot badań naukowych ostatnich lat. Dowiedziono, że wirusami AAV (z ang. *adeno-associated virus*) zarażona jest większość ludzkiej populacji, z czego wiadomo, że zakażenie te nie wywołuje stanu zapalnego w organizmie. Ich znikoma immunogenność oraz praktycznie zerowa choroobotwórczość sprawiły, że AAV stały się potencjalnymi wektorami do TG. Dodatkową korzystną cechą AAV stanowi możliwość infekcji za ich pomocą komórek nerwowych. Przykładowo, nie jest to możliwe przy zastosowaniu re-trowirusów. Do przeprowadzenia TG w PD spośród wielu serotypów tego wirusa został wybrany serotyp 2 (AAV2), ze względu na jego dużą zdolność wnikanía między innymi do neuronów. Materiał genetyczny AAV stanowi

pojedyncza nić DNA. Aby AAV mogły zostać użyte w celu terapeutycznym, muszą zostać poddane odpowiedniej modyfikacji i oczyszczeniu z wykorzystaniem technik inżynierii genetycznej [24].

4.3. Badania przedkliniczne

Mając już obrany cel terapii, wybrany materiał genetyczny w postaci ludzkiego genu kodującego enzym AADC (hAADC – z ang. *human- L-amino acid decarboxylase*) oraz wektor, za pomocą którego dany materiał genetyczny będzie dostarczany do wymagających tego obszarów, możliwe stało się rozpoczęcie badań przedklinicznych. W tym celu przeprowadzano badania na zwierzęcych modelach – gryzoniach oraz naczelnych. Aby uzyskać model mózgu ze zmianami charakterystycznymi dla PD gryzonie zostały potraktowane oksydopaminą (6-OHDA, *6-hydroksydopamine*), a naczelne MPTP (*1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine*). Obie substancje mając działanie neurotoksyczne spowodowały degenerację neuronów dopaminergicznych w ich mózgowiu, co dało możliwość oceny poziomu enzymu AADC i potwierdzenie jego obniżenia u osób z PD oraz przetestowania leczniczego działania kompleksu AAV-2-hAADC. Dany kompleks zdecydowano wprowadzić u naczelnych w obszar prądkowia, gdzie znajdują się średnie neurony kolczyste, które (jak wykazały badania) nie ulegają degeneracji w PD, zachowały zatem zdolność do ekspresji wprowadzanych podczas terapii transgenów przez dłuższy czas [25, 26].

Wśród gryzoni poddanych działaniu AAV2-AADC wykazano wzrost reakcji na podawanie L-DOPY co pozwoliło na zmniejszenie jej dawek przy jednoczesnym utrzymaniu takiego samego efektu terapeutycznego. Zaobserwowano wzrost poziomu dopaminy oraz aktywności enzymu AADC u tych osobników [27].

Naczelne, także poddane badaniom, pochodziły z gatunku *Macaca Mulatta* (Makak królewski). Po kilku miesiącach od podania 6 iniekcji MPTP, zarówno do jądra ogoniastego jak i skorupy, został zaaplikowany kompleks AAV2-hAADC. Stan zwierząt oraz ich zachowanie zostały ocenione według skali CRS (*clinical rating scale*), a ich mózg został przeskanowany przy użyciu pozytronowej tomografii emisyjnej (PET) w celu śledzenia ekspresji genu hAADC. Naczelne były badane i obserwowane przez 8 lat. W końcowej ocenie odkryto, że u osobników poddanych terapii i jednocześnie przyjmujących L-DOPE nastąpiła znaczna poprawa względem punktu wyjściowego (nawet o 35%) według skali CRS. Wykazano, że u badanych zwierząt terapia AAV2-hAADC przynosi długotrwałe, stabilne korzyści, dzięki przywróceniu

aktywności enzymu AADC w uszkodzonej półkuli. Terapia została uznana za na tyle bezpieczną i skuteczną, że mogła wkroczyć do pierwszej fazy badań klinicznych [28, 29].

4.4. Pierwsza faza badań klinicznych

W pierwszej fazie klinicznej wzięło udział 15 pacjentów z zaawansowaną postacią PD, w wieku od 40 do 70 lat, będących pod stałym, stabilnym leczeniem medykamentami o działaniu antyparkinsonowskim oraz wykazujących odpowiedź na prowadzoną dotychczas terapię. Wśród zakwalifikowanych do TG chorych dokonano podziału na trzy grupy, które w następnych etapach różniły się między sobą ilością przyjmowanego kompleksu AAV2-hAADC (funkcjonującego również pod nazwą VY-AADC01). I w ten sposób pacjenci z grupy pierwszej otrzymali dawkę o stężeniu 8.3×10^{11} vg/ml (vg z ang. *vector genomes*) do objętości 450 µl na skorupę, dając ostatecznie dawkę 7.5×10^{11} vg. U pacjentów z drugiej grupy zachowano to samo stężenie, natomiast podwojono objętość do 900 µl, dając dawkę o wartości 1.5×10^{12} vg. Z kolei w trzeciej grupie badanych zmieniono stężenie na 2.6×10^{12} vg/ml przy zachowaniu tej samej objętości co w grupie drugiej, otrzymując łącznie dawkę 4.7×10^{12} vg.

Zabieg podania pacjentom kompleksu VY-AADC01 wykonywany był przez neurochirurgów. Pacjenci byli w stanie znieczulenia ogólnego i zostali umieszczeni w pozycji supinalnej w tubie rezonansu magnetycznego. W czasie pacjentów wykonano podczas operacji dwa otwory, przez które wprowadzone były kaniule, które miały dostać się aż do skorupy. Jednocześnie wlewany był przez nie kompleks VY-AADC01. Zastosowanie rezonansu magnetycznego wraz z możliwością wykonania seryjnych obrazów oraz śródoperacyjnej nawigacji pozwoliło na zwiększenie zarówno bezpieczeństwa przeprowadzanego zabiegu jak i jego precyzji, możliwe było także monitorowanie całego przebiegu operacji, łącznie z zaobserwowaniem pokrycia skorupy przez VY-AADC01. Po zakończeniu procedury terapeutycznej pacjenci zostali poddani krótkiej obserwacji szpitalnej.

Stan pacjentów po opuszczeniu szpitala był stale kontrolowany co kilka lub kilkanaście miesięcy. Dokonywana była zarówno ocena jakości życia pacjentów jak i objawów PD według ujednoliconej skali UPDRS (z ang. *The Unified Parkinson's Disease Rating Scale*). U wszystkich pacjentów poddanych terapii z grup 1-3 nastąpiła znaczna poprawa w postaci skrócenia tak zwanego okresu "off" (podczas którego następuje nasilenie objawów motorycznych lub pozamotorycznych takich jak lęk czy depresja, skutkujące niepełnosprawnością

funkcjonalną) oraz wydłużenie czasu w ciągu doby, w których nie występuje dyskineza. U chorych zaobserwowane było również zwiększenie aktywności enzymu AADC oraz pojawienie się sposobności do stosowania mniejszych dawek leków przeciwparkinsonowskich, najczęściej L-DOPY. W grupie trzeciej, która otrzymała największą dawkę VY-AADC01 podczas zabiegu, zanotowano największą poprawę, jeśli chodzi o możliwe zmniejszenie dawki pobieranych leków. W skali UPDRS u pacjentów poddanych terapii spostrzeżono wynik lepszy nawet od 7 do 10 punktów. Po trzyletniej, a u niektórych pacjentów nawet dłuższej obserwacji wysnuto wniosek, że ta TG przynosi skutki nie tylko długoterminowe, ale nawet stałe [30-33].

4.5. Kontynuacja i rozwój badań pierwszej fazy klinicznej

W najnowszych doniesieniach naukowych pojawiają się informacje o pewnych ulepszeniach pierwszej fazy klinicznej szczególnie w aspekcie neurochirurgicznym. Zabieg opisany powyżej został lekko zmodyfikowany. Pacjent jest ułożony w pozycji pronalnej, co umożliwia podejście ciemienowo-potyliczne do skorupy. Dodatkowo została również zwiększona dwukrotnie objętość infuzji wektora do 1800µl na skorupę, przy stężeniu $2,6 \times 10^{12}$ vg / ml. Wymienione powyżej czynniki sprawiają, że znacznie wzrastają możliwości pokrycia jak największego obszaru skorupy, w porównaniu do wcześniejszego modelu zabiegu. Obecnie szacuje się, że średnie pokrycie skorupy wynosi wówczas ponad 50%. Przejście na dostęp tylny oraz skrócenie trajektorii wprowadzanej kaniuli przyczynia się do skrócenia czasu zabiegu, a co za tym idzie do zmniejszenia ryzyka powikłań pooperacyjnych [34].

5. PODSUMOWANIE

Ogólne rozważania nad terapią genową, w tym nad TG w PD trwają od kilku dekad. Przez lata podjętych zostało wiele prób jej stworzenia i wykorzystania w praktyce. Jednakże dopiero na przestrzeni ostatnich 15-20 lat jej rozwój nabrał znacznie szybszego tempa. Szczególnie w ostatnim czasie pojawiają się artykuły donoszące o jej znakomitych efektach, dając tym samym nadzieję na poprawę stanu zdrowia i komfortu życia osób chorych na PD. Warto śledzić w najbliższym czasie doniesienia ze świata nauki, aby móc zaobserwować dalsze losy terapii z wykorzystaniem AAV2-hAADC, zwłaszcza jej kolejne fazy kliniczne, ponieważ wraz z nią dokonuje się ogromny postęp w leczeniu nie tylko PD, ale również innych chorób o naturze neurodegeneracyjnej.

REFERENCJE

1. Duda, Maciej, et al. "Charakterystyka nanostrukturalna materiału genetycznego do zastosowania w terapii genowej." *Acta Bio-Optica et Informatica Medica. Inżynieria Biomedyczna* 21.1 (2015).
2. Smith, Edvard, and Pontus Blomberg. "Genterapi – från idé till verklighet - Ännu har få patienter behandlats och preparaten är ofta mycket dyra – men utvecklingen går fort nu" [Gene therapy – from idea to reality]. *Lakartidningen* vol. 114 EWYL. 19 Dec. 2017
3. Kaufmann, Kerstin B et al. "Gene therapy on the move." *EMBO molecular medicine* vol. 5,11 (2013): 1642-61. doi:10.1002/emmm.201202287
4. Smith, Edvard, and Pontus Blomberg. "Genterapi – från idé till verklighet - Ännu har få patienter behandlats och preparaten är ofta mycket dyra – men utvecklingen går fort nu" [Gene therapy – from idea to reality]. *Lakartidningen* vol. 114 EWYL. 19 Dec. 2017
5. Maeder, Morgan L, and Charles A Gersbach. "Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy." *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* vol. 24,3 (2016): 430-46. doi:10.1038/mt.2016.10
6. Young, Lawrence S et al. "Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application." *The Journal of pathology* vol. 208,2 (2006): 299-318. doi:10.1002/path.1896
7. Lukashev, A N, and A A Zamyatnin Jr. "Viral Vectors for Gene Therapy: Current State and Clinical Perspectives." *Biochemistry. Biokhimiia* vol. 81,7 (2016): 700-8. doi:10.1134/S0006297916070063
8. Maeder, Morgan L, and Charles A Gersbach. "Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy." *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* vol. 24,3 (2016): 430-46. doi:10.1038/mt.2016.10
9. Beers, Mark H., Richard K. Albert, and Stanisław Filipecki, eds. *The Merck manual: podręcznik diagnostyki i terapii*. Elsevier Urban & Partner, 2008.
10. Kozubski, W., and P. Liberski. "Neurologia." *Podręcznik dla studentów medycyny*. PZWL, Warszawa (2006): 282-286.

11. McGregor, Matthew M., and Alexandra B. Nelson. "Circuit mechanisms of Parkinson's disease." *Neuron* 101.6 (2019): 1042-1056.
12. Rocha Cabrero, Franklyn. and Elizabeth H. Morrison. "Lewy Bodies." *StatPearls*, StatPearls Publishing, 11 July 2020.
13. Dauer, William, and Serge Przedborski. "Parkinson's disease: mechanisms and models." *Neuron* 39.6 (2003): 889-909.
14. Haddad, Fatma et al. "Dopamine and Levodopa Prodrugs for the Treatment of Parkinson's Disease." *Molecules* (Basel, Switzerland) vol. 23,1 40. 25 Dec. 2017, doi:10.3390/molecules23010040
15. Beers, Mark H., Richard K. Albert, and Stanisław Filipecki, eds. *The Merck manual: podręcznik diagnostyki i terapii*. Elsevier Urban & Partner, 2008.
16. Kozubski, W., and P. Liberski. "Neurologia." *Podręcznik dla studentów medycyny*. PZWL, Warszawa (2006): 282-286.
17. Drożak, Jakub, and Jadwiga Bryła. "Dopamina—nie tylko neuroprzekaznik* Dopamine: not just a neurotransmitter." *Postępy Hig Med Dosw.* (online) 59 (2005): 405-420.
18. Bogucki, Andrzej, et al. "Leczenie zaawansowanej choroby Parkinsona—rekomendacje Polskiego Towarzystwa Choroby Parkinsona i Innych Zaburzeń Ruchowych." *Polski Przegląd Neurologiczny* 10.1 (2014): 15-22.
19. Malek, Naveed. "Deep brain stimulation in Parkinson's disease." *Neurology India* 67.4 (2019): 968.
20. Bogucki, Andrzej, et al. "Leczenie zaawansowanej choroby Parkinsona—rekomendacje Polskiego Towarzystwa Choroby Parkinsona i Innych Zaburzeń Ruchowych." *Polski Przegląd Neurologiczny* 10.1 (2014): 15-22.
21. Axelsen, Tobias M, and David P D Woldbye. "Gene Therapy for Parkinson's Disease, An Update." *Journal of Parkinson's disease* vol. 8,2 (2018): 195-215. doi:10.3233/JPD-181331
22. Sudhakar, Vivek, and R Mark Richardson. "Gene Therapy for Neurodegenerative Diseases." *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* vol. 16,1 (2019): 166-175. doi:10.1007/s13311-018-00694-0

23. Ciesielska, Agnieszka et al. "Depletion of AADC activity in caudate nucleus and putamen of Parkinson's disease patients; implications for ongoing AAV2-AADC gene therapy trial." *PloS one* vol. 12,2 e0169965. 6 Feb. 2017, doi:10.1371/journal.pone.0169965
24. Rutkowski, Andrzej, et al. "Wektory AAV w terapii genowej." *Bio-technologie* 3 (2007): 33-44.
25. Ciesielska, Agnieszka et al. "Depletion of AADC activity in caudate nucleus and putamen of Parkinson's disease patients; implications for ongoing AAV2-AADC gene therapy trial." *PloS one* vol. 12,2 e0169965. 6 Feb. 2017, doi:10.1371/journal.pone.0169965
26. Sudhakar, Vivek, and R Mark Richardson. "Gene Therapy for Neurodegenerative Diseases." *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* vol. 16,1 (2019): 166-175. doi:10.1007/s13311-018-00694-0
27. Sánchez-Pernaute, Rosario, et al. "Functional effect of adeno-associated virus mediated gene transfer of aromatic L-amino acid decarboxylase into the striatum of 6-OHDA-lesioned rats." *Molecular Therapy* 4.4 (2001): 324-330.
28. Hadaczek, Piotr et al. "Eight years of clinical improvement in MPTP-lesioned primates after gene therapy with AAV2-hAADC." *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* vol. 18,8 (2010): 1458-61. doi:10.1038/mt.2010.106
29. Ciesielska, Agnieszka et al. "Depletion of AADC activity in caudate nucleus and putamen of Parkinson's disease patients; implications for ongoing AAV2-AADC gene therapy trial." *PloS one* vol. 12,2 e0169965. 6 Feb. 2017, doi:10.1371/journal.pone.0169965
30. Christine, Chadwick W et al. "Magnetic resonance imaging-guided phase 1 trial of putaminal AADC gene therapy for Parkinson's disease." *Annals of neurology* vol. 85,5 (2019): 704-714. doi:10.1002/ana.25450
31. Mittermeyer, Gabriele et al. "Long-term evaluation of a phase 1 study of AADC gene therapy for Parkinson's disease." *Human gene therapy* vol. 23,4 (2012): 377-81. doi:10.1089/hum.2011.220

32. Nutt, John G et al. "Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase Gene Therapy Enhances Levodopa Response in Parkinson's Disease." *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* vol. 35,5 (2020): 851-858. doi:10.1002/mds.27993
33. Rastgardani, Tara et al. "Understanding, Impact, and Communication of "Off" Periods in Parkinson's Disease: A Scoping Review." *Movement disorders clinical practice* vol. 5,5 461-470. 9 Oct. 2018, doi:10.1002/mdc3.12672
34. Richardson, R Mark et al. "Data-driven evolution of neurosurgical gene therapy delivery in Parkinson's disease." *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* vol. 91,11 (2020): 1210-1218. doi:10.1136/jnnp-2020-322904

TERAPIE BIOLOGICZNE W CZERNIAKU. PRZEGLĄD DOTYCHCZASOWEGO LECZENIA I NOWYCH MOŻLIWOŚCI

Paulina Redel, Aneta Rasińska, Natalia Trędota, Kinga Dworak

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

Abstrakt:

Czerniak jest nowotworem o wysokim stopniu złośliwości wywodzącym się z neuroektodermalnych melanocytów. Pomimo, że stanowi 1-3% wszystkich zdiagnozowanych nowotworów u ludzi, to sam jest przyczyną 1,2%-1,4% zgonów. Wykazuje tendencje do wczesnych przerzutów, zarówno do okolicznych węzłów chłonnych, jak i odległych miejsc, takich jak płuca i mózg. Mając na uwadze jego dynamiczne tempo wzrostu i wczesne przerzuty, czerniak jest jednym z najgorzej rokujących nowotworów i jednocześnie najtrudniejszym w leczeniu. Do tej pory leczenie opierało się na radykalnym wycięciu nowotworu wraz z marginesem tkanek niezmiennych, biopsji węzła wartowniczego oraz chemioterapii, która to charakteryzuje się niską odpowiedzią ze strony pacjentów, niewielkimi korzyściami w wydłużeniu przeżycia, a u 15%-20% osób, nawrotami i wznowieniem choroby. Dzięki nowemu spojrzeniu i zrozumieniu podstaw molekularnych oraz onkogennej sygnalizacji tego nowotworu, możliwe było stworzenie i wprowadzenie na rynek nowych leków. Specyficzne inhibitory mutacji BRAFV600 i MEK (dabrafenib-2013, vemurafenib-2011, trametinib-2013) zrewolucjonizowały leczenie pacjentów z nieoperacyjnym przerzutowym czerniakiem. Niedawne odkrycie roli cząsteczek immunologicznych punktów kontrolnych (PD1, PD-L1, CTLA-4 - Nagroda Nobla w 2018 r.) doprowadziło do opracowania przeciwciał monoklonalnych jako inhibitorów punktów kontrolnych układu odpornościowego (ipilimumab-2011, pembrolizumab, nivolumab-2014). Nowoczesna immunoterapia w ostatnich latach stała się czwartym (obok chirurgii, chemo- i radioterapii) filarem systemowego leczenia czerniaka, który polega na promowaniu skutecznej przeciwnowotworowej odpowiedzi układu immunologicznego, co przyczynia się do osiągnięcia wieloletnich przeżyć wśród pacjentów z rozsiazanym czerniakiem. Pierwszym onkolitycznym, genetycznie zmodyfikowanym wirusem opryszczki pospolitej typu 1 zatwierdzonym do leczenia czerniaka jest Talimogene laherparepvec (T-VEC - 2015), prowadzi on do lizy komórek nowotworowych i uwolnienia specyficznych antygenów. Obecnie trwają intensywne badania nad szczepionką przeciwko czerniakowi.

Słowa kluczowe: czerniak, BRAF, MEK, immunoterapia

Abstract:

Melanoma is a high-grade malignancy neoplasm derived from neuroectodermal melanocytes. Despite the fact that accounts for 1-3% of all diagnosed human cancers, it alone accounts for 1.2% -1.4% of deaths. It shows a tendency towards early metastasis both to nearby lymph nodes and to distant places such as the lungs and brain. Due to its dynamic growth rate and early metastasis, melanoma is one of the worst-prognostic cancers and one of the most difficult treat. So far, the treatment was based on radical tumor cut outs along with the margin of unchanged tissues, sentinel node biopsy and chemotherapy which is characterized by a low patient response, little benefit in prolonging survival, and in 15%-20% of cases, relapse and recurrence of the disease. With a new perspective and understanding of the molecular basis and oncogenic signaling of this tumor, it has been possible to develop and introduce to market new drugs. Specific mutations inhibitors - BRAFV600 and MEK (dabrafenib-2013, vemurafenib-2011, trametinib-2013) revolutionized the treatment of patients with inoperable metastatic melanoma. The recent discovery of the role of immune checkpoint molecules (PD1, PD-L1, CTLA-4 - Nobel Prize 2018) has led to the development of monoclonal antibodies as immune checkpoint inhibitors (ipilimumab-2011, pembrolizumab, nivolumab-2014). In recent years, modern immunotherapy has become the fourth (next to surgery, chemotherapy and radiotherapy) pillar of the systemic treatment of melanoma which consists in promoting an effective anti-tumor response of the immune system, which contributes to the achievement of long-term survival among patients with disseminated melanoma. The first oncolytic genetically modified herpes simplex virus type 1 approved for the treatment of melanoma is Talimogene laherparepvec (T-VEC - 2015). It leads to the lysis of tumor cells and the release of specific antigens. The melanoma vaccine is currently being intensively researched.

Keywords: melanoma, BRAF, MEK, immunotherapy

1. WSTĘP

Czerniak jest nowotworem wywodzącym się z melanocytów, które lokalizują się w naskórku, mieszkach włosowych, błonie śluzowej, oponach mózgowych i warstwie naczyniowej oka [1]. Czerniaki mogą powstać na dowolnym obszarze anatomicznym zajmowanym przez melanocyty [2]. Większość jednak dotyczy skóry (około 91,2% przypadków), około 4% przypadków to czerniaki występujące w regionach o niskiej ekspozycji na promieniowanie UV, takich jak błona naczyniowa oka, błona śluzowa przewodu pokarmowego i układu moczowo-płciowego oraz opony mózgowe [2-5]. Czerniak błony śluzowej jest najrzadszym podtypem czerniaka, obejmującym 1,3% wszystkich przypadków. Czerniak akralny wywodzi się ze skóry nieowłosionej, takiej jak dłonie, podeszwy lub paznokcie palców rąk i nóg [4]. Czerniak niezwiązany ze skórą ma gorsze rokowanie, co związane jest z opóźnionym rozpoznaniem guza pierwotnego, agresywnym charakterem i dużą częstością nawrotów po leczeniu [5]. Na poziomie profili mutacji genetycznych zdefiniowano cztery różne genetycznie podtypy czerniaka: czerniaki z mutacją BRAF (około 50% wszystkich czerniaków), RAS (około 25%), NF1 (około 15%), potrójny czerniak typu

dzikiego („potrójny typ dziki”) bez mutacji w wyżej wymienionych genach (około 10%). Stopień zaawansowania czerniaka zależy od grubości guza i zajęcia węzłów chłonnych i/lub innych narządów. System TNM American Joint Commission on Cancer jest najczęściej stosowanym systemem klasyfikowania zaawansowania czerniaka, który łączy cechy histologiczne guza pierwotnego (T), obecność i rozległość choroby regionalnych węzłów chłonnych (N) oraz obecność i rozległość przerzutów odległych (M). Stopniowanie jest niezwykle ważne, ponieważ daje klinicyście narzędzia do oceny rokowania pacjenta i ustalenia schematu leczenia, który zapewni pacjentowi najlepszą możliwą szansę na wyzdrowienie lub przedłużenie przeżycia [6,7]. Ryzyko zajęcia węzłów chłonnych wzrasta wraz z grubością guza o około 2–5% dla głębokości Breslowa $\leq 1,00$ mm. 5-letnie przeżycie w przypadku choroby w stadium IIIA, IIIB i IIIC wynosi odpowiednio 78%, 59% i 40%. Pacjenci z odległymi przerzutami do skóry, tkanki podskórnej i węzłów chłonnych (M1a), przerzutami do płuc (M1b) i pozapłucnymi przerzutami do trzewi (M1c) mają roczne wskaźniki przeżycia wynoszące odpowiednio 62%, 53% i 33% [8]. Główną przyczyną śmierci pacjentów z czerniakiem są rozległe przerzuty do narządów, takich jak wątroba, płuca, mózg, kości i układ limfatyczny [9]. Średni czas przeżycia w czerniaku z przerzutami w IV stopniu zaawansowania AJCC wynosi około 8 miesięcy (± 2 miesiące), a tylko około 10% chorych przeżywa > 5 lat od rozpoznania [10]. Rokowanie w czerniaku jest wprost proporcjonalne do głębokości nowotworu, która z kolei zwiększa się w czasie, dlatego tak ważne jest wczesne wykrycie [11]. Samobadanie skóry ma duży potencjał jako prosta i wygodna metoda badania przesiewowego. W 1985 roku opracowano kryteria „ABCD”. Skrót ABCD oznacza „A” - asymetrię, „B” - nieregularność granic, „C” - zróżnicowanie barwne, „D” - średnicę > 6 mm. Później dodano literę „E” oznaczającą ewolucję, która jest szczególnie ważna w diagnostyce czerniaków guzowatych. Kierując się tymi kryteriami, czułość samobadania skóry waha się od 57% do 90%. Innym paradygmatem jest znak „brzydkiego kaczątka”. Opiera się na przekonaniu, że zmiana pigmentowana „wygląda inaczej niż wszyscy jej sąsiedzi” [11,12]. Czerniak jest uważany za chorobę współczesną, zaostrzaną przez migrację ludzi o jasnej karnacji do obszarów bliżej równika, mimo to był już znany w starożytności. Pierwszy udokumentowany przypadek został odnotowany w V wieku przez Hipokratesa z Kos, ale wcześniejsze fizyczne dowody czerniaka znaleziono w kościach mumii prekolumbijskich, które miały około 2400 lat [6]. Tempo wzrostu na całym świecie jest znacznie większe niż jakiegokolwiek innego nowotworu [3]. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) szacuje, że na całym świecie rocznie dochodzi do 66 000 zgonów

z powodu raka skóry, z czego około 80% z powodu czerniaka [13]. Częstość występowania czerniaka skóry różni się znacznie w poszczególnych krajach, a te różne wzorce zachorowalności przypisuje się różnicom w fenotypie rasowym skóry, a także różnicom w ekspozycji na słońce [2]. W przeciwieństwie do innych guzów litych, czerniak dotyka głównie ludzi młodych i w średnim wieku. Mediana wieku w chwili rozpoznania wynosi 57 lat [11]. Starszy wiek wiąże się z wyższą śmiertelnością i jest on niekorzystną zmienną prognostyczną, niezależną od grubości guza, tempa mitozy, owrzodzenia czy stadium nowotworu [14]. Rozmieszczenie preferowanych miejsc występowania czerniaka jest zależne od płci: najczęstszymi obszarami są plecy u mężczyzn oraz ręce i nogi u kobiet [11]. Czerniak jest piątym co do częstości nowotworem występującym u mężczyzn i siódmym wśród kobiet [2]. Częstość występowania jest bardzo zróżnicowana również w zależności od rasy. Populacja rasy białej ma około 10-krotnie większe ryzyko rozwoju czerniaka skóry niż populacje rasy czarnej, azjatyckiej czy latynoskiej [12].

1.1. Czynniki ryzyka

Czerniak powstaje w wyniku mutacji genetycznych w melanocytach [15]. Najbardziej znaczącym czynnikiem ryzyka rozwoju czerniaka jest ekspozycja na promieniowanie ultrafioletowe, z racji jego silnego działania genotoksycznego [11]. Promieniowanie UV-A indukuje złośliwą transformację melanocytów w komórki nowotworowe poprzez wystąpienie kilku mutacji wpływających zarówno na protoonkogen, jak i na geny supresorowe nowotworów (*TP53*, *NF1*, *PTEN*) [16]. Transformacja melanocytowa zachodzi poprzez sekwencyjną akumulację zmian genetycznych i molekularnych [17]. Ryzyko rozwoju czerniaka jest bezpośrednio związane z poziomem UV, zwłaszcza UV-B. Znaczący wpływ ma wzór i czas ekspozycji na światło słoneczne. Istnieje istotna dodatnia zależność między intensywną i przerywaną ekspozycją na promienie słoneczne, a zwiększonym ryzykiem rozwoju czerniaka. Nie bez znaczenia pozostaje również historia oparzeń w dzieciństwie i okresie dojrzewania. Osoby z >5 epizodów oparzeń słonecznych wykazują 2-krotnie większe ryzyko rozwoju czerniaka w przyszłości. Zwiększone ryzyko dotyczy również osób korzystających z solarium, niezależnie od wieku. Ilość promieniowania UVA występującego podczas typowej sesji w solarium jest znacznie wyższa od ekspozycji podczas zajęć na świeżym powietrzu czy nawet podczas opalania [16,18,19]. Łóżka opalające zostały sklasyfikowane jako czynnik rakotwórczy przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem - IARC (International Agency for

Research on Cancer) [20]. Istotne znaczenie ma też ekspozycja na sztuczne promieniowanie UV-A, stosowane jako fotochemioterapia w leczeniu łuszczycy [11]. Okresowa ekspozycja i historia oparzeń słonecznych w dzieciństwie jest silnym czynnikiem predykcyjnym czerniaka tułowia i kończyn. Natomiast ciągła ekspozycja na promieniowanie i narażenie zawodowe predysponuje do wystąpienia czerniaka głowy i szyi. Czerniak jest choroba heterogenna, obejmującą odmienne genetycznie typy, powstające poprzez inne ścieżki przyczynowe i wykazujące różną podatność na promieniowanie UV. Mutacja BRAF dotyczy 50% rozpoznanych czerniaków i lokalizowana jest miejscach typowych dla przerywanej ekspozycji na promieniowanie UV oraz u pacjentów z dużą ekspozycją w dzieciństwie [2,21,22]. Czerniaki skóry chronicznie wystawionej na działanie słońca pojawiają się zwykle u osób w podeszłym wieku (> 55 lat), na obszarach takich jak głowa, szyja i okolica grzbietowa kończyn górnych [16]. Konstytucyjnymi czynnikami ryzyka są jasna karnacja, piegi, liczne, dysplastyczne lub atypowe znamiona, zwiększają one ryzyko rozwoju czerniaka o około 50% [2,11]. Duża liczba znamion pospolitych koreluje z 7-krotnie większym ryzykiem [2]. Około 7–15% przypadków występuje u pacjentów z czerniakiem w wywiadzie rodzinnym [16]. Najczęstszymi nieprawidłowościami genetycznymi są mutacje w genie inhibitora kinazy zależnej od cykliny 2A (*CDKN2A*), która koduje dwa białka supresorowe nowotworów, P16 i p14/ARF [3,11]. Dodatkowo, u pacjentów z rodzinnymi zespołami nowotworowymi, np. rodzinnym siatkówczakiem, zespołem Li-Fraumeni i zespołem Lyncha typu II, występuje większe ryzyko rozwoju czerniaka [11]. Coraz lepsze zrozumienie biologicznych uwarunkowań ewolucji i potencjalnych kierunków leczenia, może prowadzić do lepszej diagnostyki i wcześniejszego rozpoznawania zmian [16]. Odsetek wyleczeń jest ściśle związany ze stopniem zaawansowania choroby. Ważne jest wczesne wykrycie i rozpoczęcie leczenia [3]. Rozwój i progresja czerniaka, podobnie jak prawie wszystkich innych nowotworów złośliwych, opiera się na nabyciu kolejnych zmian w szlakach genowych, metabolicznych i molekularnych, których zadaniem jest regulacji funkcji komórek. Interakcje między zmianami wewnątrzkomórkowymi, a czynnikami zewnątrzkomórkowymi, które biorą udział w aktywności immunologicznej, są odpowiedzialne za modulowanie progresji nowotworu. Pewne zmiany molekularne mogą mieć wpływ na wrażliwość nowotworu względem limfocytów T, do takich zmian molekularnych należą: wyciszenie PTEN, aktywacja MAPK, zwiększona aktywność PI3K, aktywacja sygnalizacji WNT/ β -katenina, mutacje inaktywujące JAK1/2, upośledzenie sygnalizacji

STAT1-3/STING/TBK1, zwiększone wskaźniki niestabilności lub aneuploidii chromosomów, zmiany w prezentacji antygenu [23].

2. LECZENIE DOTYCHCZASOWE

W zależności od lokalizacji, stadium i cech genetycznych nowotworu możemy wyróżnić: resekcję chirurgiczną, chemioterapię, radioterapię i terapię fotodynamiczną (PDT) [24].

2.1. Chirurgia

We wczesnym stadium czerniaka skuteczne jest leczenie chirurgiczne, a wskaźniki przeżycia osiągają wtedy wysokie wartości. Znaczny ich spadek koreluje z pojawieniem się odległych przerzutów, a prawdopodobieństwo wyleczenia zmniejsza się wraz z grubością guza i stopniem z jakim nacieka on otaczającą tkankę. Istotna zatem jest wczesna i prawidłowa diagnoza [3,6]. Leczenie chirurgiczne jest podstawową opcją terapeutyczną u pacjentów ze zlokalizowanym czerniakiem pierwotnym w stadium I-IIIB lub bez regionalnych przerzutów do węzłów chłonnych [10,24]. Wycięcie obejmuje guz i otaczającą tkankę [25]. Głębokość wycięcia sięga powięzi mięśniowej, a optymalna szerokość pozostaje nadal kwestią niejednogólną. Zalecane są szerokie i radykalne marginesy wycięcia, obejmujące tkanki głębokie, aby zmniejszyć ryzyko wznowy miejscowej i nawrotu choroby [3]. Wielkość marginesów opierana jest na grubości guza wg Breslowa i wynoszą one odpowiednio dla czerniaka *in situ* - 5 mm, dla guza <2 mm - 1 cm, a dla guza > 2 mm - 2 cm [10,24]. W przypadku czerniaka zlokalizowanego na kończynach wycięcie powinno przebiegać zgodnie z ich osią długą [25]. Dopuszczalne jest zmniejszenie wielkości wycięcia w celu zredukowania utraty tkanki i zminimalizowania konieczności przeszczepu skóry. Znajduje to zastosowanie w miejscach o ważnym aspekcie kosmetycznym, takie jak twarz, a także dłonie, stopy, narządy płciowe i w poprzek stawów [7]. Dane wykazują, że chirurgiczna resekcja opóźniona o więcej niż 90 dni, wiąże się z wyższą śmiertelnością we wszystkich stadiach czerniaka [25]. Patologiczna ocena grubości guza pierwotnego (Breslow), wskaźnik mitotyczny, owrzodzenie i zajęcie regionalnych węzłów chłonnych stanowią ważne wskaźniki prognostyczne dla czerniaka [3]. Grubość guza pierwotnego jest silnym predykatorem przeżycia, 92% pacjentów z czerniakiem T1 (grubość guza <1 mm) po 10 latach nadal żyło, gdzie w przypadku czerniaka w stadium T4 było to zaledwie 50% pacjentów [26]. Około 20% pacjentów po pierwotnym

leczeniu chirurgicznym doświadcza nawrotu z medianą przeżycia poniżej 12 miesięcy bez zastosowania leczenia [3]. W przypadku wielu przerzutów tranzytowych i satelitarnych w kończynach, gdzie miejscowe wycięcie okazałoby się nieskuteczne lub zbyt rozległe, stosowana jest izolowana hipertermiczna perfuzja kończyn (ILP - isolated limb perfusion) lub izolowana infuzja kończyn (ILI - isolated limb infusion) z melfalanem i aktynomycyną D [25]. Ta metoda polega na izolowaniu głównych naczyń w kończynie i ich kaniulowaniu, co umożliwia dostarczanie środków terapeutycznych w wysokich dawkach, które mogłyby wywołać ogólnoustrojową toksyczność [26]. Hipertermia zwiększa cytotoksyczność melfanu i jego wychwyt do komórek nowotworowych [27]. Do objawów toksyczności tej terapii zaliczamy obrzęk limfatyczny, nieprawidłową czynność kończyn, zanik lub zwłóknienie mięśni, neuropatię (40-60% pacjentów), uporczywy ból i nawracające infekcje [25,26]. Większość pacjentów zgłasza się we wczesnym stadium czerniaka, dzięki czemu sama resekcja chirurgiczna jest wystarczająca [3].

2.2. Biopsja węzła wartowniczego

Zajęcie węzłów chłonnych i grubość guza są niezależnymi czynnikami prognostycznymi, pozwalającymi określić stopień zaawansowania choroby nowotworowej [3,25]. Do ustalenia stopnia zajęcia okolicznych węzłów chłonnych służy biopsja węzła wartowniczego (SNB - sentinel node biopsy), która polega na usunięciu pierwszego węzła chłonnego w basenie limfatycznym, do którego drenażuje okolica ze zminą nowotworową oraz ocenie go pod kątem obecności komórek nowotworowych i utajonej choroby mikrop przerzutowej [7,25]. SNB stosowana jest w celu rozpoznania wczesnych przerzutów w okolicznych węzłach chłonnych. Wykonywana jest u pacjentów o grubości guza wg Breslowa 0,8-1,0 mm lub mniejszej niż 0,8 mm, ale z owrzodzeniem i wskaźnikiem mitotycznym $\geq 1/\text{mm}^2$, sklasyfikowanym wg AJCC (American Joint Committee on Cancer) jako czerniak T1b. Owrzodzenie zwiększa prawdopodobieństwo dodatniego wyniku SNB [25]. Przerzuty do węzłów chłonnych u pacjentów z czerniakiem < 1 mm występują stosunkowo rzadko (dodatknie SNB stwierdza się w 1%-5,6% przypadków). Prawdopodobieństwo dodatniego wyniku SNB zwiększa się wraz ze wzrostem grubości guza wg Breslowa. Ujemny wynik SNB rzadko wiąże się z przerzutami do innych węzłów, niż węzeł wartowniczy ($\leq 1\%$). Stwierdzenie obecności komórek nowotworowych w węźle wartowniczym, wskazuje na dodatni wynik SNB, określane jest to jako stadium IIIB/IIIC czerniaka. Koreluje z ogólnie gorszym rokowaniem wraz z większym

ryzykiem choroby ogólnoustrojowej [26]. Zalecana wtedy jest kompletna limfadenektomia zajętego basenu limfatycznego [6,7,26].

2.3. Chemioterapia

Identyfikacja przerzutów odległych ma ogromny wpływ na rokowanie, dalsze postępowanie i leczenie czerniaka [26]. Samo leczenie chirurgicznie nie przynosi efektów w przypadku czerniaka z licznymi przerzutami, w takim przypadku terapią podstawową jest chemioterapia jednoskładnikowa [6]. Zaliczamy do niej środki alkilujące, takie jak dakarbazyna, temozolomid, nitro-moicznik, analogi platyny i toksyny miktotubularne [15]. Mimo, iż czerniak uważany jest za nowotwór oporny na chemioterapię, to jest ona stosowana w jego leczeniu już od ponad 3 dekad [15,28]. Pierwszym i jedynym lekiem zatwierdzonym przez FDA (Food and Drug Administration, 1974 r.) do leczenia przerzutowego czerniaka jest dakarbazyna (DTIC-5-[3,3-dimetylo-1-triazenylo]-imidazolo-4-karboksyamid) [6,15,24]. DTIC to prolek i wymaga konwersji w wątrobie do aktywnego metabolitu 5-(3-metylo-1-triazeno)-imidazolo-4-karboksyamidu (MTIC) [28]. Wskaźniki odpowiedzi po chemioterapii dakarbazyną osiągają wartości 5-12%, a mediana przeżycia wynosi 5-11 miesięcy [3,6,10]. 5-letnie przeżycie uzyskuje zaledwie 2-6% pacjentów [24]. Objawy toksyczność chemioterapii obejmują łagodne nudności i wymioty, zahamowanie czynności szpiku kostnego, zmęczenie. Mimo niskiej skuteczność, dakarbazyna do 2011 roku pozostawała standardową i jedyną opcją terapeutyczną czerniaka przerzutowego [15]. Temozolomid to doustny analog dakarbazyny, który również przekształca się do MTIC, ale w przeciwieństwie do DTIC spontanicznie, nieenzymatycznie, bez konwersji w wątrobie, zwiększa to jego biodostępność. Łatwo przenika przez barierę krew-mózg, co może wiązać się z jego potencjalnym zapobieganiem lub leczeniem przerzutów do mózgu [15,28]. Nie udowodniono przewagi terapii temazolomidem nad dakarbazyną, dlatego wybór leku jest dokonywany na podstawie korzystniejszej drogi podania, ceny lub obecności przerzutów w mózgu [15]. Przyczyną tak dużej oporności na chemioterapię jest oporność komórek nowotworowych czerniaka na apoptozę. Mimo to chemioterapia pozostaje ważnym i podstawowym leczeniem paliatywnym pacjentów ze zmianami w IV stadium zaawansowania [15,24]. Stosunkowo niska aktywność przeciwnowotworowa środków stosowanych w monchemioterapii spowodowała wprowadzenie kombinacji leków cytotoksycznych, w celu poprawy wskaźników odpowiedzi i przeżycia całkowitego [15,28]. Jednak chemioterapia skojarzona związana jest z

wyższą toksycznością i może dawać niewiele wyższe lub bardzo porównywalne odpowiedzi do monoterapii dakarbazyną [15]. I chociaż chemioterapia nie prowadzi do trwałych odpowiedzi, była ona jedynym sposobem leczenia do 2011 roku [29]. Dopiero ostatnia dekada przyniosła bezprecedensowy postęp w leczeniu zaawansowanego czerniaka [3].

2.4 Radioterapia

Radioterapia i jej skuteczność w leczeniu czerniaka budzi rozbieżność. Eksperymenty wykazały dużą, względną oporność komórek czerniaka na promieniowanie, co wiązało się z niską skutecznością i poważnymi skutkami ubocznymi, a stosowanie większych dawek powodowało niszczenie również normalnych tkanek. Zaobserwowano zależność między skutecznością radioterapii, a typem mutacji w czerniaku. 60% lini komórkowych charakteryzujących się wysoką radioopornością wykazało mutację BRAF. Mimo to radioterapia odgrywa kluczową rolę w leczeniu paliatywnym. Znajduje zastosowanie w leczeniu bólu lub ucisku rdzenia kręgowego w przerzutach do kości, krwawieniach skóry, przerzutach do węzłów chłonnych, krwawieniach z oskrzeli [3]. Najczęstszym miejscem przerzutów czerniaka i jednocześnie odpowiedzialnym za wysoką śmiertelność jest mózg, Radioterapia jest podstawą opcją leczenia przerzutów do mózgu. Pacjenci poddani radioterapii przeżywali 1,3 miesiąca dłużej niż pacjenci poddani wyłącznie obserwacji (3,4 vs 2,1 miesiąca). Do objawów toksyczności związanych z napromieniowaniem zaliczamy: deficyty poznawcze, chorobę naczyń mózgowych, dysfunkcję neuroendokrynną i wodogłowie z normalnym ciśnieniem [26]. Jedną z ważniejszych korzyści radioterapii jest efekt pozamiejscowy (efekt abskopalny), który polega na wywołaniu odpowiedzi zarówno w miejscu napromieniowania, jak i w odległych miejscach występowania komórek nowotworowych [27]. Efekt abskopal odnotowano w przypadku kilku nowotworów złośliwych, w tym w czerniaku złośliwym lub niedrobnokomórkowym raku płuc. Termin „abskopal” (z łac. „ab” – z dala od, „scopus” – cel) został użyty po raz pierwszy w 1953 roku do opisanie obserwowanego efektu terapeutycznego w miejscu anatomicznym, które pierwotnie nie zostało napromieniowane. Polega on na napromienianiu obszaru guza, a następnie regresja również w odległych obszarach nienapromieniowanych. Od najwcześniejszych obserwacji tego zjawiska postawiono hipotezę, że lokalne promieniowanie wyzwała ogólnoustrojową odpowiedź immunologiczną. Efekt jest obserwowany również w innych rodzajach leczenia miejscowego, takich jak elektroporacja lub wstrzyknięcie doguzowe [30].

2.5. Terapia fotodynamiczna PDT

Obiecującą terapią uzupełniającą u pacjentów paliatywnych z czerniakiem w III lub IV stadium zaawansowania jest terapia fotodynamiczna (PDT) [24]. PDT wymaga obecności fotouczulacza, który wchłania się do tkanki nowotworowej, źródła światła o odpowiedniej długości fali, które wzbudza i aktywuje fotouczulacz oraz tlenu. Ważne jest, aby fotouczulacz wykazywał maksymalnie intensywne pasma absorpcji w oknach transmisyjnych. W wyniku reakcji fotochemicznej tworzone są reaktywne formy tlenu (RFT), które powodują nieodwracalne i wysoce selektywne niszczenie komórek nowotworowych, w sposób bezpośredni poprzez apoptozę lub nekrozę oraz w sposób pośredni przez niszczenie mikrounaczynienia guza, co prowadzi do jego martwicy [31].

3. DOTYCHCZASOWA TERAPIA BIOLOGICZNA

Pierwsze powiązanie nowotworu z układem odpornościowym miało miejsce w XIX wieku [24]. Badania przedkliniczne i kliniczne ukazały podatność komórek nowotworowych czerniaka na terapię, której celem jest stymulacja własnego układu odpornościowego do walki z nowotworem [15]. Na podstawie tych obserwacji, immunoterapia stała się obiecującą opcją terapeutyczną dla pacjentów z czerniakiem przerzutowym [24].

3.1. Interleukina 2

IL-2 jest limfokiną zatwierdzoną przez FDA w 1998 roku do leczenia przerzutowego czerniaka. Stymuluje ona proliferację i ekspansję efektorowych komórek T, komórek NK, komórek Treg oraz wyzwala uwolnienie INF-gamma i TNF-alfa [15,24]. Terapia wysokodawkową IL-2 HD zapewnia trwałe korzyści, ale wykazuje poważną toksyczność i wymaga intensywnej opieki szpitalnej [10]. ORR pacjentów leczonych IL-2 wyniósł 16%, z czego 60% pacjentów wykazało pełną i trwałą odpowiedź, a 44% po 5 latach nadal żyło. U żadnego z pacjentów po 5 latach nie nastąpiła progresja, a u osób u których doszło do nawrotu, resekcja chirurgiczna przyniosła zamierzony skutek. Leczenie IL-2 wymaga hospitalizacji z monitorowaniem stanu pacjenta [15]. Do objawów toksyczności zaliczamy gorączkę, niedociśnienie, posocznicę, tachykardię, obrzęki obwodowe, przemijająca niewydolność wielonarządową, skąpomocz, przeciążenie objętościowe, majaczenie i wysypkę [15,24,33]. Ryzyko

śmierci wynosi 1-2% [7]. Liczne powikłania wielonarządowe ograniczają tę terapię do młodszych pacjentów w dobrym stanie ogólnym [32]. Aby zmniejszyć toksyczność układowej terapii IL-2 i zwiększyć jej miejscowe efekty, stosowane jest podanie jej bezpośrednio do zmiany nowotworowej [27]. Pozwala to na uzyskanie wysokich stężeń w bezpośrednim sąsiedztwie guza [32]. Do zdarzeń niepożądanych tej metody zaliczamy ból w miejscu wstrzyknięcia, miejscowy stan zapalny, gorączkę, objawy grypopodobne, zmęczenie, nudności i wymioty [26]. Society for Immunotherapy for Cancer (SITC) w czerniaku z mutacją typu dzikiego BRAF w IV stadium zaawansowania zaleca terapię HD IL-2 jako leczenie pierwszego rzutu [32].

3.2. Interferon α

Interferony mają działanie zakłócające replikację wirusa i odgrywają ważną rolę w aktywności immunomodulującej, przeciwingiogennej, przeciwproliferacyjnej, proapoptycznej i przeciwnowotworowej, indukując komórki T, limfocyty B, komórki NK i komórki dendrytyczne [24]. Interferon alfa-2b został zatwierdzony przez FDA w 1995 roku do leczenia uzupełniającego po resekcji czerniaka wysokiego ryzyka w stadium IIB/III [15,24]. Opóźnia on i zmniejsza ryzyko nawrotu choroby oraz ryzyko odległy przerzutów i zgonu, odpowiednio o 25% i 31% , ale tylko mała część pacjentów reaguje na to leczenie. Czynnikiem predykcyjnym wrażliwości na INF jest owrzodzenie guza [3,24,26]. Do objawów toksyczności tej terapii zaliczamy gorączkę, dreszcze, zmęczenie, bóle mięśni, zaburzenia psychokognitywne i zdarzenia autoimmunologiczne [15]. INF- α opóźnia nawrót choroby nowotworowej, ale ma niewielki wpływ na przeżycie całkowite [3]. Kolejnym lekiem jest pegylowany IFN- α -2b, czyli INF α -2b połączony wiązaniem kowalencyjnym z glikolem polietylenowym. W takiej kombinacji wykazuje dłuższy okres półtrwania, większą biodostępność i lepsze działanie terapeutyczne. Został zatwierdzony przez FDA w 2011 roku. Stosowany jest jako terapia uzupełniająca u pacjentów chorych na czerniaka w stadium III, z mikroskopowym lub makroskopowym zajęciem węzłów chłonnych w ciągu 84 dni od resekcji chirurgicznej lub całkowitej limfadenektomii. Wśród zdarzeń niepożądanych terapii pegylowanym IFN- α -2b możemy wyróżnić toksyczność wątroby stopnia 1, neutropenię, wysypkę skórą i niedokrwistość [24].

4. INNOWACYJNA TERAPIA BIOLOGICZNA

W ciągu ostatniej dekady nastąpił ogromny przełom w leczeniu przerzutowego czerniaka. Związane to było z pogłębieniem wiedzy na temat patofizjologii i roli układu odpornościowego w walce z nowotworami. Wykazano, że układ immunologiczny stanowi bezpieczny cel terapeutyczny dla guzów litych, w tym również czerniaka, co doprowadziło do opracowania i zatwierdzenia kilku immunoterapii [24,34]. Czerniak, którego antygeny były jednymi z pierwszych zidentyfikowanych i sklasyfikowanych antygenów nowotworowych, a sam znajduje się od lat w czołówce badań immuno-onkologicznych, posłużył jako modelowy nowotwór do zrozumienia odpowiedzi przeciwnowotworowej [35]. Charakteryzuje się wysokim stopniem mutagennym oraz szybko rozwijającymi się mechanizmami unikania odpowiedzi immunologicznej przez jego komórki. Pacjenci mają upośledzoną odpowiedź przeciwnowotworową, prowadzącą do tolerancji immunologicznej guza i jego mikrośrodowiska, co sprzyja progresji choroby [5,6]. Immunoterapia skutecznie pokonuje tę supresję, przez co wywarła ona największy wpływ na leczenie czerniaka w ostatnich dziesięciu latach, finalnie doprowadzając do zatwierdzenia inhibitorów kinazy tyrozynowej i inhibitorów immunologicznego punktu kontrolnego. Otworzono tym sposobem innowacyjną erę ukierunkowanej terapii przeciwnowotworowej opartej na immunologii i mutacjach nowotworów [5,6,16]. Przed 2010 rokiem zaawansowany czerniak miał fatalne rokowania z medianą całkowitego przeżycia 6-9 miesięcy oraz 20% przeżyciem 2 letnim. Przez wiele lat standardem leczenia była tylko chemioterapia dakarbazyną [36]. Nowe terapie mają na celu stymulację układu odpornościowego do walki z czerniakiem [6].

4.1 Inhibitory punktów kontrolnych

Manipulowanie punktami kontrolnymi układu immunologicznego odbywa się za pomocą przeciwciał przeciwko cytotoksycznemu antygenowi limfocytów T 4 (CTLA-4), programowanej śmierci 1 (PD-1) lub ligandu programowanej śmierci 1 (PD-L1/L2) [6].

Inhibitory CTLA-4

Cytotoksyczny antygen limfocytów T (CTLA-4) należy do nadrodziny immunoglobulin CD28:B7, fizjologicznie jest wyrażany na powierzchni regulatorowych limfocytów T (Treg), których zadaniem jest hamowanie nadmiernej

stymulacji układu immunologicznego [5,15]. Po raz pierwszy został opisany w 1987 roku [29]. Jego ligandami są CD80 (B7.1) i CD86 (B7.2), znajdujące się na komórkach prezentujących antygen APC [37]. W 1970 roku Bretscher i Cohn zaproponowali model „dwóch sygnałów” aktywacji limfocytów T, gdzie pełna aktywacja wymaga zarówno zaangażowania receptora komórek T (TCR), jak i sygnału kostymulującego, zapewnionego przez związanie B7 na APC z CD28 na komórce T [38]. CTLA-4 jako homolog CD28 wyprzedza to wiązanie, w taki sposób hamuje aktywację i proliferację komórek T [10,37,38,39]. Prowadzi to do anergii limfocytów i ucieczki immunologicznej, umożliwiając w ten sposób wzrost guza [40]. Jako inhibitor krytycznego punktu kontrolnego oraz negatywny regulator, CTLA-4 hamuje dodatnie sygnały przekazywane do limfocytów T, kontroluje funkcje efektorowe, zapobiegając w ten sposób autoimmunizacji i umożliwiając tolerancję na własne antygeny [5,15]. Dowody przedkliniczne dostarczyły informacji o możliwości wykorzystania go jako podejścia do kontrolowania naturalnych odpowiedzi immunologicznych [41]. Blokada CTLA-4 pozwala na zniesienie jego hamującego wpływu i bezsprzeczną aktywację limfocytów T, przerywając tolerancję na antygeny guza [27]. Po raz pierwszy został przetestowany na mysich modelach raka, w tym również na raku prostaty, piersi i chłoniaku. Myszy, którym wcześniej przeszczepiono słabo immunogenną linię komórek czerniaka, wykazały do 80% wyleczenia po zastosowaniu przeciwciał anti-CTLA-4 ze szczepionką GM-CSF [41]. Ipilimumab (humanizowane przeciwciało monoklonalne) jest pierwszym i jedynym lekiem anti-CTLA-4 zatwierdzonym w lipcu 2011 r. przez Agencję Żywności i Leków, FDA do leczenia zaawansowanego czerniaka [24]. Hamuje on wiązanie antygeny CTLA-4 limfocytów T z ligandem. Wykorzystuje naturalną zdolność organizmu do eliminacji nowotworu za pomocą układu immunologicznego, przez zwiększenie produkcji prozapalnych cytokin, klonalną ekspansję komórek T i infiltrację guza [24,42]. Mimo zwiększania aktywności immunologicznej i odpowiedzi przeciwnowotworowej przez ipilimumab, może on również łamać tolerancję immunologiczną na własne antygeny i powodować liczne, autoimmunologiczne skutki uboczne (irAE). irAE wstępują u 72% pacjentów leczonych ipilimumabem, przy czym zdarzenia niepożądane o dużym stopniu złośliwości stanowią 24% [37]. Do działań niepożądanych 3 i 4 stopnia o podłożu immunologicznym należą objawy toksyczności ze strony przewodu pokarmowego (16% - zapalenie jelit, zapalenie okrężnicy, zapalenie wątroby), układu endokrynologicznego (8,5%), zapalenie skóry i zapalenie przysadki (1,5%) [5,15,24]. Dodatkowo zmęczenie (6,9%), duszność (3,9%), niedokrwistość (3,1%), zmniejszenie apetytu (1,5%) i wysypka (0,8%) [21].

U około 1 na 10 pacjentów może wystąpić ciężka toksyczność o podłożu immunologicznym, zagrażająca życiu, wymagająca leczenia kortykosteroidami o działaniu ogólnoustrojowym i/lub innymi lekami immunosupresyjnymi [3,5]. Przerwanie leczenia w trakcie badań z powodu zdarzeń niepożądanych nastąpiło u 52% pacjentów leczonych ipilimumabem, natomiast zgon wystąpił u 1% chorych [5]. Zauważono, że częstość zdarzeń niepożądanych koreluje z odpowiedzią kliniczną, zależy od dawki i schematu leczenia [26,40]. Biorąc pod uwagę znaczny odsetek irAE, kliniczne zastosowanie ipilimumabu jest trudne i wymaga starannego monitorowania i niezwłocznego zwracania uwagi na potencjalne zdarzenia niepożądane [43]. Reakcje na przeciwciała anty-CTLA-4 mają opóźniony początek, a jedną z charakterystycznych cech tej terapii jest wstąpienie u 5-10% pacjentów pseudoprogresji [15,37]. Z tego powodu kliniczna ocena odpowiedzi na leczenie może być trudna, a częstość występowania tego zjawiska może być jednak niedoszacowana, ze względu na jego efemeryczny charakter i częstą lokalizację w trzewnych zmianach przerzutowych, które ocenia się jedynie na podstawie badań obrazowych co 2–3 miesiące [44]. Zjawisko to polega na zwiększaniu rozmiaru już istniejących lub pozorny rozwój nowych zmian. Jednak w przypadku kontynuacji leczenia, finalnie obserwowane jest zmniejszenie wielkości guza [36]. Pozorny wzrost masy guza w przypadku istniejących zmian może oznaczać ciągłe powiększanie masy guza do czasu wytworzenia dostatecznie silnej odpowiedzi immunologicznej lub infiltrację aktywowanych immunologicznych komórek efektorowych, co prowadzi do widocznego zwiększenia rozmiaru zmiany. Pojawienie się nowych zmian chorobowych może odzwierciedlać infiltrację aktywowanych komórek odpornościowych do wcześniej istniejącej zmiany, ale zbyt małej lub nieaktywnej, aby można ją było wykryć radiologicznie podczas wstępnej oceny [45]. Chociaż częstość występowania pseudoprogresji jest stosunkowo niska, to dużą trudnością dla lekarzy jest rozróżnienie pseudoprogresji z postępującą chorobą [36]. Odkrycie ipilimumabu uznano za przełom, był pierwszym lekiem poprawiającym wskaźniki przeżycia w zaawansowanym, przerzutowym czerniaku. Jednym z pierwszych przedstawionych efektów jego stosowania (w dawce 3 mg/kg masy ciała) była regresja guza u 2 z 17 pacjentów z czerniakiem. To dało początek dalszym badaniom nad tym lekiem [39]. Międzynarodowe wieloośrodkowe badania wykazały zwiększone przeżycie (10,1 miesiąca) u pacjentów leczonych ipilimumabem, w porównaniu z 6,4 miesiąca w ramieniu kontrolnym [3]. Zaobserwowano również trwałe przeżycie do 10 lat u 20% pacjentów z czerniakiem w IV stadium zaawansowania [6]. Ipilimumab znacząco poprawia wskaźniki przeżycia w czerniaku z przerzutami,

które do tej pory nie zostały osiągnięte żadną wcześniejszą terapią [5]. Bardziej imponujące od korzyści w zakresie średniego przeżycia pacjentów, było utrzymanie efektów terapeutycznych przez ponad 2 lata w 18% przypadków, nawet przy wstrzymaniu leczenia, co wskazuje na przypuszczenie o możliwej reedukacji układu odpornościowego, która pozwoliłaby na kontrolowanie guza [46]. Zbiorcze analizy prospektywne i retrospektywne potwierdziły możliwość długotrwałego przeżycia pacjentów z zaawansowanym czerniakiem leczonych ipilimumabem [37]. Oprócz udokumentowanej aktywności w przerzutowym czerniaku, ipilimumab wykazał aktywność kliniczną w kilku dodatkowych typach nowotworów, w tym w raku nerkowokomórkowym, raku płuc i prostaty [43]. Częstym powikłaniem guzów litych, w tym czerniaka, są przerzuty do mózgu. Pozostają one główną przyczyną powikłań neurologicznych i zgonów. Czerniak ma jedną z największych skłonności do przerzutów do mózgu, a w momencie rozpoznania już ponad jedna trzecia pacjentów z zaawansowanym czerniakiem, ma przerzuty do mózgu. W przypadku pacjentów z zaawansowanym czerniakiem, u których wystąpią przerzuty do OUN, rokowanie jest szczególnie złe, z medianą całkowitego przeżycia wynosi od 4 do 5 miesięcy i tylko 5% przeżywa ≥ 5 lat [38,47]. Wykazano, że ipilimumab oraz pembrolizumab wykazują działanie przeciw przerzutom czerniaka do mózgu, gdy każdy środek jest stosowany indywidualnie w monoterapii. Odpowiedzi wewnątrzczaszkowe były obserwowane u ponad połowy leczonych pacjentów, a aktywność wewnątrzczaszkowa była porównywalna z aktywnością zewnątrzczaszkową [47]. Tremelimumab jest kolejnym ludzkim przeciwciałem monoklonalnym (IgG2) anty-CTLA-4. W badaniu III fazy porównano monoterapię tremelimumabem z dakarbazyną lub temozolomidem, mimo obiecujących wstępnych wyników w fazie I i II, ostatecznie nie wykazał żadnej znaczącej przewagi, a badanie zostało wstrzymane w fazie III [27,34]. Przyszłe badania kliniczne prawdopodobnie zajmą się opracowaniem i weryfikacją biomarkerów predykcyjnych, umożliwiając identyfikację podgrupy pacjentów, która z największym prawdopodobieństwem odniesie korzyści kliniczne z leczenia przeciwciałami anty CTLA-4 [43].

Inhibitory PD-1 i PD-L1

Receptor programowanej śmierci komórki-1 (PD-1, CD279) należy do rodziny receptorów CD28/CTLA-4, jest receptorem hamującym, konstytutywnie wyrażanym na aktywowanych limfocytach T CD8+, limfocytach T CD4+, limfocytach B, monocytach i komórkach NK [5,32,34]. Został po raz

pierwszy opisany przez japońskich naukowców w 1992 r. Nazwa wywodzi się od jego izolacji przez hybrydyzację subtraktywną limfocytów T podlegających zaprogramowanej śmierci komórkowej [48]. Do tej pory zidentyfikowano 2 ligandy receptora PD-1: PD-L1 (B7-H1, CD274) i PD-L2 (B7-DC, CD273), są one szeroko wyrażane w różnych tkankach [5]. PD-L1, który został opisany w 2000 r., ulega ekspresji w wielu nowotworach, w tym czerniaku, a także na komórkach szpikowych, nabłonkowych, komórkach prezentujących antygen APC, śródbłonku, makrofagach, i fibroblastach. Interakcja między PD-1 i PD-L1/PD-L2 hamuje proliferację cytotoksycznych limfocytów T CD8+, indukuje anergię komórek T i sprzyja ich różnicowaniu do limfocytów Treg, przyczyniając się w ten sposób do immunosupresji [5,34,48]. Wysoki poziom ekspresji PD-1 stwierdza się w niefunkcjonalnych limfocytach T w kontekście przewlekłego zakażenia lub progresji nowotworu, jest charakterystycznym objawem „wyczerpanych” limfocytów T, które doświadczyły znacznego poziomu stymulacji lub zmniejszonej pomocy limfocytów T CD4+ [49]. Komórki nowotworowe wykorzystują óś immunologiczną składającą się z PD-1 i PD-L1/L2 na swoją korzyść, jako negatywny regulator odpowiedzi immunologicznej. Czerniak był jednym z pierwszych guzów litych, w którym wykryto ekspresję PD-L1, a jego podtypy różnią się poziomem ekspresji tego białka (62% czerniak skóry, 44% czerniak błony śluzowej, 31% czerniak okolicy akralnej) [4]. Wysoka ekspresja PD-L1 na komórkach nowotworowych koreluje ze złym rokowaniem [5]. Wskazano również na zależność między wysoką ekspresją PD-L1 w komórkach nowotworowych czerniaka, a obecnością limfocytów naciekających guz (TIL), które charakteryzują się zmniejszoną zdolnością do proliferacji, produkcji cytokin i lizy guza. [5,37]. Liczba TIL obecnych w guzie jest wskaźnikiem prognostycznym w czerniaku. Jeśli w guzie nie ma TIL, oznacza to, że skutecznie ominął odpowiedź przeciwnowotworową, co może wskazywać na gorsze rokowanie [6]. Gdy TIL usuniemy z mikrośrodowiska guza (TME) i będziemy hodować *ex vivo*, będą one wykazywać silniejszą odpowiedź przeciwnowotworową, co uzasadnia tłumiacą aktywność TME (Tumor microenvironment) na CTL, indukcję mechanizmów ucieczki immunologicznej guza, w tym regulację w górę PD-L1 [37]. Regulacja w dół odpowiedzi przeciwnowotworowej przez PD-1 była krytycznym celem terapeutycznym dla leczenia czerniaka, doprowadziło to do wyodrębnienia innej klasy inhibitorów immunologicznego punktu kontrolnego, przeciwciał monoklonalnych anty-PD1. Zablockowanie receptorów PD1 prowadzi do aktywacji limfocytów T, uruchomienia odpowiedzi immunologicznej i zmniejszenia wzrostu guza [34,39]. Pembrolizumab (MK3475/Lambrolizumab) jest pierwszym

zatwierdzonym przez FDA (wrzesień 2015r.) humanizowanym przeciwciałem IgG4 anty-PD-1 [39]. Badania wykazały znaczną poprawę rocznego przeżycia całkowitego w porównaniu do ipilimumabu (74% dla dawki 10 mg/kg co 2 tygodnie i 68% dla dawki 10 mg/kg co 3 tygodnie vs 58% dla ipilimumabu). Natomiast wskaźniki przerwania leczenia z powodu zdarzeń niepożądanych były niższe w grupie pembrolizumabu (wyniosły odpowiednio 4% i 6,9% vs 9,4% dla ipilimumabu) [36]. Najczęstszymi niepożądanymi reakcjami jest zmęczenie niskiego stopnia, wysypka, biegunka, bóle stawów, bóle głowy i świąd [22,25,26]. Niwolumab jest kolejnym przeciwciałem monoklonalnym IgG4, blokującym PD-1 [39]. Stał się drugim przeciwciałem monoklonalnym przeciwko receptorowi PD-1 zatwierdzonym przez FDA w grudniu 2014 r. do leczenia pacjentów z nieoperacyjnym lub przerzutowym czerniakiem i progresją choroby po podaniu ipilimumabu i inhibitora BRAF (jeśli mutacja BRAF V600 jest dodatnia) [5]. Zatwierdzenie niwolumabu oparto na wynikach badania, w którym wzięło udział łącznie 418 wcześniej nieleczonych pacjentów z zaawansowanym czerniakiem, losowo przydzielonych do dwóch grup otrzymujących niwolumab lub dakarbazynę. Odsetek obiektywnych odpowiedzi (ORR) wyniósł 40% dla niwolumabu w porównaniu do 14% dla dakarbazyny [50]. Do działań niepożądanych terapii niwolumabem należą słabe zmęczenie, biegunka, nudności, kaszel, duszności, zaparcia, wymioty, zapalenie skóry, gorączka i ból głowy. Zdarzeni niepożądane pochodzenia immunologicznego (irAE) to zapalenie płuc, bielactwo nabyte, zapalenie okrężnicy, wątroby, przysadki i tarczycy [39]. Po sukcesie terapii anty-PD-1 w czerniaku, FDA zatwierdziła stosowanie niwolumabu do leczenia niedrobnokomórkowego raka płuc oraz określiła terapię niwolumabem jako terapię przełomową w leczeniu chłoniaka Hodgkina. Dodatkowo wykazano skuteczność terapii anty-PD-1 w leczeniu raka urotelialnego pęcherza moczowego i potrójnie ujemnego raka piersi [9]. Przeciwciała skierowane przeciwko PD-L1 były testowane u pacjentów z przerzutowym czerniakiem. Mimo skuteczność w leczeniu, żaden z tych leków (atezolizumab, awelumab i durwalumab) nie został zatwierdzony, a wiele badań skojarzonych nadal trwa [29]. Immunoterapia anty-PD1 jest zalecana jako leczenie pierwszego rzutu zaawansowanego, nieoperacyjnego lub przerzutowego czerniaka, niezależnie od statusu BRAF V600 i jako leczenie drugiego rzutu u pacjentów z mutacją BRAF V600 po niepowodzeniu celowanego leczenia anty-BRAF i anty-MEK [49]. Terapie oparte na inhibicji punktów kontrolnych zrewolucjonizowały leczenia przerzutowego czerniaka w ostatnich latach. Mimo to wiedza na temat biomarkerów prognozujących odpowiedź na leczenie lub wystąpienie poważnej irAE

jest wciąż ograniczona. Ekspresja PD-1/PD-L1 (ligandu zaprogramowanej śmierci 1) jako predykcyjnych biomarkerów skuteczności leczenia pozostaje kontrowersyjna, a brak ekspresji PD-L1 w czerniaku niekoniecznie jest związany z niepowodzeniem [51].

Terapia skojarzona

CTLA-4 i PD-1 wykazują działanie na odmiennych etapach kaskady aktywacji układu immunologicznego, ale skojarzenie obu terapii wykazało obiektywną odpowiedź u 50-60% pacjentów z zaawansowanym czerniakiem, co stanowi istotny wynik, w porównaniu z monoterapią [53]. Mediana czasu przeżycia bez progresji u pacjentów przyjmujących kombinację leków wyniosła 11,5 miesiąca (w porównaniu do 2,9 miesiąca dla monoterapii ipilimumabem i 6,9 miesiąca dla monoterapii niwolumabem) [39]. Jednak skojarzona immunoterapia wiąże się z prawie dwukrotnie częstszym wstępowaniem zdarzeń niepożądanych (50%) w porównaniu do terapii samym ipilimumabem (20–30%) lub samym anti-PD-1 (10–20%) [53]. Mimo tego takie połączenie okazało się przełomem, osiągając wskaźniki odpowiedzi prawie dziesięciokrotnie wyższe od chemioterapii, która to przez ponad 25 lat była jedyną opcją terapeutyczną dopuszczoną do leczenia czerniaka przerzutowego [53,54]. FDA opierając się na wynikach tych badań, zatwierdziła skojarzenie niwolumabu z ipilimumabem jako leczenie pierwszego rzutu w zaawansowanym czerniaku z ekspresją BRAF typu dzikiego [39]. Terapia systemowa z połączeniem niwolumabu i ipilimumabu ma klinicznie znaczącą skuteczność u pacjentów z bezobjawowymi, nieleczonymi przerzutami czerniaka do mózgu. Zapobiega progresji wewnątrzczaszkowej przez ponad 6 miesięcy u 64% pacjentów, co jest istotne w przypadku szybkiej progresji, skutkującej znacznymi objawami neurologicznymi i upośledzeniem czynnościowym. Obecna praktyka leczenia przerzutów do mózgu polega na operacji i radioterapii stereotaktycznej. Zastosowanie nowych leków może prowadzić do zmniejszenia częstości lub uniknięcia powikłań radioterapii całego mózgu i radioterapii stereotaktycznej, takich jak osłabienie funkcji poznawczych i martwica popromienna [47]. Każda decyzja o rozpoczęciu leczenia inhibitorami immunologicznych punktów kontrolnych musi obejmować dokładną ocenę ryzyka związanego z leczeniem, w tym sercowe irAE. Są one stosunkowo rzadkie (<1%), mimo tego, wraz z neurologicznymi działaniami niepożądanymi o podłożu immunologicznym, stanowią prawie 50% zgonów po leczeniu inhibitorami punktów kontrolnych. Sercowe irAEs pojawiają się na wczesnym etapie leczenia, charakteryzują się

niespecyficznym początkiem i szybko postępującym śmiertelnym przebiegiem klinicznym. Mając na uwadze brak swoistych biomarkerów, podejmowane są wysiłki w celu określenia, którzy pacjenci mogą być najbardziej narażeni. Na podstawie pro- i retrospektywnego rejestru pacjentów, u których rozwinął się irM po leczeniu, stwierdzono podwyższone poziomy troponiny T o wysokiej czułości (hsTnT) i nieprawidłowe EKG, odpowiednio u 94 i 89% pacjentów. Z tego względu zalecano ścisłą kontrolę hsTnT przed rozpoczęciem leczenia oraz we wczesnych cyklach leczenia, zwłaszcza gdy planowane jest skojarzone leczenie anty-CTLA4 i anty-PD1 [55].

4.2. Szczepionki

Wraz z rosnącą wiedzą na temat roli układu odpornościowego w rozwoju i progresji czerniaka, zaczęto interesować się szczepionkami przeciwko czerniakowi. Obecnie testuje się różne strategie szczepień, które mają na celu wywołanie odporności czynnej, w tym szczepionki skierowane bezpośrednio na komórki czerniaka, szczepionki na bazie DC, szczepionki na bazie peptydów i szczepionki na bazie wektorów. Większość z nich znajduje się obecnie w fazie badań i nie uzyskano jeszcze obiecujących wyników [15,56]. Mają one na celu wywołanie odpowiedzi immunologicznej przeciwko antygenom wyrażonym na komórkach czerniaka, antygenom związanym z guzem TAA lub neoantygenom oraz stymulacji proliferacji limfocytów T, a następnie specyficznej eradykacji komórek nowotworowych [29,32]. Szczepionki zawierają antygeny nowotworowe lub peptydy antygenów nowotworowych [36]. Antygeny czerniaka można podzielić na 4 kategorie: antygeny z nadekspresją (MART-1/Melan-A, tyrozynaza, gp-100), antygeny jąder nowotworowych, zmutowane onkogeny i zmutowane neoantygeny [12]. TAA specyficzne dla czerniaka obejmują antygen czerniaka A1 (MAGE-A1), gp100, MART-1/Melan-A, tyrozynazę, białko związane z tyrozynazą-1 (trp-1) i białko związane z tyrozynazą 2 (trp-2). [29,39]. Tyrozynaza, TRP-2, Melan-A/MART-1 i gp-100 są również wyrażane na normalnych melanocytach i kilku innych komórkach pigmentowych, dlatego może dochodzić do autoimmunizacji melanocytów lub ograniczenia odpowiedzi przez centralną tolerancję [57]. MAGE-A3 jest antygenem specyficznym dla guza i ulega ekspresji w 76% przerzutów czerniaka. Według niektórych dowodów szczepionka MAGE-A3 może skutecznie hamować, a nawet eliminować komórki nowotworowe czerniaka [36]. Do antygenów gangliozydowych zaliczamy GM2, GD2, GD3 i 9-O-acetylo-GD3. Wyniki randomizowanego badania wykazały dłuższy okres bez choroby (23%)

i większe wskaźniki przeżycia (14%) wśród pacjentów z czerniakiem w III stadium, którzy otrzymali szczepionka GM2/BCG w porównaniu z pacjentami zaszczepionymi samą BCG [33]. W przypadku pojedynczych antygenów wyniki okazały się rozczarowujące, ze względu na niską immunogenność. Na podstawie wcześniejszych doniesień wskazujących na nasilenie odpowiedzi przeciwnowotworowej przez cytokiny, takie jak HD IL-2, IL-4, GM-CSF, postawiono na podejście kombinatoryczne [29,36]. Jedną ze szczepionek, która zwiększyła wskaźniki przeżycia w połączeniu z leczeniem IL-2, jest szczepionka oparta na antygenie nowotworowym gp100 [56]. Gp-100 jest zmodyfikowaną glikoproteiną wyrażaną jedynie na komórkach czerniaka, zdrowych melanocytach naskórki i siatkówki, naturalnie prezentowaną przez HLA-A2 i rozpoznawaną przez limfocyty T CD8+. Szczepienie gp-100 zwiększa reaktywność CTL, które mogą rozpoznawać i zabijać komórki nowotworowe [24,27,57]. Szczepionki zawierające komórki lub części komórek czerniaka są formą aktywnej, swoistej immunoterapii. Polegają na zastosowaniu komórek pochodzących z wyciętych guzów od pacjenta, innego dawcy lub kilku dawców [56]. Komórki dendrytyczne, będące komórkami prezentującymi antygen, zostały również wykorzystane do wytwarzania szczepionek w zaawansowanym czerniaku [39]. Szczepionki z komórek dendrytycznych DC wykorzystują autologiczne DC do prezentowania i stymulowania komórek odpornościowych poprzez wydzielanie cytokin prozapalnych. Izoluje się DC z krwi obwodowej, poddaje działaniu antygenów *ex vivo*, a następnie podaje pacjentowi [57]. Zauważono również właściwości adiuwantowe listeriolizyny O (LLO), hemolizyny wydzielanej przez *Listeria monocytogenes*. Do tych właściwości należą: aktywacja DC, stymulacja cytotoksycznych limfocytów T i wzmocnienie odpowiedzi immunologicznej z dominacją Th1, dodatkowo LLO celuje w komórki czerniaka i powoduje regresję guza. LLO zawarte w szczepionce DC przeciwko czerniakowi zapobiega adhezji, rozsiewowi i przerzutom, a dodatkowo indukuje wrodzoną i swoistą odpowiedź immunologiczną na infekcję *Listerią*. Zmniejsza 20-krotne wskaźnik mitotyczny komórek czerniaka [57]. Leczenie nieoperacyjnego czerniaka szczepionkami nadal wiąże się z kilkoma wyzwaniami [39]. Pomimo wysokiej odpowiedzi immunologicznej, wskaźniki odpowiedzi klinicznej w terapii szczepionkami oscylują poniżej 10%. Taka niska odpowiedź kliniczna wynika z dysfunkcji komórek T w mikrośrodku guza i niewystarczającego ich pobudzania [57]. Oczekuje się, że kombinacje immunoterapeutyczne będą prawdopodobnie najbardziej dynamiczną rozwijającą się dziedziną w nadchodzących latach [58].

4.3. Wiroterapia onkolityczna

Wirusy onkolityczne (OV) to natywne lub zmodyfikowane wirusy, które selektywnie infekują i indukują lizę komórek nowotworowych, a także potencjalną ogólnoustrojową odpowiedź przeciwnowotworową. Współczesna era wirusoterapii onkolitycznej rozpoczęła się na początku lat 90. XX wieku od przełomowego badania, w którym zaobserwowano, że zmutowany wirus opryszczki pozbawiony kinazy tymidynowej z powodzeniem powoduje lizę komórek nowotworowych glejaka. Obecnie Talimogene laherparepvec (On-covex lub T-Vec) jest jedynym OV zatwierdzonym przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA) w 2015 r. [59]. Talimogene laherparepvec to genetycznie zmodyfikowany wirus opryszczki pospolitej (HSV) typu 1 [27,29]. Jest on bezpośrednio wstrzykiwany do widocznych, wyczuwalnych lub możliwych do zidentyfikowania przy pomocy badania USG zmian chorobowych, gdzie ulega wybiórczej replikacji w komórkach nowotworowych [36,59]. Replikacja wirusa ostatecznie prowadzi do śmierci komórek guza przez nekrozę lub piroptozę, uwolnienia antygenów nowotworowych, wirusowych i cytokin [59]. Wydzielany jest czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów GM-CSF, wzmacniający miejscową i ogólnoustrojową odpowiedź przeciwnowotworową [36]. Efekt wirotepii obejmuje wybiórcze zakażenie komórek nowotworowych, a następnie bezpośrednie zabijanie przez zmniejszenie masy guza lub odpowiedź immunologiczną gospodarza przeciwko komórkom zakażonym wirusem [60]. Ze względu na brak ICP 34.5 i ICP 47, wirus namnaża się tylko w komórkach nowotworowych [27]. Wyłączenie genu ICP34.5 nastąpiło w celu neurowirulencji, wirus charakteryzuje się zmniejszoną patogennością z promowaną selektywną replikacją w komórkach nowotworowych, delecja genu ICP47 daje antygenom wirusowym i nowotworowym peptydom dostęp do kompleksów MHC klasy I, prowadząc do wzmocnionej odpowiedzi immunologicznej gospodarza [50,60]. Zatwierdzenie było oparte na randomizowanym badaniu III fazy z udziałem pacjentów z czerniakiem w IIIB/C lub IV stopniu zaawansowania, gdzie wykazano trwalszy i wyższy odsetek obiektywnych odpowiedzi dla T-VAC w porównaniu z GM-CSF (odpowiednio 16,3% i 26,4% vs 2,1% i 5,7%) [29,39,58]. Do zdarzeń niepożądanych tej terapii zaliczamy: zmęczenie, dreszcze, gorączkę, nudności, objawy grypopodobne, reakcję w miejscu wstrzyknięcia i wymioty [29]. Obawy związane z bezpieczeństwem biologicznym są istotne dla OV i należy zachować specjalne środki ostrożności podczas ich podawania,

szczególnie w przypadku żywych OV (T-VEC). Cięża i obniżona odporność są przeciwwskazaniem dla tej terapii [59].

4.4. Terapia celowana

Terapia celowana wykorzystuje drobnocząsteczkowe inhibitory lub przeciwciała i może być stosowana jako terapia pierwszego rzutu lub jako terapia uzupełniająca [4,24]. Mimo istnienia kilku dziedzicznych mutacji w rozwoju czerniaka, większość wynika z mutacji nabytych w ciągu życia [6]. Mutacje w genach kluczowych szlaków sygnałowych czerniaka występują u około 70% pacjentów, a jednym z najczęściej zmutowanych szlaków jest szlak MAPK [6,24].

Inhibitory BRAF

BRAF to kinaza serynowo-treoninowa wchodząca w skład szlaku sygnałowego kinazy białkowej aktywowanej mitogenem MAPK [24]. Mutacja BRAF po raz pierwszy została odkryta w 2002 roku i stwierdza się ją u 66% pacjentów z czerniakiem, a 80% z nich wykazuje podstawienie kwasu glutaminowego (E) na waline (V) w kodonie 600 [7]. Najczęstszą mutacją jest V600 i K, rzadziej V600R i D [36]. Wiąże się z hiperaktywacją szlaku MAPK, unikaniem apoptozy, zwiększonym wzrostem i proliferacją komórek nowotworowych [7,24]. Mutacja BRAF najczęściej pochodzi z miejsc okresowo narażonych na promieniowanie UV oraz z fenotypem powierzchownego rozprzestrzeniania się czerniaka (SSM) [6,7]. Sama mutacja BRAF nie jest wystarczająca do rozwoju złośliwego nowotworu, gdyż około 80% łagodnych znamion posiada już tę mutację, dopiero szereg kolejnych prowadzi do zezłośliwienia fenotypu. Promieniowanie UV również bezpośrednio aktywuje szlak MAPK, dlatego należy on do głównych szlaków zaangażowanych w kancerogenezę indukowaną UV. Właśnie ta zależność stała się obszarem intensywnych badań, które umożliwiły opracowanie nowych, ukierunkowanych terapii czerniaka skóry [6]. Odkrycie mutacji BRAF dało początek ukierunkowanym inhibitorom białka BRAF - wemurafenibu i dabrafenibu [36]. W 2011 roku FDA zatwierdziło pierwszą terapię celowaną dla czerniaka (wemurafenib) [4]. Wemurafenib jest selektywnym doustnym inhibitorem mutacji BRAF, wykorzystywanym do leczenia czerniaka z mutacją BRAFV600E, hamuje on aktywność kinazy powodującej hiperktywację szlaku MAPK [4,24]. Okazał się wysoce skuteczny i obiecujący we wczesnych badaniach klinicznych [26]. Odsetek odpowiedzi w badaniach

wyniósł 53%, a mediana całkowitego przeżycia 15,9 miesiąca. Około 80% pacjentów wykazało zmniejszenie masy guza, a u 50% zmniejszenie masy było większe lub równe 30%. Na podstawie tych badań wemurafenib został zatwierdzony przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA) do leczenia czerniaka z mutacją BRAF [7]. Do działań niepożądanych terapii inhibitorami BRAF, obejmujących 90% pacjentów, zaliczamy: bóle stawów, wysypkę, nadwrażliwość na światło (występujące w ciągu kilku dni od rozpoczęcia leczenia), zmęczenie, łysienie, gorączkę, wykwity trądzikopodobne, rumieniowe, hiperkeratotyczne grudki pęcherzykowe, wykwity ziarniniakowe, brodawki, prosaki, raka kolczystokomórkowego skóry oraz raka płaskonabłonkowego skóry u 25% leczonych pacjentów, co jest związane z paradoksalną aktywacją BRAF w keratynocytach [7,3,24]. Wykazano również korelacje zwiększonej częstości wystąpienia raka kolczystokomórkowego z współistnieniem mutacji w genie RAS i BRAF [27]. Przewagę tej terapii daje możliwość włączenia do leczenia pacjentów z dużym zaawansowaniem choroby (przerzuty do mózgu) i złym stanie fizycznym, gdzie byłiby oni wyłączeni z chemioterapii [3]. Kolejnym inhibitorem BRAF jest dabrafenib, został zatwierdzony przez FDA w maju 2013 roku. Jest odwracalnym, konkurencyjnym inhibitorem adenozynotrifosforanu (ATP). Wykazał obiecujące wyniki i został dopuszczony do leczenia czerniaka z mutacją BRAF V600E i V600K [4,7]. Zatem nasuwa się pytanie, który inhibitor zastosować w leczeniu czerniaka z mutacją BRAF? Nie były one porównywane bezpośrednio, a ich skuteczność jest podobna. Decyzję opiera się na profilu skutków ubocznych, gdzie wemurafenib powoduje większą toksyczność skórą, a dabrafenib większą gorączkę [7]. Jednak korzyści kliniczne terapii inhibitorami BRAF są ograniczone i krótkotrwałe, ze względu na rozwój nabytej oporności [7,24]. Biorąc w tym udział takie mechanizmy jak: podwyższona ekspresja kinaz CRAF, COT1, aktywowanie mutacji N-RAS (NRASQ61), MEK1 (MEK1Q56P i MEK1E203K) lub AKT1, nieprawidłowy splicing BRAF, aktywacja kinazy fosfatydyloinozytolo-3-OH (PI3K) oraz trwała aktywacja receptorowych kinaz tyrozynowych [24,27]. Obecnie są badane strategie, które mają na celu przezwyciężyć oporność [3]. I takie dążenie doprowadziło do wprowadzenia inhibitorów MEK [7].

Inhibitory MEK

Trametynib to doustny, małocząsteczkowy inhibitor MEK1 i MEK2, który został zatwierdzony przez FDA w 2013 roku jako monoterapia do leczenia przerzutowego czerniaka z mutacją BRAF V600E lub V600K. Do działań

niepożądanych inhibitorów MEK zaliczamy: biegunkę, obrzęki obwodowe, zmęczenie, nudności i wymioty, wysypkę trądzikopodobną [7,24]. W badaniu III fazy trametynib wykazał odsetek odpowiedzi - 81% oraz medianę czasu przeżycia wolnego od progresji - 4,8 miesiąca (w porównaniu do chemioterapii dakarbazyną - 67% i 1,5 miesiąca) u pacjentów z czerniakiem w stadium IV [7]. Kombinacja trametynibu i dabrafenibu wykazała istotne odpowiedzi (76% vs 54% monoterapia dabrafenibem), została zatwierdzona w styczniu 2014 roku [5,21]. Do działań niepożądanych zaliczamy tutaj gorączkę, dreszcze, zmęczenie, nudności, wymioty i biegunkę [3]. Taka terapia skojarzona stała się światowym standardem leczenia przerzutowego lub nieoperacyjnego czerniaka z mutacją BRAF [36].

5. PODSUMOWANIE

Czerniak jest uważany za chorobę wieloczynnikową wynikającą z interakcji między podatnością genetyczną, a narażeniem środowiskowym [12]. Tempo wzrostu zachorowalności na całym świecie jest znacznie większe niż jakiegokolwiek innego nowotworu i porównywalne do epidemii [3]. Częstość występowania ciągle wzrasta, a badania kohortowe sugerują, że tendencja wzrostowa zachorowalności utrzyma się przez co najmniej następne 2 dekady [61]. W diagnostyce czerniaka kluczowe znaczenie ma szybkie rozpoznanie, wykrycie i leczenie [12]. Pacjent, u którego 10 lat temu zdiagnozowano czerniaka z przerzutami, generalnie mógł oczekiwać leczenia jedynym tradycyjnym chemioterapeutykiem (dakarbazyna - zatwierdzoną przez FDA w 1975 r.) [53]. Leczenie i rokowanie w czerniaku, szczególnie w przypadku przerzutów, uległo znacznym zmianom w ciągu ostatniej dekady. [62]. Celowanie w szlaki immunologiczne (nadrodziny CTLA4, PD1, TNF i TNFR, nadrodzina immunoglobulin, B7, CD28, TLR-9, TLR-3, komórki NK i inne mediatory, takie jak IDO, TGFβ, CXCR4, szlak adenozynowy, VEGF), mutacje kierujące (BRAF, NRAS, ckit i odpowiadające im szlaki sygnałowe) oraz genetycznie modyfikowane wirusy i szczepionki, okazały się być obiecującymi opcjami terapeutycznymi [63]. Na przykład przed 2011 rokiem mediana przeżycia w przypadku czerniaka z przerzutami wynosiła 9 miesięcy, w porównaniu do ponad 2 lat obecnie. Ta poprawa wyników wynika w dużej mierze z zatwierdzenia i klinicznego zastosowania drobnocząsteczkowych inhibitorów BRAF i MEK, a także inhibitorów immunologicznego punktu kontrolnego. Chociaż środki immunomodulujące mają długą historię w leczeniu czerniaka, pojawienie się inhibitorów immunologicznego punktu kontrolnego, szczególnie tych skierowanych

przeciwko CTLA-4 i PD-1/PD-L1, radykalnie zmieniło leczenie i rokowanie w przerzutowym czerniaku [62]. Wpływ inhibitorów pierwszego immunologicznego punktu kontrolnego, anty-CTLA-4 i anty-PD-1/ anty-PD-L1, jest bezprecedensowy. W ciągu 10 lat przekształcił czerniaka w zaawansowanym stadium, w chorobę uleczalną u ponad 50% pacjentów [58]. Dlatego dziś jesteśmy świadkami rewolucji w leczeniu raka za pomocą immunoterapii [64]. Pomimo ekscytujących postępów w leczeniu zaawansowanego czerniaka, zapobieganie i wczesne wykrywanie pozostają głównymi celami wojny z tym nowotworem. Dzięki lepszej edukacji zawodowej, świadomości społecznej, edukacji pacjentów i postępom w badaniach możemy znacznie zmniejszyć zapadalność i śmiertelność na ten nowotwór [33].

REFERENCJE

1. Gabrisova V, Kucerova L. Malignant melanoma: diagnosis, treatment and cancer stem cells. *Neoplasma*. 2016;63(4):510-517. doi:10.4149/neo_2016_403
2. Nikolaou V, Stratigos AJ. Emerging trends in the epidemiology of melanoma. *Br J Dermatol*. 2014;170(1):11-19. doi:10.1111/bjd.12492]
3. Corrie P, Hategan M, Fife K, Parkinson C. Management of melanoma. *British Medical Bulletin*. 2014;111(1):149-162. doi:10.1093/bmb/ldu019
4. Eddy K, Chen S. Overcoming Immune Evasion in Melanoma. *Int J Mol Sci*. 2020;21(23):8984. Published 2020 Nov 26. doi:10.3390/ijms21238984
5. Achkar T, Tarhini AA. The use of immunotherapy in the treatment of melanoma. *J Hematol Oncol*. 2017;10(1):88. Published 2017 Apr 24. doi:10.1186/s13045-017-0458-3
6. Davis LE, Shalin SC, Tackett AJ. Current state of melanoma diagnosis and treatment. *Cancer Biol Ther*. 2019;20(11):1366-1379. doi:10.1080/15384047.2019.1640032
7. Saranga-Perry V, Ambe C, Zager JS, Kudchadkar RR. Recent developments in the medical and surgical treatment of melanoma. *CA A Cancer Journal for Clinicians*. 2014;64(3):171-185. doi:10.3322

8. Davar D, Tarhini AA, Kirkwood JM. Adjuvant immunotherapy of melanoma and development of new approaches using the neoadjuvant approach [published correction appears in Clin Dermatol. 2013 Jul-Aug;31(4):501]. Clin Dermatol. 2013;31(3):237-250. doi:10.1016/j.clindermatol.2012.08.012
9. Koppolu V, Rekha Vasigala VK. Checkpoint immunotherapy by nivolumab for treatment of metastatic melanoma. J Cancer Res Ther. 2018;14(6):1167-1175. doi:10.4103/jcrt.JCRT_1290_16
10. Garbe C, Eigentler TK, Keilholz U, Hauschild A, Kirkwood JM. Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. Oncologist. 2011;16(1):5-24. doi:10.1634/theoncologist.2010-0190
11. Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. In Vivo. 2014;28(6):1005-1011
12. Elder DE, Bastian BC, Cree IA, Massi D, Scolyer RA. The 2018 World Health Organization Classification of Cutaneous, Mucosal, and Uveal Melanoma: Detailed Analysis of 9 Distinct Subtypes Defined by Their Evolutionary Pathway. Arch Pathol Lab Med. 2020;144(4):500-522. doi:10.5858/arpa.2019-0561-RA
13. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma [published correction appears in N Engl J Med. 2010 Sep 23;363(13):1290]. *N Engl J Med*.
14. Kleemann J, Jäger M, Valesky E, Kippenberger S, Kaufmann R, Meissner M. Real-World Experience of Talimogene Laherparepvec (T-VEC) in Old and Oldest-Old Patients with Melanoma: A Retrospective Single Center Study. *Cancer Manag Res*. 2021;13:5699-5709. Published 2021 Jul 15. doi:10.2147/CMAR.S286917
15. Bhatia S, Tykodi SS, Thompson JA. Treatment of metastatic melanoma: an overview. Oncology (Williston Park). 2009;23(6):488-496.
16. Leonardi GC, Falzone L, Salemi R, et al. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). Int J Oncol. 2018;52(4):1071-1080. doi:10.3892/ijo.2018.4287

17. Palmieri G, Capone M, Ascierto M, et al. Main roads to melanoma. *Journal of Translational Medicine*. 2009;7(1):86. doi:10.1186/1479-5876-7-86
18. Elwood JM, Jopson J. Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. *Int J Cancer*. 1997;73(2):198-203. doi:10.1002/(sici)1097-0215(19971009)73:2<198::aid-ijc6>3.0.co;2-r
19. Lazovich D, Vogel RI, Berwick M, Weinstock MA, Anderson KE, Warshaw EM. Indoor tanning and risk of melanoma: a case-control study in a highly exposed population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19(6):1557-1568. doi:10.1158/1055-9965.EPI-09-1249
20. Bradford PT, Anderson WF, Purdue MP, Goldstein AM, Tucker MA. Rising melanoma incidence rates of the trunk among younger women in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19(9):2401-2406. doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-0503
21. Kozovska Z, Gabrisova V, Kucerova L. Malignant melanoma: diagnosis, treatment and cancer stem cells. *Neoplasma*. 2016;63(4):510-517. doi:10.4149/neo_2016_403
22. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med*. 2005;353(20):2135-2147. doi:10.1056/NEJMoa050092
23. Palmieri G, Puzanov I, Massi D, Ascierto PA. Editorial: Advances in Molecular Diagnosis and Treatment of Melanoma. *Front Oncol*. 2021;11:728113. Published 2021 Jul 9. doi:10.3389/fonc.2021.728113
24. Domingues, B., Lopes, J., Soares, P. i Populo, H. (2018). Przegląd leczenia czerniaka. *ImmunoTargets and Therapy*, tom 7, 35–49. doi: 10.2147 / itt.s134842
25. Falk Delgado A, Zommarodi S, Falk Delgado A. Sentinel Lymph Node Biopsy and Complete Lymph Node Dissection for Melanoma. *Curr Oncol Rep*. 2019;21(6):54. Published 2019 Apr 26. doi:10.1007/s11912-019-0798-y
26. Algazi AP, Soon CW, Daud AI. Treatment of cutaneous melanoma: current approaches and future prospects. *Cancer Manag Res*. 2010;2:197-211. Published 2010 Aug 17. doi:10.2147/CMR.S6073

27. Maverakis E, Cornelius LA, Bowen GM, et al. Metastatic melanoma - a review of current and future treatment options. *Acta Derm Venereol.* 2015;95(5):516-524. doi:10.2340/00015555-2035
28. Yang AS, Chapman PB. The history and future of chemotherapy for melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2009;23(3):583-x. doi:10.1016/j.hoc.2009.03.006
29. Albittar AA, Alhalabi O, Glitza Oliva IC. Immunotherapy for Melanoma. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1244:51-68. doi:10.1007/978-3-030-41008-7_3
30. Kodet O, Němejcová K, Strnadová K, et al. The Abscopal Effect in the Era of Checkpoint Inhibitors. *Int J Mol Sci.* 2021;22(13):7204. Published 2021 Jul 4. doi:10.3390/ijms22137204
31. Wawrzuta A, Saczko J, Kulbacka J, Chwiłkowska A. Can photodynamic therapy be an alternative method in melanoma treatment?. *Dermatology Review/Przegląd Dermatologiczny.* 2009;96(3):240-243.
32. Sanlorenzo M, Vujic I, Posch C, et al. Melanoma immunotherapy. *Cancer Biology & Therapy.* 2014;15(6):665-674. doi:10.4161/cbt.28555
33. Rigel DS, Carucci JA. Malignant melanoma: prevention, early detection, and treatment in the 21st century. *CA: A Cancer Journal for Clinicians.* 2000;50(4):215-236. doi:10.3322/canjclin.50.4.215
34. Marconcini R, Spagnolo F, Stucci LS, et al. Current status and perspectives in immunotherapy for metastatic melanoma. *Oncotarget.* 2018;9(15):12452-12470. Published 2018 Jan 3. doi:10.18632/oncotarget.23746
35. Maio M. Melanoma as a model tumour for immuno-oncology. *Ann Oncol.* 2012;23 Suppl 8:viii10-viii14. doi:10.1093/annonc/mds257
36. Atkinson V. Recent advances in malignant melanoma. *Intern Med J.* 2017;47(10):1114-1121. doi:10.1111/imj.13574
37. Redman JM, Gibney GT, Atkins MB. Advances in immunotherapy for melanoma. *BMC Med.* 2016;14(1). doi:10.1186/s12916-016-0571-0
38. Callahan MK, Postow MA, Wolchok JD. Immunomodulatory therapy for melanoma: ipilimumab and beyond. *Clin Dermatol.* 2013;31(2):191-199. doi:10.1016/j.clindermatol.2012.08.006

39. Dany M, Nganga R, Chidiac A, Hanna E, Matar S, Elston D. Advances in immunotherapy for melanoma management. *Hum Vaccin Immunother*. 2016;12(10):2501-2511. doi:10.1080/21645515.2016.1190889
40. Thumar JR, Kluger HM. Ipilimumab: a promising immunotherapy for melanoma. *Oncology (Williston Park)*. 2010;24(14):1280-1288.
41. Mansh M. Ipilimumab and cancer immunotherapy: a new hope for advanced stage melanoma. *Yale J Biol Med*. 2011;84(4):381-389.
42. Olszanski AJ. Current and future roles of targeted therapy and immunotherapy in advanced melanoma. *J Manag Care Spec Pharm*. 2014;20(4):346-356. doi:10.18553/jmcp.2014.20.4.346
43. Lipson EJ, Drake CG. Ipilimumab: an anti-CTLA-4 antibody for metastatic melanoma. *Clin Cancer Res*. 2011;17(22):6958-6962. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1595
44. Garcia D, Beal JR, Alvarez DM, Macarenco RSES, Schvartsman G. Pseudoprogression with Neoadjuvant Immunotherapy for Cutaneous Melanoma. *Case Rep Oncol*. 2021;14(2):881-885. Published 2021 Jun 17. doi:10.1159/000516036
45. Kwok G, Yau TC, Chiu JW, Tse E, Kwong YL. Pembrolizumab (Keytruda). *Hum Vaccin Immunother*. 2016;12(11):2777-2789. doi:10.1080/21645515.2016.1199310
46. Giavina-Bianchi MH, Giavina-Bianchi PF Junior, Festa C Neto. Melanoma: tumor microenvironment and new treatments. *An Bras Dermatol*. 2017;92(2):156-166. doi:10.1590/abd1806-4841.20176183
47. Tawbi HA, Forsyth PA, Algazi A, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab in Melanoma Metastatic to the Brain. *N Engl J Med*. 2018;379(8):722-730. doi:10.1056/NEJMoa1805453
48. Tsai KK, Zarzoso I, Daud AI. PD-1 and PD-L1 antibodies for melanoma. *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(11):3111-3116. doi:10.4161/21645515.2014.983409
49. Leven C, Padelli M, Carré JL, Bellissant E, Misery L. Immune Checkpoint Inhibitors in Melanoma: A Review of Pharmacokinetics and Exposure-Response Relationships. *Clin Pharmacokinet*. 2019;58(11):1393-1405. doi:10.1007/s40262-019-00789-7

50. Steininger J, Gellrich FF, Schulz A, Westphal D, Beissert S, Meier F. Systemic Therapy of Metastatic Melanoma: On the Road to Cure. *Cancers (Basel)*. 2021;13(6):1430. Published 2021 Mar 20. doi:10.3390/cancers13061430
51. Filipski K, Scherer M, Zeiner KN, et al. DNA methylation-based prediction of response to immune checkpoint inhibition in metastatic melanoma. *J Immunother Cancer*. 2021;9(7):e002226. doi:10.1136/jitc-2020-002226
52. Weiss SA, Wolchok JD, Sznol M. Immunotherapy of Melanoma: Facts and Hopes. *Clin Cancer Res*. 2019;25(17):5191-5201. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-1550
53. Herzberg B, Fisher DE. Metastatic melanoma and immunotherapy. *Clin Immunol*. 2016;172:105-110. doi:10.1016/j.clim.2016.07.006
54. Zaremba A, Zimmer L, Griewank KG, et al. Immuntherapie beim malignen Melanom [Immunotherapy for malignant melanoma]. *Internist (Berl)*. 2020;61(7):669-675. doi:10.1007/s00108-020-00812-1
55. Kurzhals JK, Graf T, Boch K, et al. Serum Troponin T Concentrations Are Frequently Elevated in Advanced Skin Cancer Patients Prior to Immune Checkpoint Inhibitor Therapy: Experience From a Single Tertiary Referral Center. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:691618. Published 2021 Jul 5. doi:10.3389/fmed.2021.691618
56. Rodríguez-Cerdeira C, Carnero Gregorio M, López-Barcenas A, et al. Advances in Immunotherapy for Melanoma: A Comprehensive Review. *Mediators of Inflammation*. 2017;2017:1-14. doi:10.1155/2017/3264217
57. Kwak M, Leick KM, Melssen MM, Slingluff CL Jr. Vaccine Strategy in Melanoma. *Surg Oncol Clin N Am*. 2019;28(3):337-351. doi:10.1016/j.soc.2019.02.003
58. Eggermont AMM, Crittenden M, Wargo J. Combination Immunotherapy Development in Melanoma. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2018;38:197-207. doi:10.1200/EDBK_201131
59. Bayan CY, Lopez AT, Gartrell RD, et al. The Role of Oncolytic Viruses in the Treatment of Melanoma [published correction appears in *Curr Oncol Rep*. 2018 Nov 13;20(12):100]. *Curr Oncol Rep*. 2018;20(10):80. Published 2018 Aug 25. doi:10.1007/s11912-018-0729-3

60. Ascierto PA, Flaherty K, Goff S. Emerging Strategies in Systemic Therapy for the Treatment of Melanoma. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2018;38:751-758. doi:10.1200/EDBK_1990
61. Crispo A, Corradin MT, Giulioni E, et al. Real Life Clinical Management and Survival in Advanced Cutaneous Melanoma: The Italian Clinical National Melanoma Registry Experience. *Front Oncol*. 2021;11:672797. Published 2021 Jul 8. doi:10.3389/fonc.2021.672797
62. Axelrod ML, Johnson DB, Balko JM. Emerging biomarkers for cancer immunotherapy in melanoma. *Semin Cancer Biol*. 2018;52(Pt 2):207-215. doi:10.1016/j.semcancer.2017.09.004
63. Villani A, Scalvenzi M, Fabbrocini G, Ocampo-Candiani J, Ocampo-Garza SS. Looking into a Better Future: Novel Therapies for Metastatic Melanoma. *Dermatol Ther (Heidelb)*. 2021;11(3):751-767. doi:10.1007/s13555-021-00525-9
64. Vesely MD, Chen L. Normalization Cancer Immunotherapy for Melanoma. *J Invest Dermatol*. 2020;140(6):1134-1142. doi:10.1016/j.jid.2020.02.005

ZOLGENSMA - REWOLUCJA W LECZENIU RDZENIOWEGO ZANIKU MIĘŚNI (SMA) TYPU I

Iwona Jabłońska, Joanna Bączyk, Jakub Słota, Marcin Goławski, Grzegorz O. Machelski

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

Abstrakt:

Rdzeniowy zanik mięśni (SMA) jest chorobą genetyczną, w której przebiegu neurony jąder przednich rdzenia kręgowego ulegają degeneracji, co skutkuje postępującym zanikiem mięśni szkieletowych. Schorzenie to występuje w pięciu odmianach różniących się od siebie nasileniem objawów, oraz czasem ich wystąpienia. Przyczyną SMA jest mutacja genu SMN1, kodującego białko SMN (ang. survival motor neuron). Schorzenie to jest obecnie najczęstszą dziedziczną przyczyną śmierci u dzieci, jednak dzięki możliwościom leczenia przyczynowego, które pojawiły się w ciągu ostatnich kilku lat, być może wkrótce ulegnie to zmianie. Leczenie przyczynowe SMA oparte jest na podnoszeniu w motoneuronach poziomu białka SMN, którego to niedobór powoduje rozwój tej choroby. Lek onasemnogene abeparvovec znany pod nazwą handlową jako Zolgensma to terapia genowa, która z wykorzystaniem kapsydu wirusa infekującego motoneurony dostarcza do ich wnętrza odpowiedni gen i umożliwia syntezę niezbędnego do ich przeżycia białka SMN. Badania kliniczne wykazały znaczną poprawę rozwoju motorycznego u dzieci chorujących na SMA typu I, którym podano onasemnogene abeparvovec.

Słowa kluczowe: onasemnogene abeparvovec, SMA, spinal muscular atrophy

Abstract:

Spinal muscular atrophy (SMA) is a neurodegenerative genetic disorder of the anterior horn motor neurons in the spinal cord, manifested through progressive atrophy of the skeletal muscles. There are five types of the disease, varying in symptoms intensity and age of onset. SMA is caused by the mutation in SMN1 gene, which encodes the survival motor neuron (SMN) protein. The disease is the most frequent genetic cause of infants death, however, due to the recent introduction of new methods of treatment, this might change in the near future. Lack of SMN protein results in spinal muscular atrophy, therefore rational treatment of the SMA is based on increasing level of SMN protein in motor neurons. Recently introduced drug, Onasemnogene abeparvovec (Zolgensma) is a gene replacement therapy, which uses viral vectors that infects motor neurons, deriving a copy of a proper gene and enabling biosynthesis of protein SMN, which is required to survive. Clinical trials showed significant improvement of motor development in children with SMA type I, that received onasemnogene abeparvovec.

Keywords: onasemnogene abeparvovec, SMA, spinal muscular atrophy

1. WSTĘP

Rdzeniowy zanik mięśni (SMA) jest uwarunkowanym genetycznie schorzeniem, dziedziczonym w sposób autosomalny recesywny. Przyczyną jest mutacja genu SMN1, kodującego białko SMN (ang. survival motor neuron), które jest niezbędne do przeżycia i prawidłowego funkcjonowania motoneuronów [1]. W przebiegu SMA neurony jąder przednich rdzenia kręgowego ulegają degeneracji, co skutkuje postępującym zanikiem mięśni szkieletowych [2]. Jest to rzadka choroba, występująca z częstością ok. 1 na 10000 żywych urodzeń, która stanowi jednak najczęstszą dziedziczną przyczynę śmierci u dzieci [3].

Wraz z postępem genetyki i inżynierii genetycznej, pojawiła się szansa na rozwój terapii genowej, czyli leczenia polegającego na wprowadzeniu obcego kwasu nukleinowego do komórek organizmu. Chociaż pierwsza propozycja takiego sposobu leczenia została opisana w czasopiśmie Science już w 1972 roku [4], to dopiero ponad 30 lat później, w roku 2003, dopuszczono do użytku w Chinach pierwszy tego typu lek [5, 6]. Około 10 lat później, w roku 2013, takie leki zostały zarejestrowane w Unii Europejskiej. Ostatnie lata były okresem bardzo intensywnego rozwoju terapii genowej, co zaowocowało pojawieniem się możliwości leczenia przyczynowego niektórych chorób genetycznych [6].

Jednym z najnowszych leków tego typu jest onasemnogene abeparvovec, znany pod nazwą handlową jako Zolgensma, który jest drugim lekiem zarejestrowanym w leczeniu rdzeniowego zaniku mięśni typu I i pierwszą terapią genową stosowaną w tym wskazaniu [7, 8]. Pierwsze możliwości przyczynowego leczenia SMA pojawiły się w grudniu 2016 roku wraz z zatwierdzeniem przez FDA preparatu nusinersen, znanego pod nazwą handlową Spinraza. Obydwa dostępne dotychczas leki prowadzą do podniesienia w motoneuronach poziomu białka SMN, którego to niedobór powoduje rozwój tej choroby [9]. Przed pojawieniem się tych preparatów, możliwe było jedynie objawowe leczenie pacjentów chorujących na rdzeniowy zanik mięśni.

2. RDZENIOWY ZANIK MIĘŚNI

2.1. Patogeneza

Przyczyną rozwoju SMA jest w zdecydowanej większości przypadków mutacja genu SMN1. Najczęściej, bo aż w 90% jest to delecja, rzadziej rearanżacja

(5%) lub inne mutacje [10]. U około 5% pacjentów choroba ta nie jest powiązana z uszkodzeniem lub brakiem genu SMN1 [11]. Gen ten koduje białko SMN, które, uczestniczy w tworzeniu małych, jądrowych rybonukleoprotein (ang. small nuclear ribonucleoproteins, snRNPs) [1]. snRNPs w połączeniu z innymi białkami tworzą spliceosomy i pełnią zasadniczą rolę w wycinaniu intronów z pre-mRNA w procesie splicingu [12]. Białko SMN ulega ekspresji w niewielkim stopniu we wszystkich komórkach organizmu, jednak większość z nich potrafi poradzić sobie w przypadku jego braku. Inaczej na brak tej proteiny reagują motoneurony, w których białko SMN osiąga wysoki poziom ekspresji i jest niezbędne do ich przeżycia [2].

Gen SMN1 występuje na ramieniu długim chromosomu 5 (pozycja 5q13) i jest częścią odwróconej duplikacji zawierającej co najmniej cztery geny [13, 14]. W tej samej pozycji znajduje się jego centromerowa kopia (SMN2) [15]. Mutacje kopii telomerowej (SMN1) prowadzą do wystąpienia rdzeniowego zaniku mięśni, natomiast mutacje w obszarze kopii centromerowej nie powodują pojawienia się tej choroby [14, 15]. Mimo tego gen SMN2 nie pozostaje bez znaczenia w przebiegu SMA.

Obydwa geny są pod względem sekwencji prawie identyczne, ich eksony różnią się od siebie zaledwie dwoma nukleotydami. Chociaż żadna z tych dwóch różnic nie skutkuje zmianą sekwencji aminokwasowej, to jednak gen SMN2 ulega ekspresji do prawidłowego białka jedynie w niewielkiej części [16]. Jako przyczynę podaje się mutację substytucyjną C->T w szóstej pozycji eksonu 7, która zmienia wzór splicingu, jakiemu ulega pierwotny transkrypt (pre-mRNA). Prawdopodobnie zmiana powoduje, że sekwencja przestaje być rozpoznawana jako wzmacniacz splicingu [6, 16] lub, według innych autorów, zaczyna być rozpoznawana jako jego wyciszacz [17]. Ta różnica w sekwencji nukleotydowej sprawia, że większość produkowanego na matrycy SMN2 białka jest pozbawiona fragmentu kodowanego przez ekson 7 [6].

Okolo 10-20% transkryptów genu SMN2 pozwala na syntezywanie prawidłowego białka, dlatego gen ten jest czynnikiem modyfikującym przebieg SMA [18]. Im więcej jego kopii występuje u osób z uszkodzonym lub nieobecnym genem SMN1, tym łżejszy jest przebieg choroby i tym później pojawiają się jej objawy [19].

2.2. Warianty SMA i ich manifestacja kliniczna

W zależności od liczby kopii genu SMN2 można wyróżnić pięć wariantów SMA oznaczonych cyframi od 0 do 4. Różnią się one od siebie stopniem

nasilenia objawów oraz wiekiem ich manifestacji [19, 20]. Zależnie od typu, pierwsze objawy mogą pojawić się jeszcze przed narodzinami lub dopiero w czwartej dekadzie życia, a zaburzenia motoryczne mogą wahać się od znacznej hipotonii u nowo narodzonego dziecka do lekkiego osłabienia mięśni w dorosłości [19].

SMA typu 0 charakteryzuje się bardzo ciężkim przebiegiem, z uwagi na obecność tylko 1 kopii genu SMN2 [19]. Objawy pojawiają się jeszcze przed porodem, w postaci zmniejszonych ruchów płodu w macicy. Dzieci z tym schorzeniem rodzą się z asfiksją oraz poważnym osłabieniem mięśni (także twarzowych). Najczęściej już od momentu narodzin nie są zdolne do samodzielnego oddychania [21].

SMA typu I, zwany inaczej chorobą Werdniga-Hoffmana, stanowi najczęściej występującą odmianę tego schorzenia (około 57,5% wszystkich rozpoznań SMA) [18, 22]. U większości pacjentów obecne są dwie kopie genu SMN2, jednak możliwa jest również obecność jednej lub trzech kopii, co wpływa na ciężkość przebiegu choroby i jest podstawą dla wyróżnienia podtypów Ia, Ib i Ic [19]. Objawy zaczynają pojawiać się około szóstego miesiąca życia i przejawiają się w początkowej fazie upośledzonym rozwojem ruchowym. Niemowlęta nigdy nie nabywają zdolności do samodzielnego siedzenia, a osłabienie mięśni szybko postępuje, co skutkuje koniecznością wspomagania oddechu oraz prowadzi do śmierci dziecka w pierwszych latach życia. Według badań opisujących historię naturalną choroby śmierć następuje zwykle przed drugimi urodzinami, chociaż mediana przeżycia wydłużyła się na przestrzeni ostatnich kilkudziesięciu lat [23, 24].

W przypadku SMA typu II pierwsze objawy zaczynają pojawiać się nieco później, bo w przedziale między siódmym a osiemnastym miesiącem życia. Upośledzenie rozwoju ruchowego jest nieco mniejsze niż w przypadku SMA typu I, w związku z czym dzieci są w stanie siedzieć samodzielnie. Niektóre z nich uczą się także samodzielnie wstawać, jednak nie zdobywają umiejętności chodzenia [25,26]. Dzieci z tym typem rdzeniowego zaniku mięśni zwykle posiadają 3 kopie genu SMN2 [19]. Według niektórych autorów rokowanie koreluje z osiągniętymi przez dziecko kamieniami milowymi [19]. Oczekiwana długość życia jest krótsza niż u ludzi zdrowych, jednak większość pacjentów dożywa dorosłości [23].

Kolejnym, jeszcze łżejszym w przebiegu wariantem SMA jest typ III. W tym przypadku dzieci osiągają zwykle wszystkie najistotniejsze dla rozwoju ruchowego kamienie milowe, przede wszystkim zdolność do samodzielnego chodzenia. Mogą pojawiać się jednak problemy z wykonywaniem bardziej

złożonych czynności ruchowych, takich jak skakanie, bieganie, czy wchodzenie po schodach [2, 11]. Objawy osłabienia mięśni pojawiają się po 18 miesiącu życia [27, 28], co może prowadzić do utraty nabytych umiejętności ruchowych i konieczności poruszania się na wózku inwalidzkim [27]. Rokowanie w tym wypadku koreluje z maksymalną sprawnością ruchową, jaką dziecko osiągnęło [11]. Oczekiwana długość życia pacjentów jest bliska normalnej [26]. Występowanie rdzeniowego zaniku mięśni typu III wiąże się z obecnością czterech lub rzadziej trzech kopii genu SMN2 [20].

Najlżejszą odmianą SMA jest typ IV, którego objawy ujawniają się najczęściej w trzeciej dekadzie życia, a u pacjentów występują zwykle cztery lub więcej kopii genu SMN2 [28].

Postępujące osłabienie mięśni szkieletowych w przebiegu SMA prowadzi nie tylko do ograniczenia rozwoju ruchowego, ale również pociąga za sobą inne poważne konsekwencje. W przypadku typu I u chorujących dzieci pojawiają się zaburzenia odżywiania, objawiające się zmniejszonym przyjmowaniem pokarmu lub nawet odmową przyjęcia posiłku. Osłabienie mięśni oddechowych prowadzi do przewlekłej niewydolności oddechowej, będącej najczęstszą przyczyną śmierci tych pacjentów [9]. Ponadto u chorych z SMA typu II i III zmniejszanie się siły skurczu odpowiednich mięśni wywołuje postępującą skoliozę, często wymagającą leczenia operacyjnego [29].

3. DOTYCHCZASOWE TERAPIE SMA

3.1. Leczenie objawowe

Jeszcze do niedawna możliwe było jedynie leczenie objawowe pacjentów chorujących na rdzeniowy zanik mięśni. Wciąż pełni ono zasadniczą rolę w terapii SMA, z uwagi na bardzo wysokie ceny leków przyczynowych, co sprawia, że dla wielu chorych te preparaty pozostają niedostępne.

Opieka paliatywna nad dziećmi z SMA na przestrzeni lat znacznie się poprawiła i ułatwione zostało prowadzenie jej w warunkach domowych [9, 30]. Hully et al. przeprowadziła w latach 2012-2016 we Francji wieloośrodkowe, prospektywne badanie dotyczące opieki paliatywnej nad pacjentami cierpiącymi na SMA typu 1. Zdecydowana większość dzieci uczestniczących w badaniu była poddawana regularnej fizjoterapii oddechowej (91%) oraz tlenoterapii (81%). W przypadku niektórych chorych prowadzono ponadto wentylację nieinwazyjną (NIV) [9], która nie wymaga stosowania rurki intubacyjnej, czy tracheotomijnej. SMA typu 1 poza postępującym upośledzeniem oddychania,

cechuje się też licznymi zaburzeniami związanymi z odżywianiem oraz funkcjonowaniem przewodu pokarmowego. W związku z tym u 92% pacjentów konieczne stało się zastosowanie żywienia przez zgłębnik nosowo-żołądkowy. W ramach opieki paliatywnej prowadzono również farmakologiczne leczenie bólu [9]. W przypadku łagodniejszych odmian SMA (typ II i III) leczenie objawowe obejmuje również operację często pojawiającej się u pacjentów postępującej skoliozy [29].

3.2. Leczenie przyczynowe

W grudniu 2016 roku w Stanach Zjednoczonych zatwierdzono do leczenia SMA nusinersen (nazwa handlowa- Spinraza) [5, 31]. Jest to pierwszy dopuszczony do stosowania w rdzeniowym zaniku mięśni lek przyczynowy. Preparat ten jest oligonukleotydem antysensownym stworzonym z zamierzeniem przywrócenia ekspresji prawidłowego białka SMN poprzez korekcję splicingu. Dzięki temu prowadzi on do zwiększenia poziomu tej proteiny w motoneuronach [9, 31, 32]. Spinraza wiąże się ze specyficzną sekwencją w intronie znajdującym się za eksonem 7 (ang. downstream) w pre-mRNA genu SMN2. To wywołuje modyfikację splicingu, dzięki której ostateczny transkrypt mRNA zawiera ekson 7 i może dojść do biosyntezy prawidłowo zbudowanego białka [32].

Pod koniec 2016 roku opublikowane zostało badanie open-label, wykazujące poprawę rozwoju ruchowego, jak również wydłużenie czasu przeżycia u dzieci z SMA typu I, którym podawano nusinersen. W badaniu wzięło udział 20 uczestników w wieku poniżej 7 miesięcy. Podawanie leku zaowocowało istotną poprawą funkcji motorycznych, co mierzono testem CHOP-INTEND (ang. Children's Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disorders) oraz w zakresie zdobywania kamieni milowych testem HINE-2 (ang. Hammersmith Infant Neurological Exam- Part 2) [33]. Po badaniu open-label przeprowadzone zostało również podwójnie zaślepienie badanie randomizowane. Wzięło w nim udział 122 pacjentów cierpiących na SMA typu I. Rozwój funkcji motorycznych mierzono w taki sam sposób jak we wcześniej opisanym badaniu. Zaobserwowano znacząco lepsze wyniki przeprowadzanych testów u pacjentów pobierających nusinersen niż w grupie kontrolnej [34]. W 2017 roku ukazało się kolejne ważne badanie, w którym lek podawano dzieciom przed wystąpieniem pierwszych objawów choroby. Włączono do niego chorych poniżej 6 tygodnia życia, u których nie występowały objawy SMA, ale potwierdzono badaniami genetycznymi mutację lub delecję genu

SMN1, jak również obecność dwóch, bądź trzech kopii genu SMN2. Rozwój funkcji motorycznych dzieci oceniano z wykorzystaniem metod identycznych jak w poprzednich badaniach. Pacjenci, którym podawano nusinersen przed wystąpieniem pierwszych objawów schorzenia przejawiali lepszy rozwój ruchowy niż pacjenci nieleczeni przyczynowo oraz ci, którzy zaczęli otrzymywać lek dopiero po wystąpieniu objawów [35].

Przeprowadzono również badania z udziałem pacjentów cierpiących na później ujawniające się postaci SMA. W 2017 roku ukazało się międzynarodowe, wielośrodkowe, podwójnie zaślepienie badanie, w którym udział wzięło 126 pacjentów chorujących na SMA typu II. W celu oceny funkcji motorycznych zastosowano m. in. skalę HFMSE (ang. Hammersmith Functional Motor Scale–Expanded). Wykazano, że pacjenci przyjmujący nusinersen osiągnęli lepsze oceny funkcji motorycznych niż pacjenci z próby kontrolnej [36].

4. TERAPIA GENOWA W LECZENIU SMA

4.1. Onasemnogene abeparvovec

Onasemnogene abeparvovec znany pod nazwą handlową jako Zolgensma to lek, który został dopuszczony do stosowania w USA w maju 2019 roku, a w Unii Europejskiej w maju roku 2020 [7,37]. Zolgensma jest pierwszą terapią genową dostępną w leczeniu rdzeniowego zaniku mięśni. Zatwierdzono ją do leczenia chorujących na SMA dzieci poniżej 2 roku życia, posiadających mutacje w obu allelach genu SMN1 [8]. Preparat jest produkowany przez amerykańską firmę AveXis, należącą do koncernu farmaceutycznego Novartis [8]. Za pojedynczą dawkę (kompletna terapia) została wyznaczona cena ponad 2 milionów dolarów, co czyni Zolgensmę najdroższym preparatem leczniczym na świecie [20].

Onasemnogene abeparvovec to preparat składający się z kapsydów wirusa AAV9 zawierających kopie genu kodującego białko SMN o pełnej długości (zawierające ekson 7) [8]. Rekomendowana dawka leku to 1×10^{14} wektorów wirusowych na kg masy ciała (vg/kg), podana w postaci infuzji dożylną trwającej 60 minut [8]. Część dzieci posiada wysoki poziom przeciwciał przeciwko wirusowi AAV9 i z tego powodu lek może u nich nie zadziałać. Dlatego też przed podaniem preparatu konieczne jest zbadanie poziomu tych przeciwciał [8].

4.2. Badania kliniczne

Przed zatwierdzeniem leku przez FDA przeprowadzono kilka badań klinicznych oceniających jego skuteczność. W 2017 roku ukazało się badanie, w którym onasemnogene abeparvovec podano 15 pacjentom chorującym na SMA typu 1. Dla pierwszych 9 pacjentów kryterium włączenia stanowił wiek poniżej 9 miesięcy przy podaniu preparatu. W przypadku kolejnych chorych wiek ten nie mógł przekraczać 6 miesięcy. Wszyscy uczestnicy badania mieli po dwie kopie genu SMN2. Trzech pacjentów otrzymało mniejszą dawkę leku (6.7×10^{13} vg/kg), a dwunastu większą (2.0×10^{14} vg/kg). Średni wiek pacjentów grupy pierwszej w czasie podania preparatu wyniósł 6,3 miesiąca, natomiast w grupie drugiej 3,4 miesiąca. W sierpniu 2017 wszyscy pacjenci osiągnęli wiek 20 miesięcy i żaden z nich nie wymagał stałej wentylacji mechanicznej, co było ogromną poprawą względem historycznej kohorty, w której takie wyniki uzyskało jedynie 8% pacjentów. W zakresie oceny funkcji motorycznych wykorzystano test CHOP-INTEND i odnotowano, że w obydwu grupach pacjentów uzyskiwane wyniki uległy poprawie. Ponadto w grupie drugiej oceniono osiąganie kamieni milowych i stwierdzono, że 11 na 12 pacjentów (92%) nabyło umiejętność unoszenia głowy oraz samodzielnego siedzenia przez co najmniej 5 sekund. 2 uczestników badania dzięki podaniu leku zaczęło wstać i chodzić. W tej grupie oceniono również wydolność oddechową i sposób odżywiania, stwierdzając, że 7 z 12 pacjentów (58%) nie wymagało wspomagania oddychania na ostatniej wizycie. Ponadto 11 chorych nabyło lub utrzymało zdolność samodzielnego połykania, a 4 z nich (33%) można było karmić drogą doustną [38].

W kwietniu 2021 roku w czasopiśmie Lancet ukazały się wyniki badania STRIVE, które było wieloośrodkowym badaniem open-label przeprowadzonym w USA. Wzięło w nim udział 22 pacjentów chorujących na SMA typu I. Do kryteriów włączenia należał wiek poniżej 6 miesięcy oraz obecność jednej lub dwóch kopii genu SMN2. Pacjenci otrzymali onasemnogene abeparvovec w dawce 1×10^{14} vg/kg. Oceniano zdolność do samodzielnego siedzenia przez co najmniej 30 sekund oraz konieczność stałej wentylacji mechanicznej i przeżycie pacjentów w wieku 14 miesięcy. Uzyskane wyniki porównano z wynikami grupy 23 nieleczonych dzieci pozyskanymi z bazy danych Pediatric Neuromuscular Clinical Research (PNCR). 13 z 22 pacjentów (59%) osiągnęło zdolność do samodzielnego siedzenia przez co najmniej 30 sekund (w grupie PNCR żadne z 23 dzieci nie nabyło tej umiejętności). 20 uczestników (91%)

osiągając wiek 14 miesięcy, nie wymagało ciągłej wentylacji mechanicznej (w porównaniu do 26% w grupie PNCR) [39].

Podobnie jak w przypadku nusinersenu prowadzone jest obecnie badanie, w którym onasemnogene abeparvovec jest podawany dzieciom jeszcze przed wystąpieniem pierwszych objawów choroby. Według doniesień z konferencji lek podano 18 pacjentom w wieku do 6 tygodni, u których występowały dwie lub trzy kopie genu SMN2. W czasie obserwacji, którego mediana wyniosła 5,4 miesiąca wszystkie dzieci posiadające 2 kopie genu SMN2 (n=8) osiągnęły odpowiednie dla wieku kamienie milowe w zakresie rozwoju ruchowego [40].

4.3. Działania niepożądane

Stosowanie onasemnogene abeparvovec może być przyczyną podniesienia się poziomu aminotransferaz we krwi, a nawet poważnego, ostrego uszkodzenia wątroby. Z tego powodu przed infuzją należy ocenić funkcje wątroby w badaniu fizykalnym oraz poprzez badania laboratoryjne. Ponadto należy rozpocząć podawanie glikokortykosteroidów dzień przed podaniem Zolgensmy i kontynuować terapię przez co najmniej 30 dni, by zmniejszyć ryzyko związane z podniesieniem się poziomu wspomnianych enzymów [41].

5. PODSUMOWANIE

Jeszcze do niedawna możliwe było jedynie paliatywne leczenie dzieci cierpiących na rdzeniowy zanik mięśni typu I. Pacjenci najczęściej umierali przed ukończeniem drugiego roku życia z powodu niewydolności oddechowej. W 2016 roku FDA dopuściło pierwszy lek przyczynowy- nusinersen w leczeniu rdzeniowego zaniku mięśni [31], a w 2019- preparat onasemnogene abeparvovec [7]. Obydwa leki są jednak bardzo drogie, przez co dla wielu pacjentów pozostają niedostępne. Ponadto przeprowadzane dotychczas badania nie pozwoliły ocenić działania preparatu w przypadku podania go pacjentom z zaawansowaną chorobą [41]. Na podstawie obecnie posiadanej wiedzy można przypuszczać, że efekt terapeutyczny jest tym lepszy, im wcześniej lek zostanie podany.

Onasemnogene abeparvovec to bez wątpienia innowacyjny preparat leczniczy, który dzięki ingerowaniu w genom chorego jest w stanie złagodzić objawy rdzeniowego zaniku mięśni. Jest to ważny krok nie tylko w leczeniu SMA, ale również w rozwoju terapii genowej. Ten kierunek rozwoju nauki niesie nadzieję na wyleczenie wielu dotychczas nieuleczalnych chorób. Obecnie brakuje

badania, by ocenić, jaki długofalowy efekt będzie miało podanie preparatu onasemnogene abeparvovec. Czy kiedykolwiek możliwe będzie wyleczenie rdzeniowego zaniku mięśni typu I, czy może leki przyczynowe są w stanie jedynie opóźnić wystąpienie niewydolności oddechowej i związanej z nią śmierci? Być może kolejne badania kliniczne dostarczą odpowiedzi na rodzące się obecnie pytania.

REFERENCJE

1. Li W. How do SMA-linked mutations of SMN1 lead to structural/functional deficiency of the SMA protein? *Plos one*. 2017;12(6):e0178519. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178519>
2. Lunn MR, Wang CH. Spinal muscular atrophy. *Lancet*. 2008; 371:212033. doi:10.1016/S0140-6736(08)60921-6
3. Sugarman E, Nagan N, Zhu H et al. Pan-ethnic carrier screening and prenatal diagnosis for spinal muscular atrophy: clinical laboratory analysis of >72 400 specimens. *Eur J Hum Genet* 2012;20:27–32. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2011.134>
4. Friedmann T, Roblin R. Gene therapy for human genetic disease? *Science*. 1972;175(4025):949–955. doi:10.1126/science.175.4025.949
5. Daley J. Gene Therapy Arrives. *Nature*. 2019;576:12-13. <https://doi.org/10.1038/d41586-019-037>
6. Monani UR, Lorson CL, Parsons DW, et al. A Single Nucleotide Difference That Alters Splicing Patterns Distinguishes the SMA Gene SMN1 From the Copy Gene SMN2. *Hum Mol Genet*. 1999;8(7):1177–1183. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.7.1177>
7. FDA approves innovative gene therapy to treat pediatric patients with spinal muscular atrophy, a rare disease and leading genetic cause of infant mortality. U.S. Food and Drug Administration. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-innovative-gene-therapy-treat-pediatric-patients-spinal-muscular-atrophy-rare-disease>. Published: 24.06.2019. Access: 01.04.2021.
8. Hoy SM. Onasemnogene Abeparvovec: First Global Approval. *Drugs*. 2019;79:1255–1262. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01162-5>

9. Hully M, Barnerias C, Chabaliere D, et al. Palliative Care in SMA Type 1: A Prospective Multicenter French Study Based on Parents' Reports. *Front Pediatr.* 2020;8:4 doi:10.3389/fped.2020.00004
10. Szczerba A, Śliwa A, Żarowski M, Jankowska A. Molekularne podłoże i terapia rdzeniowego zaniku mięśni. *Neurol Dziec.* 2018;27(55):39-46. doi:10.20966/chn.2018.55.429
11. Chien SC, Su YN. Current Aspects in the Molecular Genetics and Diagnostics of Spinal Muscular Atrophy. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2009;44(3):201-208. doi:10.1016/s1028-4559(09)60142-x
12. SMN2 survival of motor neuron 2, centromeric [*Homo sapiens* (human)]. National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6607>. Updated: 02.03.2021. Access: 20.03.2021.
13. Lerner M, Boyle J, Mount S, et al. Are snRNPs involved in splicing? *Nature.* 1980;283:220-224. <https://doi.org/10.1038/283220a0>
14. Dangouloff T, Servais L. Clinical Evidence Supporting Early Treatment Of Patients With Spinal Muscular Atrophy: Current Perspectives. *Ther Clin Risk Manag.* 2019;15:1153-1161.
2. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S172291>
15. Pearson S, Jia H, Kandachi, K. China approves first gene therapy. *Nat Biotechnol.* 2004;22:3-4. <https://doi.org/10.1038/nbt0104-3>
16. SMN1 survival of motor neuron 1, telomeric [*Homo sapiens* (human)]. National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6606>. Updated: 06.04.2021. Access: 06.04.2021.
17. Kashima T, Manley J. A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nat Genet.* 2003;34:460-463. <https://doi.org/10.1038/ng1207>
18. Verhaart, IEC, Robertson A, Wilson IJ, et al. Prevalence, incidence and carrier frequency of 5q-linked spinal muscular atrophy – a literature review. *Orphanet J Rare Dis.* 2017;12:124. <https://doi.org/10.1186/s13023-017-0671-8>
19. Wadman RI, Stam M, Gijzen M, et al. Association of motor milestones, SMN2 copy and outcome in spinal muscular atrophy types 0-4. *J. Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2017;88:365-367. doi:10.1136/jnnp-2016-314292

20. Majchrzak-Celińska A, Warych A, Szoszkiewicz M. Rdzeniowy zanik mięśni – onasemnogene abeparvovec i inne opcje terapeutyczne. *Farm Pol.* 2020;76(1):10–17. doi:10.32383/farmpol/118343
21. Dubowitz V. Very severe spinal muscular atrophy (SMA type 0): an expanding clinical phenotype. *Eur J Paediatr Neurol.* 1999;3(2):49–51. [https://doi.org/10.1016/S1090-3798\(99\)80012-9](https://doi.org/10.1016/S1090-3798(99)80012-9).
22. Ogino S, Wilson R, Gold B. New insights on the evolution of the *SMN1* and *SMN2* region: simulation and meta-analysis for allele and haplotype frequency calculations. *Eur J Hum Genet.* 2014;12:1015–1023. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201288>
23. Farrar MA, Vucic S, Johnston HM, et al. Pathophysiological insights derived by natural history and motor function of spinal muscular atrophy. *J Pediatr.* 2013;162(1):155–9. doi:10.1016/j.jpeds.2012.05.067.
24. Jędrzejowska M, Kostera-Pruszczyk A. Rdzeniowy zanik mięśni – nowe terapie, nowe wyzwania. *Neurol Dziec.* 2017;26(52):11–17. doi:10.20966/chn.2017.52.400
25. Identification and Characterization of a Spinal Muscular Atrophy-Determining Gene. *Cell.* 1995;80:155–165. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90460-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90460-3)
26. Zerres K, Rudnik-Schöneborn S, Forrest Eric, et al. A collaborative study on the natural history of childhood and juvenile onset proximal spinal muscular atrophy (type II and III SMA): 569 patients. *J Neurol Sci.* 1997;146(1):67–72. [https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(96\)00284-5](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(96)00284-5)
27. Wirth B, Brichta L, Schrank B, et al. Mildly affected patients with spinal muscular atrophy are partially protected by an increased SMN2 copy number. *Hum Genet.* 2006;119:422–428 doi:10.1007/s00439-006-0156-7
28. Brahe C, Servidei S, Zappata S, et al. Genetic homogeneity between childhood-onset and adult-onset autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Lancet.* 1995;346(8977):741–2. doi:10.1016/s0140-6736(95)91507-9.
29. Wijngaarde CA, Brink RC, de Kort FAS, et al. Natural course of scoliosis and lifetime risk of scoliosis surgery in spinal muscular atrophy. *Neurology.* 2019; 93(2):149–158. doi:10.1212/wnl.00000000000007742

30. Waldrop MA, Kolb SJ. Current Treatment Options in Neurology—SMA Therapeutics. *Curr Treat Options Neurol.* 2019;21:25. <https://doi.org/10.1007/s11940-019-0568-z>
31. Ottesen EW. ISS-N1 makes the first FDA-approved drug for spinal muscular atrophy. *Transl Neurosci.* 2017;8(1):1-6. <https://doi.org/10.1515/tnsci-2017-0001>
32. Hoy SM. Nusinersen: First Global Approval. *Drugs.* 2017;77:473-479. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0711-7>
33. Finkel RS, Chiriboga CA, Vajsar J, et al. Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: a phase 2, open-label, dose-escalation study. *Lancet.* 2016;388(10063):3017-3026. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31408-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31408-8).
34. Finkel R, Kuntz N, Mercuri E, et al. Efficacy and safety of nusinersen in infants with spinal muscular atrophy (SMA): Final results from the phase 3 ENDEAR study. *Eur J Paediatr Neurol.* 2017;21:14-15. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2017.04.1219>
35. Bertini E, Hwu WL, Reyna SP, et al. Efficacy and safety of nusinersen in infants with presymptomatic spinal muscular atrophy (SMA): Interim results from the NURTURE study. *Eur J Paediatr Neurol.* 2017;21:14. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2017.04.1218>
36. Mercuri E, Finkel R, Kirschner J, et al. Efficacy and safety of nusinersen in children with later-onset spinal muscular atrophy (SMA): end of study results from the phase 3 CHERISH study. *Neuromuscul Disord.* 2017;27:210. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2017.06.418>
37. AveXis receives EC approval and activates “Day One” access program for Zolgensma®, the only gene therapy for spinal muscular atrophy (SMA). Novartis. <https://www.novartis.com/news/media-releases/avexis-receives-ec-approval-and-activates-%22day-one%22-access-program-zolgensma-only-gene-therapy-spinal-muscular-atrophy-sma>. Published: 19.05.2020. Access: 06.04.2021.
38. Mendell JR, Al-Zaidy S, Shell R, et al. Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med.* 2017;377(18):1713-1722. doi: 10.1056/NEJMoa1706198.

39. Day JW, Finkel RS, Chiriboga CA, et al. Onasemnogene abeparvovec gene therapy for symptomatic infantile-onset spinal muscular atrophy in patients with two copies of SMN2 (STRIVE): an open-label, single-arm, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Neurol.* 2021;20(4):284-293. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00001-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00001-6).
40. Pearson SD, Thokala P, Stevenson M, et al. The Effectiveness and Value of Treatments for Spinal Muscular Atrophy A Summary from the Institute for Clinical and Economic Review's New England Comparative Effectiveness Public Advisory Council. *J Manag Care Spec Pharm.* 2019;25(12):1300-1306. <https://doi.org/10.18553/jmcp.2019.25.12.1300>
41. U.S. Food and Drug Administration. Dokument pdf. (online) 2019. Dostępny w Internecie: <https://www.fda.gov/media/126109/download>.

DIAGNOSTYKA OBRAZOWA COVID-19

Emilia Słabońska, Aleksandra Szczuraszyk, Dominika Majer,
Robert Kasza, Piotr Limanówka

Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Klinice Neurochirurgii w Katowicach,
Wydział Nauk Medycznych w Katowicach, Śląski, Uniwersytet Medyczny w Katowicach,

Abstrakt

Drastycznie zmieniająca się sytuacja na świecie związana z wybuchem epidemii COVID-19 wywołanej przez wirus Sars-Cov2 sprawiła, iż w naturalny sposób służba zdrowia została ustawiona na pierwszej linii frontu w walce z chorobą. Diagnostyka obrazowa jest jednym z niezbędnych narzędzi w walce z wirusem. Właściwe zastosowanie i wykorzystanie diagnostyki obrazowej pozwala na bardziej gruntowne, wnikliwe zbadanie przyczyn choroby i jej skutków, a w konsekwencji ma także wpływ na opracowanie leczenia, objawowego, jak i pośrednio oddziałuje na dostosowanie odpowiedniej rehabilitacji i leczenia już po przejściu zakażenia. Weryfikacja wewnętrznych objawów i skutków zarażenia wirusem Sars-Cov 2, także z zastosowaniem diagnostyki obrazowej powinna zatem być ciągle doskonalona celem zwiększenia możliwości profilaktyki i leczenia. Diagnostyka obrazowa przyczynia się do lepszego poznania schematu działania choroby oraz pozwala na dokładniejszą weryfikację uszkodzeń organizmu, wynikających z samej choroby jak i skutków leczenia mechanicznego- przez wentylację mechaniczną. Aby móc zaobserwować chorobę i stwierdzić jak na pacjenta wpływa SARS-CoV-2, wykorzystuje się metody diagnostyki obrazowej, takiej jak na przykład tomografia komputerowa, rentgenografia, ultrasonografia. lekarz może na podstawie badań obrazowych uzyskać odpowiedź jakie zmiany zaszły w organizmie pacjenta i jakie kroki w leczeniu należy podjąć, uwzględniając uszkodzenia poszczególnych narządów lub układów. Wskazaniami do badań obrazowych rentgenografii (RTG) są utrzymujący się kaszel lub objawy wskazujące na zajęcie płuc. Jest to szczególnie ważne w przypadku pacjentów, których oddychanie jest wspomagane przez wentylację mechaniczną. Przy tym badaniu należy pamiętać, by wykonywać je możliwie najrzadziej ze względu na szkodliwy wpływ promieniowania. Tomografia komputerowa (TK) zalecana jest przede wszystkim w momencie, gdy może ona mieć wpływ na zmianę rodzaju postępowania klinicznego. Takie zalecenia wynikają z faktu, że swoistość wyglądu zmian po COVID-19 jest niska i zmiany mogą być podobne do tych występujących w przypadku zapalenia płuc wywołanego przez inne wirusy, pneumocystozy, ostrego uszkodzenia płuc spowodowanego toksycznym działaniem leków, nadwrażliwością lub chorobami autoimmunologicznymi. Do badania zmian wykorzystywane jest także badanie ultrasonografem (USG). Badanie ultrasonograficzne jest stosowane u pacjentów z wysiękiem w jamach opłucnej, ponieważ jest to jeden z początkowych objawów COVID-19, który można zaobserwować w diagnostyce obrazowej.

Słowa kluczowe: COVID-19, tomografia komputerowa, ultrasonografia, rentgenografia

Abstract

The world situation changed drastically due to global COVID-19 pandemic outbreak, putting healthcare workers in first line. Medical imaging is crucial in overcoming coronavirus disease. Right diagnosis of cause of illness and its consequences have an impact on the curing process of symptomatic treatment and also on possible methods of rehabilitation and treatment after the contamination. Verification of internal symptoms and effects of illness caused by SARS-CoV-2 need to be constantly improved for better prevention and treatment, basing on the knowledge of how the coronavirus effects the organism. Medical imaging shows the damage that is caused by the virus and also by methods of therapy like mechanical ventilation. In diagnostic imaging there are plenty methods to use, for example: computed tomography, X-ray or ultrasonography. Thanks to those methods, specialists are able to suit the treatment, basing on the knowledge of abnormalities in structure of different organs or whole systems. Indications for X-ray diagnosis are constant cough or symptoms common to lung involvement. It is especially important in cases of patients, whose breathing was stimulated by mechanical ventilation. In this method it is very important to remember, that X-ray should be chosen as rarely as possible because of the potentially harmful radiation. Computed tomography is indicated only when it can change the type of clinical management- it is because of its low specificity and changes shown in CT can be similar to other damage caused by other viruses, pneumocystosis, severe damage of lungs caused by toxic medications, oversensitivity or autoimmune diseases. Ultrasonography is also used in medical imaging of COVID-19, especially in early stage of the disease, when a pleural diffusion is often shown.

Keywords: COVID-19, computed tomography, ultrasound, X-ray

1. WSTĘP

Rok 1895 był dla medycyny początkiem zupełnie nowej epoki i nowego poziomu diagnostyki. Wówczas odkryte zostało promieniowanie X, odkrycia zaś dokonał Wilhelm Konrad Roentgen. Od tamtego momentu do użytku, całkiem zresztą obecnie powszechnego, weszły wszelakie formy diagnostyki obrazowej z wykorzystaniem tzw. promieni Roentgena, które nieustannie są i będą ulepszane wraz z rozwojem medycyny. Fenomenem tego odkrycia była uzyskana odpowiedź na pytanie: jak zbadać wnętrze organizmu pomijając bezpośrednią ingerencję w ciało pacjenta. Roentgen dał podwaliny pod jedną z obecnie kluczowych metod diagnostyki.

11 lutego 2020 roku WHO ogłosiło odkrycie nowej choroby zakaźnej COVID-19, wywołanej wirusem SARS-CoV-2. Pierwszy przypadek tej choroby został wykryty w Chinach, w mieście Wuhan, 17 listopada 2019 roku. 4 marca 2020 roku zarejestrowano, pierwszego w Polsce, zakażonego wirusem SARS-CoV-2. Od tego momentu, również na terenie Polski, rozpoczęła się walka z pandemią. Choroba rozprzestrzeniła się po całym świecie, co przyczyniło się do wdrożenia stosownych obostrzeń, takich jak noszenie maseczek w przestrzeni publicznej, szczególna dbałość o higienę i dezynfekcję rąk,

restrykcje dotyczące podróży zarówno między miastami jak i między krajami oraz globalny lockdown, by uniknąć zbędnych przemieszczania się i zbiorowisk, mogących narażać większą ilość ludzi na zakażenie wirusem. Obostrzenia te wynikają to z faktu, że COVID-19 jest chorobą zakaźną, a do zarażenia dochodzi drogą kropelkową [1]. Diagnostyka obrazowa jest jednym ze sposobów weryfikacji choroby i oceny jej wpływu na organizm [2]. Wykorzystuje się różne metody oraz urządzenia, co pozwala na zwiększenie dokładności badania. Należy jednak zaznaczyć, że póki co, najbardziej wiarygodną metodą weryfikowania zakażeniem koronawirusem jest test rRT-PCR-rodzaj molekularnego testu oparty o pobranie wymazu z nosogardzieli i analizę laboratoryjną metodą PCR (ang. polymerase chain reaction) w czasie rzeczywistym. Test ten wykazuje się większą wrażliwością- waha się ona w granicach 95%. Zastosowanie diagnostyki obrazowej jest w porównaniu z testem laboratoryjnym obarczone dużym marginesem błędu, głównie ze względu na subiektywność odczytu obrazu, mniejszą dokładność i swoistość badania [3] [4]. Niemniej jednak okazuje się, że jeśli test rRT-PCR daje wynik fałszywie negatywny, co oznacza, że według testu do zakażenia nie doszło, a na podstawie objawów wnioskuje się, że pacjent może być zarażony wirusem SARS-CoV-2, możliwe jest zweryfikowanie wyniku testu przez wykorzystanie tomografii komputerowej. Ma ona 98% dokładności przy porównaniu z wspomnianą powyżej metodą diagnostyki laboratoryjnej [5] [6] [7]. Mimo trzyprocentowej różnicy w dokładności, obrazowanie medyczne jest niezbędne ze względu na wykrycie, jaki wpływ na organizm ma wirus SARS-Cov-2 [8]. Diagnostyka obrazowa pozwala zobaczyć nie tylko obszar szczególnie narażony na uszczerbek, jakim jest układ oddechowy. Umożliwia także całościowe badanie organizmu i umożliwia uzyskanie szczegółowej obserwacji pozostałych organów, takich jak na przykład serce, gdzie wirus także może wywierać wpływ na jego budowie. [9]

Metody diagnostyki obrazowej różnią się między sobą nie tylko sprzętem koniecznym przy danym badaniu do jego wykonania, obszarem, który podlega diagnozie, ale także samym obrazem, który dzięki nim jest pozyskiwany. Różnice wynikają ze sposobu badania i budowy anatomicznej badanego obszaru.

2. ULTRASONOGRAFIA

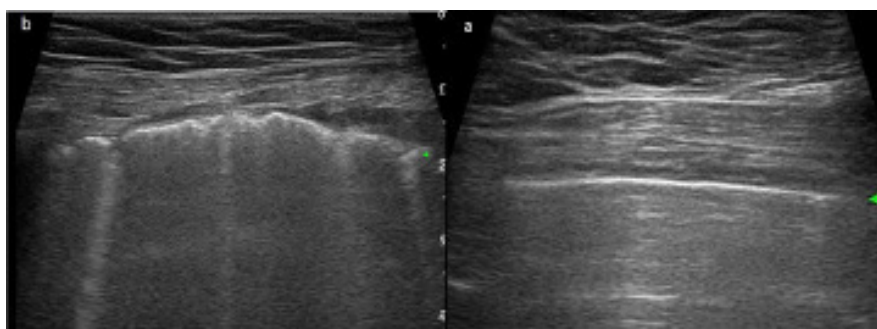
Jednym z badań stosowanych w przypadku diagnostyki obrazowej COVID-19 jest badanie ultrasonografem. Zgodnie z zaleceniami Polskiego Lekarskiego Towarzystwa Radiologicznego, wskazania do badania

ultrasonografem są uwidocznienie wysięku w jamach opłucnych i wstępne rozpoznanie zapalenia płuc. Badanie to pozwala na ocenę kształtu, przekroju i położenia narządu, a także stanu wnętrza i powierzchni organu. Ultrasonografia polega na wykorzystaniu zjawiska odbijania się, rozpraszania i rozchodzenia fali ultradźwiękowej na granicy struktur. Plusem tej metody jest możliwość przeprowadzenia badania przy łóżku pacjenta [10].

2.1. Ultrasonografia płuc

Ultrasonograficzne Badanie Płuc (ang. Lung Ultrasound, LUS) może stanowić narzędzie diagnozujące COVID-19 [11] [12] [13]. Musi być ono jednak prawidłowo przeprowadzone. Sugerowane jest użycie głowicy liniowej, z jednym punktem ogniskowym i ustawienie jej na linii opłucnej. Takie położenie sondy gwarantuje dobry wgląd w obszar opłucnej i podopłucnowej powierzchni [14]. Zalecane jest wykonywanie skanu w obszarach między żebrami. Dzięki temu kości zasłaniają możliwie najmniejszą część obrazu. Badanie należy wykonać w obu stronach klatki piersiowej, przez co możliwa będzie weryfikacja czy do zmian doszło w obu płucach.

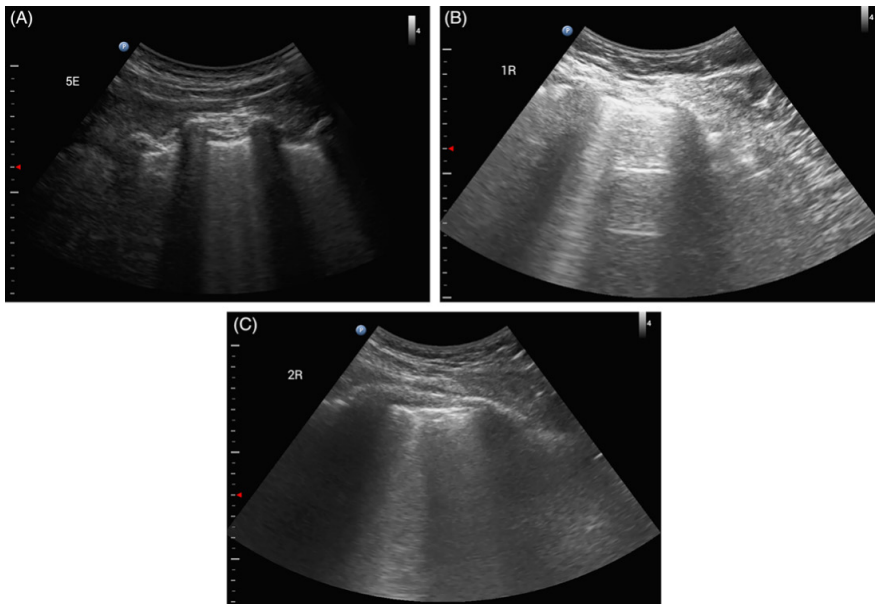
Jednym z charakterystycznych objawów COVID-19 widocznych w obrazach uzyskanych w badaniu ultrasonografem jest obustronna śródmiąższowa choroba płuc [15]. W USG jest ona widoczna jako liczne, zlewające się linie B, pogrubiona i/lub nieregularna linia opłucnej, wysięk opłucnowy i konsolidacje podopłucnowe [16] [17][18] [19] [20] [21].



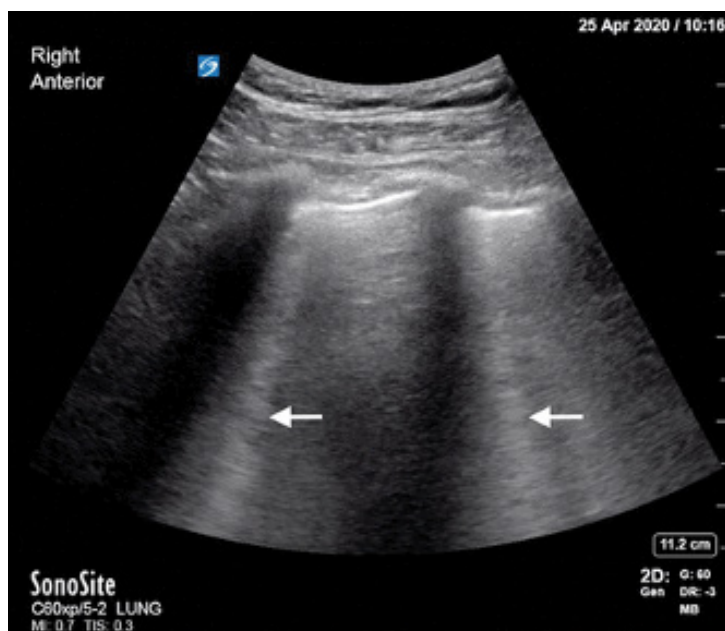
Ryc. 1 Porównanie obrazu USG płuca u zdrowego i chorego na COVID-19 pacjenta. A) zaznaczona zieloną strzałką opłucna w zdrowym płucu- widoczne poziome echo, liczne linie A b) śródmiąższowa choroba płuc z wyraźnie nieregularną linią opłucnej oraz dużym zagęszczeniem pionowych linii, wskazujących na linie B [17]

Podobny obraz uzyskuje się przy chorobach wywołanych wirusami H1N1 i A H7N9. Zakażenie tymi wirusami, podobnie jak zakażenie SARS-CoV-2 prowadzi do choroby śródmiąższowej płuc [22]. Występowanie tego symptomu nie ogranicza się jednak do chorób na tle wirusowym, bowiem podobne obrazy są także wynikiem chlamydii-wywołanej infekcją bakteryjną, i pneumocytozy, do której prowadzi grzyb *Pneumocystis*.

Charakterystyka obrazu COVID-19 w USG zmienia się wraz z rozwojem choroby. W początkowych stadiach widoczne są linie B, które w późniejszych etapach choroby zlewają się ze sobą i tworzą wiele ognisk [23]. Trzy lub więcej linii B między dwoma żebrami tworzą tak zwane „rakiety płucne”. w zależności od kontekstu klinicznego, ogniskowe linie B, ułożone obwodowo do obszaru konsolidacji mogą sugerować zapalenie płuc, podczas gdy rozlane linie B w trzech lub więcej strefach po obu stronach klatki piersiowej sugerują rozlany zespół śródmiąższowy pęcherzyków płucnych, taki jak obrzęk płuc lub ostry zespół niewydolności oddechowej. U pacjentów cierpiących na duszności, konsolidacje podopłucnowe występują znacznie częściej niż u tych, którzy oddychają bez problemów.



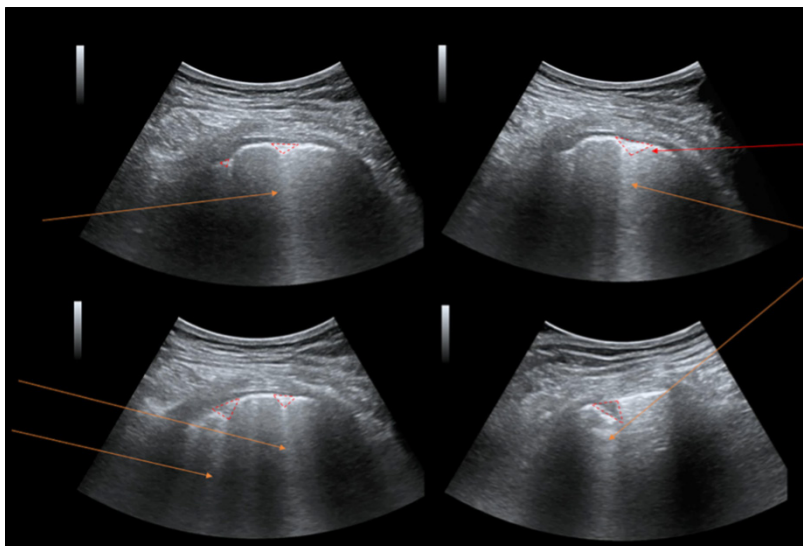
Ryc. 2 zdjęcia a) i b) wyraźnie wskazują linie B. c) podopłucnowa konsolidacja, na którą wskazują linie B [24]



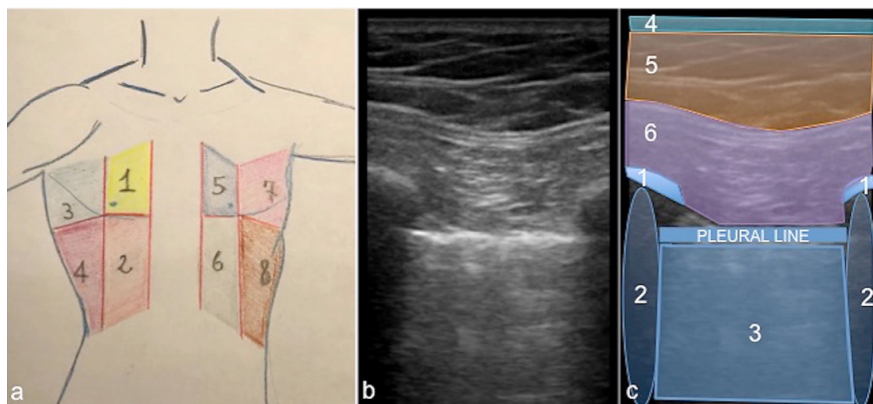
Ryc. 3 Białymi strzałkami oznaczono linie B [25]

Obserwuje się zależność dotyczącą swoistości badań USG a diagnostyką COVID-19. W późniejszym stadium choroby, otrzymywane obrazy są bardziej swoiste- co oznacza, że wskazują wyraźnie na COVID-19 jako przyczynę zmian występujących w obszarze płuc.

Zmiany te, wykrywane przez USG dotyczą jedynie powierzchni płuc, opłucnej i na ich obwodzie. Wynika to z faktu, że zgromadzone wewnątrz płuc powietrze blokuje przechodzenie fal ultradźwiękowych. Czyni to zatem niemożliwym zaobserwowanie głęboko umiejscowionych zmian w płucu. Ograniczenie to, może wpływać negatywnie na wiarygodność wyników badania. Aby zmiana była dostrzegalna w obrazie USG, musi się ona znajdować na powierzchni płuca. Jest to o tyle problematyczne, że w przypadku rozpoznawania nacieków, dzięki sile grawitacji mogą się one przemieścić do dolnych płatów płuc. Wówczas, badanie USG może okazać się niemożliwe ze względu na wyżej wspomniane ograniczenie.



Ryc. 4 Na górze oba obrazy prezentują płuca pacjenta, u którego został potwierdzony COVID-19. Typowe pionowe, pneumogenne duże artefakty pochodzą z linii opłucnej lub z małych, rozmytych konsolidacji podopłucnowych (czerwona strzałka). Ich pochodzenie nie jest punktowe. Na dole, Linia opłucnowa jest przerywana przez bardziej widoczne, ale niewielkie konsolidacje (linie pomarańczowe). Widoczne są duże pionowe artefakty powstające w wyniku konsolidacji, które nakładają się na obszary białego płuca (głowica wypukła, skany międzyżebrowe) [26]



Ryc. 5 a) schemat podziału klatki piersiowej na strefy podczas wykonywanego badania b) i c) obrazowanie USG z wykorzystaniem liniowej głowicy. (c,1)- żebra (c2)- przestrzeń między żebrami i artefaktami stożka cienia (c3)- obszar artefaktów podopłucnowych, (c4)- płaszczyna skórna, (c5) podskórna i (c6) mięśniowa PLEURAL LINE- oznacza tutaj hiperechogeniczne odbicie opłucnej [27]

Przez pojęcie artefaktu rozumie się strukturę, która nie odpowiada żadnej strukturze anatomicznej, pojawiającą się na obrazie [28]. Hiperechogeniczna zmiana odpowiada tkance, w tym przypadku jest to opłucna, która cechuje się podwyższoną zdolnością do odbijania fal ultradźwiękowych o wysokiej częstotliwości. Taka zmiana świadczy o tym, że tkanka jest zbita i twarda. W skład hiperechogenicznej linii, widocznej na rycinie nr 5 wchodzi: opłucna ścienna, przestrzeń opłucnowa i opłucna trzewna. Linia ta, w zdrowym płucu wykazuje widoczną w badaniu ruchliwość, która pokrywa się z aktywnością oddechową. W przypadku słabo napowietrzonego płuca, ruchy te występują w większości na skutek drgań przeniesionych na płuca z bijącego serca, jest to zjawisko tzw. Tętna płucnego. Występowanie tętna płucnego oznacza całkowitą niedodmę lub konsolidację podopłucnową [29].

Przy odpowiednich warunkach, USG umożliwia zbadanie około 70% powierzchni płuc, co nie jest wystarczającym obszarem, by móc ocenić kondycję całych płuc. W dużej mierze powierzchnia badania jest ograniczona ze względu na anatomiczną budowę klatki piersiowej oraz funkcję samego organu - zawierają one powietrze. Sama czułość USG na zmiany w obszarze opłucnej jest wysoka, jednak swoistość względem COVID-19 może nie być zadowalająca.

Ultrasonografia jest także możliwością obserwacji pacjenta w okresie rekonwalescencji. Możliwe jest monitorowanie stanu płuc po rozpoczęciu terapii, a co za tym idzie ocena postępu w kierunku polepszenia stanu zdrowia. Ma to szczególne znaczenie przy rozstrzygnięciu jakie kroki powinny zostać podjęte podczas postępowania klinicznego.

2.2. Echokardiografia

Zasada działania tej metody jest identyczna jak przy klasycznym USG. Do obrazowania serca używa się częstotliwości od 1 do 10 MHz. W przypadku echokardiografii możliwe jest stosowanie kontrastu, zwiększający echogeniczność krwi. Echokardiografia jest zróżnicowaną metodą badania. Dzieli się na echokardiografię przezklatkową, przezprzełykową, obciążeniową oraz kontrastową. W przypadku diagnostyki COVID-19 pomijana jest metoda obciążeniowa ze względu na zwiększenie częstotliwości oddechów, skutkujące kaszlem [30].

2.3. Echokardiografia a COVID-19

Badania przeprowadzone przez Zhi-Yao, Wei Yong-Jian, Geng Ji Huang i Hai-Yan Qian udowadniają, że w wyniku zakażenia COVID-19 w morfologii i na powierzchni serca następują patologiczne zmiany [31]. Wielokrotnie powtarzającymi się uszkodzeniami pośród pacjentów są, wskazane przez echokardiografię, nieprawidłowe ruchy ścian, zmniejszenie frakcji wyrzutowej z lewej komory oraz niewielkie ilości wysięku osierdziowego [32]. Stwierdza się także występowanie obrzęku mięśnia sercowego, hipokinezy komorowej oraz zgrubienie ścian [33] [34]. Może wystąpić także ciężka niedomykalność zastawki trójdzielnej. Równocześnie należy zaznaczyć, że w grupie badanej znajdowali się pacjenci, którzy jeszcze przed zakażeniem, cierpieli na choroby układu krążenia. U pacjentów, którzy nie mieli żadnych chorób serca lub naczyń, wspomniane powyżej objawy pojawiają się bardzo rzadko. Wśród pacjentów bez schorzeń kardiologicznych, dochodzi częściej do zmniejszonej wydajności pracy serca, niż do np. zmniejszonej frakcji wyrzutowej z komory lewej oraz powiększenie prawego przedsionka [35]. Najnowsze dane wskazują na to, że uszkodzenie mięśnia sercowego wynika z komplikacji związanych z COVID-19 [36]. Obecność wirusa SARS-CoV-2 w organizmie wywołuje zapalenie śródbrzońka w narządach, czego skutkiem mogą być kolejne infekcje wirusowe, będące bezpośrednią przyczyną zmian w morfologii danego organu. Nieprawidłowości w obrębie mięśnia sercowego, których przyczyną może być koronawirus, to obrzęk serca i jego zwłóknienie, a także niedokrwienność. W wyniku zaburzeń funkcji układu oddechowego może także dojść do niedotlenienia, prowadzącego później do obumarcia mięśnia sercowego [37]. Patologiczne zmiany mogą być także wynikiem zażywania leków [38].

Zaletą echokardiografii, podobnie jak przy standardowym USG, jest możliwość używania aparatury do badania bezpośrednio przy łóżku chorego [39]. Nie jest konieczne przemieszczanie pacjenta, co dla osób, które korzystają z wentylacji mechanicznej, jest niezbędne. Metoda ta jest szczególnie ceniona w szpitalach i innych punktach opieki, ze względu na krótki czas trwania badania, odpowiednią dokładność i możliwość wykrycia zmian na całym obszarze serca [40] [41]. Ten rodzaj szybkiego badania przy łóżku chorego nazywany jest POCUS, co w tłumaczeniu z języka angielskiego, z którego pochodzi skrót, oznacza USG w punkcie opieki (ang. Point Of Care Ultrasound) [42]. Z kolei w przypadku COVID-19, dopiero późniejszym badaniem jest echokardiografia przezklatkowa. Oznacza to, że POCUS może kierunkować dalsze postępowanie kliniczne, względem pacjentów ze schorzeniami kardiologicznymi

[43] [44]. Dodatkowo wykorzystywana jest także echokardiografia przezklatkowa i przezprzełykowa [45] [46]. Przy przezprzełykowej metodzie, należy szczególnie uważać przy badaniu osoby chorej na COVID-19. Ponieważ jest to choroba przenoszona drogą kropelkową, należy zachować odpowiednie procedury, by nie narażać osoby badającej na zakażenie przez kontakt ze śliną chorego w momencie wysuwania rurki laparoskopowej z jego przełyku [47]. W tym celu, rurkę tę umieszcza się w specjalnym rękawie, pozwalającym na zachowanie niezbędnego bezpieczeństwa [48].



Ryc. 6- na zdjęciu widoczna jest laparoskopowa kamera do echokardiografii przezprzełykowej z założonym rękawem. Rękaw jest założony aż do ustnika.[6]

Przy echokardiografii wykonanej u pacjentów chorych na COVID-19 wykazuje się najczęściej powiększenie komory prawej i jej dysfunkcje. Patologie te są częściej obserwowane w przypadku prawej komory, niż ma to miejsce przy lewej. Jest to zauważalne szczególnie w późniejszych i groźniejszych dla zdrowia fazach choroby.

Należy jednak pamiętać, że samo wykrycie na echokardiografii zmian w obrębie serca, nie może jednoznacznie potwierdzić lub wykluczyć zakażenia SARS-CoV-2.

3. TOMOGRAFIA KOMPUTEROWA

Wykorzystywane są tutaj promienie X, czyli fale elektromagnetyczne. Zaletą tomografii są jej rezultaty- obrazy są o wiele bardziej precyzyjne i wyraźne, umożliwiając pozyskanie dokładnego obrazu wybranej struktury [49]. Sam obraz jest tworzony przez liczne przekroje, co jest przewagą TK nad USG- można sprawdzić cały organ, np. płuco, nie ograniczając się jedynie do jego powierzchni.

3.1. Tomografia komputerowa a COVID-19

Tomografię komputerową, w przypadku diagnostyki COVID-19, wykorzystuje się jedynie w przypadkach, gdy jej wynik może zmienić sposób postępowania i leczenia chorych. Rutynowo wykonuje się je bez podania kontrastu pacjentowi, za pomocą techniki wysokiej rozdzielczości. Środek kontrastujący wykorzystuje się tylko, gdy występuje podejrzenie chorób współistniejących np. Zatorowości płuca. “Jednak w niedawnym oświadczeniu Fleischner Society zidentyfikowało trzy główne scenariusze, w których obrazowanie może być stosowane jako podstawowe narzędzie diagnostyczne: (1) pacjenci z łagodnymi cechami oddechowymi zgodnymi z COVID-19, ale z czynnikami ryzyka progresji choroby, (2) pacjenci z umiarkowanymi lub ciężkimi cechami COVID-19, niezależnie od wyników testu RT-PCR oraz (3) pacjenci z objawami od umiarkowanych do ciężkich w środowisku o dużej częstości występowania choroby i przy ograniczonych zasobach badawczych”-Journal of Cardiovascular Computed Tomography Volume 15, Issue 1, January–February 2021, Pages 27-36.

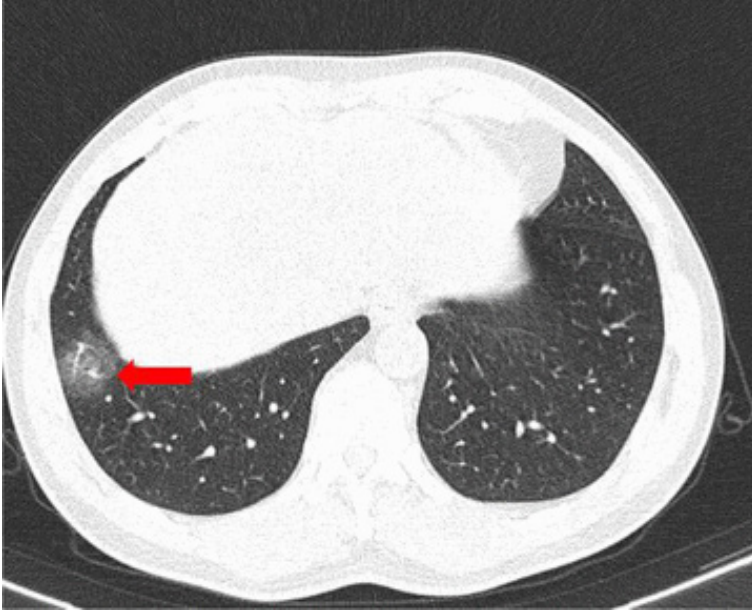
Charakterystycznymi zmianami w płucach u osób chorych na COVID-19 są zmiany typu matowego szkła (ang. Ground-Glass Opacity, GGO) [50] [51] [52]. Jest to patologia szczególnie widoczna w badaniach TK [53] [54]. Występuje zarówno u dorosłych, jak i u dzieci chorych na koronawirusa [55]. W przypadku koronawirusa odznacza się ono zaokrągloną morfologią, z charakterystycznym obustronnym rozmieszczeniem obwodowym, które może być związane z zagęszczeniem tkanki płucnej wskutek nacieku i zgrubieniem przegrody zrazikowej ze zmiennym wypełnieniem pęcherzyków płucnych [56] [57] [58] [59]. Poszerzenie naczyń i rozstrzenie oskrzeli są również typowymi objawami stwierdzanymi u pacjentów z COVID-19 [60]. Badania potwierdzają, że przy zakażeniu SARS-CoV-2, znacznie częściej niż w przypadku innych chorób występują prążki podopłucnowe, zgrubienie naczyń

krwionośnych oraz zmiany w dolnych płatach płuc [61] [62]. Przy użyciu tomografii wysokiej rozdzielczości, można także wykryć torbiele płucne [63]. Tomografia komputerowa klatki piersiowej może w większości przypadków pokazać różnicę między zmętnieniem typu matowego szkła u pacjentów z COVID-19, a osobami niedotknietymi zakażeniem dzięki swojej dokładności pozyskiwanego obrazu [64].

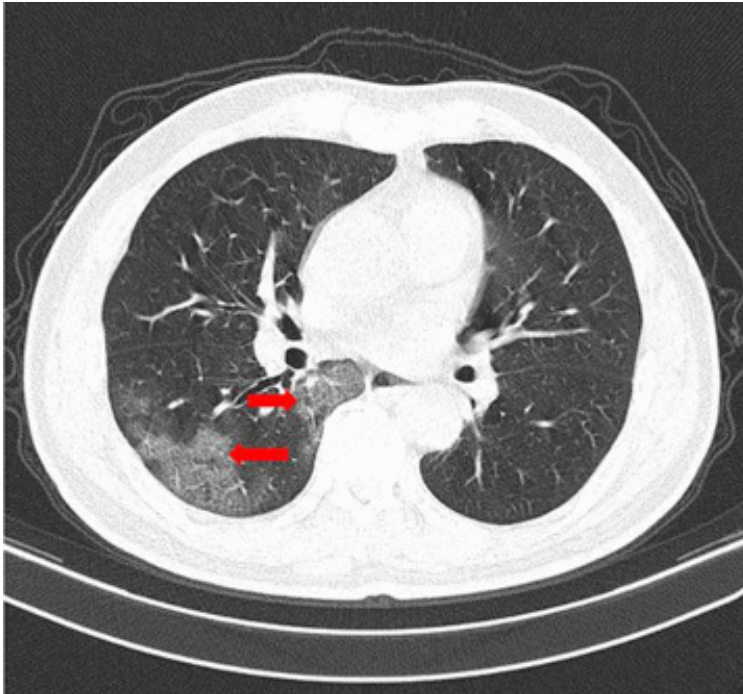
Tomografia komputerowa może zostać wykorzystana do diagnostyki zmian wywołanych COVID-19 [65] [66]. Odgrywa ona istotną rolę przy prognozowaniu dalszego rozwoju choroby i dobieraniu właściwych metod leczenia [67]. Jednym z charakterystycznych patologii powodowanych przez koronawirus jest zmętnienie typu matowego szkła [68]. Zmętnienie to pojawia się także w przypadku innych chorób, co powoduje niską specyficzność obrazu pozyskanego metodą tomografii komputerowej pod kątem zmian będących rezultatem zakażenia COVID-19. Obrazy, na których widać wyżej wspomniane zmętnienie, mogą dotyczyć różnych chorób, co ma wpływ na wiarygodność wyników diagnostyki obrazowej z tomografu komputerowego. Ponownie należy zaznaczyć, że póki co, diagnostyka oparta na testach laboratoryjnych daje większe prawdopodobieństwo trafnej diagnozy aniżeli wykorzystanie metod obrazowania. Nie zmienia to jednak faktu, że może się ono okazać bardzo pomocne.

Wczesnym objawem obserwowanym w przypadku COVID-19 w tomografii komputerowej jest naciek zapalny w obszarach podopłucnowych, czego skutkiem w późniejszym stadium jest GGO. Kolejne stadium choroby, czyli moment jej najbardziej dynamicznego rozwoju obejmuje konsolidacje wokół zmian typu matowego szkła oraz wysięk opłucnowy w niewielkich ilościach [69] [70] [71] [72]. W szczytowym etapie choroby dochodzi do rozlanego uszkodzenia pęcherzyków płucnych [73].

COVID-19 ma także inny specyficzny obraz w TK- są to zmiany typu szalonego wzoru kostki (ang. Crazy Paving Patterns) [74]. Towarzyszy im także zgrubienie przegrody międzyzrazikowej. Jest to zmiana powstająca z GGO z nałożeniem zgrubienia przegrody międzyzrazikowej oraz wewnątrzrazikowym zgrubieniem przegrody [75] [76]. Jest to widoczne jako linowa zmiana na matowo szarym tle. Obraz, na którym widoczne są zmiany typu szalonego wzoru kostki, pozyskiwany jest głównie w tomografii wysokiej rozdzielczości i jest charakterystyczny dla ostrych chorób przewlekłych. Takie zobrazowanie może świadczyć o proteinozie pęcherzykowej.

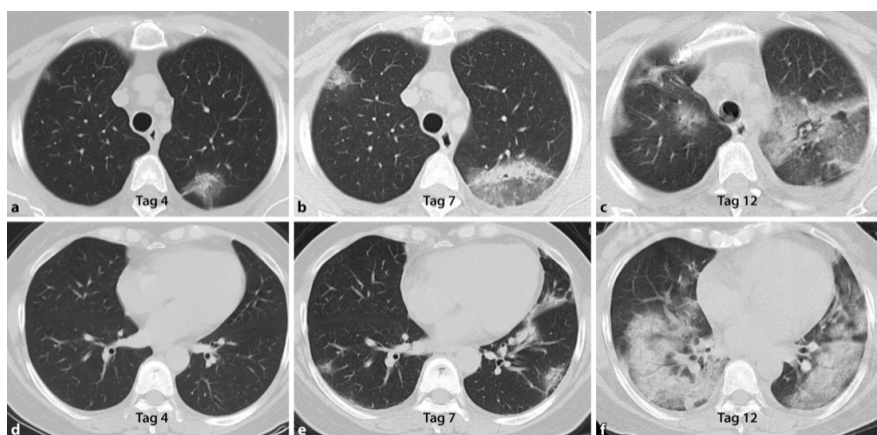


Ryc. 7 Czerwona strzałka wskazuje GGO w dolnym płacie prawego płuca [78]



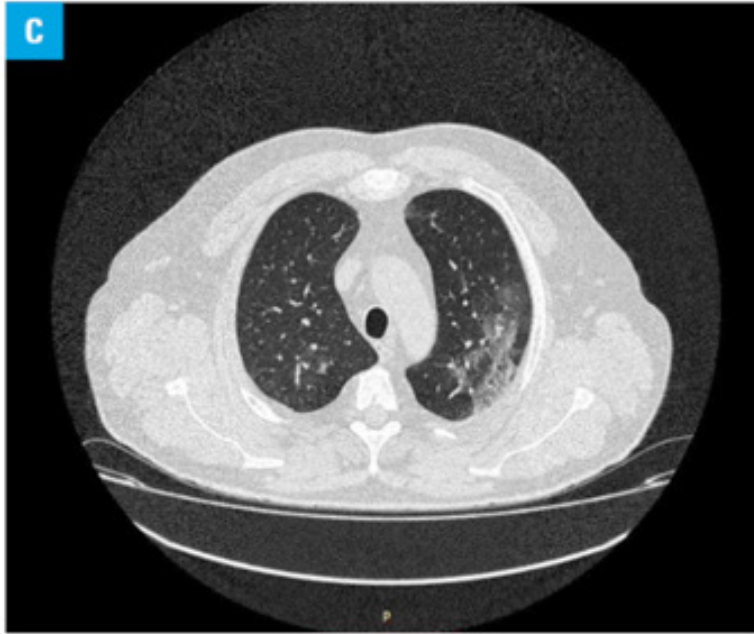
Ryc. 8. Czerwoną strzałką zaznaczono zmiany typu crazy paving patterns oraz zgrubienie przegrody międzypazikowej [79]

Występowanie obu zmian płucnych, zarówno zmętnienie jak i zmiany typu szalonego wzoru kostki są charakterystyczne dla COVID-19 [77]. Zmiany dotyczą głównie dolnego obszaru płuc i mogą, w zależności od stopnia zaawansowania choroby, występować na jednym lub dwóch płucach jednocześnie [78]. Dodatkowo odnotowuje się często liniowe oraz siatkowate zmętnienia. Oprócz tych zmian. Występuje widoczne na TK śródmiąższowe zapalenie płuc, świadczące często o zakażeniu SARS-CoV-2. Często obserwowane są także zmiany torbielowate [79].

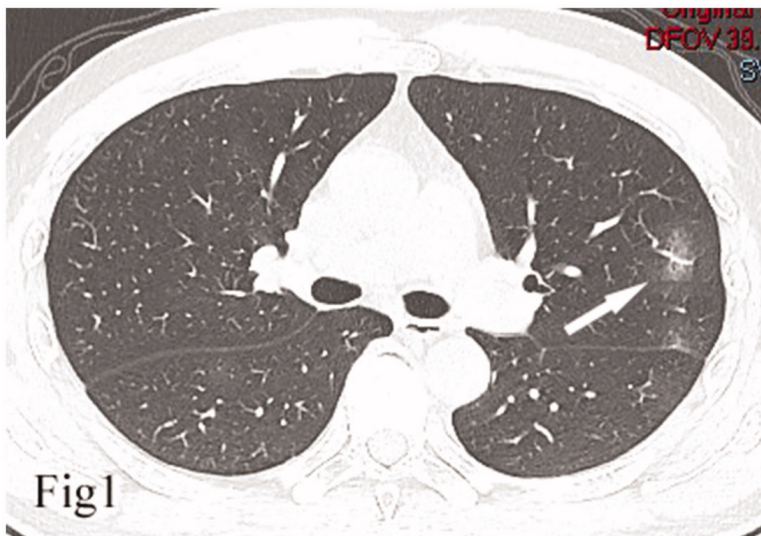


Ryc. 9 Zmiany w płucach nasilają się wraz z rozwojem choroby- w dniu 4 nie są one tak wyraźne jak w dniu siódmym, gdzie zaznaczają się postępujące aż do dnia 12 zmętnienia o kolistej morfologii. Następuje tu też znaczny wzrost wysięku w opłucnej [80]

Wskazaniem do przeprowadzenia obrazowania za pomocą tomografu komputerowego w przestrzeni klatki piersiowej ze szczególną uwagą na płuca jest występowanie objawów typowych dla COVID-19 gdy test RT-PCR daje wynik fałszywie negatywny. Jeśli występują wymienione wcześniej w podrozdziale zmiany, są one widoczne w obu płucach, głównie w dolnych płatach i na tylnej części ciała, można z w oparciu o obraz TK zdiagnozować zarażenie SARS-CoV-2.

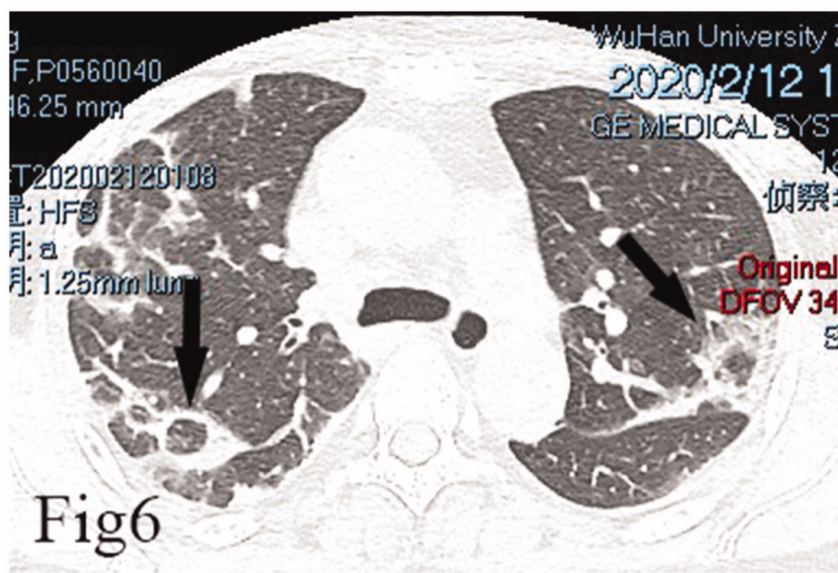


Ryc. 10 Liniowe i siatkowate zmętnienia występujące u pacjenta rozproszone po całej objętości płuc. Dodatkowo widoczne są GGO i zmiany typu szalonego układu kostki, szczególnie w obrębie prawego płuca. [94]



Ryc. 11 obraz przedstawia zaznaczone strzałką centralne zmętnienie liniowe, zwane także znakiem mniszka lekarskiego [85]

Zmętnienie liniowe tworzące kształt mniszka lekarskiego jest charakterystyczne we wcześniejszych etapach choroby [80]. Dodatkowo, mogą występować zmętnienia otoczone konsolidacją w kształcie pierścienia [81]. Wykazują one obraz tak zwanego odwróconego znaku halo (ang. Reversed Halo Sign)



Ryc. 12 Czarną strzałką zaznaczono znak odwróconego halo widoczny na obrazie TK pacjenta chorego na COVID-19 [85]

3.2. Tomografia komputerowa układu żołądkowo-jelitowego

Poza obszarem płuc, zmiany mogą dotyczyć także innych narządów lub całych ich układów w organizmie. Wirus wywołuje zmiany w układzie żołądkowo-jelitowym. Niektóre objawy, takie jak biegunka, wzdęcia oraz hematochezia występujące u osób zakażonych, dotyczą właśnie układu żołądkowo-jelitowego. Badania z użyciem wielorzędowej tomografii komputerowej wykazały niedokrwiennie zmiany jelit, zmiany zapalne w jelicie cienkim, esicy i odbytnicy, takie jak obrzęk podśluzówkowy. Ponadto wykazywano obecność płynu w jelitach.[82]

Obrazowanie metodą tomografii komputerowej służy do weryfikowania chorób i patologicznych stanów wywołanych COVID-19. Badania przeprowadzone przez: Einat Blumfield, Terry L. Levin, Jessicę Kurian, Edwarda Y. Lee i Marka C. Liszewskiego, skupiają się na wykryciu z metodą obrazowania

zmian wywołanych wieloukładowym zespołem zapalnym- MISC (ang. Multi-system Inflammatory Syndrome in Children) [83]. Zespół ten jest wywołany obecnością wirusa Sars-COV-2, szczególnie wśród dzieci [84]. Mimo tego, przebieg choroby powodowanej tym wirusem jest łagodniejszy u dzieci niż u dorosłych i ludzi w podeszłym wieku [85]. Do badań zgłoszono pacjentów z objawami zakażenia i pozytywnym wynikiem testu rRT-PCR pod kątem obecności wirusa SARS-CoV-2. Symptomami były: gorączka, biegunka, wymioty, bóle brzucha, zapalenie spojówek, wysypka, bóle głowy i gardła. "Dodatkowo, każdy z pacjentów cierpiał na duszności i kaszel."- AJR Am J Roentgenol 2021 Feb;216(2):507-517 doi:10.2214/AJR.20.24032. Epub 2020 Jul 29. Angiografia wykazała zatorowość płucną [86]. Tomografia komputerowa ukazała wodobrzusze małej objętości, powiększenie wątroby, nerki echogeniczne, zgrubienie ściany jelita, pogrubienie ściany pęcherzyka żółciowego, powiększenie węzłów chłonnych krezki, powiększenie śledziony i pogrubienie ściany pęcherza. Badanie klatki piersiowej wskazywało także na kardiomegalię, zastoinową niewydolność serca lub kardiogeny obrzęk płuc, niedodmę, wysięk opłucnowy, zespół ostrej niewydolności oddechowej i zapalenie płuc [87]. Rozpoznanie MIS-C jest kluczowe by zapobiec gwałtownemu pogorszeniu się zdrowia pacjentów i rozpoczęcie odpowiednio dostosowanego leczenia.

3.3 Tomografia komputerowa w badaniu powikłań układu sercowo-naczyniowego

COVID-19 wpływa negatywnie nie tylko na narządy układów oddechowego i pokarmowego, ale także na układ sercowo-naczyniowy. Choroba powoduje ciężkie powikłania sercowo-naczyniowe [88]. Tomografia komputerowa wykazuje często obecność tkanki tłuszczowej w nasierdziu, co może wskazać na uszkodzenia mięśnia sercowego i stan zapalny w jego obrębie.

Jedną z metod wykorzystania tomografii komputerowej w badaniu serca jest koronarografia komputerowa [89]. Badanie to jest skupione wokół naczyń wieńcowych serca i pozwala na uzyskanie wielopłaszczyznowej rekonstrukcji tętnic wieńcowych [90]. Jest to metoda odznaczająca się najwyższą wartością diagnostyczną spośród badań nieinwazyjnych przy badaniu naczyń wieńcowych. Możliwa jest wówczas obserwacja nieprawidłowości w budowie tętnic wieńcowych oraz mostków wieńcowych i przetok.

W przypadku COVID-19 koronarografia komputerowa daje możliwość diagnozy ostrego zespołu wieńcowego, który objawia się u pacjentów wykazujących już wcześniej choroby naczyń wieńcowych- wcześniej tj, przed

zakażeniem, jak i jako powikłanie po COVID-19, będące zagrożeniem zdrowia i życia pacjenta.

4. RENTGENOGRAFIA

W badaniu tego rodzaju wykorzystuje się fale elektromagnetyczne w postaci fotonów. Ograniczeniem tej metody jest fakt, że tkanki miękkie nie są tak dobrze widoczne jak na USG czy w TK.

4.1. Rentgenografia klatki piersiowej

Obrazowanie metodą RTG wykazuje się mniejszą czułością i swoistością niż badanie tomografem komputerowym, ale jest ono wykorzystywane przy diagnostyce obrazowej COVID-19 [91] [92]. Wykazuje podobne zmiany w obszarze płuc jak TK, są to: zmętnienie typu matowego szkła (Ground Glass Opacities- GGO) oraz zagęszczenie tkanki płucnej wskutek nacieku. W przypadku GGO wyróżnia się kilka rodzajów jego opisu, może być ono nieregularne, niejednolite, zamglone, siatkowate i rozległe.

W przypadku GGO bardzo trudnym jest dokładne dostrzeżenie go na obrazie RTG. Znacznie łatwiej je zlokalizować w oparciu o obraz z TK, nie dotyczy się to jednak wszystkich typów GGO. Przykładowo, zmętnienie siatkowate jest widoczne lepiej na obrazie RTG klatki piersiowej [93].

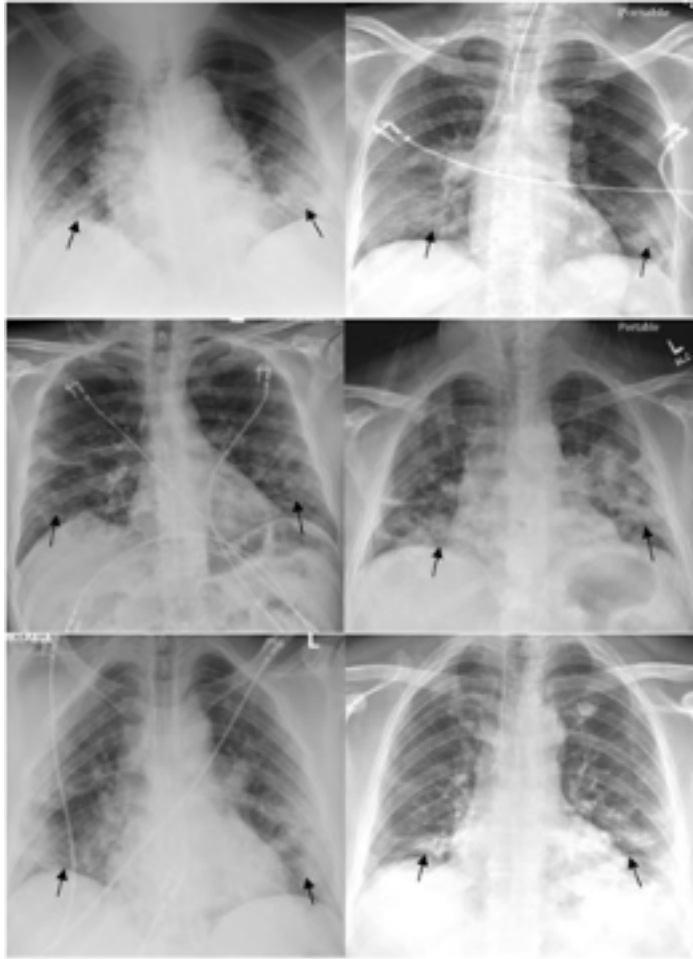
Charakterystyczną dla COVID-19 i innych chorób wirusowych zmianą jest przeważnie obustronne zmętnienie płuc, występujące w więcej niż jednym płacie. Jest to jeden z czynników, pozwalających na weryfikację czy doszło do zakażenia wirusem SARS-CoV-2 dzięki diagnostyce obrazowej.

Zapalenie płuc będące jednym ze skutków zakażenia koronawirusem, daje obraz peryferyjnego zmętnienia płuc- oznacza to, że zmiany są widoczne na obwodzie płuc. Peryferyjne zmętnienia mogą mieć różne formy, zarówno wieloogniskowe, jak i niejednolite bądź też zlewne.

Ponieważ swoistość RTG względem zmian wywołanych SARS-CoV-2 w organizmie jest dość niska, diagnostyka opiera się tutaj głównie na badaniu patologii następujących po chorobie lub może być dodatkową formą potwierdzenia zakażenia, oprócz podstawowego testu rRT-PCR.

Rentgenografia pozwala odróżnić choroby będące następstwem zakażenia wirusowego od tych, wynikających z infekcji bakteryjnej. Wyżej wspomnianą cechą, która jest charakterystyczna dla zmian wywołanych wirusem, są zmiany w więcej niż jednym płacie płuc oraz na obszarze obu płuc. Obraz jest wówczas

podobny do innych wirusowych chorób lub powikłań, np. Zespołu ostrej niewydolności płuc.



Ryc. 13 Obrazy RTG pozyskane od 6 pacjentów chorych na COVID-19, u których wystąpiło zapalenie płuc powodowane COVID-19. Strzałkami zaznaczono dolne obszary płuc zajęte przez zapalenie w obu płucach. [86]

Pozyskane w RTG obrazy mają mniejszą rozdzielczość niż w przypadku TK, jednak istotną zaletą rentgenografii jest fakt, że aparatura jest znacznie tańsza, niż w przypadku tomografu. Oznacza to, że RTG jest lepiej dostępne. Ponadto, co jest szczególnie ważne w czasach pandemii, sprzęt niezbędny do badania jest łatwiejszy w dezynfekcji, co pozwala na szybszy proces badania i diagnozę większej ilości osób w krótszym czasie. Jednak w przeciwieństwie

do TK i USG, tutaj powtarzalność badania jest ograniczona ze względu na możliwe negatywne skutki wynikające z częstej ekspozycji na promieniowanie oraz grono pacjentów, które można poddać badaniu jest znacznie mniejsze.

5. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Pierwszą metodą diagnostyki obrazowej omówioną w powyższym rozdziale, był ultrasonograf. Jest to metoda ogólnodostępna, znajdująca szerokie zastosowanie w diagnostyce ze względu na niską cenę aparatu oraz nieskomplikowaną obsługę. Dodatkową zaletą jest fakt, że nie naraża ona pacjenta na promieniowanie i badaniu może zostać poddany praktycznie każdy.

Kolejną metodą była tomografia komputerowa. Cechuje się najwyższą ze wszystkich wymienionych metod najwyższą jakością i rozdzielczością obrazu, dzięki czemu diagnoza oparta o wyniki TK jest przeważnie najbardziej wiarygodna [94] [95] [96] [97].

Ostatnią metodą była rentgenografia. Wykazuje się dużą zbieżnością z wynikami TK, jest jednak mniej przystępna dla pacjentów ze względu na promieniowanie, które przez częstą ekspozycję może okazać się szkodliwe. Także rozdzielczość obrazu jest niższa i węższe jest grono pacjentów, których można diagnozować tą metodą, ponownie, ze względu na promieniowanie [98].

Diagnostyka obrazowa nie może jednoznacznie i samodzielnie potwierdzić lub wykluczyć obecność wirusa SARS-CoV-2 w organizmie. Jest to niemożliwe ze względu na niską swoistość obrazu- COVID-19 daje objawy podobne do innych chorób wywołanych wirusami. Porównując jednak wynik testu rRT-PCR i obrazy uzyskane powyższymi metodami, można upewnić się co do przyczyny zmian w organizmie oraz podjąć odpowiednie postępowanie kliniczne.

REFERENCJE

1. Soldati, Gino, et al. "Is There a Role for Lung Ultrasound During the COVID-19 Pandemic?" *Journal of Ultrasound in Medicine*, vol. 39, no. 7, 2020, pp. 1459–62. Crossref, doi:10.1002/jum.15284.
2. Kapoor, Indu, et al. "Diagnostic Imaging of Patients With Coronavirus Disease (COVID-19): Benefit Versus Risk." *American Journal of Roentgenology*, vol. 215, no. 5, 2020, p. W61. Crossref, doi:10.2214/ajr.20.24091.

3. Wang, Youxin, et al. "Combination of CT and RT-PCR in the Screening or Diagnosis of COVID-19." *Journal of Global Health*, vol. 10, no. 1, 2020. Crossref, doi:10.7189/jogh.10.010347.
4. Salameh, Jean-Paul, et al. "Thoracic Imaging Tests for the Diagnosis of COVID-19." *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2020. Crossref, doi:10.1002/14651858.cd013639.pub2.
5. Karabay, Gunduz, Yaylacı, Guclu, Cengiz, Oguz, Yasemi, Selcuk, Ertugrul. "Correlation of Lung Ultrasound and Computed Tomography Findings in COVID-19 Pneumonia." *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan* 2020, Vol. 30 (Supplement 1 COVID-19):S147-S152, 2020
6. Waller, Joseph V., et al. "Diagnostic Tools for Coronavirus Disease (COVID-19): Comparing CT and RT-PCR Viral Nucleic Acid Testing." *American Journal of Roentgenology*, vol. 215, no. 4, 2020, pp. 834–38. Crossref, doi:10.2214/ajr.20.23418.
7. Khatami, Fatemeh, et al. "A Meta-Analysis of Accuracy and Sensitivity of Chest CT and RT-PCR in COVID-19 Diagnosis." *Scientific Reports*, vol. 10, no. 1, 2020. Crossref, doi:10.1038/s41598-020-80061-2.
8. Carpenter, Christopher R., et al. "Diagnosing COVID-19 in the Emergency Department: A Scoping Review of Clinical Examinations, Laboratory Tests, Imaging Accuracy, and Biases." *Academic Emergency Medicine*, edited by Shahriar Zehtabchi, vol. 27, no. 8, 2020, pp. 653–70. Crossref, doi:10.1111/acem.14048.
9. Schmid, Bonaventura, et al. "Lung Ultrasound in the Emergency Department - a Valuable Tool in the Management of Patients Presenting with Respiratory Symptoms during the SARS-CoV-
10. Mongodi, Silvia, et al. "Lung Ultrasound in Patients with Acute Respiratory Failure Reduces Conventional Imaging and Health Care Provider Exposure to COVID-19." *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 46, no. 8, 2020, pp. 2090–93. Crossref, doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2020.04.033.
11. Alencar, Julio Cesar Garcia de, et al. "Lung Ultrasound Score Predicts Outcomes in COVID-19 Patients Admitted to the Emergency Department." *Annals of Intensive Care*, vol. 11, no. 1, 2021. Crossref, doi:10.1186/s13613-020-00799-w.

12. Zhifeng, Jiang, et al. "Consistency Analysis of COVID-19 Nucleic Acid Tests and the Changes of Lung CT." *Journal of Clinical Virology*, vol. 127, 2020, p. 104359. Crossref, doi:10.1016/j.jcv.2020.104359.
13. Bosso, Giorgio et al. "Lung ultrasound as diagnostic tool for SARS-CoV-2 infection." *Internal and emergency medicine* vol. 16,2 (2021): 471-476. doi:10.1007/s11739-020-02512-y
14. Zanforlin, Alessandro et al. "Lung Ultrasound in the Emergency Department for Early Identification of COVID-19 Pneumonia." *Respiration; international review of thoracic diseases* vol. 100,2 (2021): 145-153. doi:10.1159/000512782
15. Jackson, Karl, et al. "Lung Ultrasound in the COVID-19 Pandemic." *Postgraduate Medical Journal*, vol. 97, no. 1143, 2020, pp. 34–39. Crossref, doi:10.1136/postgradmedj-2020-138137..
16. Mafort, Thiago Thomaz, et al. "Changes in Lung Ultrasound of Symptomatic Healthcare Professionals with COVID -19 Pneumonia and Their Association with Clinical Findings." *Journal of Clinical Ultrasound*, vol. 48, no. 9, 2020, pp. 515–21. Crossref, doi:10.1002/jcu.22905.
17. Allinovi, Marco, et al. "Lung Ultrasound May Support Diagnosis and Monitoring of COVID-19 Pneumonia." *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 46, no. 11, 2020, pp. 2908–17. Crossref, doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2020.07.018.
18. Vetrugno, Luigi, et al. "Our Italian Experience Using Lung Ultrasound for Identification, Grading and Serial Follow-up of Severity of Lung Involvement for Management of Patients with COVID-19." *Echocardiography*, vol. 37, no. 4, 2020, pp. 625–27. Crossref, doi:10.1111/echo.14664.
19. Trovato, Guglielmo M, and Marco Sperandeo. "Usefulness of lung ultrasound imaging in COVID-19 pneumonia: The persisting need of safety and evidences." *Echocardiography (Mount Kisco, N.Y.)* vol. 37,7 (2020): 1138-1139. doi:10.1111/echo.14769
20. Zhang, Yao et al. "Lung Ultrasound Findings in Patients With Coronavirus Disease (COVID-19)." *AJR. American journal of roentgenology* vol. 216,1 (2021): 80-84. doi:10.2214/AJR.20.23513

21. Seibel, A et al. "Lungensonographie bei COVID-19" [Lung ultrasound in COVID-19]. *Der Anaesthesist* vol. 70,2 (2021): 146-154. doi:10.1007/s00101-020-00883-7
22. Adams, Scott J, and Carole Dennie. "Chest imaging in patients with suspected COVID-19." *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* vol. 192,25 (2020): E676. doi:10.1503/cmaj.200626
23. Ji, L et al. "Response to: Lung ultrasound early detection and monitoring in COVID-19 pneumonia: fact and fiction." *QJM : monthly journal of the Association of Physicians* vol. 113,8 (2020): 603. doi:10.1093/qjmed/hcaa166
24. Schmid, Bonaventura, et al. "Lung Ultrasound in the Emergency Department - a Valuable Tool in the Management of Patients Presenting with Respiratory Symptoms during the SARS-CoV-2 Pandemic." *BMC Emergency Medicine*, vol. 20, no. 1, 2020. Crossref, doi:10.1186/s12873-020-00389-w. ZDJ
25. Vetrugno, Luigi, et al. "Our Italian Experience Using Lung Ultrasound for Identification, Grading and Serial Follow-up of Severity of Lung Involvement for Management of Patients with COVID-19." *Echocardiography*, vol. 37, no. 4, 2020, pp. 625–27. Crossref, doi:10.1111/echo.14664. ZDJ
26. Mafort, Thiago Thomaz, et al. "Changes in Lung Ultrasound of Symptomatic Healthcare Professionals with COVID -19 Pneumonia and Their Association with Clinical Findings." *Journal of Clinical Ultrasound*, vol. 48, no. 9, 2020, pp. 515–21. Crossref, doi:10.1002/jcu.22905. ZDJ
27. Ostad, S. P., et al. "CT Manifestation of COVID-19 Pneumonia; Role of Multiplanar Imaging." *Academic Radiology*, vol. 27, no. 5, 2020, pp. 753–54. Crossref, doi:10.1016/j.acra.2020.03.028.
28. Di Serafino, Marco, et al. "The Lung Ultrasound: Facts or Artifacts? In the Era of COVID-19 Outbreak." *La Radiologia Medica*, vol. 125, no. 8, 2020, pp. 738–53. Crossref, doi:10.1007/s11547-020-01236-5.
29. Capotosto, Lidia, et al. "Heart, COVID-19, and Echocardiography." *Echocardiography*, vol. 37, no. 9, 2020, pp. 1454–64. Crossref, doi:10.1111/echo.14834.

30. Wei, Zhi-Yao, et al. "Pathogenesis and Management of Myocardial Injury in Coronavirus Disease 2019." *European Journal of Heart Failure*, vol. 22, no. 11, 2020, pp. 1994–2006. Crossref, doi:10.1002/ehf.1967.
31. Lairez, Olivier, et al. "Cardiac Imaging Phenotype in Patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): Results of the Cocarde Study." *The International Journal of Cardiovascular Imaging*, vol. 37, no. 2, 2020, pp. 449–57. Crossref, doi:10.1007/s10554-020-02010-4.
32. Mishra, Ajay Kumar, et al. "Quantifying and Reporting Cardiac Findings in Imaging of COVID-19 Patients." *Monaldi Archives for Chest Disease*, vol. 90, no. 4, 2020. Crossref, doi:10.4081/monaldi.2020.1394.
33. Cameli, Matteo, et al. "Usefulness of Echocardiography to Detect Cardiac Involvement in COVID-19 Patients." *Echocardiography*, vol. 37, no. 8, 2020, pp. 1278–86. Crossref, doi:10.1111/echo.14779.
34. Argulian Edgar, et al. "Right Ventricular Dilation in Hospitalized Patients With COVID-19 Infection." *JACC: Cardiovascular Imaging*, vol. 13, no. 11, 2020, pp. 2459–61. Crossref, doi:10.1016/j.jcmg.2020.05.010.
35. Agricola, Eustachio, et al. "Heart and Lung Multimodality Imaging in COVID-19." *JACC: Cardiovascular Imaging*, vol. 13, no. 8, 2020, pp. 1792–808. Crossref, doi:10.1016/j.jcmg.2020.05.017.
36. Tajbakhsh, Amir, et al. "COVID-19 and Cardiac Injury: Clinical Manifestations, Biomarkers, Mechanisms, Diagnosis, Treatment, and Follow Up." *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, vol. 19, no. 3, 2020, pp. 345–57. Crossref, doi:10.1080/14787210.2020.1822737.
37. Cau, Riccardo, et al. "Cardiac Involvement in COVID-19—Assessment with Echocardiography and Cardiac Magnetic Resonance Imaging." *SN Comprehensive Clinical Medicine*, vol. 2, no. 7, 2020, pp. 845–51. Crossref, doi:10.1007/s42399-020-00344-7.
38. Soldati, Gino, et al. "Is There a Role for Lung Ultrasound During the COVID-19 Pandemic?" *Journal of Ultrasound in Medicine*, vol. 39, no. 7, 2020, pp. 1459–62. Crossref, doi:10.1002/jum.15284.
39. Rath, Dominik, et al. "Impaired Cardiac Function Is Associated with Mortality in Patients with Acute COVID-19 Infection." *Clinical Research in Cardiology*, vol. 109, no. 12, 2020, pp. 1491–99. Crossref, doi:10.1007/s00392-020-01683-0.

40. Nigam, Priya, et al. "The Evolution of Fetal Echocardiography before and during COVID-19." *Progress in Pediatric Cardiology*, vol. 58, 2020, p. 101259. Crossref, doi:10.1016/j.ppedcard.2020.101259.
41. Brenner, Daniel S., et al. "Diagnostic Accuracy of Lung Ultrasound for SARS-CoV-2: A Retrospective Cohort Study." *The Ultrasound Journal*, vol. 13, no. 1, 2021. Crossref, doi:10.1186/s13089-021-00217-7.
42. Duggan, Nicole M et al. "Best Practice Recommendations for Point-of-Care Lung Ultrasound in Patients with Suspected COVID-19." *The Journal of emergency medicine* vol. 59,4 (2020): 515-520. doi:10.1016/j.jemermed.2020.06.033
43. Jha, Anamika et al. "Current Imaging Trends in COVID-19 Pneumonia." *JNMA; journal of the Nepal Medical Association* vol. 58,226 444-446. 30 Jun. 2020, doi:10.31729/jnma.4992
44. Jain, Sneha S., et al. "Indications for and Findings on Transthoracic Echocardiography in COVID-19." *Journal of the American Society of Echocardiography*, vol. 33, no. 10, 2020, pp. 1278–84. Crossref, doi:10.1016/j.echo.2020.06.009.
46. Zhang, Li, et al. "Bedside Focused Cardiac Ultrasound in COVID-19 from the Wuhan Epicenter: The Role of Cardiac Point-of-Care Ultrasound, Limited Transthoracic Echocardiography, and Critical Care Echocardiography." *Journal of the American Society of Echocardiography*, vol. 33, no. 6, 2020, pp. 676–82. Crossref, doi:10.1016/j.echo.2020.04.004.
47. Antonini-Canterin, Francesco et al. "Document Addressed to Cardiovascular Echography Operators at the Time of COVID-19: A Document by the "Società Italiana di Ecocardiografia e CardioVascular Imaging" Board 2019-2021." *Journal of cardiovascular echography* vol. 30,1 (2020): 2-4. doi:10.4103/jcecho.jcecho_27_20
48. Bracco, David. "Safe(r) Transesophageal Echocardiography and COVID-19." *Canadian Journal of Anesthesia/Journal Canadien d'anesthésie*, vol. 67, no. 8, 2020, pp. 1101–03. Crossref, doi:10.1007/s12630-020-01667-8..
49. Dai, Wei-cai, et al. "CT Imaging and Differential Diagnosis of COVID-19." *Canadian Association of Radiologists Journal*, vol. 71, no. 2, 2020, pp. 195–200. Crossref, doi:10.1177/0846537120913033. ZDJ

50. Polat, Çağın et al. "COVID-19 diagnosis from chest X-ray images using transfer learning: Enhanced performance by debiasing dataloader." *Journal of X-ray science and technology* vol. 29,1 (2021): 19-36. doi:10.3233/XST-200757
51. Niu, Ruichao, et al. "Chest CT Features Associated with the Clinical Characteristics of Patients with COVID-19 Pneumonia." *Annals of Medicine*, vol. 53, no. 1, 2021, pp. 169–80. Crossref, doi:10.1080/07853890.2020.1851044.
52. Yang, Wenjie, et al. "Clinical Characteristics and Imaging Manifestations of the 2019 Novel Coronavirus Disease (COVID-19): A Multi-Center Study in Wenzhou City, Zhejiang, China." *Journal of Infection*, vol. 80, no. 4, 2020, pp. 388–93. Crossref, doi:10.1016/j.jinf.2020.02.016.
53. Lei, Pinggui, et al. "The Progression of Computed Tomographic (CT) Images in Patients with Coronavirus Disease (COVID-19) Pneumonia." *Journal of Infection*, vol. 80, no. 6, 2020, pp. e30–31. Crossref, doi:10.1016/j.jinf.2020.03.020.
54. Pan, Yueying, and Hanxiong Guan. "Imaging Changes in Patients with 2019-NCov." *European Radiology*, vol. 30, no. 7, 2020, pp. 3612–13. Crossref, doi:10.1007/s00330-020-06713-z.
53. Liu, Chenbin, et al. "Chest Computed Tomography and Clinical Follow-Up of Discharged Patients with COVID-19 in Wenzhou City, Zhejiang, China." *Annals of the American Thoracic Society*, vol. 17, no. 10, 2020, pp. 1231–37. Crossref, doi:10.1513/annalsats.202004-324oc.
54. Cui, Xiaojian, et al. "Children with Coronavirus Disease 2019: A Review of Demographic, Clinical, Laboratory, and Imaging Features in Pediatric Patients." *Journal of Medical Virology*, vol. 92, no. 9, 2020, pp. 1501–10. Crossref, doi:10.1002/jmv.26023.
55. Qin, Chunxia, et al. "18F-FDG PET/CT Findings of COVID-19: A Series of Four Highly Suspected Cases." *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, vol. 47, no. 5, 2020, pp. 1281–86. Crossref, doi:10.1007/s00259-020-04734-w.
56. Elmokadem, Ali H., et al. "Diagnostic Performance of Chest CT in Differentiating COVID-19 from Other Causes of Ground-Glass Opacities." *Egyptian Journal of Radiology and Nuclear Medicine*, vol. 52, no. 1, 2021. Crossref, doi:10.1186/s43055-020-00398-6.

57. Dennie, Carole, et al. "Canadian Society of Thoracic Radiology/Canadian Association of Radiologists Consensus Statement Regarding Chest Imaging in Suspected and Confirmed COVID-19." *Canadian Association of Radiologists Journal*, vol. 71, no. 4, 2020, pp. 470–81. Crossref, doi:10.1177/0846537120924606.
58. Achour, Asma et al. "Chest CT-scan finding of asymptomatic COVID-19 pneumonia: a prospective 542 patients' single center study." *The Pan African medical journal* vol. 36 257. 7 Aug. 2020, doi:10.11604/pamj.2020.36.257.23632
59. Yan, Shuo, et al. "Chest CT Evaluation of 11 Persistent Asymptomatic Patients with SARS-CoV-2 Infection." *Japanese Journal of Infectious Diseases*, vol. 74, no. 1, 2021, pp. 1–6. Crossref, doi:10.7883/yoken.jjid.2020.264.
60. Jiang, Xiangsen, et al. "COVID-19 Dynamic Computed Tomography (CT) Performance and Observation of Some Laboratory Indicators." *Medical Science Monitor*, vol. 26, 2020. Crossref, doi:10.12659/msm.924403.
61. Parry, Arshed Hussain, et al. "Spectrum of Chest Computed Tomographic (CT) Findings in Coronavirus Disease-19 (COVID-19) Patients in India." *European Journal of Radiology*, vol. 129, 2020, p. 109147. Crossref, doi:10.1016/j.ejrad.2020.109147.
62. Abbas, M A et al. "Development of a novel computational method using computed tomography images for the early detection and severity classification of COVID-19 cases." *Journal of X-ray science and technology* vol. 29,2 (2021): 211-228. doi:10.3233/XST-200794
63. Yang, Li-Qin et al. "Concordance of Chest CT and Nucleic Acid Testing in Diagnosing Coronavirus Disease Outside its District of Origin (Wuhan, China)." *Clinics (Sao Paulo, Brazil)* vol. 75 (2020): e1910. doi:10.6061/clinics/2020/e1910
64. Xu, Xi, et al. "Imaging and Clinical Features of Patients with 2019 Novel Coronavirus SARS-CoV-2." *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, vol. 47, no. 5, 2020, pp. 1275–80. Crossref, doi:10.1007/s00259-020-04735-9.

65. Waller, Joseph V et al. "The Limited Sensitivity of Chest Computed Tomography Relative to Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 Infection: A Systematic Review on COVID-19 Diagnostics." *Investigative radiology* vol. 55,12 (2020): 754-761. doi:10.1097/RLI.0000000000000700
66. Shao, J. M., et al. "A Systematic Review of CT Chest in COVID-19 Diagnosis and Its Potential Application in a Surgical Setting." *Colorectal Disease*, vol. 22, no. 9, 2020, pp. 993–1001. Crossref, doi:10.1111/codi.15252.
67. Li, Xiaoming, et al. "CT Imaging Changes of Corona Virus Disease 2019(COVID-19): A Multi-Center Study in Southwest China." *Journal of Translational Medicine*, vol. 18, no. 1, 2020. Crossref, doi:10.1186/s12967-020-02324-w.
68. Zeng, Jie, et al. "Clinical and Imaging Features of COVID-19 Patients: Analysis of Data from High-Altitude Areas." *Journal of Infection*, vol. 80, no. 6, 2020, pp. e34–36. Crossref, doi:10.1016/j.jinf.2020.03.026.
69. Jin, Qianna, et al. "CT-Verlauf Einer Coronavirus(2019-NCoV)-Pneumonie." *Medizinische Klinik - Intensivmedizin Und Notfallmedizin*, vol. 115, no. 5, 2020, pp. 412–13. Crossref, doi:10.1007/s00063-020-00694-z.
70. Jin, Qianna et al. "CT-Verlauf einer Coronavirus(2019-nCoV)-Pneumonie" [Evolution of CT manifestations in a Coronavirus (2019-nCoV) pneumonia patient]. *Medizinische Klinik, Intensivmedizin und Notfallmedizin* vol. 115,5 (2020): 412-413. doi:10.1007/s00063-020-00694-z
- 71.. Shaikh, Faiq et al. "Current Landscape of Imaging and the Potential Role for Artificial Intelligence in the Management of COVID-19." *Current problems in diagnostic radiology* vol. 50,3 (2021): 430-435. doi:10.1067/j.cpradiol.2020.06.009
72. Pontone, Gianluca, et al. "Role of Computed Tomography in COVID-19." *Journal of Cardiovascular Computed Tomography*, vol. 15, no. 1, 2021, pp. 27–36. Crossref, doi:10.1016/j.jcct.2020.08.013.
73. Rogalska-Płońska, Magdalena, et al. "Computed Tomography Changes in Lungs of COVID-19 Patients." *Polish Archives of Internal Medicine*, 2020. Crossref, doi:10.20452/pamw.15363.

74. Rogalska-Płońska, Magdalena, et al. "Computed Tomography Changes in Lungs of COVID-19 Patients." *Polish Archives of Internal Medicine*, 2020. Crossref, doi:10.20452/pamw.15363.
75. Heidinger, Benedikt H et al. "Radiologische Manifestationen von Lungenerkrankungen bei COVID-19" [Radiological manifestations of pulmonary diseases in COVID-19]. *Der Radiologe* vol. 60,10 (2020): 908-915. doi:10.1007/s00117-020-00749-4
76. Bernheim, Adam, et al. "Chest CT Findings in Coronavirus Disease-19 (COVID-19): Relationship to Duration of Infection." *Radiology*, vol. 295, no. 3, 2020, p. 200463. Crossref, doi:10.1148/radiol.2020200463.
77. Xing, Changyang, et al. "Lung Ultrasound Findings in Patients with COVID-19 Pneumonia." *Critical Care*, vol. 24, no. 1, 2020. Crossref, doi:10.1186/s13054-020-02876-9.
78. Zhang, Zili, et al. "High-Resolution Computed Tomographic Imaging Disclosing COVID-19 Pneumonia: A Powerful Tool in Diagnosis." *Journal of Infection*, vol. 81, no. 2, 2020, pp. 318–56. Crossref, doi:10.1016/j.jinf.2020.03.047
79. Achour, Asma, et al. "Chest Ct-Scan Finding of Asymptomatic Covid-19 Pneumonia: A Prospective 542 Patients Single Center Study." *Pan African Medical Journal*, vol. 36, 2020. Crossref, doi:10.11604/pamj.2020.36.257.23632.
80. Naguib, Michael, et al. "The Use of Radiological Imaging alongside Reverse Transcriptase PCR in Diagnosing Novel Coronavirus Disease 2019: A Narrative Review." *Future Microbiology*, vol. 15, no. 10, 2020, pp. 897–903. Crossref, doi:10.2217/fmb-2020-0098.
81. Zhan, Xi, et al. "Dandelion and Focal Crazy Paving Signs: The Lung CT Based Predictors for Evaluation of the Severity of Coronavirus Disease." *Current Medical Research and Opinion*, vol. 37, no. 2, 2020, pp. 219–24. Crossref, doi:10.1080/03007995.2020.1846173.
82. Fu, Xiaobin et al. *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University* vol. 40,2 (2020): 159-163. doi:10.12122/j.issn.1673-4254.2020.02.03

83. Abdelmohsen, Mohsen Ahmed, et al. "Gastrointestinal Tract Imaging Findings in Confirmed COVID-19 Patients: A Non-Comparative Observational Study." *Egyptian Journal of Radiology and Nuclear Medicine*, vol. 52, no. 1, 2021. Crossref, doi:10.1186/s43055-021-00433-0.
84. Blumfield, Einat, et al. "Imaging Findings in Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C) Associated With Coronavirus Disease (COVID-19)." *American Journal of Roentgenology*, vol. 216, no. 2, 2021, pp. 507–17. Crossref, doi:10.2214/ajr.20.24032.
85. Oualha, M., et al. "Severe and Fatal Forms of COVID-19 in Children." *Archives de Pédiatrie*, vol. 27, no. 5, 2020, pp. 235–38. Crossref, doi:10.1016/j.arcped.2020.05.010.
86. Patel, Neha A. "Pediatric COVID-19: Systematic Review of the Literature." *American Journal of Otolaryngology*, vol. 41, no. 5, 2020, p. 102573. Crossref, doi:10.1016/j.amjoto.2020.102573.
87. Citro, Rodolfo, et al. "Role of Multimodality Imaging in Evaluation of Cardiovascular Involvement in COVID-19." *Trends in Cardiovascular Medicine*, vol. 31, no. 1, 2021, pp. 8–16. Crossref, doi:10.1016/j.tcm.2020.10.001.
88. Morparia, Kavita, et al. "Abdominal Imaging Findings in Critically Ill Children With Multisystem Inflammatory Syndrome Associated With COVID-19." *Pediatric Infectious Disease Journal*, vol. 40, no. 2, 2020, pp. e82–83. Crossref, doi:10.1097/inf.0000000000002967.
89. Colombi, Davide, et al. "Well-Aerated Lung on Admitting Chest CT to Predict Adverse Outcome in COVID-19 Pneumonia." *Radiology*, vol. 296, no. 2, 2020, pp. E86–96. Crossref, doi:10.1148/radiol.2020201433.
90. Fijałkowska, Jadwiga. "Zastosowanie Tomografii Komputerowej w Kardiologii | Fijałkowska | Forum Medycyny Rodzinnej." *Via Medica*, 2013, journals.viamedica.pl/forum_medycyny_rodzinnej/article/view/35384.
91. Tabik, S., et al. "COVIDGR Dataset and COVID-SDNet Methodology for Predicting COVID-19 Based on Chest X-Ray Images." *IEEE Journal of Biomedical and Health Informatics*, vol. 24, no. 12, 2020, pp. 3595–605. Crossref, doi:10.1109/jbhi.2020.3037127.

92. Schultz, Marcus J., et al. "Challenges and Opportunities for Lung Ultrasound in Novel Coronavirus Disease (COVID-19)." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 102, no. 6, 2020, pp. 1162–63. Crossref, doi:10.4269/ajtmh.20-0323.
93. Rorat, Marta et al. "Usefulness of a portable chest radiograph in the initial diagnosis of coronavirus disease 2019." *Polish archives of internal medicine* vol. 130,10 (2020): 906-909. doi:10.20452/pamw.15512
94. Jacobi, Adam, et al. "Portable Chest X-Ray in Coronavirus Disease-19 (COVID-19): A Pictorial Review." *Clinical Imaging*, vol. 64, 2020, pp. 35–42. Crossref, doi:10.1016/j.clinimag.2020.04.001.
95. An, Peng et al. "CT Manifestations of Novel Coronavirus Pneumonia: A Case Report." *Balkan medical journal* vol. 37,3 (2020): 163-165. doi:10.4274/balkanmedj.galenos.2020.2020.2.15
96. Zuo, Houdong. "Contribution of CT Features in the Diagnosis of COVID-19." *Canadian respiratory journal* vol. 2020 1237418. 12 Nov. 2020, doi:10.1155/2020/1237418
97. Uchida, Sho et al. "CT screening for COVID-19 in asymptomatic patients before hospital admission." *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy* vol. 27,2 (2021): 232-236. doi:10.1016/j.jiac.2020.09.025
98. Hammer, Mark M et al. "Challenges in the interpretation and application of typical imaging features of COVID-19." *The Lancet. Respiratory medicine* vol. 8,6 (2020): 534-536. doi:10.1016/S2213-2600(20)30233-2
99. Kim, Hyunjoong W et al. "The role of initial chest X-ray in triaging patients with suspected COVID-19 during the pandemic." *Emergency radiology* vol. 27,6 (2020): 617-621. doi:10.1007/s10140-020-01808-y
100. Trovato, Guglielmo M, and Marco Sperandeo. "Usefulness of lung ultrasound imaging in COVID-19 pneumonia: The persisting need of safety and evidences." *Echocardiography (Mount Kisco, N.Y.)* vol. 37,7 (2020): 1138-1139. doi:10.1111/echo.14769
101. Fang, Yicheng et al. "CT Manifestations of Two Cases of 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) Pneumonia." *Radiology* vol. 295,1 (2020): 208-209. doi:10.1148/radiol.202000280

102. Catapano, Federica, et al. "Role of Advanced Imaging in COVID-19 Cardiovascular Complications." *Insights into Imaging*, vol. 12, no. 1, 2021. Crossref, doi:10.1186/s13244-021-00973-z.
103. Xu, Yu-Huan, et al. "Clinical and Computed Tomographic Imaging Features of Novel Coronavirus Pneumonia Caused by SARS-CoV-2." *Journal of Infection*, vol. 80, no. 4, 2020, pp. 394–400. Crossref, doi:10.1016/j.jinf.2020.02.017.
104. Gargani, Luna, et al. "Why, When, and How to Use Lung Ultrasound during the COVID-19 Pandemic: Enthusiasm and Caution." *European Heart Journal - Cardiovascular Imaging*, vol. 21, no. 9, 2020, pp. 941–48. Crossref, doi:10.1093/ehjci/jeaa163.
105. Liu, Kefu, et al. "COVID-19 with Cystic Features on Computed Tomography." *Medicine*, vol. 99, no. 18, 2020, p. e20175. Crossref, doi:10.1097/md.00000000000020175.

POSTĘPY W LECZENIU COVID-19

Dominika Majer, Aleksandra Szczuraszyk, Piotr Limanówka,
Emilia Słabońska, Robert Kasza

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

Abstrakt:

Zakażenie wirusem SARS-CoV-2 prowadzi do rozwoju ostrej choroby zakaźnej układu oddechowego – COVID-19. Pierwsze przypadki zostały odnotowane w grudniu 2019 roku w mieście Wuhan (prowincja Hubei) w Chinach. Wyróżniamy cztery stadia klinicznego zakażenia SARS-CoV-2, a kuracja pacjenta jest zależna od tego, w którym stadium choroby się on znajduje. Obecnie na świecie nie istnieje zatwierdzona metoda leczenia COVID-19. Leczenie etiologiczne, które skupia się na pierwotnej przyczynie choroby nie jest możliwe. Stosuje się leczenie objawowe, które ma na celu złagodzenie objawów oraz wsparcie organizmu w walce z chorobą. Pomaga to poprawić jakość życia osoby chorej, jednakże nie eliminuje przyczyn infekcji. Metody leczenia, które są obecnie stosowane, opierają się głównie na doświadczeniach związanych z występującymi już wcześniej na świecie wirusami podobnymi do koronawirusa, takimi jak SARS-CoV czy MERS-CoV oraz wirusie grypy. Badacze kliniczni testują setki leków, które mogłyby wykazać właściwości terapeutyczne. Na świecie prowadzone są badania nad leczeniem COVID-19 z wykorzystaniem istniejących już na rynku leków przeciwwirusowych, leków przeciwreumatycznych, dożylnych immunoglobulin (IVIg), hiperimmunizacyjnych immunoglobulin (IgG), heparyn drobnocząsteczkowych oraz interleukin. Naukowcy rozpoczęli także prace nad szczepionką, która umożliwiłaby nabycie sztucznej odporności przeciwko koronawirusowi, co przyczyniłoby się do zmniejszenia śmiertelności związanej z zakażeniem. Ważnym aspektem szczepień jest także spadek ryzyka powikłań, które mogą wystąpić po przejściu choroby i okazać się od niej gorszymi w skutkach. Dnia 10 stycznia 2020 roku opracowano dokładną sekwencję białka S (kolca), znajdującego się na powierzchni wirusa, co umożliwiło pracę nad tworzeniem szczepionki. Białko S (kolca) jest odpowiedzialne za interakcje z receptorem na powierzchni komórki gospodarza i wnikięcie do jej wnętrza. W szczepionce znajduje się mRNA kodująca informację genetyczną o szczytowym białku S (kolca), a nie tak jak szczepionki starej generacji oparta jest na inaktywowanych cząstkach wirusa. Pierwsze testy szczepionki datowane są na marzec 2020. W maju 2020 roku przynajmniej 6 szczepionek weszło w fazę testów klinicznych, a 80 innych w stadium testów przedklinicznych. Pierwsze szczepienia miały miejsce pod koniec 2020 roku.

Słowa kluczowe: leczenie, koronawirus, szczepionka, COVID-19, choroba

Abstract:

The infection of SARS-CoV-2 causes a severe illness of the respiratory system called COVID-19. First reports/cases were noted in December 2019 in the city of Wuhan. We can distinguish four clinical stages of SARS-CoV-2 infection and chosen treatment depends on the clinical stage of the patient. At this moment in the world there is no confirmed method for COVID-19 treatment. Etiotropic therapy, which is focused on the initial cause of illness, is not possible. The one that's currently applied is symptomatic treatment which aims to relieve symptoms and support in overcoming the illness. It helps to improve the condition of the sick person's health quality, however it doesn't eliminate the cause of infection. Treatment methods, which are currently used, are based mostly on common knowledge about already present viruses similar to coronavirus like SARS-CoV or MERS-CoV, influenza virus. These days studies on COVID-19 treatment with the use of existing in the market antiviral medicines, disease-modifying anti-rheumatic drug, intravenous immunoglobulin (IVIg), immunoglobulin IgG, low-molecular-weight heparins and interleukins are being carried out around the world. Scientists have started working on vaccines which would allow to induce artificially acquired active immunity to coronavirus and as a result, decrease death rate related to virus infection. Significant aspect of vaccination also decreases the risk of complications that could appear after overcoming this illness and turn out to be even worse in the long term. On the 10th of January in 2020 a specific S-Protein sequence located on the surface of the virus was designed, thereby the vaccination process has begun. The integration between S-Protein and transmembrane receptors in the host cell activates the receptor's associated biochemical pathway. The vaccine contains mRNA which encodes the synthesis of a gene product: S-Protein in contrast to old generation vaccines, which are based on inactivated viral particles. First vaccine tests took place in March 2020. In May 2020 at least 6 vaccines were in process of clinical tests, another 80 in the preclinical tests phase. First vaccinations were held at the end of 2020.

Keywords: treatment, coronavirus, vaccine, COVID-19, disease

1. WSTĘP

SARS-CoV-2 jest nowo odkrytym koronawirusem, który wywołuje chorobę zwaną COVID-19. Stanowi ona nie lada wyzwanie dla lekarzy ze względu na trudności wiążące się z opracowaniem procedury leczenia choroby, która jak dotąd nie była znana ludzkości.

Do przeniesienia SARS-CoV-2 dochodzi drogą kropelkową, jednakże wirus ten zachowuje również zdolność do zakażenia poza organizmem człowieka. Można się nim zakazić dotykając zanieczyszczone przedmioty, dlatego istotna jest profilaktyka polegająca na częstym myciu rąk oraz ich odkażaniu, noszeniu maski w miejscach publicznych i zachowaniu bezpiecznej odległości.

Według Światowej Organizacji Zdrowia (ang. World Health Organization – WHO) czas inkubacji wirusa wynosi średnio 5-6 dni, ale może również wahać się od 1-14 dni [1]. Przebieg choroby ma bardzo często postać bezobjawową lub skąpoobjawową, której towarzyszą dolegliwości takie jak kaszel czy gorączka [2]. Od początku pandemii, z każdym kolejnym miesiącem, wydłuża się lista objawów występujących u osób, które zakażyły się patogenem.

Do najczęściej występujących symptomów zaliczamy: gorączkę, suchy kaszel, duszności, bóle: gardła, mięśni, głowy, kręgosłupa, zmęczenie, utratę węchu i/lub smaku, biegunkę, wymioty, a w bardziej zaawansowanych stadiach może wystąpić śródmiąższowe zapalenie płuc [3]. W ciężkich przypadkach może rozwinąć się ostra niewydolność oddechowa, która prowadzi do niewydolności wielonarządowej, a w konsekwencji do zgonu pacjenta [3]. Obecnie poziom śmiertelności wynosi około 1-3% i jest związany z występowaniem chorób współistniejących, wiekiem pacjentów oraz dostępem do służby zdrowia [4].

Pomimo ciągłych badań nad efektywnym zwalczaniem wirusa, nadal nie są znane optymalne metody leczenia. Lekarze początkowo mogli jedynie sugerować się doświadczeniami nabytymi podczas epidemii wirusów MERS-CoV czy SARS-CoV, wywołujących odpowiednio choroby – MERS (bliskowschodni zespół oddechowy) oraz SARS (ciężki ostry zespół oddechowy) [5]. Z czasem medycy na całym świecie, po bliższym poznaniu przebiegu choroby, zaczęli zdobywać wiedzę, umożliwiającą zastosowanie odpowiednich metod leczenia COVID-19.

W zależności od przebiegu i stadium COVID-19, stosuje się różnego rodzaju leki oraz terapie. Zgodnie z informacjami przedstawionymi przez WHO, badania dowodzą skuteczności deksometazonu, będącego glikokortykosteroidem, który może zostać zastosowany w przypadkach o ciężkim przebiegu. Leki takie jak hydroksychlorochina czy lopinawir/ritonawir mają małe znaczenie i często nie odgrywają istotnej roli w leczeniu COVID-19 [1]. Innym lekiem, które są stosowane do leczenia tej choroby, nie udowodniono skuteczności działania [4]. Duże nadzieje pokładane są również w związku ze szczepionkami przeciwko SARS-CoV-2, które zostały wprowadzone na rynek pod koniec grudnia 2020 roku.

2. STADIA KLINICZNE I ICH CHARAKTERYSTYKA

Możemy wyróżnić cztery stadia kliniczne zakażenia wirusem SARS-CoV-2 [6]:

- 1 – stadium bezobjawowe lub skąpoobjawowe
- 2 – stadium pełnoobjawowe
- 3 – stadium z niewydolnością oddechową (burza cytokinowa)
- 4 – stadium ostrej niewydolności oddechowej (ARDS)

2.1. Stadium bezobjawowe lub skąpoobjawowe

Stadium pierwsze dotyczy osób, które nie wymagają hospitalizacji. Zakażeni bardzo często przechodzą chorobę łagodnie – bezobjawowo lub skąpoobjawowo [2, 6]. Symptomy, które wskazują na zakażenie to najczęściej: gorączka, zmęczenie, utrata węchu i/lub smaku oraz suchy kaszel [1, 3]. Rzadziej występują również bóle głowy, gardła, mięśni, wymioty, biegunka, zapalenie spojówek, wysypka, problemy ze snem, spadek kondycji, przebarwienia palców u stóp i rąk oraz problemy z koncentracją [1]. Istotne jest jednak obserwowanie czy stan zdrowia zakażonego się nie pogarsza, gdyż z czasem może rozwinąć się pełnoobjawowa postać choroby [6].

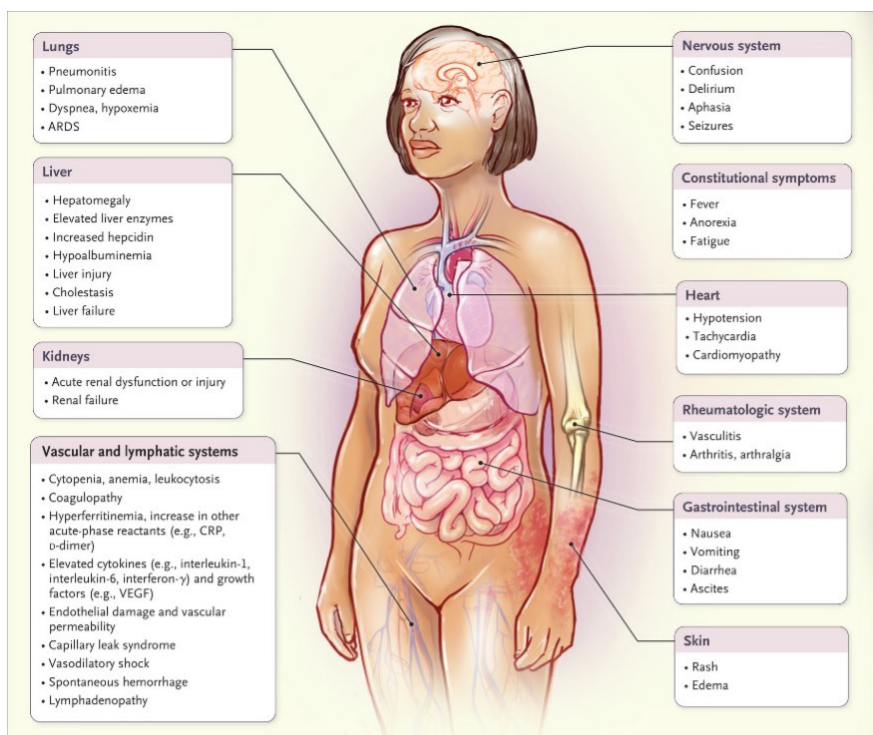
2.2. Stadium pełnoobjawowe

Kontrolowanie saturacji jest bardzo ważne w przypadku zakażenia koronawirusem SARS-CoV-2, gdyż jej spadek poniżej 95% oznacza rozwój stadium drugiego. Zwykle następuje to w ciągu pierwszego tygodnia choroby [6]. Na tym etapie dochodzi do namnażania się wirusa oraz nasilenia się objawów [6]. Pacjenci wymagają hospitalizacji [6]. Istotne jest wdrożenie leczenia przeciwwirusowego, profilaktyka zmian zatorowo-zakrzepowych oraz możliwość zapewnienia tlenoterapii w razie pogorszenia stanu zdrowia pacjenta.

2.3. Stadium z niewydolnością oddechową

Występowanie silnych duszności i spadek saturacji hospitalizowanego pacjenta poniżej 90%, pomimo zastosowania tlenoterapii oraz leczenia przeciwwirusowego, może wskazywać na dalszy postęp choroby, co prowadzi do rozwoju stadium trzeciego. W tym stadium może wystąpić burza cytokinowa [6], która dotyczy niekontrolowanej, nadmiernej odpowiedzi immunologicznej chorego [12]. Hospitalizowani mogą mieć dolegliwości ze strony układu oddechowego takie jak: kaszel, przyspieszony oddech czy duszności, które mogą prowadzić do zespołu ostrej niewydolności oddechowej [28].

Większość pacjentów z burzą cytokinową ma gorączkę, ale może również występować u nich zmęczenie, ból stawów, ból głowy, mięśni czy wysypka (ryc.1.) [28]. Wszystkie te objawy mogą być bezpośrednio spowodowane przez uszkodzenia tkanek wywołane cytokinami lub wynikać z odpowiedzi immunologicznej układu odpornościowego pacjenta [28].



Ryc.1. Prezentacja kliniczna burzy cytokinowej. <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra2026131>

2.4. Stadium ostrej niewydolności oddechowej

W stadium czwartym dochodzi do rozwoju ARDS (ang. acute respiratory distress syndrome) czyli zespołu ostrej niewydolności oddechowej. Charakterystyczne dla tego stadium uszkodzenia płuc, powodują wyciek i gromadzenie się płynu, a ostatecznie zapadnięcie się pęcherzyków płucnych [11]. Skutkuje to zmniejszeniem wydajności wymiany gazowej i niedostarczeniem wystarczającej ilości tlenu do tkanek i narządów [11]. Może to prowadzić do niewydolności wielonarządowej, a w konsekwencji do śmierci pacjenta [3]. Chorzy w stadium ostrej niewydolności oddechowej wymagają opieki na oddziale intensywnej terapii, gdyż konieczne może być zastosowanie wentylacji mechanicznej [6].

3. WPŁYW CHOROÓB WSPÓLISTNIEJĄCYCH NA PRZEBIEG COVID-19

Obecność chorób współistniejących u pacjentów zakażonych wirusem SARS-CoV-2 powoduje zwiększenie ryzyka ciężkiego przebiegu choroby, a nawet zgonu [2, 13]. Znajomość chorób współistniejących jest ważnym kryterium, na podstawie którego lekarz może dobrać odpowiednie leczenie do każdego pacjenta indywidualnie [13]. Choroby współistniejące, które mają wpływ na zwiększenie ryzyka śmierci z powodu COVID-19 to [13, 14]:

- Nadciśnienie tętnicze
- Cukrzyca
- Choroby nerek
- Choroby układu krążenia
- Choroby naczyniowo-mózgowe
- Choroby płuc
- Otyłość

Odpowiednio szybkie wdrożenie leczenia u osób z chorobami współistniejącymi może znacząco zmniejszyć ryzyko zgonu związanego z COVID-19 [14].

4. LECZENIE COVID-19

Na całym świecie trwają badania nad skutecznością działania wielu leków. Wiele opublikowanych dotychczas wyników wskazuje, że leki takie jak chlorochina, hydroksychlorochina, azytromycyna nie są skuteczne w walce z chorobą wywoływaną przez SARS-CoV-2 [1, 32, 33, 34]. Naukowcy w dalszym ciągu próbują opracować odpowiednią metodę leczenia COVID-19. Wszystko sprowadza się jednak do leczenia objawowego. W zależności od stadium klinicznego w jakim znajduje się chory, dobierane jest odpowiednie leczenie podstawowe. Dodatkowo można zastosować leczenie wspomagające [6].

4.1. Leczenie pacjentów w stadium objawowym lub skąpoobjawowym

Niezależnie od tego czy wystąpiły objawy, czy zakażony przechodzi chorobę bezobjawowo, bardzo ważne jest ciągle kontrolowanie swojego stanu zdrowia. Pacjenci powinni monitorować saturację krwi, która wskazuje na stopień nasycenia tlenem hemoglobiny krwi tętniczej i jest oznaczana jako SpO_2 . U zakażonych, którzy są zaliczani do stadium 1 powinna utrzymywać się na

poziomie 95% [6]. Wyjątkiem są osoby zmagające się z przewlekłymi chorobami układu oddechowego, których saturacja wyjściowa może nie osiągać progu 95% i będzie przez to naturalnie obniżona [6].

U chorych powyżej 65 r.ż. zalecane jest regularne monitorowanie ciśnienia tętniczego [15]. Jeżeli pacjent jest leczony z powodu nadciśnienia tętniczego i/lub niewydolności serca również należy regularnie mierzyć ciśnienie tętnicze [15].

U pacjentów bezobjawowych nie stosuje się żadnej terapii. Jeżeli pojawiają się jakiegokolwiek symptomy można zastosować leczenie objawowe. W przypadku gorączki powyżej 38,5°C najskuteczniejszym działaniem wykazują się niesteroidowe leki przeciwzapalne lub paracetamol [15]. Podobnie jak w przypadku grypy należy odpoczywać oraz zadbać o nawodnienie doustne [6]. Zgodnie z zaleceniami WHO nie powinno się stosować antybiotyków do leczenia COVID-19 [1]. Wyjątek może stanowić stwierdzona przez lekarza koinfekcja bakteryjna lub współistnienie grypy [6]. Wdrożenie kortykosteroidów nie powoduje poprawy stanu zdrowia, wręcz może być szkodliwe na tym etapie, dlatego stosowanie ich jest przeciwwskazane [6, 16].

4.2. Leczenie pacjentów w stadium pełnoobjawowym

Stosowanie leków przeciwwirusowych w tym stadium może ograniczyć postępowanie choroby. Leki te stosowane są w walce z infekcjami wirusowymi, w celu zahamowania replikacji wirusów, ale należy pamiętać, że nie eliminują całkowicie patogenów. Przez wiele miesięcy prowadzono badania, które mogłyby dowieść skuteczności istniejących już leków takich jak: lopinawir/ritonawir czy remdesiwir.

Naukowcy udowodnili, że leczenie lopinawirem/ritonawirem nie przynosi oczekiwanego efektu [2, 18, 19, 20, 22].

Remdesiwir jest obecnie jedynym zarejestrowanym w Unii Europejskiej lekiem przeciwwirusowym w walce z SARS-CoV-2 [21]. Można go wykorzystać do leczenia podstawowego. Chociaż WHO oświadczyło, że remdesiwir nie odgrywa znaczącej roli w leczeniu COVID-19 [2], to badania kliniczne wykazują, że u pacjentów w stadium pełnoobjawowym, po zastosowaniu leczenia remdesiwirem, doszło do poprawy stanu zdrowia [22]. Początkowo zalecano, aby lek ten stosować przez 10 dni. Badania z udziałem osób chorych na COVID-19 wykazały jednak, że wystarczające jest stosowanie remdesiwiru przez 5 dni [23].

W stadium pełnoobjawowym można także zastosować leczenie wspomagające, do którego zaliczamy: heparyny drobnocząsteczkowe, deksametazon, tlenoterapię, leczenie objawowe oraz nawodnienie doustne lub żyłne [6]. U pacjentów, których oddychanie jest wspomagane tlenem, zastosowanie deksametazonu przyczynia się do zmniejszenia śmiertelności i poprawy stanu klinicznego [24].

Od początku walki z koronawirusem pokładano nadzieje w zastosowaniu osocza ozdrowieńców. Badania kliniczne nie udowodniły jednoznacznie jego skuteczności. Choć wiele badań wskazuje na korzystne działanie osocza ozdrowieńców [25, 26], to niedawno opublikowany przez AMA (ang. American Medical Association) artykuł temu zaprzecza [27]. Wynika z niego, że osocze nie wpływa niekorzystnie na przebieg choroby, ale również nie przyczynia się do poprawy stanu zdrowia pacjentów [27]. Mimo różnych publikacji, osocze ozdrowieńców można traktować jako opcję terapeutyczną pod warunkiem, że zostanie ono przetoczone na wczesnym etapie choroby [25]. Bardzo ważna jest również zawartość przeciwciał anty-SARS-CoV-2 w wysokim mianie [25].

4.3. Leczenie pacjentów w stadium z niewydolnością oddechową

Pogarszanie się stanu zdrowia może świadczyć o gwałtownym postępowaniu choroby. Burza cytokinowa pojawiająca się na tym etapie jest bardzo niebezpieczna dla organizmu, dlatego istotna jest szybka reakcja i zastosowanie odpowiedniego leczenia, które może powstrzymać jej dramatyczne w skutkach następstwa [6].

Badania kliniczne wykazują, że u wielu pacjentów doszło do poprawy zdrowia po zastosowaniu Tocilizumabu – inhibitora interleukiny-6 [29, 35]. Jest to lek stosowany do leczenia reumatoidalnego zapalenia stawów. Tocilizumab może mieć wpływ na zmniejszenie odpowiedzi zapalnej, ale należy pamiętać, że nie ma wystarczającej ilości dowodów, które potwierdzają jego skuteczność [2, 29].

Ważną rolę odgrywają również glikokortykosteroidy takie jak deksametazon. Połączenie deksametazonu ze standardową terapią skutkuje skróceniem czasu pobytu pod respiratorem, bądź skróceniem czasu stosowania tlenoterapii [30]. U pacjentów hospitalizowanych z powodu COVID-19 zaleca się stosowanie leków przeciwzakrzepowych, gdyż wirus atakuje także śródbłonek naczyń krwionośnych oraz sprzyja powstawaniu zakrzepów [31].

Do leczenia wspomagającego możemy zaliczyć: tlenoterapię nisko- i wysokoprzepływową, leczenie objawowe, nawodnienie doustne lub dożylnie oraz antybiotykoterapię [6].

4.4. Leczenie pacjentów w stadium z ostrą niewydolnością oddechową

Jeżeli, pomimo zastosowania leczenia farmakologicznego, stan zdrowia hospitalizowanego pogarsza się, to oznacza, że doszło do rozwoju stadium ostrej niewydolności oddechowej. Pacjenci są kierowani na oddział intensywnej terapii [6]. Chorzy nie są w stanie oddychać samodzielnie i wymagają wentylacji mechanicznej.

W tym stadium stosuje się głównie glikokortykosteroidy, najczęściej w wysokich dawkach [6]. Zaleca się stosowanie deksametazonu oraz metyloprednizolonu. Można również zastosować ECMO – pozaustrojową oksygenację membranową, tlenoterapię wysokoprzepływową, nawodnienie dożylnie, a także antybiotyki [6]. Istotne jest podawanie heparyny drobnocząsteczkowej w celu profilaktyki zmian zatorowo-zakrzepowych [31]. Zatorowość płucna może być przyczyną 30% zgonów [36].

5. SZCZEPIONKI PRZECIWKO SARS-COV-2

Wraz z pojawieniem się nowego wirusa SARS-CoV-2, naukowcy zaczęli opracowywać szczepionkę w celu sztucznego uodpornienia populacji. Szczepienia ochronne mają na celu pobudzić organizm do wytwarzania przeciwciał, które zapewniają ochronę przed negatywnym działaniem patogenów. Do tej pory do obrotu na terenie Unii Europejskiej dopuszczono szczepionki firm: Pfizer i BioNTech, Moderna, AstraZeneca oraz Janssen. Szczepionki, które mają szansę uzyskać rekomendację Europejskiej Agencji Leków to: NVX-CoV2373 firmy Novavax, CVn-CoV firmy CureVac oraz szczepionka Gam-COVID-Vac (Sputnik V) opracowana przez Centrum Epidemiologii i Mikrobiologii im. Nikołaja Gamelei. Na świecie stosuje się także chińskie szczepionki, jednak nie ma wystarczającej ilości informacji na ich temat [46]. Skuteczność szczepionek, które obecnie są stosowane na terenie UE, została przedstawiona w tabeli.

Tabela 1. Przedstawia skuteczność preparatów stosowanych w Unii Europejskiej w celu szczepienia przeciwko SARS-CoV-2, [opracowanie własne], [37, 40, 42, 45].

Szczepionka	Skuteczność (%)
Pfizer	95
Moderna	94,1
AstraZeneca	59,5
Janssen	66,1 (po 28 dniach)

5.1. Szczepionka BNT162b2 firmy Pfizer

Opis szczepionki

Szczepionka BNT162b2 jest produktem stworzonym we współpracy koncernu farmaceutycznego Pfizer oraz przedsiębiorstwa biotechnologicznego BioNTech. Zawiera ona mRNA ze zmodyfikowanymi nukleozydami, który jest zamknięty w nanocząsteczkach lipidowych [37]. Taka budowa stanowi ochronę dla materiału genetycznego oraz sprzyja przenikaniu cząsteczek mRNA do wnętrza komórki gospodarza [37, 38]. mRNA koduje informację genetyczną dotyczącą glikoproteiny S (ang. spike) „kolca”, która występuje na powierzchni wirusa SARS-CoV-2 [38]. Białko to jest antygenem, który sprzyja wytwarzaniu przeciwciał neutralizujących [38].

Ochronę przed rozwinieniem się choroby zapewnia wywołana przez tę szczepionkę odpowiedź immunologiczna oraz odpowiedź komórkowa [37].

Przechowywanie

Nieotwartą fiolkę ze szczepionką należy przechowywać przez 6 miesięcy w zamrażarce w temperaturze od -90°C do -60°C [37]. Szczepionka może być przechowywana w temperaturze od -25°C do -15°C (np. w transporcie) w okresie do dwóch tygodni, a następnie należy ją z powrotem umieścić w temperaturze od -90°C do -60°C [37].

Fiolka może być rozmrożona maksymalnie przez okres 5 dni i należy ją przechowywać w temperaturze od 2°C do 8°C [37].

Nieotwarta fiolka może znajdować się maksymalnie przez 2 godziny w temperaturze do 30°C przed jej użyciem [37].

Nie należy zamrażać ponownie szczepionki ponownie po uprzednim rozmrożeniu.

Skuteczność

Randomizowane badanie zostało przeprowadzone w wielu państwach na świecie, a uczestnicy, którzy brali w nim udział znajdowali się w następujących przedziałach wiekowych [39]:

- 12 – 15 lat (uwzględniono tylko do obserwacji)
- 16 – 55 lat
- 56 lat i starsze (minimum 40% uczestników w przedziale 56 lat)

W badaniu nie mogły brać udziału osoby, które zmagają się z obniżoną odpornością oraz osoby, które miały wcześniej rozpoznany COVID-19 [37, 39]. Ochotnikami mogły być osoby zdrowe lub osoby z chorobami współistniejącymi, których stan był stabilny i nie wymagały zmiany leczenia lub hospitalizacji spowodowanej zaostrzeniem choroby w ciągu 6 tygodni przed rozpoczęciem badania [37]. Z badania nie wykluczono również osób, które miały potwierdzone stabilne zakażenie wirusami takimi jak: HIV, HCV, HBV [37].

Uczestnikom w grupie kontrolnej podano placebo, a w grupie badawczej 2 dawki szczepionki BNT162b2 [39]. Druga dawka została podana po 21 dniach od podania pierwszej dawki [39].

Badania potwierdziły, że szczepionka BNT162b2 zapobiega zachorowaniom na COVID-19. W porównaniu z placebo, skuteczność szczepionki wynosiła 94,6% u uczestników w przedziale 16 lat [37]. Niezależnie od wieku, płci, rasy, pochodzenia etnicznego oraz obecności chorób współistniejących skuteczność szczepionki była bardzo podobna [39].

Działania niepożądane

Podczas badań klinicznych wśród osób w przedziale 16 odnotowano różnego rodzaju działania niepożądane. Najczęściej występującymi okazały się: ból w miejscu wstrzyknięcia (>80%), zmęczenie (>60%), ból głowy (>50%), ból mięśni i dreszcze (>30%), ból stawów (>20%), gorączka i obrzęk w miejscu wstrzyknięcia (>10%).

Działania niepożądane były niegroźne dla organizmu, najczęściej miały charakter łagodny lub umiarkowany, a czas ich trwania wynosił do kilku dni od momentu podania szczepionki [37].

5.2. Szczepionka mRNA-1237 firmy Moderna

Opis szczepionki

Szczepionka firmy Moderna zawiera informacyjny RNA, który jest zamknięty w nanocząsteczkach lipidowych [40]. mRNA koduje glikoproteinę S „kolca” wirusa, która wiąże się z receptorem (ACE2) znajdującym się na powierzchni komórki człowieka [38]. Białko to ulega ekspresji i zostaje rozpoznane przez układ odpornościowy człowieka jako obcy antygen [40]. Rozwija się w ten sposób odpowiedź immunologiczna, która opiera się na działaniu przeciwciał neutralizujących.

Przechowywanie

Nieotwartą fiolkę ze szczepionką należy przechowywać w zamrażarce temperaturze od -25°C do -15°C przez okres 7 miesięcy [40]. W lodówce można ją przechowywać maksymalnie przez okres 30 dni w temperaturze od 2°C do 8°C , pod warunkiem, że jest ona zabezpieczona przed działaniem światła [40]. Nieotwarta szczepionka może znajdować się poza lodówką maksymalnie do 12 godzin tylko jeżeli w pomieszczeniu panują warunki od 8°C do 25°C [40].

Nie należy zamrażać ponownie szczepionki po uprzednim rozmrożeniu.

Skuteczność

Przeprowadzono randomizowane badanie, w którym uczestnicy zostali przydzieleni do dwóch grup – grupy eksperymentalnej oraz grupy badawczej. W badaniu nie mogły wziąć udziału osoby, które już wcześniej przebyły COVID-19, osoby o obniżonej odporności, kobiety w ciąży, osoby przyjmujące leki immunosupresyjne [40]. Z badania nie wykluczono osób, które miały potwierdzone stabilne zakażenie wirusem HIV [40]. Ochotnikom podano dwie dawki w odstępie około 25-35 dniowym. Badania potwierdziły, że szczepionka mRNA-1273, w porównaniu z placebo, wyraźnie zmniejszyła ryzyko zachorowania na COVID-19 [41]. Skuteczność szczepionki firmy Moderna wynosiła 94,1% [40].

Działania niepożądane

Wśród badanych wystąpiły następujące działania niepożądane: ból w miejscu wstrzyknięcia (92%), zmęczenie (70%), ból głowy (64,7%), ból

mięśni (61,5%), ból stawów (46,4%), dreszcze (45,4%), nudności/wymioty (23%), obrzęk/tkliwość pod pachą (19,8%), gorączka (15,5%), obrzęk w miejscu wstrzyknięcia (14,7%) i zaczerwienienie (10%) [40].

5.3. Szczepionka ChAdOx1 nCoV-19 (Vaxzevria) firmy AstraZeneca

Opis szczepionki

Szczepionka firmy AstraZeneca zawiera szympansi wektor adenowirusowy (ChAdOx1), który jest niezdolny do replikacji i koduje glikoproteinę S „kolca” wirusa SARS-CoV-2 [42, 43]. Odpowiedź immunologiczna rozwijająca się po podaniu szczepionki może chronić przed chorobą COVID-19.

Przechowywanie

Nieotwartą fiolkę ze szczepionką firmy AstraZeneca można przechowywać w lodówce w temperaturze od 2°C do 8°C przez maksymalny okres 6 miesięcy [42]. Otwarta fiolka wykazuje chemiczną i fizyczną stabilność od momentu otwarcia do podania (w ciągu 48 godzin), pod warunkiem przechowywania jej w lodówce w temperaturze od 2°C do 8°C [42]. Przed podaniem produkt leczniczy może przebywać maksymalnie przez 6 godzin w temperaturze do 30°C [42]. Nie należy ponownie umieszczać produktu w lodówce.

Skuteczność

Do badania dopuszczono osoby w wieku 18 lat oraz starsze [42]. Wykluczano uczestników, którzy w przeszłości chorowali na COVID-19, mieli ciężkie i/lub niekontrolowane choroby sercowo-naczyniowe, żołądkowo-jelitowe, choroby wątroby, nerek, choroby endokrynologiczne/metaboliczne, osoby z zaburzeniami neurologicznymi, z ciężką immunosupresją oraz kobiety w ciąży [42]. Ochotnikom podano dwie dawki. Odstęp czasowy pomiędzy podaniem pierwszej, a drugiej dawki wynosił ≥ 28 dni [43]. Badania kliniczne potwierdziły skuteczność działania szczepionki ChAdOx1 firmy AstraZeneca w porównaniu z placebo [42, 43]. Zapobiega zachorowaniom na COVID-19 u osób powyżej 18 r.ż. Skuteczność działania szczepionki firmy AstraZeneca wynosi 59,5% [42].

Działania niepożądane

Działania niepożądane, które wystąpiły wśród badanych osób to najczęściej: tklliwość w miejscu wstrzyknięcia (63,7%), ból w miejscu wstrzyknięcia (54,2%), ból głowy (52,6%), zmęczenie (53,1%), ból mięśni (44,0%), złe samopoczucie (44,2%), gorączka (włączając uczucie gorączki (33,6%) oraz gorączkę $>38^{\circ}\text{C}$ (7,9%), dreszcze (31,9%), ból stawów (26,4%) i nudności (21,9%) [42]. Skutki uboczne były niegroźne dla organizmu, najczęściej miały charakter łagodny lub umiarkowany, a czas ich trwania wynosił do kilku dni od momentu podania szczepionki. Statystycznie działania niepożądane po podaniu drugiej dawki występowały rzadziej niż po pierwszej dawce oraz miały łagodny przebieg [42].

Zalecenia

Niedawno pojawiły się kontrowersje związane ze stosowaniem szczepionki firmy AstraZeneca. PRAC (ang. Pharmacovigilance Risk Assessment Committee) opublikował wyniki dotyczące wystąpienia zmian zakrzepowo-zatorowych u osób szczepionych tym produktem [47]. Na podstawie analizy wnioskuje się, że istnieje związek między występowaniem nietypowych zdarzeń zakrzepowo-zatorowych przebiegających z małopłytkowością, a szczepieniem preparatem Vaxzevria [47]. PRAC zaznaczył również, że mimo występujących incydentów, korzyści ze szczepienia preparatem firmy AstraZeneca przewyższają potencjalne ryzyko z nim związane. Po tym oświadczeniu Sekcja ds. hemostazy Polskiego Towarzystwa Hematologów i Transfuzjologów przedstawiła zalecenia zgodnie, z którymi powinno się kwalifikować pacjentów do szczepienia [44]. Według niektórych zaleceń [44]:

Odradza się szczepienia preparatem Vaxzevria osób, które w przeszłości przebyły prawdopodobną lub udokumentowaną małopłytkowość indukowaną heparyną oraz osób, które w przeszłości przebyły zakrzepicę zatok żylnych mózgu

Zaleca się obserwację pacjentów, którzy w przeszłości przebyli żylną chorobę zakrzepowo-zatorową lub są obciążeni zwiększonym ryzykiem związanym z wystąpieniem tej choroby, którzy nie przyjmują leków przeciwkrzepliowych przez 20 dni po zaszczepieniu.

Objawy, które mogą pojawić się między 4-20 dniem od podania szczepionki i będą wymagać konsultacji z lekarzem to: silny uporczywy ból głowy, zaburzenia widzenia, drgawki, ogniskowe objawy neurologiczne, duszność,

ból w klatce piersiowej lub brzucha, obrzęk lub niesymetryczny ból kończyny dolnej.

5.4. Szczepionka Ad26.COV.2-S firmy Janssen

Opis szczepionki

Szczepionka firmy Janssen zawiera zrekombinowany ludzki wektor adenowirusowy, który koduje glikoproteinę S „kolca” wirusa SARS-CoV-2 [45]. Białko to ulega ekspresji, dzięki czemu wytwarzane są przeciwciała neutralizujące oraz funkcjonalne przeciwko antygenowi S, co umożliwia ochronę przed chorobą wywoływaną przez SARS-CoV-2 [45].

Przechowywanie

Nieotwarta fiolka ze szczepionką Ad26.COV.2-S może być przechowywana w zamrażarce przez okres 2 lat w temperaturze od -25°C do -15°C [45]. Produkt ten może być również przechowywany w lodówce w temperaturze od 2°C do 8°C maksymalnie do 3 miesięcy, pod warunkiem, że będzie chroniony przed światłem [45]. Przekłuty produkt leczniczy przed podaniem, może znajdować się w temperaturze od 2°C do 8°C przez maksymalnie 6 godzin lub do 3 godzin w temperaturze pokojowej [45].

Nie należy zamrażać ponownie szczepionki po uprzednim rozmrożeniu.

Skuteczność

Ochotnicy biorący udział w randomizowanym badaniu byli w wieku ≥ 18 lat [45]. W badaniu nie mogły brać udziału osoby, które miały obniżoną odporność, osoby poddane terapii immunosupresyjnej w ciągu 6 miesięcy oraz kobiety w ciąży [45]. Z badania nie wykluczono osób, które miały potwierdzone stabilne zakażenie wirusem HIV [45]. Szczepionka jest podawana jednorazowo (jedna dawka) [45]. Badania wykazały, że szczepionka jest skuteczna i chroni przed zachorowaniem na COVID-19. Skuteczność wynosi 66,1% po 28 dniach od zaszczepienia [45].

Działania niepożądane

Najczęściej pojawiającymi się działaniami niepożądanymi wśród uczestników był: ból w miejscu wstrzyknięcia (48,6%), ból głowy (38,9%), zmęczenie (38,2%), ból mięśni (33,2%) i nudności (14,2%) [45]. Wśród 9% uczestników zaobserwowano gorączkę, która przekraczała 38,0°. Wszystkie objawy miały charakter łagodny, bądź umiarkowany i ustępowały po około 1-2 dniach [45].

6. ZASTOSOWANIE AMANTADYNY W MEDYCYNIE

Amantadyna jest lekiem neurologicznym, który ma zastosowanie w leczeniu zaburzeń ruchowych u pacjentów z chorobą Parkinsona, a w 1976 roku została zatwierdzona przez FDA (ang. Food and Drug Administration) do objawowego oraz profilaktycznego leczenia grypy wywoływanej wirusem grypy typu A [48].

6.1. Amantadyna a wirus SARS-CoV-2

Badania kliniczne

Badanie Mancilla-Galingo 2020 obejmowało badanie obserwacyjne retrospektywne, w którym 319 pacjentów leczonych było amantadyną. Otrzymane rezultaty porównano z wynikami 114 143 chorych, u których nie zastosowano terapii przeciwwirusowej ani antybiotykoterapii [49, 50]. Stosowanie amantadyny w monoterapii skutkowało wzrostem ryzyka zgonu wśród zakażonych SARS-CoV-2 [49, 50]. Autorzy przeprowadzonego badania, wskazują na brak skuteczności amantadyny w leczeniu COVID-19 [50]. Ze względu na otrzymane wyniki, autorzy nie zalecają kontynuowania dalszych prób klinicznych z ww. substancją [49, 50].

Badanie Aranda-Abreu 2020 obejmowało grupę 15 pacjentów i zostało przeprowadzone w Meksyku w warunkach ambulatoryjnych. Osobom zakażonym wirusem SARS-CoV-2, przez okres 14 dni podawano amantadynę. Większość badanych osób spożywało również azytromycynę, celekoksyb, kwas acetylosalicylowy, a 3 pacjentom z 15 podawano bromowodorek ipratropium z salbutamolem do nebulizacji [50]. U dwóch pacjentów konieczne było zastosowanie tlenoterapii z powodu obniżonej saturacji. Wszyscy pacjenci biorący

udział w badaniu, po 14 dniach leczenia, uzyskali dodatni wynik testu na przeciwciała IgG. Autorzy powyższego badania konkludują, iż amantadyna jest skuteczna w leczeniu COVID-19. Istotne jest, iż badanie nie posiadało grupy kontrolnej, a także brała w nim udział niska liczebność populacji [50].

Badanie Rejda 2020 zostało przeprowadzone w Polsce. Wzięło w nim udział 22 pacjentów z rozpoznanymi chorobami takimi jak: stwardnienie rozsiane (10 pacjentów), choroba Parkinsona (5 pacjentów) oraz z zaburzeniami kognitywnymi (7 pacjentów) [50]. Pacjenci zażywali amantadynę lub memantynę przez okres dłuższy niż 3 miesiące przed zachorowaniem na COVID-19. U żadnej z chorych osób nie wystąpiły objawy zakażenia koronawirusem. Autorzy wskazują, że amantadyna może mieć zastosowanie profilaktyczne [50].

Zastosowanie w leczeniu

Amantadyna jest lekiem, który wzbudza kontrowersje w związku z domniemaną skutecznością w leczeniu osób z powodu COVID-19. Aktualne wytyczne nie zalecają jej stosowania [49].

7. PODSUMOWANIE

Nowo odkryta choroba COVID-19, wywoływana przez wirusa SARS-CoV-2, stanowi wyzwanie dla pracowników opieki zdrowotnej. Leki przeciwwirusowe odgrywają ważną rolę w hamowaniu progresji chorób wirusowych, jednakże potrzebne są dalsze badania dowodzące ich skuteczności w walce z koronawirusem. Remdesiwir jest obecnie jedynym zarejestrowanym w Unii Europejskiej lekiem przeciwwirusowym stosowanym przeciwko SARS-CoV-2. Poprawę kliniczną i wysoką przeżywalność stwierdzono u pacjentów poddanych leczeniu deksametazonem z jednoczesnym zastosowaniem tlenoterapii. Wiele opublikowanych wyników badań wskazuje, iż leki takie jak chlorochina, hydroksychlorochina, azytromycyna nie są skuteczne w walce z chorobą. Tocilizumab – inhibitor interleukiny-6, jest lekiem stosowanym do leczenia reumatoidalnego zapalenia stawów. Stosowany w walce z COVID-19 może przyczyniać się do zmniejszenia odpowiedzi zapalnej, jednakże brakuje wystarczającej ilości dowodów, które dowodzą jego skuteczności. Największe nadzieje pokładane są w szczepieniach ochronnych. Wyszczepienie odpowiednio dużej ilości populacji może być przepustką do zakończenia pandemii i powrotu do normalnego życia.

REFERENCJE

1. <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/coronavirus-disease-covid-19>
2. Stasi C, Fallani S, Voller F, Silvestri C. Treatment for COVID-19: An overview. *Eur J Pharmacol.* 2020;889:173644. doi:10.1016/j.ejphar.2020.173644
3. Lei S, Jiang F, Su W, et al. Clinical characteristics and outcomes of patients undergoing surgeries during the incubation period of COVID-19 infection. *EClinicalMedicine.* 2020;21:100331. Published 2020 Apr 5. doi:10.1016/j.eclinm.2020.100331
4. Asselah T, Durantel D, Pasmant E, Lau G, Schinazi RF. COVID-19: Discovery, diagnostics and drug development. *J Hepatol.* 2021;74(1):168-184. doi:10.1016/j.jhep.2020.09.031
5. B. Yousefi, S. Valizadeh, H. Ghaffari, A. Vahedi, M. Karbalaee, M. Eslami. A global treatments for coronaviruses including COVID-19. *Journal of Cellular Physiology*, May 2020, doi: 10.1002/jcp.29785
6. Flisiak R., Parczewski M., Horban A., Jaroszewicz J., Kozielowicz D., Pawłowska M., Piekarska A., Simon K., Tomasiewicz K., ZarębskaMichałuk D.: Zalecenia diagnostyki i terapii zakażeń SARS-CoV-2 Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych z dnia 13 października 2020 roku. Aneks 2 do rekomendacji z 31 marca 2020 roku. *Med. Prakt.*, 2020; 11: 51–69
7. Song Y, Zhang M, Yin L, et al. COVID-19 treatment: close to a cure? A rapid review of pharmacotherapies for the novel coronavirus (SARS-CoV-2). *Int J Antimicrob Agents.* 2020;56(2):106080. doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.106080
8. Uzunova K, Filipova E, Pavlova V, Vekov T. Insights into antiviral mechanisms of remdesivir, lopinavir/ritonavir and chloroquine/hydroxychloroquine affecting the new SARS-CoV-2. *Biomed Pharmacother.* 2020;131:110668. doi:10.1016/j.biopha.2020.110668
9. Caddy S. Developing a vaccine for covid-19. *BMJ.* 2020;369:m1790. Published 2020 May 4. doi:10.1136/bmj.m1790
10. Jackson LA, Anderson EJ, Roupheal NG, et al. An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 - Preliminary Report. *N Engl J Med.* 2020;383(20):1920-1931. doi:10.1056/NEJMoa2022483
11. <https://www.yalemedicine.org/conditions/ards>

12. <https://pulsmedycyny.pl/czym-moze-grozic-burza-cytokinowa-w-przebiegu-covid-19-1106248>
13. Gold MS, Sehayek D, Gabrielli S, Zhang X, McCusker C, Ben-Shoshan M. COVID-19 and comorbidities: a systematic review and meta-analysis. *Postgrad Med.* 2020;132(8):749-755. doi:10.1080/00325481.2020.1786964
14. Biswas M, Rahaman S, Biswas TK, Haque Z, Ibrahim B. Association of Sex, Age, and Comorbidities with Mortality in COVID-19 Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis [published online ahead of print, 2020 Dec 9]. *Intervirology.* 2020;1-12. doi:10.1159/000512592
15. <https://www.mp.pl/covid19/zalecenia/258390,zalecenia-dotyczace-postepowania-u-osob-z-choroba-covid-19-leczonych-w-domu,1>
16. <https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/who-updates-clinical-care-guidance-with-corticosteroid-recommendations>
17. <https://www.mp.pl/covid19/leczenie/251451,leczenie-covid-19-w-swietle-aktualnych-wytycznych>
18. Cao B, Wang Y, Wen D, et al. A Trial of Lopinavir-Ritonavir in Adults Hospitalized with Severe Covid-19. *N Engl J Med.* 2020;382(19):1787-1799. doi:10.1056/NEJMoa2001282
19. RECOVERY Collaborative Group. Lopinavir-ritonavir in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial [published online ahead of print, 2020 Oct 5]. *Lancet.* 2020;396(10259):1345-1352. doi:10.1016/S0140-6736(20)32013-4
20. <https://www.mp.pl/covid19/leczenie/241727,badanie-recovery-lopinawir-z-rytonawirem-nieskuteczny-u-chorych-na-covid-19>
21. <https://www.mp.pl/covid19/leczenie/240834,remdesiwir-zarejestrowany-w-unii-europejskiej>
22. Flisiak R, Zarębska-Michaluk D, Berkan-Kawińska A, et al. Remdesivir-based therapy improved the recovery of patients with COVID-19 in the multicenter, real-world SARSTer study. *Pol Arch Intern Med.* 2021; 131: 103-110. doi:10.20452/pamw.15735
23. Goldman JD, Lye DCB, Hui DS, et al. Remdesivir for 5 or 10 Days in Patients with Severe Covid-19. *N Engl J Med.* 2020;383(19):1827-1837. doi:10.1056/NEJMoa2015301
24. RECOVERY Collaborative Group, Horby P, Lim WS, et al. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *N Engl J Med.* 2021;384(8):693-704. doi:10.1056/NEJMoa2021436

25. Libster R, Pérez Marc G, Wappner D, et al. Early High-Titer Plasma Therapy to Prevent Severe Covid-19 in Older Adults. *N Engl J Med*. 2021;384(7):610-618. doi:10.1056/NEJMoa2033700
26. [https://www.mayoclinicproceedings.org/article/S0025-6196\(21\)00140-3/pdf](https://www.mayoclinicproceedings.org/article/S0025-6196(21)00140-3/pdf)
27. Janiaud P, Axfors C, Schmitt AM, et al. Association of Convalescent Plasma Treatment With Clinical Outcomes in Patients With COVID-19: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA*. 2021;325(12):1185-1195. doi:10.1001/jama.2021.2747
28. Fajgenbaum DC, June CH. Cytokine Storm. *N Engl J Med*. 2020;383(23):2255-2273. doi:10.1056/NEJMr2026131
29. Tomasiewicz K, Piekarska A, Stempkowska-Rejek J, Serafińska S, Gawkowska A, Parczewski M, Niścigorska-Olsen J, Łapiński TW, Zarębska-Michaluk D, Kowalska JD, Horban A, Flisiak R. Tocilizumab for patients with severe COVID-19: a retrospective, multi-center study. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2021 Jan;19(1):93-100. doi: 10.1080/14787210.2020.1800453. Epub 2020 Aug 1. PMID: 32693650; PMCID: PMC7441800.
30. Tomazini BM, Maia IS, Cavalcanti AB, et al. Effect of Dexamethasone on Days Alive and Ventilator-Free in Patients With Moderate or Severe Acute Respiratory Distress Syndrome and COVID-19: The CoDEX Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2020;324(13):1307–1316. doi:10.1001/jama.2020.17021
31. <http://chpl.com.pl/ekspert-chorzy-na-covid-19-trafiacy-doszpitala-powinni-otrzymywac-leki-przeciwzakrzepowe,3023,artykul.html>
32. RECOVERY Collaborative Group, Horby P, Mafham M, et al. Effect of Hydroxychloroquine in Hospitalized Patients with Covid-19. *N Engl J Med*. 2020;383(21):2030-2040. doi:10.1056/NEJMoa2022926
33. Cavalcanti AB, Zampieri FG, Rosa RG, et al. Hydroxychloroquine with or without Azithromycin in Mild-to-Moderate Covid-19 [published correction appears in *N Engl J Med*. 2020 Nov 19;383(21):e119]. *N Engl J Med*. 2020;383(21):2041-2052. doi:10.1056/NEJMoa2019014
34. Furtado RHM, Berwanger O, Fonseca HA, et al. Azithromycin in addition to standard of care versus standard of care alone in the treatment of patients admitted to the hospital with severe COVID-19 in Brazil (COALITION II): a randomised clinical trial. *Lancet*. 2020;396(10256):959-967. doi:10.1016/S0140-6736(20)31862-6

35. Perrone F, Piccirillo MC, Ascierto PA, et al. Tocilizumab for patients with COVID-19 pneumonia. The single-arm TOCIVID-19 prospective trial. *J Transl Med.* 2020;18(1):405. Published 2020 Oct 21. doi:10.1186/s12967-020-02573-9
36. Gautret P, Million M, Jarrot PA, et al. Natural history of COVID-19 and therapeutic options. *Expert Rev Clin Immunol.* 2020;16(12):1159-1184. doi:10.1080/17446666X.2021.1847640
37. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/comirnaty-epar-product-information_pl.pdf
38. <https://www.mp.pl/szczepienia/aktualnosci/253426,co-juz-dzisiaj-wiemy-o-szczepionkach-przeciwko-covid-19>
39. <https://www.mp.pl/szczepienia/przeglad/przeglad-covid-19/255332,skuteczność-kliniczna-i-bezpieczeństwo-szczepionki-mrna-bnt162b2-przeciwko-covid-19-analiza-wstępna>
40. https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2021/20210106150575/anx_150575_pl.pdf
41. <https://www.mp.pl/szczepienia/przeglad/przeglad-covid-19/256317,skuteczność-kliniczna-i-bezpieczeństwo-szczepionki-mrna-1273-przeciwko-covid-19>
42. https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2021/20210129150842/anx_150842_pl.pdf
43. <https://www.mp.pl/szczepienia/przeglad/przeglad-covid-19/255331,skuteczność-kliniczna-i-bezpieczeństwo-szczepionki-wektorowej-chadox1-ncov-19-przeciwko-covid-19-analiza-wstępna>
44. <https://www.mp.pl/szczepienia/artykuly/wytyczne/263793,uaktualnione-stanowisko-sekcji-ds-hemostazy-polskiego-towarzystwa-hematologow-i-transfuzjologow-w-sprawie-szczepionki-przeciwko-covid-19-firmy-astrazeneca-07042021-r>
45. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/covid-19-vaccine-janssen-epar-product-information_pl.pdf
46. <http://chpl.com.pl/obecnie-na-swiecie-stosuje-sie-cztery-chinskie-szczepionki-ale-wciaz-niewiele-o-nich-wiemy,3018,artykul.html>
47. <https://www.mp.pl/szczepienia/aktualnosci/263694,stanowisko-ema-w-sprawie-szczepionki-firmy-astrazeneca-aktualizacja>
48. Araújo R, Aranda-Martínez JD, Aranda-Abreu GE. Amantadine Treatment for People with COVID-19. *Arch Med Res.* 2020;51(7):739-740. doi:10.1016/j.arcmed.2020.06.009

49. <https://www.aotm.gov.pl/media/2021/02/Farmakoterapia-COVID-19-Aktualizacja-wersja-2.1-5-luty-2021-r..pdf>
50. <https://www.aotm.gov.pl/media/2020/11/Przegląd-doniesien-naukowych-dla-amantadyny-stosowanej-w-leczeniu-COVID-19-wersja-1.1-19-listopada-2020-r..pdf>

POWRÓT DO ZDROWIA PO COVID-19: REHABILITACJA ODDECHOWA

Aleksandra Szczuraszyk, Dominika Majer, Piotr Limanówka,
Emilia Słabonska, Robert Kasza

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

Abstrakt:

COVID-19 jest chorobą wywołaną przez nowego ludzkiego koronawirusa SARS-CoV-2. Światowa Organizacja Zdrowia – WHO (z ang. World Health Organization) 30 stycznia 2020 r. ogłosiła epidemię, natomiast już 11 marca 2020 r. choroba COVID-19 została zakwalifikowana jako globalna pandemia. Jest to wysoce zakaźna choroba powodująca krótko- i długotrwałe dysfunkcje układu oddechowego. Większość osób przechodzi COVID-19 łagodnie w domu, bez potrzeby wizyty w szpitalu, a przebieg infekcji jest podobny do przeziębienia lub grypy. Natomiast, gdy przebieg choroby staje się coraz cięższy, wielu pacjentów może wymagać hospitalizacji. Pogarszający się stan chorego może wskazywać na rozwinięcie się zespołu ciężkiej niewydolności oddechowej. Takie osoby potrzebują leczenia, a następnie dalszej rehabilitacji na oddziałach intensywnej terapii. Krótkotrwałym celem rehabilitacji oddechowej jest załagodzenie objawów duszności oraz zminimalizowanie powikłań. Natomiast celem długoterminowym jest poprawa funkcji i jakości życia pacjenta. Lekarze i naukowcy analizując wszystkie konsekwencje proponują praktyczne opcje leczenia, oparte na aktualnych badaniach i doświadczeniu klinicznym. W celu przywrócenia funkcji układu oddechowego stosuje się techniki rehabilitacji tj. ćwiczenia aerobowe: chodzenie, jogging, pływanie itp., trening siłowy, trening równowagi oraz trening oddechowy, który obejmuje ćwiczenia w regulacji rytmu oddechu, pozycji ciała, ćwiczenia grupowych mięśni oddechowych, wibroterapię oraz szkolenie w zakresie odkrztuszania. Coraz popularniejszą metodą zalecaną przez fizjoterapeutów i lekarzy jest tlenoterapia, która polega na zwiększeniu stężenia tlenu w powietrzu wdychanym przez chorego. Skutkuje ona redukcją zaburzeń oddychania oraz poprawą dotlenienia narządów wewnętrznych.

Słowa kluczowe: koronawirus; rehabilitacja; ćwiczenia oddechowe; ćwiczenia aerobowe; tlenoterapia

Abstract

COVID-19 is an illness caused by new human coronavirus SARS-CoV-2. On 30th January 2020, World Health Organization declared epidemic, and on 11 March 2020, COVID-19 was announced a global pandemic. It is very contagious illness, causing short- or long-term dysfunction of respiratory system. Most patients undergo COVID-19 mildly at home, without hospitalization, and the symptoms are similar to regular cold or flu. In more severe cases, many patients need to be hospitalized. Those patients need hospital treatment and further rehabilitation on intensive care units (ICU). Worsening health situation can lead to respiratory failure. In these cases, rehabilitation on ICU is necessary. Major goals of short-term rehabilitation are: soothing shortness of breath and minimizing complications after COVID-19. Long-term rehabilitation is recommended for improvement of life quality of a patient. By analyzing all consequences, both, doctors and scientists, propose practical methods of treatment, based on current research and clinical experience. In order to restore respiratory system function, different rehabilitation techniques are used, for example: aerobic exercise like: jogging, walking, swimming etc. and breathing techniques, that include exercises of breathing rhythm and respiratory muscles, vibrotherapy and training on coughing up. Oxygen therapy is more and more popular method, recommended by doctors and physical therapists. Oxygen therapy consists of increasing oxygen level in air inhaled by a patient. This kind of therapy reduces breathing problems and results in better oxygenation of internal organs.

Key words: coronavirus, rehabilitation, breathing exercises, aerobic exercises, oxygen therapy

1. WPROWADZENIE

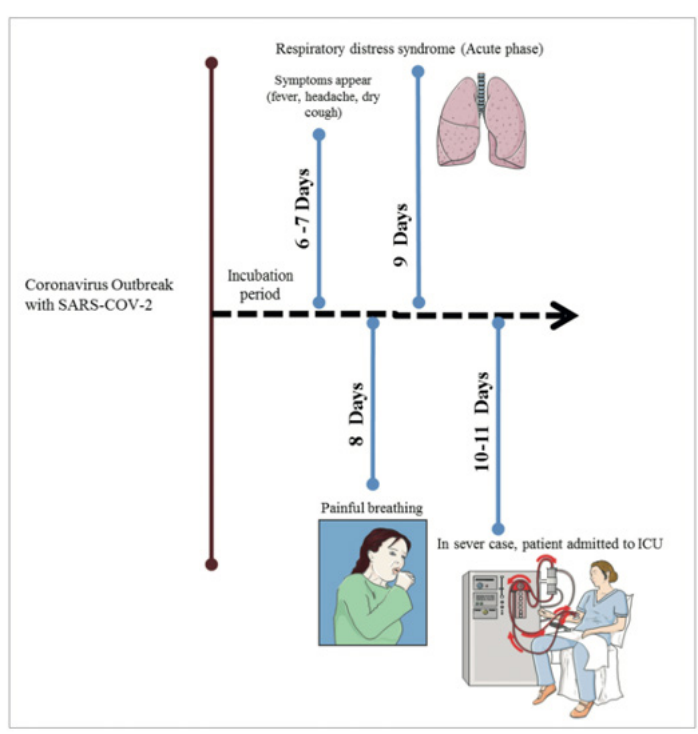
Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) pod koniec grudnia koronawirus 2019 (2019-nCoV) został zakwalifikowany jako nowy β -koronawirus, określany jako koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego 2 (ang. severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 SARS-CoV-2) [1,2,5]. Wirus może się dostać do organizmu żywiciela przez drogi oddechowe lub powierzchnie śluzowe oczu, ust i nosa [1,3]. Zakażeni pacjenci wykazują objawy infekcji górnych dróg oddechowych tj. ból gardła i wyciek z nosa. Chorobie towarzyszy również niska lub wysoka gorączka, uporczywy i suchy kaszel, bóle mięśni, ogólne zmęczenie, utrata smaku i/lub węchu, duszność, utrata apetytu oraz potwierdzone objawy zapalenia płuc. Do rzadszych objawów zakażenia wirusem SARS-CoV-2 należą wymioty, biegunki, zapalenia spojówek, wysypki skórne oraz przebarwienia palców u rąk i stóp. Objawy COVID-19 pojawiają się w miarę upływu kolejnych dni inkubacji wirusa (Ryc.1) [3-6].

COVID-19 to choroba wielonarządowa, która przebiega w czterech etapach [15]:

- stadium 1.: bezobjawowe lub skąpoobjawowe
- stadium 2.: pełnoobjawowe

- stadium 3.: “burza cytokinowa”
- stadium 4.: zespół ostrej niewydolności oddechowej (ang. acute respiratory distress syndrome ARDS)

Celem lekarzy różnych specjalności (pulmonologów, immunologów, lekarzy chorób zakaźnych) jest zatrzymanie rozwoju u pacjentów tzw. “burzy cytokinowej” [7], czyli gwałtownej reakcji systemu immunologicznego na infekcję. Niestety nie zawsze terapia przynosi oczekiwane skutki i taki pacjent w wyniku przejścia do ostatniego stadium choroby wymaga intensywnego leczenia takiego jak wentylacja mechaniczna, sedacja i stosowanie środków blokujących przewodnictwo nerwowo-mięśniowe [5]. Właśnie ta grupa pacjentów jest szczególnie narażona na rozwój nabytego osłabienia, który doprowadza do pogorszenia sprawności fizycznej.



Ryc. 1. Pojawienie się objawów COVID-19 w odniesieniu do dni inkubacji wirusa SARS-CoV-2. [Źródło: <https://www.europeanreview.org/wp/wp-content/uploads/4016-4026.pdf>], [3]

Większość pacjentów, a przede wszystkim pacjenci ze stadium 4, cierpią na zaburzenia oddychania, w tym: duszności, kaszel oraz ból w klatce piersiowej. U ponad 80% pacjentów mogą wystąpić zmiany w tkance płucnej tj. wysięk opłucnowy, rozstrzeń oskrzeli, konsolidacja płuc, a nawet zakrzepy krwi we wszystkich naczyniach krwionośnych, w szczególności w najmniejszych naczyniach w płucach [38, 39]. W związku z tym rehabilitacja przyciąga coraz większą uwagę. Medycyna rehabilitacyjna odgrywa istotną rolę w powrocie do zdrowia, dlatego nadzwyczaj ważne jest zbadanie dysfunkcji i dobranie odpowiednich potrzeb rehabilitacyjnych. Należy skupić się na ocenie układu oddechowego, która obejmuje ocenę czynności klatki piersiowej, amplitudę i ruchomość przepony oraz wzorca i czynności oddychania [17].

2. REHABILITACJA

Rehabilitacja jest wysoce ważną, lecz często niedocenianą metodą leczenia wielu chorób. Korzyści z rehabilitacji odnoszą pacjenci z pulmonologicznymi chorobami przewlekłymi, u których pozwala ona załagodzić dolegliwości, a także uniknąć pogorszenia choroby i zmniejszyć ryzyko ewentualnych powikłań. Rehabilitacja oddechowa opiera się na ćwiczeniach poprawiających wentylację płuc, zwiększających objętość płuc, usuwających wydzielinę, regulujących cykl oddechowy oraz usprawniających pracę mięśni szkieletowych, w tym funkcje przepony [4-6]. Rehabilitacja oddechowa może zostać wdrożona np. po operacji w obrębie klatki piersiowej, urazach płuc, a także u osób chorujących na przewlekłą obturacyjną chorobę płuc (POChP), dlatego właśnie znalazła zastosowanie u pacjentów z COVID-19, a w szczególności u pacjentów, u których konieczna była hospitalizacja [30].

Lekarze i specjaliści przedstawiają kilka ćwiczeń oddechowych, które mogą być stosowane u osób chorych w pełni samodzielnych, u których przebieg COVID-19 był łagodny. Są to ćwiczenia, które nie wymagają specjalistycznego sprzętu, a mogą poprawić jakość oddychania chorego, poprzez oczyszczanie dróg oddechowych, kontrolę oddechową i postawy [5,6], co doprowadza ostatecznie do przyspieszenia okresu rekonwalescencji. Są to m.in.: [23-25]

- Ćwiczenia rozluźniające

Rozluźnienie mięśni oraz zmniejszenie napięcia mięśni klatki piersiowej. Zmniejszenie wzmożonego napięcia mięśni międzybrowowych zewnętrznych uzyskuje się, utrzymując przez kilka minut klatkę piersiową w ustawieniu wydechowym.

- Ćwiczenia wydłużonego oddechu

Wykonywanie krótkiego wdechu z niewielkim udziałem pomocniczym mięśni wdechowych oraz spokojnego, długiego wydechu przez zwężone jak do gwizdania usta z równoczesnym wciąganiem brzucha i unikaniem parcia. Ćwiczenia wydechu przy użyciu nieelastycznej opaski obejmującej dolne partie klatki piersiowej.

- Ćwiczenia oddychania przeponowego

Ćwiczenia oddychania przeponowego wykonuje się w pozycji leżącej na wznak z poduszką pod głową, z kończynami dolnymi zgiętymi w stawach biodrowych i kolanowych oraz stopami opartymi o podłoże. Opór dla ruchów przepony w czasie wdechu uzyskuje się również, kładąc na nadbrzuszu chorego woreczek z piaskiem.

- Ćwiczenia zwiększające ruch oddechowy dolnożebrowy

Zwiększenie ruchu oddechowego dolnych odcinków klatki piersiowej i ruchów przepony uzyskuje się, stabilizując obręcz kończyn górnych, co powoduje ograniczenie ruchów górnych odcinków klatki piersiowej w czasie wdechu.

- Ćwiczenia oddychania z ruchem do “żabki”

Ćwiczenia wykonuje się w pozycji siedzącej lub stojącej. Ręce należy wyciągnąć przed siebie na wysokości ramion, dłonie powinny być złączone. W trakcie wdechu należy rozłączyć dłonie, ramiona przesunąć do tyłu z otwarciem klatki piersiowej. W momencie wydechu na poziomie mostka zaleca się ponownie złączyć dłonie i wyciągnąć do przodu.

Natomiast gdy pacjent nie jest w pełni samodzielny, program rehabilitacyjny opiera się na ćwiczeniach ruchowych pasywnych (zakres ruchu pacjenta nie wykracza poza jego możliwości ruchowe, ćwiczenia są wykonywane w obecności rehabilitanta), rozciąganiu mięśni międzyżebrowych oraz wibracjach mechanicznych klatki piersiowej za pomocą kamizelki pneumatycznej wibrującej. Program rehabilitacyjny takich osób obejmuje również ćwiczenia oddechowe przeponowe oraz oddychanie przez zaciśnięte usta. W kolejnym etapie programu poziom trudności wzrasta, dołączane są ćwiczenia na ergometrze, a także spirometr motywacyjny [8].

Spirometria motywacyjna jest techniką kliniczną, polegającą na wykorzystaniu spirometru motywacyjnego (urządzenie medyczne zawierające rurkę i ustnik przymocowany do miernika) (Ryc.2). Według zaleceń lekarza lub pielęgniarki, pacjent powinien usiąść na skraju łóżku i trzymać urządzenie pionowo. Powolne wdychanie powietrza przez ustnik skutkuje podniesieniem tłoku w środkowej kolumnie. Pacjentowi nakazuje się wstrzymanie oddechu przez

co najmniej pięć sekund przed wydechem. Ćwiczenie należy powtarzać 10 razy na godzinę, a po wykonaniu serii powtórzeń warto jest kaszleć, aby oczyścić płuca z nagromadzonego płynu. Za pomocą tego urządzenia osoba chora ćwiczy płuca i zachęca pęcherzyki płucne do pełnego napełnienia. Obserwujemy poprawę funkcji płuc, zmniejszenie nagromadzonego się śluzu, wzmocnienie płuc podczas dłuższego odpoczynku, a także zmniejszenie ryzyka wystąpienia infekcji płuc [28, 29].



Ryc. 2. Ogólna budowa i schematyczny sposób użycia spirometru motywacyjnego. [Źródło: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Incentive_Spirometer.png]

Należy wspomnieć, iż powstały również programy pilotażowe w zakresie rehabilitacji leczniczej po przebytej chorobie COVID-19. W projekcie określone są poszczególne modele fizjoterapii oddechowej, które są ukierunkowane na remisję choroby, poprawę wydolności wysiłkowej i krążeniowej, sprawności oddechowej, siły mięśniowej i ogólnej sprawności fizycznej oraz wsparcie zdrowia psychicznego. Klasyfikacja pacjenta do odpowiedniego modelu fizjoterapii oddechowej dokonuje się po przeprowadzeniu: testu wysiłkowego na ergometrze rowerowym/bieżni ruchomej lub testu 6-minutowego marszu. Ćwiczenia wykonywane są do osiągnięcia limitu tętna tzw. tętna submaksymalnego. Terapia obejmuje trening wydolnościowy, ćwiczenia oddechowe, trening

stacyjny, techniki ogólnousprawniające, techniki usuwania wydzielin z drzewa oskrzelowego, inhalacje oraz relaksacje [20].

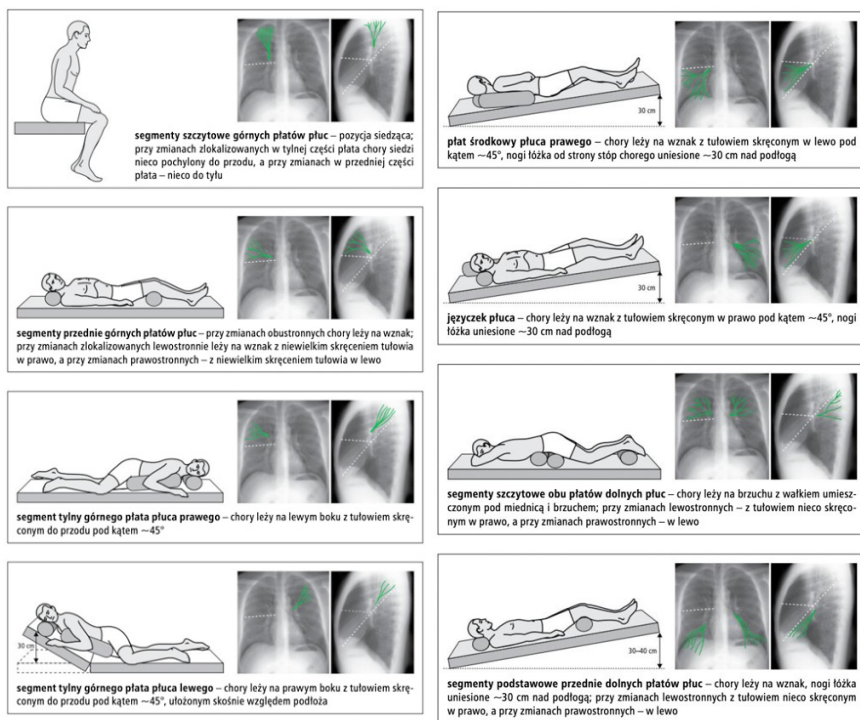
2.1. Techniki oczyszczenia dróg oddechowych

Techniki oczyszczania dróg oddechowych (z ang. airway clearance technique ACT) stosowane są w wielu chorobach układu oddechowego, w tym w mukowiscydozie, zapaleniu oskrzeli, a nawet w trakcie leczenia przewlekłej obturacyjnej choroby płuc, która często towarzyszy wirusowej chorobie COVID-19. Rozluźniają one gęsty i lepki śluz, dzięki czemu ułatwione jest usuwanie zakażonych wydzielin oskrzelowych, które potencjalnie mogą prowadzić do niedrożności dróg oddechowych i zalegania płwociny [9, 18]. Oczyszczanie dróg oddechowych może pomóc zmniejszyć częstotliwość infekcji płuc i poprawić ich czynność [27].

Jedną z technik jest aktywny cykl oddechowy (z ang. active cycle of breathing technique ACBT), który odbywa się w trzech etapach. Faza pierwsza służy do rozluźnienia wydzieliny i obejmuje swobodny wdech przez nos i wydech przez usta. Ramiona i górna część klatki piersiowej powinny być rozluźnione. Podczas wydechu zaleca się mieć zaciśnięte wargi (jak podczas całowania kogoś), tworzy to ciśnienie wsteczne utrzymujące drożność dróg oddechowych. Faza druga polega na wykorzystaniu ćwiczeń rozszerzających klatkę piersiową. Zaleca się głębokie oddychanie i wstrzymanie oddechu na trzy sekundy, aby przenieść powietrze do mniejszych dróg oddechowych. Ostatnia faza, czyli trzecia pomaga usunąć śluz z płuc poprzez kaszel i sapanie [18, 19].

Drenaż ułożeniowy jest jednym z rodzajów rehabilitacji stosowanej u pacjentów z trudnościami w odkasztuszaniu dużej ilości zalegającej wydzieliny w płucach. Technika ta polega na odpowiednim ustawieniu pozycji ciała pacjenta, aby dany odcinek dróg oddechowych znajdował się powyżej tzw. wnęki płuc, dzięki temu wydzielina może swobodnie spływać z małych oskrzeli do dużych i dalej do tchawicy, skąd jest wykrztuszana. U pacjentów, którzy są samodzielnymi terapeutami oddechowymi ma obowiązek wydać zalecenia i udzielić wskazówek dotyczących prawidłowego położenia ciała, aby wydzielina grawitacyjnie mogła opuścić drogi oddechowe (Rys.3). Natomiast u osób, u których samodzielność jest ograniczona można zastosować łóżka z możliwością otrzymania odpowiedniej pozycji. Pomagają tutaj liczne wezgłowia bądź uniesienie połowy łóżka o kąt 30°-45°-60° [16]. Odpowiedni czas trwania drenażu to mniej więcej 2-10 minut na jedną pozycję [26]. Według fizjoterapeutów postawa stojąca jest najodpowiedniejszą i najbardziej efektywną pozycją do

oddychania znacznie zwiększającą wydolność oddechową i poprawiającą funkcję płuc, dlatego należy dążyć, aby wszyscy podopieczni jak najdłużej przyjmowali pozycję stojącą.



Rys.3. Pozycje do drenażu ułożeniowego statycznego [Źródło: Mały podręcznik „Choroby wewnętrzne” 2010 pod redakcją Andrzeja Szczeklika i Piotra Gajewskiego]

2.2. Technika podwyższonego ciśnienia oddechowego oraz dodatniego ciśnienia końcowo-wydechowego

Technika podwyższonego ciśnienia oddechowego (z ang. positive expiratory pressure PEP) polega na korzystaniu z urządzenia wytwarzającego opór w trakcie wydechu. Urządzenie składa się z krótkiej rurki z zaworem zwrotnym, pierścieniem regulującym opór oraz ustnika bądź maski dla młodszych pacjentów. Prawidłowe używanie PEP-a nie jest trudne, ale wymaga podstawowego szkolenia z udziałem fizjoterapeuty. Samodzielna nauka może prowadzić do wykształcenia złych nawyków. Osoba chora wykonuje normalny, spokojny wdech natomiast wydech powinien być głęboki. Powietrze wydechowe przechodzi przez jednokierunkowy zawór z ustawionym oporem przez fizjoterapeutę/lekarza. PEP zapobiega zapadaniu się oskrzelików, zmniejsza

ilość infekcji, poprawia usuwanie śluzu, zwiększa czynnościową pojemność zalegającą oraz objętość oddechową płuc [31, 32].

Zmodyfikowaną formą tej techniki jest PEP oscylacyjny (z ang. oscillating positive expiratory pressure oPEP). Urządzenia te mają na celu ułatwienie usunięcia płwociny występującej w trakcie przewlekłej obturacyjnej choroby płuc [33]. Urządzenie jest bardzo proste w budowie, składa się z plastikowego korpusu z ustnikiem oraz ciężkiej metalowej kulki luźno osadzonej na wyjmowanym lejku. W czasie wydechu metalowa kulka zaczyna stawiać opór, powoli wzrasta ciśnienie. Podczas unoszenia się kulki spada ciśnienie i pod wpływem grawitacji opada zamykając przepływ powietrza. Powtarzający cykl unoszenia i podnoszenia się ma miejsce nawet kilkakrotnie w ciągu każdej sekundy wydechu. Ruchy te skutkują zmianą ciśnienia, które działają jak "oklepywanie". Zwiększone ciśnienie w oskrzelikach zapobiega ich zapadaniu się, co w konsekwencji poprawia usuwanie zalegającego śluzu [34]. Jednym z popularniejszych urządzeń oscylacyjnych jest tzw. Acapella. Dzięki innowacyjnej konstrukcji skupia zalety różnych metod fizjoterapii, w tym terapii dodatnim ciśnieniem wydechowym PEP i masażu wibracyjnego, eliminując jednocześnie niedogodności związane z ich stosowaniem. Przyrząd posiada wiele unikalnych cech tj. możliwość działania w różnych pozycjach, co pozwala na pracę z niezdyscyplinowanymi pacjentami, pozwala na precyzyjne dobranie terapii (może być stosowane zarówno z ustnikiem jak i maską twarząwą), jest nieuciążliwa dla pacjentów, w porównaniu z tradycyjnymi technikami fizjoterapii np. oklepywanie.

Technika dodatniego ciśnienia końcowo-wydechowego (z ang. positive end-expiratory pressure PEEP) jest stosowana rutynowo u pacjentów wentylowanych mechanicznie. Pozwala utrzymać tzw. czynnościową pojemność zalegającą, która zapobiega zapadaniu się pęcherzyków powietrznych. Prowadzona wentylacja prowadzi do zwiększenia pojemności życiowej płuc, pozwala na odpoczynek mięśni oddechowych [21]. Chorzy oddychają głębiej, odruch kaszlowy staje się skuteczniejszy [22].

2.3. Wibroterapia w rehabilitacji COVID-19

Ćwiczenia wykorzystujące wibracje całego ciała (ang. whole body vibration VBS) to nieinwazyjna forma terapii, która wpływa korzystnie głównie w rehabilitacji słabszych pacjentów, którzy nie mogą angażować się w żaden rodzaj aktywności fizycznej. W związku z tym do programu rehabilitacji, nawet na oddziałach intensywnej terapii włączane są ćwiczenia VBS. [10]. Dzięki

zastosowaniu pasywnego charakteru ćwiczeń VBS w przypadku COVID-19 można zauważyć kilka korzyści tj.:

- redukcję zmęczenia i ryzyka duszności
- poprawienie statusu immunologicznego i redoks, sprzyjające utrzymaniu homeostazy i utrzymaniu prawidłowej reakcji zapalnej w płucach
- ogólna poprawa jakości życia, umożliwiającą lepsze rokowania dla pacjentów obłożnie chorych, również hospitalizowanych w oddziałach intensywnej terapii [10]
- ułatwia usuwanie wydzieliny płucnej



Henriette 2012;27:143-53

Ryc. 4. Pozycja treningowa pacjentów na platformie wibracyjnej Zeptoring® (Scisen GmbH, Niemcy). [Źródło: <https://www.elsevier.es/es-revista-neurologia-english-edition--495-articulo-effects-vibrotherapy-on-postural-control-S2173580812000430>]

Autorzy badań [11] podejrzewają, że ćwiczenia VBS zmniejszają ryzyko rozwoju chorób przewlekłych poprzez indukowanie odpowiedzi immunologicznej i miokinowej. Seria intensywnych ćwiczeń na platformie wibrującej (Ryc.3) np. przysiady, powodują porównywalny poziom duszności, za to zachodzą z większą wydajnością [10]. Skurcz mięśni wywołany wysiłkiem fizycznym powoduje zwiększoną ekspresję genów i wydzielanie IL-6 przez miocyty szkieletowe [12], przyczyniając się tym samym do zmniejszenia stanu zapalnego w płucach. Badacze obserwują również wzrost odsetka

limfocytów T oraz neutrofilii [10, 12], to neutrofilom przypisuje się korzyści wynikające z prozapalnej odpowiedzi cytokinowej, która pomaga załagodzić reakcję zapalną wywołaną wysiłkiem fizycznym. Natomiast limfocyty T minimalizują i spowalniają progresję choroby.

Ćwiczenia fizyczne mają korzystny wpływ na utrzymanie i poprawę sprawności fizycznej, a także pozytywnie wpływają na redukcję stresu i poprawę samopoczucia. W dobie pandemii COVID-19 wykonywanie ćwiczeń, szczególnie przez osoby starsze, które praktykowały długie spacery zostały utrudnione. Możliwość samodzielnego wykonywania ćwiczeń za pomocą wibrujących materaców zyskują zainteresowanie. Samodzielnie prowadzona wibroterapia może poprawić kondycję i nastrój u osób starszych, którzy nie mogą swobodnie korzystać z wizyt domowych fizjoterapeutów oraz nie mogących opuszczać miejsca zamieszkania.

2.4. Tlenoterapia jako metoda wspomagająca rehabilitację

Tlenoterapia jest techniką leczniczą, polegającą na zwiększeniu stężenia tlenu w powietrzu wdychanym osoby chorej. Tlen jest lekiem stosowanym rutynowo na całym świecie, lecz tak samo jak w przypadku innych leków jego stosowanie należy dokładnie rozważyć [14]. Regularne uczęszczanie na zabiegi z użyciem życiodajnego pierwiastka wspomagają układ immunologiczny, a przede wszystkim powodują wzrost liczby fagocytów i limfocytów we krwi organizmu. To właśnie fagocyty i limfocyty odpowiedzialne są za walkę z drobnoustrojami chorobotwórczymi. Tlen korzystnie wpływa również na procesy regeneracji, redukuje stany zapalne w organizmie, co jest istotne przy zwalczaniu dolegliwości po COVID-19. Zabiegi stosuje się zarówno w celach profilaktycznych, ale również w okresie rekonwalescencji pacjenta. Mają one na celu zminimalizowanie powikłań, często związanych z zaburzeniem ciśnienia krwi, zakrzepami zatorowymi, zmniejszeniem wydolności oddechowej oraz ogólnym osłabieniem organizmu.

Tlenoterapia hiperbaryczna

Tlenoterapia hiperbaryczna (z ang. hyperbaric oxygen therapy HbOT) trafiła na listę leczenia eksperymentalnego WHO.

Jak zauważają naukowcy i liczni badacze utrata węchu i/lub smaku i silne bóle głowy dowodzą, iż wirus wnika do struktur mózgu poprzez opuszkę węchową. W efekcie, wiele pacjentów skarży się miesiącami na zmęczenie,

zawroty głowy czy nawet problemy z koncentracją. Rehabilitacja tlenem hiperbarycznym znajduje zastosowanie właśnie u osób z uszkodzeniami mózgu, w tym po przebytych udarach. Terapia HbOT obniża hipoksję spowodowaną przez wirusa SARS-CoV-2, poprzez oddychanie tlenem o zwiększonym stężeniu w warunkach ciśnienia wyższego niż atmosferyczne [15]. Terapia przeprowadzana jest wewnątrz przedziału zwanego komorą hiperbaryczną. Jest uznawana jako ugruntowana metoda terapeutyczna zwiększająca stężenie tlenu we wszystkich tkankach [35], używany tlen stymuluje aktywność fibroblastów, produkcję kolagenu, zmniejsza odpowiedź zapalną oraz ogranicza obrzęki, co poprawia mikrokążenie [37]. Podaje się, iż HbOT jest skuteczna w leczeniu zaburzeń naczyń obwodowych, ostrego pourazowego niedokrwienia obwodowego i poprawy gojenia się ran [35]. HbOT jest metodą skuteczną w wielu patologicznych przypadkach, chociaż ich skutki i funkcje nadal nie są wyjaśnione [36].

3. PODSUMOWANIE

Upośledzenie funkcji układu oddechowego przez COVID-19 zaburza zdolność do wykonywania codziennych czynności, wpływa negatywnie na wyniki zawodowe oraz utrudnia interakcję społeczną. Osoby dotknięte chorobą przechodzą na siedzący tryb życia, co zwiększa ryzyko rozwoju chorób współistniejących tj. otyłość, cukrzyca typu II oraz nadciśnienie tętnicze. Obecnie zarówno publiczne i prywatne placówki opieki medycznej, dostosowują się do panujących warunków wdrażając metody, pozwalające pacjentowi zakażonemu wirusem SARS-CoV-2 powrócić do odzyskania pełnej sprawności fizycznej. Rehabilitacja oddechowa powinna być prowadzona przez cały okres leczenia chorego, niezależnie od tego czy pacjent został hospitalizowany czy przechodził chorobę COVID-19 w domu. Ponadto skierowania na rehabilitację powinny być zindywidualizowane w zależności od stanu zdrowia potrzebującego. Większość programów fizjoterapii płucnej opiera się na metodach stosowanych wcześniej przy leczeniu dysfunkcji układu oddechowego oraz na doświadczeniu zdobytym, dzięki szybko rosnącej liczbie pacjentów z COVID-19. U pacjentów z obturacyjną chorobą płuc zaleca się rehabilitację pulmonologiczną obejmującą trening wydolnościowy, ćwiczenia oddechowe, techniki oczyszczania dróg oddechowych, inhalacje a także w skrajnych przypadkach tlenoterapię. Wykazano, iż ćwiczenia wysiłkowe zmniejszają negatywny wpływ siedzącego trybu życia i braku aktywności fizycznej w okresie hospitalizacji i/lub kwarantanny domowej. Udowodniono również, że rehabilitacja

oddechowa zwiększa wydolność wysiłkową oraz siłę mięśni oddechowych tj. mięśni międzyżebrowych oraz mięśni powłok brzucha, odgrywających istotną rolę w utrzymaniu funkcji oddechowych.

Promowanie ćwiczeń oddechowych i ich korzystnego wpływu na stan zdrowia pacjentów po COVID-19 jest korzystne nie tylko dla beneficjentów terapii, ale także ich rodzin. Sama świadomość prawidłowych zachowań może prowadzić do wykształcenia zdrowych nawyków zarówno wśród pacjentów jak i osób zdrowych.

REFERENCJE

1. Wu Y, Chen C, Chan Y. The outbreak of COVID-19: An overview. *Journal of the Chinese Medical Association*. 2020;83(3):217-20.
2. World Health Organization (WHO). Available from: <https://www.who.int/csr/don/12-january-2020-novel-coronavirus-china/en/>. Accessed on 31 March, 2020. 2020.
3. Chakraborty C, Sharma AR, Sharma G, Bhattacharya M, Lee SS. SARS-CoV-2 causing pneumonia-associated respiratory disorder (COVID-19): diagnostic and proposed therapeutic options. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020;24(7):4016-4026. doi:10.26355/eurev_202004_20871
4. Siddiq MAB. Pulmonary Rehabilitation in COVID-19 patients: A scoping review of current practice and its application during the pandemic. *Turk J Phys Med Rehab*. 2020;66(4):480-94.
5. Grigoletto I, Cavalheri V, Lima FFd, Ramos EMC. Recovery after COVID-19: The potential role of pulmonary rehabilitation. *Brazilian Journal of Physical Therapy*. 2020;24(6):463-4.
6. Sun T, Guo L, Tian F, et al. Rehabilitation of patients with COVID-19. *Expert Review of Respiratory Medicine*. 2020;14(12):1249-56.
7. Henderson LA, Canna SW, Schulert GS, et al. On the Alert for Cytokine Storm: Immunopathology in COVID -19. *Arthritis Rheumatol*. 2020;72(7):1059-63.
8. Arzani P, Khalkhali Zavieh M, Khademi-Kalantari K, Akbarzadeh Baghban A. Pulmonary rehabilitation and exercise therapy in a patient with COVID-19: A Case report. *Med J Islam Repub Iran*. 2020;34:106. Published 2020 Aug 26. doi:10.34171/mjiri.34.106

9. Pryor J, Tannenbaum E, Scott S, et al. Beyond postural drainage and percussion: Airway clearance in people with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2010;9(3):187-92.
10. Sañudo B, Seixas A, Gloeckl R, et al. Potential Application of Whole Body Vibration Exercise for Improving the Clinical Conditions of COVID-19 Infected Individuals: A Narrative Review from the World Association of Vibration Exercise Experts (WAVex) Panel. *IJERPH*. 2020;17(10):3650.
11. Tossige-Gomes R, Avelar N, Simão A, et al. Whole-body vibration decreases the proliferative response of TCD4+ cells in elderly individuals with knee osteoarthritis. *Braz J Med Biol Res*. 2012;45(12):1262-8.
12. Leal LG, Lopes MA, Batista ML. Physical Exercise-Induced Myokines and Muscle-Adipose Tissue Crosstalk: A Review of Current Knowledge and the Implications for Health and Metabolic Diseases. *Front Physiol*. 2018;9:.
13. Flisiak R., Parczewski M., Horban A., Jaroszewicz J., Kozielowicz D., Pawłowska M., Piekarska A., Simon K., Tomaszewicz K., Zarębska-Michaluk D.: Zalecenia diagnostyki i terapii zakażeń SARS-CoV-2 Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych z dnia 13 października 2020 roku. Aneks 2 do rekomendacji z 31 marca 2020 roku. *Med. Prakt.*, 2020; 11: 51–69
14. Cousins JL, Wark PA, McDonald VM. Acute oxygen therapy: a review of prescribing and delivery practices. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2016;11:1067-1075. Published 2016 May 24. doi:10.2147/COPD.S103607
15. Butler GJ, Al-Waili N, Passano DV, et al. Altitude mountain sickness among tourist populations: a review and pathophysiology supporting management with hyperbaric oxygen. *J Med Eng Technol*. 2011;35(3-4):197-207. doi: 10.3109/03091902.2010.497890
16. Tingbo L, Hongliu C, Yu C, Zuobing C, Qiang F, Wei Li H, et al. COVID-19 Zapobieganie i leczenie. Bielsko-Biała, Polska: Alpha Medica Press 2020.
17. Cieloszyk A, Lewko A, Śliwka A, Włoch T, Pyszora A. KORONAWIRUS SARS-CoV-2 Zalecenia do prowadzenia fizjoterapii dorosłych pacjentów z COVID-19. Krajowa Izba Fizjoterapeutów 2020. <https://cloud.gumed.edu.pl/s/MxxWMg2bnKZFkpB>

18. Lewis LK, Williams MT, Olds TS. The active cycle of breathing technique: A systematic review and meta-analysis. *Respiratory Medicine*. 2012;106(2):155-72.
19. Salehi Derakhtanjani A, Ansari Jaber A, Haydari S, Negahban Bonabi T. Comparison the Effect of Active Cyclic Breathing Technique and Routine Chest Physiotherapy on Pain and Respiratory Parameters After Coronary Artery Graft Surgery: A Randomized Clinical Trial. *Anesth Pain Med*. 2019;9(5):e94654. Published 2019 Oct 16. doi:10.5812/aapm.94654
20. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 13 lipca 2020 r. w sprawie programu pilotażowego w zakresie rehabilitacji leczniczej dla świadczeniobiorców po przebytej chorobie COVID-19/p>
21. Alsous F, Amoateng-Adjepong Y, Manthous CA. Noninvasive ventilation: experience at a community teaching hospital. *Intensive Care Med*. 1999;25(5):458-463. doi:10.1007/s001340050880
22. Pankow W, Hijeh N, Schüttler F, et al. Influence of noninvasive positive pressure ventilation on inspiratory muscle activity in obese subjects. *Eur Respir J*. 1997;10(12):2847-2852. doi:10.1183/09031936.97.10122847
23. Zha L, Xu X, Wang D, Qiao G, Zhuang W, Huang S. Modified rehabilitation exercises for mild cases of COVID-19. *Ann Palliat Med*. 2020;9(5):3100-3106. doi:10.21037/apm-20-753
24. Shukla M, Chauhan D, Raj R. Breathing exercises and pranayamas to decrease perceived exertion during breath-holding while locked-down due to COVID-19 online randomized study. *Complement Ther Clin Pract*. 2020;41:101248. doi:10.1016/j.ctcp.2020.101248
25. Felten-Barentsz KM, van Oorsouw R, Klooster E, et al. Recommendations for Hospital-Based Physical Therapists Managing Patients With COVID-19. *Phys Ther*. 2020;100(9):1444-1457. doi:10.1093/ptj/pzaa114
26. Leelarungrayub J, Eungpinichpong W, Klaphajone J, Prasannarong M, Boontha K. Effects of manual percussion during postural drainage on lung volumes and metabolic status in healthy subjects. *J Bodyw Mov Ther*. 2016;20(2):356-363. doi:10.1016/j.jbmt.2015.11.002
27. Lee AL, Burge AT, Holland AE. Airway clearance techniques for bronchiectasis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;2015(11):CD008351. Published 2015 Nov 23. doi:10.1002/14651858.CD008351.pub3

28. Overend TJ, Anderson CM, Lucy SD, Bhatia C, Jonsson BI, Timmermans C. The effect of incentive spirometry on postoperative pulmonary complications: a systematic review. *Chest*. 2001;120(3):971-978. doi:10.1378/chest.120.3.971
29. Tyson AF, Kendig CE, Mabedi C, Cairns BA, Charles AG. The effect of incentive spirometry on postoperative pulmonary function following laparotomy: a randomized clinical trial. *JAMA Surg*. 2015;150(3):229-236. doi:10.1001/jamasurg.2014.1846
30. Spruit MA. Pulmonary rehabilitation. *Eur Respir Rev*. 2014;23(131):55-63. doi:10.1183/09059180.00008013
31. Hoff IE, Hisdal J, Landsverk SA, Røislien J, Kirkebøen KA, Høiseth LØ. Respiratory variations in pulse pressure and photoplethysmographic waveform amplitude during positive expiratory pressure and continuous positive airway pressure in a model of progressive hypovolemia. *PLoS One*. 2019;14(9):e0223071. Published 2019 Sep 27. doi:10.1371/journal.pone.0223071
32. Phimphasak C, Ubolsakka-Jones C, Jones DA. Design and Function of a New Conical Positive Expiratory Pressure Device to Be Used During Exercise. *Respir Care*. 2018;63(8):966-980. doi:10.4187/respcare.06049
33. Alghamdi SM, Barker RE, Alsulayyim ASS, et al. Use of oscillatory positive expiratory pressure (OPEP) devices to augment sputum clearance in COPD: a systematic review and meta-analysis. *Thorax*. 2020;75(10):855-863. doi:10.1136/thoraxjnl-2019-214360
34. Morgan SE, Mosakowski S, Giles BL, Naureckas E, Tung A. Variability in expiratory flow requirements among oscillatory positive expiratory pressure. *Can J Respir Ther*. 2020;56:7-10. Published 2020 Mar 4. doi:10.29390/cjrt-2019-025
35. Yephuny SN, Lyskin GI, Fokina TS. Hyperbaric oxygenation in treatment of peripheral vascular disorders. *Int Angiol*. 1985;4(2):207-209.
36. Akcılar R, Akcılar A, Şimşek H, et al. Hyperbaric oxygen treatment ameliorates lung injury in paraquat intoxicated rats. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(10):13034-13042. Published 2015 Oct 1.

37. Kunnavatana SS, Quan SY, Koch RJ. Combined effect of hyperbaric oxygen and N-acetylcysteine on fibroblast proliferation. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005;131(9):809-814. doi:10.1001/archotol.131.9.809
38. Pan Y, Guan H. Imaging changes in patients with 2019-nCov. *Eur Radiol.* 2020;30(7):3612-3613. doi:10.1007/s00330-020-06713-z
39. Wu J, Pan J, Teng D, Xu X, Feng J, Chen YC. Interpretation of CT signs of 2019 novel coronavirus (COVID-19) pneumonia. *Eur Radiol.* 2020;30(10):5455-5462. doi:10.1007/s00330-020-06915-5

STAN PSYCHICZNY LUDZI W CZASIE KWARANTANNY

Robert Kasza, Dominika Majer, Piotr Limanówka,
Emilia Słabonska, Aleksandra Szczuraszyk

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

Abstrakt:

Ogólnoswiatowa pandemia COVID-19 wywołała chaos w wielu sektorach gospodarki oraz służbie zdrowia. Wirus uśmierca miliony osób na świecie, a lekarze walczą o życie każdego pacjenta. Przedstawiciele władz poszczególnych państw wprowadzają wiele restrykcji dotyczących higieny w miejscach publicznych oraz ograniczenie rozprzestrzeniania się wirusa drogą kropelkową poprzez nakaz stosowania maseczek a także ograniczenie kontaktów międzyludzkich dzięki czemu szanse na zachorowania maleją. Wprowadzenie w wielu krajach ograniczeń, wymusza na obywatelach pozostawanie w domu i stosowanie się do kwarantanny. Mija wiele miesięcy, odkąd ludzie nie organizują spotkań towarzyskich oraz nie odwiedzają rodzin. Odebrano im również możliwość korzystania z wielu przyjemności czy rozrywek w życiu codziennym, zaczynają izolować się od świata i dobrowolnie pozostają w domach. Zaczynają popadać w depresję, towarzyszą im stany lękowe, dotyka ich samotność, bezbronność i bezradność wobec sytuacji jaka nastąpiła. Wielu z nich popada w alkoholizm, a także coraz częściej sięga po używki lub leki psychotropowe. Pojawiają się również problemy w nawiązywaniu prostych kontaktów z innymi, przez co coraz bardziej stają się aspołeczni, obojętni na innych. W ramach programów rządowych, w wielu krajach stworzone zostały infolinie, które funkcjonują podczas kwarantanny i pomagają osobom samotnym. Wielu próbuje umilić sobie czas spędzony w domu, realizując swoje pasje, czy szukając nowego hobby. Ci, którzy nie radzą sobie z sytuacją, udają się do psychologa i z jego pomocą rozwiązują swoje problemy. Istnieją jednak przypadki osób, które nie poradziły sobie z zaistniałą sytuacją, co doprowadziło do samookaleczeń, a nawet śmierci. Pomimo ciężkiej sytuacji, ludzie z dnia na dzień starają się wrócić do rzeczywistości, poprzez komunikowanie się z resztą świata, różnego rodzaju fora i portale społecznościowe. Zaczynają się nawet spotykać w mniejszych grupach, zachowując przy tym dystans i szczególną ostrożność. Pogłębianie się wyżej wymienionych objawów, może prowadzić do tragedii, którym należy zapobiegać. Powinno się dążyć do przynajmniej częściowej minimalizacji ich efektów. Niezbędne jest podjęcie kroków zapobiegających próbom okaleczania, lękiem społecznym oraz samobójstwom w trosce o zdrowie i życie ludzkie.

Słowa kluczowe:

Abstract:

The global COVID-19 pandemic draws chaos in many sectors in worldwide economy and health service. The SARS-CoV-2 virus takes millions of people's life and doctors fight for a life of every citizen. The government comes forward and institutes a lot of sanitary restrictions, so that chances of getting sick diminish. Implementing the constraints in many countries forces the citizens to stay at home and abide by quarantine. After many months, people still don't meet with each other, don't visit their families and don't benefit by any enjoyments. People start isolating themselves from the world and staying at home voluntarily. The populace begins to become depressed, is accompanied by anxiety states, loneliness, defencelessness and helplessness in the actual reality. A lot of them lapse into alcoholism and more often get at drugs and psychotropic drugs. Establishing relations poses the people a difficulty, so they isolate from the society. Within government's program, there were created the special helplines in many countries, which function during the quarantine and help lonely people. However there are people, who don't cope with occurrent situation, what lead them to self-injury and suicides. Despite hard situation, day by day people bother to back to reality through the forum and social media. They start visiting each other in small groups, staying sharp and keeping distance. Developing above symptoms and situations may lead to tragedy, which should be prevented from. Effects should be at least partially minimized. It is essential to take steps to prevent attempts at mutilation, social anxiety and suicide for the sake of human health and life.

Key words:

1. WSTĘP

17 listopada 2019 r. w mieście Wuhan, leżącym w środkowej części Chin, rozpoczęła się epidemia zakaźnej choroby COVID-19, która wywoływana jest przez koronawirusa SARS-CoV-2. Wirus rozprzestrzeniał się na terenie całego kraju w szybkim tempie, a już w drugiej połowie stycznia 2020 r. potwierdzono pierwsze przypadki zakażenia poza granicami Chin, w tym w Europie. W lutym 2020 r. zaczęto odnotowywać gwałtowny wzrost liczby nowych zakażeń w innych rejonach świata, m.in. w Korei Południowej i we Włoszech. W wyniku dużej epidemiologii SARS-CoV-2, 11 marca 2020 r. Światowa Organizacja Zdrowia ogłosiła pandemię COVID-19, a dwa dni później podała, że jej centrum stała się Europa. SARS-CoV-2 to siódmy z kolei patogen z grupy koronawirusów, który udało się dotychczas odkryć. Wirus ten przenoszony jest drogą kropelkową podczas kasłania czy kichania i może wywoływać ostrą chorobę układu oddechowego. Według WHO najczęstszymi objawami zarażenia są: gorączka, suchy kaszel, zmęczenie. Ponadto u zarażonych można zaobserwować również ból mięśni, ból gardła, biegunkę, utratę węchu i/lub smaku. W celu uniknięcia dużej liczby zakażeń, rządzący wielu krajów stopniowo zaczęli wprowadzać szereg restrykcji, które znacznie wpłynęły na funkcjonowanie gospodarki, służby zdrowia oraz wielu innych sektorów życia

społecznego. W ten sposób ograniczono także swobodę przemieszczania się obywateli, w wyniku czego, społeczeństwo jest nadal zmuszone do pozostawania w domach. Wprowadzono obowiązkowe testowanie osób z objawami wskazującymi na nosicielstwo COVID 19. Osoby z pozytywnym wynikiem testu, a także podejrzane o kontakt z chorym czy przybywające spoza granic państwa, zwłaszcza z terenów objętych pandemią, mają obowiązek odbyć kilkunastodniową kwarantannę, o której długości czasu trwania decyduje rząd oraz odpowiednie instytucje. W wielu państwach jako środki zapobiegawcze rozprzestrzenianiu się wirusa, zostały wprowadzone również godziny policyjne, a nawet narodowe kwarantanny, które uniemożliwiają opuszczanie miejsc zamieszkania przez ludność, z wyłączeniem konieczności przemieszczania się w celu zaspokojenia potrzeb, związanych ze sprawami życia codziennego.

2. JAK POZOSTANIE W DOMU WPŁYNĘŁO NA STAN PSYCHICZNY OBYWATELI?

Wprowadzenie przez władzę restrykcji, wymusiło na ludności pozostanie w domach, zmianę swojego dotychczasowego trybu życia oraz przystosowanie się do funkcjonowania na co dzień w warunkach domowych. Jednakże wiemy, iż nic nie zastąpi człowiekowi normalności tak, jak codzienna rutyna oraz monotonia, które w okresie kwarantanny nabrały całkowicie innego znaczenia. Od początku pandemii to młodzież stanowiła zdecydowanie większą grupę osób pozostających w domach. Poprzez zdalne nauczanie dbali oni o swoją edukację, zaś w wolnym czasie spotykali się online z rówieśnikami, podczas gdy dorośli nadal musieli przemieszczać się, chociażby do pracy czy sklepów, w celu zaspokojenia najważniejszych potrzeb życiowych. Ludzie pozostawali zamknięci w domach przez wiele miesięcy i z trudem próbowali oswoić się z nową rzeczywistością. Dla niektórych zdalna edukacja czy praca, stały się wyzwaniem, z którym nie wszyscy sobie poradzili. Duża część społeczeństwa miała także problem z przystosowaniem się do nałożonej kwarantanny, która była całkowicie nowym doświadczeniem. Według badań dzieci i młodzież poddane kwarantannie doznawały większego cierpienia psychicznego, niż dzieci i młodzież, które tego nie doświadczyły. Ponad 60% badanych nieletnich przyznało, że podczas kwarantanny towarzyszyły im m.in. strach, bezradność oraz zmartwienie [1]. W związku z zaistniałym zagrożeniem i dotychczasową sytuacją epidemiologiczną, ludzie potrafili nawet przez kilka dni z rzędu nie przemieszczać się poza obszar własnego miejsca zamieszkania. Badania dowodzą, iż takie zachowania prowadzą do nieoczekiwanych rezultatów.

2.1. Problemy i skutki kwarantanny

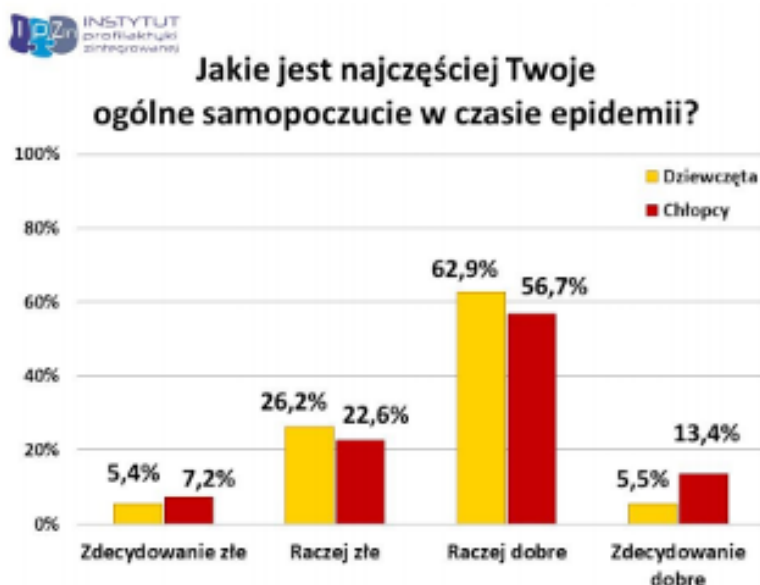
W jednym z przeglądów narracyjnych[2], w których wzięło udział łącznie 20 069 osób, zostały odnotowane najczęściej występujące objawy, które towarzyszyły ludziom podczas izolacji. Były nimi: niepokój, depresja, słaba jakość snu i brak aktywności fizycznej. Dystans społeczny związany z COVID-19 ma negatywny wpływ na zdrowie psychiczne i fizyczne osób starszych.

Ludność objęta kwarantanną, coraz częściej zaniedbuje się oraz zapomina o tym, jak ważne jest zdrowie, zarówno to fizyczne, jak i psychiczne, w wyniku czego coraz większą część społeczeństwa dotykają problemy zdrowotne oraz zaburzenia psychiczne. Badania wskazują na to, że duży odsetek ludzi zaczęło zmieniać swoje nawyki żywieniowe, jednocześnie wprowadzając do swojej diety żywność przetworzoną. Towarzyszy temu wzrost spożywania napojów alkoholowych. Stwierdza się również, iż spożywanie wyrobów tytoniowych, które na wiele osób mogą działać odstresowująco w związku z zaistniałą sytuacją, stale utrzymuje się na wysokim poziomie[3]. Inne badanie[4] dowodzi, że zmniejszenie całkowitego tygodniowego wydatku energetycznego, związanego z aktywnością fizyczną negatywnie wpływa na samopoczucie psychiczne. Wśród 2524 badanych 23.06% było mało aktywnych, zaś 41,76% uprawiało często sport. Podczas kwarantanny odsetek osób, które były mało aktywne zwiększył się o prawie 17 punktów procentowych, zaś odsetek osób aktywnych spadł o około 11 p. p.. Przyczyną zmniejszenia wydatków jest brak aktywności fizycznej. Prowadzenie zdrowego i aktywnego trybu życia jest niezbędne do funkcjonowania i pozytywnie wpływa na zdrowie psychiczne, zwiększając poczucie własnej wartości i odporność na stres. Zmniejsza się również poczucie lęku czy depresji

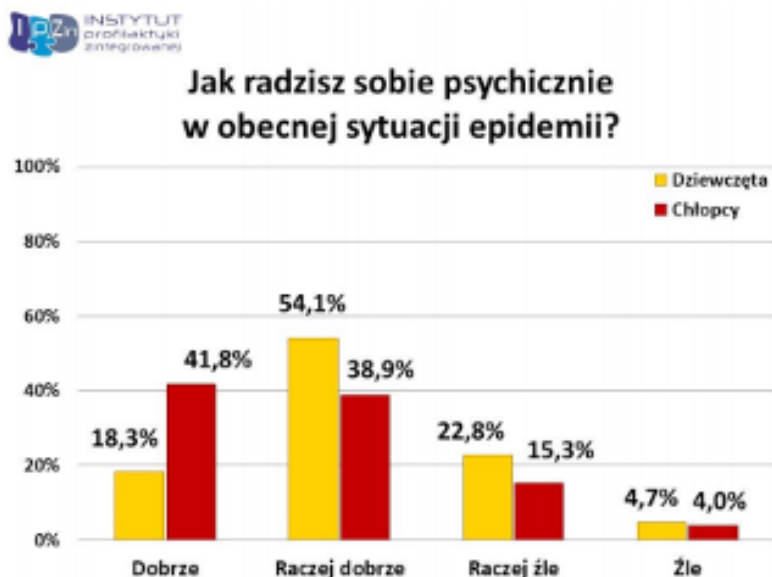
Innym z kolei badaniem [5], które przeprowadzono w Chinach na grupie osób w wieku 70+, było badanie funkcjonowania osób starszych w okresie pandemii. Wynik doświadczenia ukazał ciekawe rezultaty, w których prawie 10% ankietowanych wskazywało na depresję podczas izolacji, zaś 27% przyznało się do samotności. Pomimo dobrego stanu zdrowia i niskiego poziomu lęku oraz depresji, powinno się wprowadzić strategię, których celem powinno być złagodzenie negatywnego wpływu samotności na osoby starsze. W przeglądzie [6][7] opublikowanym na stronie „SAGE Journals” przedstawione są również problemy, z jakimi borykają się osoby starsze w czasie izolacji. Większości osób również towarzyszą wspomniane wcześniej lęk, strach i samotność. Wiele starszych osób doświadcza niepokoju, którego przyczyną okazuje się nowoczesna technologia, z którą starsze osoby nie mogą sobie poradzić. Nie

są w stanie „nadażyć” z postępującym rozwojem elektroniki, co skutkuje problemami związanymi z obsługą urządzeń, które są w tym okresie niezbędne do kontaktu zdalnego.

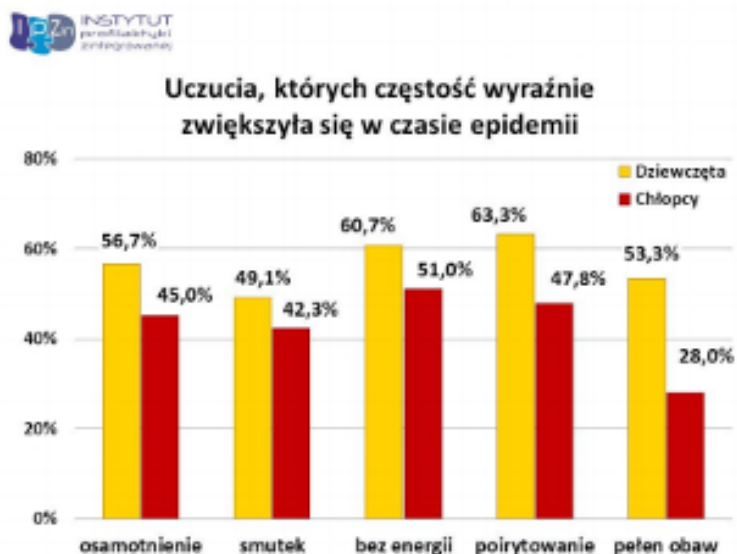
W raporcie [8] opublikowanym przez Instytut Profilaktyki Zintegrowanej przedstawione są dane, odnośnie przeżywania okresu izolacji przez młode pokolenie. Badane zostało przeprowadzone wśród 2079 osób w wieku szkolnym. 26,2% badanych dziewczyn i 22,6% chłopców przyznało się do „raczej złego” samopoczucia w czasie pandemii, zaś 5,4% dziewczynek i 7,2% chłopców jednoznacznie określili swoje samopoczucie jako „złe”. W tym samym badaniu 22,8% dziewczyn i 15,3% chłopców zadeklarowało, że „raczej źle” radzi sobie psychicznie z zaistniałą sytuacją, zaś 4,7% dziewczynek i 4% chłopców stwierdziło, że „źle” znosi psychicznie izolację. Jako główne przyczyny takiego samopoczucia badani podają: brak ruchu (53%), brak możliwości uprawiania sportu (42%), nuda (50%), niewystarczający dostęp do Internetu (27%) oraz brak dostępu do komputera w chwili potrzeby (17%). Ponadto wcześniej przeżyte stresujące sytuacje rodzinne, przemoc rodzinna czy zły stan majątkowy znacznie zwiększają ryzyko wystąpienia objawów problemów z psychiką podczas izolacji.[9]



Wykres 1. Wykres przedstawiający ogólne samopoczucie w czasie epidemii.



Wykres 2. Wykres przedstawiający jak młodzież radzi sobie psychicznie z sytuacją epidemii.



Wykres 3. Wykres przedstawiający uczucia pojawiające się podczas izolacji.

Podobne badanie [10], wykonane przy pomocy 4805 nastolatków płci żeńskiej, ukazuje niepokojącą tendencję do popadania w depresję osób w wieku szkolnym. Prawie 40% badanych kobiet cierpiało na depresję w różnym stopniu, który zależny był od wieku, zdalnego nauczania, nastawienia do pandemii COVID-19, czasu poświęcanego na sen i regenerację oraz czasu spędzonego na wykonywaniu aktywności fizycznej. Opublikowane na portalu „Serwis Zdrowie” badanie[11] „ujawniło, że 39 proc. osób w wieku od 18 do 29 lat uważa, że w czasie pandemii zwiększyły się u nich odczucia przewlekłego zmęczenia, osłabienia, senności, trudności z koncentracją. Respondenci z tej grupy wiekowej wskazywali też, że częściej zdarzały im się napady złości, agresji czy frustracji. Młodzi silnie odczuli również samotność. Zwiększenie tego odczucia deklarowało 41 proc. badanych, a 44 proc. o wiele gorzej przechodziło i trudniej sobie radziło z okresami przygnębienia czy nawet stanami depresyjnymi”.

Istnieją również inne badania[12], ukazujące ciekawe informacje na temat ogólnego samopoczucia oraz występowania stanów lękowych i depresyjnych podczas kwarantanny. Według nich, objawy te częściej diagnozowane są u kobiet oraz młodzieży. Najbardziej narażoną na negatywne skutki izolacji i pandemii grupą osób jest personel medyczny[12][13], który dba o życie obywateli. W czasie kwarantanny częściej dochodziło do sytuacji wyczerpania, lęku, zmęczenia czy nadmiernego stresu[14]



Wykres 4. Wykres przedstawiające odczucia ludzi podczas pandemii oraz różnice między przeżywaniem izolacji przez osoby starsze, a młodsze.

Dodatkowymi czynnikami, wpływającymi na zwiększone ryzyko występowania objawów wpływu izolacji, są stan finansowy rodzin oraz poziom rozwoju i potrzeb narodu. Według badania [15], zdrowie psychiczne było gorsze u młodych dorosłych, kobiet i osób mieszkających na obszarach najbardziej potrzebujących.

W czasie pandemii wiele osób doświadcza utraty bliskich, zostają oni również pozbawieni pracy oraz spotykają się z różnymi problemami zdrowotnymi, co jeszcze bardziej negatywnie wpływa na ich ogólne samopoczucie w czasie pandemii i przyczynia się do tego, że coraz częściej popadają w alkoholizm, czy sięgają po używki. Skutkiem złej diety i nadmiernego spożywania alkoholu mogą być problemy ze snem, nadmierna pobudliwość, a także wzmożona agresja.

Przekrojowe badanie epidemiologiczne[16] wykazało, że ważony współczynnik rozpowszechnienia zaburzeń psychicznych (z wyłączeniem otępienia) w Chinach wynosił 9,3%. Kwestią czasu jest, kiedy wskaźnik ten zacznie rosnąć, a zaburzenia psychiczne dotkną ludzi z całego świata.

W wielu badaniach znaczna część ankietowanych przyznaje się do tego, że boryka się z zespołem stresu pourazowego. Ludzie odczuwają także silne stany depresyjne, które uniemożliwiają normalne funkcjonowanie w obecnej rzeczywistości[12][16-22]. Stają się coraz bardziej agresywni, nerwowi i nadpobudliwi, a zaburzenia osobowości utrudniają komunikację z innymi osobami. Coraz bardziej izolują się od społeczeństwa, a ich zachowania odbiegają od norm społecznych. COVID-19 to globalne zagrożenie zdrowia publicznego, które ma ogromny wpływ na zdrowie psychiczne. Przedstawione przeglądy narracji, badania, opinie oraz raporty wykazały, "że osoby dotknięte pandemią mogą mieć duże obciążenie epidemiologiczne depresją, zaburzeniami lękowymi, stresem, napadem paniki, zaburzeniami somatyzacji, zaburzeniami snu, zaburzeniami emocjonalnymi, objawami PTSD, zachowaniami samobójczymi i wieloma innymi problemami ze zdrowiem psychicznym." [16]

2.2. Pomoc w czasie kwarantanny

Z biegiem czasu ludzie zaczynają dostrzegać problemy, wynikające z obecnie trwającej pandemii i szukają wielu sposobów, aby je rozwiązać. Pierwszym, łatwo dostępnym dla nich źródłem wiedzy, gdzie mogą zaczerpnąć informacji, bądź zgłosić się po pomoc, są wszelkiego rodzaju fora internetowe oraz portale społecznościowe tj. Facebook, Twitter, Instagram czy YouTube. Dzięki nim mogą dzielić się swoimi przemyśleniami oraz problemami, szukać

porad, jak sobie radzić w obecnej sytuacji, a także starać się wspierać nawzajem. W okresie epidemii to właśnie internet oraz media społecznościowe stały się miejscem spotkań i nawiązywania kontaktów. W ten sposób niektórzy starają się nie popaść w samotność, uciec przed depresją czy radzić sobie z nostalgią. Wspólna rozmowa na forach ułatwia ludziom nawiązywanie na nowo relacji oraz sprawia, że nie zamykają się w sobie i nadal chcą uczestniczyć w życiu społeczeństwa, pomimo zamknięcia.

Jednak dla wielu osób kontakt z innymi przez portale i media nie są wystarczające. W celu rozwiązania problemów oraz poprawy samopoczucia, korzystają z usług psychologa. Spotkanie ze specjalistą, odpowiednia rozmowa oraz profesjonalne podejście do sytuacji, z jaką boryka się pacjent, powoduje, że staje się on spokojniejszy oraz pełny nadziei lepsze jutro. Troska oraz wsparcie, jakie może okazać ludziom psycholog, daje im poczucie zrozumienia i bliskości oraz sprawia, że nie czują się osamotnieni w trudnym dla nich okresie życia. Specjalnie wyszkolony personel medyczny również może służyć pomocą psychologiczną podczas pandemii i domowej izolacji [23]. W wielu krajach dostępne są informacje na rządowych stronach, które pomagają w uzyskaniu pomocy psychologicznej podczas kwarantanny [24]

Powstały także specjalne infolinie, z których ludzie mogą bezpłatnie korzystać i w ten sposób kontaktować się ze specjalistami, w ramach powstałych teleporad, tj. Telefon zaufania Fundacji Znajdź Pomoc[25] czy Linia wsparcia psychologicznego, prowadzona przez Polski Czerwony Krzyż [26], a także wiele innych opublikowanych na stronach rządowych. Dzięki temu specjaliści mogą zdalnie próbować rozwiązywać problemy, z jakimi borykają się pacjenci. Jest to także rozwiązanie dla osób, które potrzebują stałej opieki psychologa czy psychiatry, dzięki czemu mogą regularnie uczestniczyć w konsultacjach i poradach online bez konieczności uczęszczania na sesje stacjonarnie.

“Zgodnie ze ścisłą polityką zapobiegania i kontroli epidemii, społeczny system opieki psychiatrycznej, internetowa służba zdrowia psychicznego, telemedycyna i inne środki mogą odgrywać ważną rolę w tej pandemii ze względu na swoje zalety, takie jak zmniejszenie ryzyka infekcji.”[16]

Mimo, iż istnieje wiele środków pomocy w wyżej wymienionych sytuacjach, to coraz częściej ludzie sięgają po leki psychotropowe. Gdy rozmowy z ludźmi czy psychologiem zawodzą i nie przynoszą rezultatu, ostatecznością okazują się właśnie medykamenty. Pomagają one w codziennych czynnościach, niwelując odczuwane na co dzień napady lęków, uczucie depresji czy senność. W wielu krajach w okresie epidemii/pandemii, medykamenty stały się łatwiej dostępne do użytku. Niekiedy mówi się nawet o zażywaniu “legalnych

narkotyków” [27]. Pomimo swojej wysokiej skuteczności leki psychotropowe powinny być ostatecznością w stosowanym leczeniu, a jednak wiele osób sięga po nie dużo wcześniej. Ludzie nie potrafią zrozumieć i stawić czoła problemom, jakie ich obecnie dotyczą, dlatego sięgają po leki, które przyćmiewają tylko skutki problemów, zamiast szukać innych metod, które mogłyby je rozwiązać i nie stanowiłyby dłużej dla nich trudności.

2.3. Jak ludność radzi sobie z zaistniałą sytuacją

Codzienna aktywność i dbanie o własne zdrowie psychiczne stało się kluczowym punktem w radzeniu sobie z izolacją. Według przeprowadzonego badania [17][38], grupa osób z Hiszpani w wieku 60+, która zaangażowana była w VPA i MVPA, lepiej radziła sobie z samotnością, zaś objawy depresji i złego samopoczucia zmalały. Badanie to pozwoliło również na rozpoczęcia opracowywania programów promocji zdrowia dla osób starszych w pozostałym okresie lub w przyszłości.

Wiele stron rządowych zawiera dokładne informacje, “jak radzić sobie podczas izolacji”. Eksperti podpowiadają, na co należy zwracać uwagę, czego unikać oraz często proponują, by starać się zapomnieć o trudnościach i skupić się na codzienności.[28] Ponadto na wielu forach powstały osobne sekcje przeznaczone na sytuację związaną z pandemią COVID-19. W wielu z nich możemy odnaleźć wskazówki, czy nawet wypowiedzi innych osób, które pomogą nam przetrwać kwarantannę [29][30]

Mimo wielu rozwiązań i środków niosących pomoc w rozwiązywaniu problemów oraz trudności w życiu codziennym, zaistniałych w związku z pandemią, obserwuje się przypadki osób, które w żaden sposób nie były w stanie poradzić sobie z nową rzeczywistością, do której powinni się dostosować. Takie osoby podczas kwarantanny nie radziły sobie psychicznie z samotnością, utratą bliskich oraz podejmowali drastyczne decyzje, nie potrafiąc pogodzić się z przykrymi doświadczeniami, które napotkały na swojej drodze. Badania wskazują, iż ponad 60% młodych osób doświadczyło myśli samobójczych podczas kwarantanny [31]. Za ich przyczynę uznaje się lęk i depresję, które dotyczą wiele osób, a ich źródłem może być chociażby samotność, spowodowana ciągłym spędzaniem czasu w domu oraz ciągle narzucanymi restrykcjami. Badania ukazują prawie ośmiokrotny wzrost myśli samobójczych. Jednakże obecny brak danych „w czasie rzeczywistym” na temat tendencji w zakresie samobójstw według World Suicide Prevention Day nie pozwala na

wyciągnięcie jakichkolwiek solidnych wniosków na temat zmian związanych z pandemią [32].

Do kolejnych drastycznych posunięć, spowodowanych narzuconą izolacją społeczeństwa, zaliczamy bezpośrednie zachowania autoagresywne, takie jak myśli i próby samookaleczania. Według badań osoby, udające się na izolację, częściej doświadczały myśli o samookaleczaniu się, niż osoby nieobjęte izolacją[9]. Większość prób samobójczych notuje się u młodzieży, która w ten sposób próbuje zwrócić na siebie uwagę i pokazać także, jak bardzo przytłacza ich obecna sytuacja. Jednakże pomimo wzrostu liczby osób myślących o samookaleczaniu, badania nie potwierdzają wzrostu realnych prób samookaleczenia wśród ludzi, jak to było w przypadku myśli samobójczych [33]. Według programu Evolve, rodzice nie skupiają wystarczająco uwagi swoim dzieciom, w wyniku czego rodzą się myśli o samookaleczaniu. Młodzi nie radzą sobie ze stresem, izolacją oraz samotnością, dlatego okaleczają swoje ciało, by dać sygnał rodzicom do działania i pokazać jak bardzo potrzebują pomocy w tak trudnej dla nich sytuacji [34]. Jak donosi polska strona Medonet[35], od marca 2020 r. wzrosła liczba młodych ludzi, którzy potrzebują pomocy. Problemem najczęściej jest obniżenie nastroju lub depresja, które mogą być skutkiem ogólnoswiatowej izolacji. Pomimo powszechnego problemu, jakim są próby samobójcze wśród młodzieży oraz próby samookaleczeń, sytuacja na świecie, związana z pandemią COVID-19, pogarsza sytuację psychiczną młodych osób, które zmuszone są pozostać w domach, co może doprowadzić do wzrostu liczby tych prób.

3. PODSUMOWANIE

Ogólnoswiatowa pandemia zdecydowanie wpłynęła na psychikę ludzi. Wprowadzone restrykcje znacząco pogorszyły sytuację ludności, która musiała zmierzyć się z nową codziennością. Samoizolacja i zamknięcie ludzi w domach przyczyniło się do powstawania w społeczeństwie negatywnych nastrojów i emocji, nawet w kontaktach między sobą. Wiele osób nadal nie jest w stanie psychicznie poradzić sobie z nową rzeczywistością i ciągle poszukuje wszelkich sposobów na zaradzenie temu. Według wielu relacji specjalistów, głównie ludzie, borykający się z problemami podczas pandemii, napotkają wiele trudności przy powrocie do starej rzeczywistości, gdy pandemia zostanie zażegnana. Niełatwo będzie im nawiązać relacje, a lęk i strach, które towarzyszyły im przez wiele miesięcy, sprawią, że będą zamknięci na nowe znajomości.[36][37] Rządzący, nakazując społeczeństwu izolację w ramach ochrony i zapewnienia

bezpieczeństwa, powinni zagwarantować także wszelką pomoc i wsparcie podczas kwarantanny, w szczególności pomoc mentalną. Również ludzie powinni wzajemnie otaczać się troską, pomagać, dbać nie tylko o siebie, ale także o najbliższych oraz pomagać znajomym, aby w tym trudnym dla wszystkich okresie minimalizować ilość przypadków osób, które nie są w stanie psychicznie poradzić sobie z pandemią. Należy robić wszystko, by unikać sytuacji, w których człowiek zaczyna dążyć do samookaleczeń czy samobójstwa, a nawet myśli o tak drastycznych decyzjach. Dobro i pomoc innym leży w ludzkiej naturze od wielu lat, dlatego nie zapominajmy o tym w tak trudnym dla nas okresie i starajmy się wspierać wzajemnie oraz wyczekiwać lepszej przyszłości. “To jest mały krok dla człowieka, ale wielki skok dla ludzkości”

REFERENCJE

- [1] Saurabh K, Ranjan S. Compliance and Psychological Impact of Quarantine in Children and Adolescents due to Covid-19 Pandemic. *Indian J Pediatr.* 2020;87(7):532-6.
- [2] Sepúlveda-Loyola W, Rodríguez-Sánchez I, Pérez-Rodríguez P, et al. Impact of social isolation due to COVID-19 on health in older people: Mental and physical effects and recommendations. *J Nutr Health Aging.* 2020;24(9):938-947.
- [3] Cicero AFG, Fogacci F, Giovannini M, et al. COVID-19-Related Quarantine Effect on Dietary Habits in a Northern Italian Rural Population: Data from the Brisighella Heart Study. *Nutrients.* 2021;13(2):309.
- [4] Maugeri G, Castrogiovanni P, Battaglia G, et al. The impact of physical activity on psychological health during Covid-19 pandemic in Italy. *Heliyon.* 2020;6(6):e04315.
- [5] Brown L, Mossabir R, Harrison N, Brundle C, Smith J, Clegg A. Life in lockdown: a telephone survey to investigate the impact of COVID-19 lockdown measures on the lives of older people (≥ 75 years). *Age Ageing.* 2021;50(2):341-346.
- [6] Gorenko JA, Moran C, Flynn M, Dobson K, Konnert C. Social isolation and psychological distress among older adults related to COVID-19: A narrative review of remotely-delivered interventions and recommendations. *J Appl Gerontol.* 2021;40(1):3-13.

- [7] Mukhtar S. Psychological health during the coronavirus disease 2019 pandemic outbreak. *Int J Soc Psychiatry*. 2020;66(5):512-516.
- [8] Ipzin.org. Accessed April 10, 2021. https://ipzin.org/images/dokumenty/RAPORT_Modziez_w_czasie_epidemii_2020_IPZIN.pdf
- [9] Guessoum SB, Lachal J, Radjack R, et al. Adolescent psychiatric disorders during the COVID-19 pandemic and lockdown. *Psychiatry Res*. 2020; 291(113264):113264
- [10] Zhou J, Yuan X, Qi H, et al. Prevalence of depression and its correlative factors among female adolescents in China during the coronavirus disease 2019 outbreak. *Global Health*. 2020;16(1):69.
- [11] COVID-19 groźny dla psychiki młodych ludzi. Pap.pl. Accessed April 10, 2021. https://zdrowie.pap.pl/psyche/covid-19-grozny-dla-psychiki-mlodych-ludzi?fbclid=IwAR0DJ0An0DGZJk9phsaJ352vaQXihZ3wVT3GS_K3zTHDPdERjjiR61yUg7U
- [12] Talevi D, Socci V, Carai M, et al. Mental health outcomes of the CoViD-19 pandemic. *Riv Psichiatr*. 2020;55(3):137-144.
- [13] Banerjee D, Rai M. Social isolation in Covid-19: The impact of loneliness. *Int J Soc Psychiatry*. 2020;66(6):525-527
- [14] Brooks SK, Webster RK, Smith LE, et al. The psychological impact of quarantine and how to reduce it: rapid review of the evidence. *Lancet*. 2020;395(10227):912-920.
- [15] Hubbard G, den Daas C, Johnston M, Dixon D. Sociodemographic and psychological risk factors for anxiety and depression: Findings from the Covid-19 health and adherence research in Scotland on mental health (CHARIS-MH) cross-sectional survey. *Int J Behav Med*. Published online 2021. doi:10.1007/s12529-021-09967-z
- [16] Wang S, Wen X, Dong Y, Liu B, Cui M. Psychological influence of coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic on the general public, medical workers, and patients with mental disorders and its countermeasures. *Psychosomatics*. 2020;61(6):616-624.
- [17] Wu T, Jia X, Shi H, et al. Prevalence of mental health problems during the COVID-19 pandemic: A systematic review and meta-analysis. *J Affect Disord*. 2021;281:91-8.

- [18] Kisely S, Warren N, McMahon L, Dalais C, Henry I, Siskind D. Occurrence, prevention, and management of the psychological effects of emerging virus outbreaks on healthcare workers: rapid review and meta-analysis. *BMJ*. 2020;369:m1642.
- [19] Hawryluck L, Gold WL, Robinson S, Pogorski S, Galea S, Styra R. SARS control and psychological effects of quarantine, Toronto, Canada. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(7):1206-12.
- [20] Brooks SK, Webster RK, Smith LE, et al. The psychological impact of quarantine and how to reduce it: rapid review of the evidence. *Lancet*. 2020;395(10227):912-20.
- [21] Hossain MM, Tasnim S, Sultana A, et al. Epidemiology of mental health problems in COVID-19: a review. *F1000Res*. 2020;9(636):636.
- [22] Vindegaard N, Benros ME. COVID-19 pandemic and mental health consequences: Systematic review of the current evidence. *Brain Behav Immun*. 2020;89:531-542.
- [23] Thombs BD, Bonardi O, Rice DB, et al. Curating evidence on mental health during COVID-19: A living systematic review. *J Psychosom Res*. 2020;133(110113):110113.
- [24] Gdzie dostać pomoc psychologiczną w trakcie pandemii? Gov.pl. Published June 25, 2020. Accessed April 10, 2021. <https://www.rpo.gov.pl/pl/content/FAQ-koronawirus-pomoc-psychologiczna-w-trakcie-pandemii>
- [25] Fundacja "Znajdź Pomoc." Znajdzipomoc.pl. Accessed April 10, 2021. <https://znajdzipomoc.pl/potrzebuje-pomocy/psycholog/>
- [26] Linia wsparcia psychologicznego PCK. Pck.pl. Published October 2, 2020. Accessed April 10, 2021. <https://pck.pl/linia-wsparcia-psychologicznego-pck/>
- [27] Dunlop A, Lokuge B, Masters D, et al. Challenges in maintaining treatment services for people who use drugs during the COVID-19 pandemic. *Harm Reduct J*. 2020;17(1):26.
- [28] Jak przetrwać kwarantannę? Psycholog odpowiada: daj sobie czas - Ministerstwo Rodziny i Polityki Społecznej - Portal Gov.pl. Gov.pl. Accessed April 10, 2021. <https://www.gov.pl/web/rodzina/jak-przetrwac-kwarantanne-psycholog-odpowiada-daj-sobie-czas>

- [29] Jak radzić sobie z samotnością podczas kwarantanny lub izolacji z powodu koronawirusa? Enel.pl. Published February 2, 2021. Accessed April 10, 2021. <https://enel.pl/enelzdrowie/koronawirus/jak-radzc-sobie-z-samotnoscia-podczas-kwarantanny-lub-izolacji-z-powodu-koronawirusa>
- [30] Jak sobie radzić w izolacji domowej czy w kwarantannie - Służba Więzienna. Gov.pl. Accessed April 10, 2021. <https://www.sw.gov.pl/aktualnosc/areszt-sledczy-w-koszalinie-jak-sobie-radzc-w-izolacji-domowej-czy-kwarantanny>
- [31] Kaparounaki CK, Patsali ME, Mousa DV, Papadopoulou EVK, Papadopoulou KKK, Fountoulakis KN. University students' mental health amidst the COVID-19 quarantine in Greece. *Psychiatry Res.* 2020;290:113111.
- [32] Suicide in the era of COVID-19 - on health. Biomedcentral.com. Published September 8, 2020. Accessed April 10, 2021. <http://blogs.biomedcentral.com/on-health/2020/09/08/suicide-in-the-era-of-covid-19/> [9] Daly Z, Slemon A, Richardson CG, et al. Associations between periods of COVID-19 quarantine and mental health in Canada. *Psychiatry Res.* 2021;295:113631.
- [33] John A, Okolie C, Eyles E, et al. The impact of the COVID-19 pandemic on self-harm and suicidal behaviour: a living systematic review. *F1000Res.* 2020;9(1097):1097.
- [34] Klein Y. Help! My Teen is Self-Harming During Coronavirus. *Evolvetreatment.com*. Published May 5, 2020. Accessed April 10, 2021. <https://evolvetreatment.com/blog/teen-self-harming-coronavirus/>
- [35] Mazur-Puchała A. Depresja i próby samobójcze wśród nastolatków w czasie pandemii. Niepokojące liczby. *Medonet.pl*. Accessed April 10, 2021. <https://www.medonet.pl/psyche/psychologia,depresja-i-proby-samobojcze-wsrod-nastolatkow-w-czasie-pandemii--niepokojace-liczby,artykul,34523060.html>
- [36] Moore R, McKie R, Hinsliff G, Adams T, Sodha S, Bell T. Life after Covid: will our world ever be the same? *The guardian*. <http://www.theguardian.com/world/2020/nov/29/life-after-covid-will-our-world-ever-be-the-same>. Published November 29, 2020. Accessed April 10, 2021.
- [37] Choi C, Bower B, Milius S, et al. What will life be like after the coronavirus pandemic ends? *Sciencenews.org*. Published December 18, 2020. Accessed April 10, 2021. <https://www.sciencenews.org/article/covid-19-coronavirus-life-after-pandemic-ends-predictions>

- [38] Carriedo A, Cecchini JA, Fernandez-Rio J, Méndez-Giménez A. COVID-19, psychological well-being and physical activity levels in older adults during the nationwide lockdown in Spain. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2020;28(11):1146-1155.

RDZENIOWY ZANIK MIĘŚNI – NOWA ERA TERAPII PRZYZYNOWEJ

Michał Nicze¹, Magdalena Wątroba², Nadia Woźniak², Aurelia Malczyk², Magdalena Świątko²

1. Studenckie Koło Naukowe przy Klinice Geriatrii, Katedra Chorób
Wewnętrznych i Metabolicznych, Wydział Nauk o Zdrowiu w
Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

2. Wydział Nauk Medycznych w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Abstrakt:

Rdzeniowy zanik mięśni (SMA – ang. spinal muscular atrophy) to rzadka (1:11000) choroba nerwowo-mięśniowa związana z mutacją genu *SMN1* na chromosomie 5q13 o dziedziczeniu autosomalnym recesywnym. W przebiegu SMA dochodzi do utraty motoneuronów rdzenia kręgowego, a za rozpoznaniem przemawiają m.in. symetrycznie osłabiona siła mięśniowa, wiotkie napięcie i zaniki mięśni oraz osłabienie/zniesienie odruchów głębokich. Obraz kliniczny zależy od liczby kopii genu *SMN2*. Im mniej kopii, tym choroba ujawnia się wcześniej, a objawy są bardziej nasilone. Wyróżniamy zatem różne fenotypy choroby: od SMA typu 0 o najgorszym rokowaniu (zgon zwykle w pierwszych tygodniach życia) do SMA typu IV o najlepszym rokowaniu (początek u dorosłych zdolnych do samodzielnego chodzenia). Nieleczony SMA jest chorobą postępującą i uważaną za najczęstszą genetyczną przyczynę śmierci dzieci do 2. roku życia. Do niedawna nie istniała żadna metoda leczenia przyczynowego – podnoszącego poziom funkcjonalnego białka SMN w motoneuronach i zapobiegającego ich dalszemu obumieraniu. Po postawieniu diagnozy lekarze mogli wtedy stosować jedynie leczenie objawowe i rehabilitacyjne u pacjentów, których stan z czasem pogarszał się. W 2016 r. nastąpił przełom, gdy amerykańska Agencja Żywności i Leków (FDA) dokonała rejestracji preparatu nusinersen (Spinraza®), pierwszego leku stosowanego w terapii przyczynowej SMA. Nusinersen znacząco poprawia rokowanie oraz jakość życia pacjentów, a efekt terapeutyczny jest szczególnie widoczny, kiedy pierwsze podanie leku nastąpi u szybko zdiagnozowanych pacjentów jeszcze bez rozwiniętych objawów klinicznych. W Polsce od 2019 r. leczenie nusinersenem zostało w pełni objęte refundacją i jest obecnie dostępne w ramach programu lekowego dla dzieci i dorosłych. Ponadto zaplanowane do końca 2022 r. całkowite wdrożenie ogólnopolskiego programu przesiewowego noworodków umożliwi wykrywanie tej rzadkiej choroby już w pierwszych dwóch tygodniach życia, zapewniając rozpoczęcie terapii na etapie przedobjawowym. W tej chwili na świecie zatwierdzone są jeszcze przynajmniej dwa inne leki celowane, a mianowicie terapia genowa preparatem onasemnogen abeparwówek (Zolgensma®) oraz preparat risdiplam (Evrysdi™). Pozostaje mieć nadzieję, że w przyszłości nowe leki wraz z odpowiednią fizjoterapią spowolnią postęp

choroby, znacząco wydłużają czas przeżycia i zagwarantują dobrą jakość życia wszystkim pacjentom, czyniąc z SMA dobrze kontrolowaną chorobę przewlekłą, pozwalającą chorym, cierpiącym nawet na jej najcięższe typy, dożyć wieku, kiedy będą mogli zostać objęci opieką geriatryczną zupełnie z innych przyczyn.

Słowa kluczowe: rdzeniowy zanik mięśni, SMA, nusinersen, terapia genowa, screening noworodków

Abstract:

Spinal muscular atrophy (SMA) is a rare (1:11000) neuromuscular autosomal recessive disease caused by mutations in the *SMN1* gene located in a 5q13 region. SMA results in the loss of motor neurons in the spinal cord and the following symptoms may suggest the diagnosis: symmetrical muscle weakness, hypotonia, muscle atrophy and hyporeflexia/areflexia. The clinical presentation depends on the number of *SMN2* gene copies. The lesser the number, the sooner the symptoms appear and the more severe they are. Therefore, we can describe several phenotypes: from SMA type 0 with a very poor prognosis (death in the very first weeks after birth) to SMA type IV with the best prognosis (affecting adults who are able to walk on their own). Untreated SMA, being a progressive disorder, is a leading inherited cause of death in children under 2 years old. Until recently, no form of targeted treatment was available – the one to increase the functional SMN protein level in motoneurons, preventing their further degeneration. Doctors, having diagnosed SMA, were only able to provide symptomatic treatment and rehabilitation in their patients deteriorating over time. In 2016 a major breakthrough appeared, when The U.S. Food and Drug Administration (FDA) registered nusinersen (Spinraza®), the first targeted drug for SMA. Nusinersen significantly improves both patients' prognosis and the quality of life. The therapeutic effect is particularly visible, when the first dose is administered to the early diagnosed patients still without developed symptoms. In Poland since 2019 the treatment with nusinersen has become entirely refunded and now is available for both children and adults within the drug program. Additionally, the implementation of Polish nation-wide newborn screening program for SMA, which will have been completed by the end of 2022, will enable the detection of this rare disease in the very first two weeks after birth, providing the start of nusinersen administration at the presymptomatic stage. Currently worldwide there are at least two other targeted drugs used, namely, onasemnogen abeparvovek (Zolgensma®), being a gene-replacement therapy, and risdiplam (Evrysdi™). Hopefully, in the future all these modern drugs together with appropriate physiotherapy will significantly slow down the disease progression, prolong life expectancy and guarantee a good-quality life in every single patient, making SMA a well-controlled chronic disease and enabling people, even with the most severe types, to live to an elderly age.

Keywords: spinal muscular atrophy, SMA, nusinersen, gene-replacement therapy, newborn screening

1. WPROWADZENIE

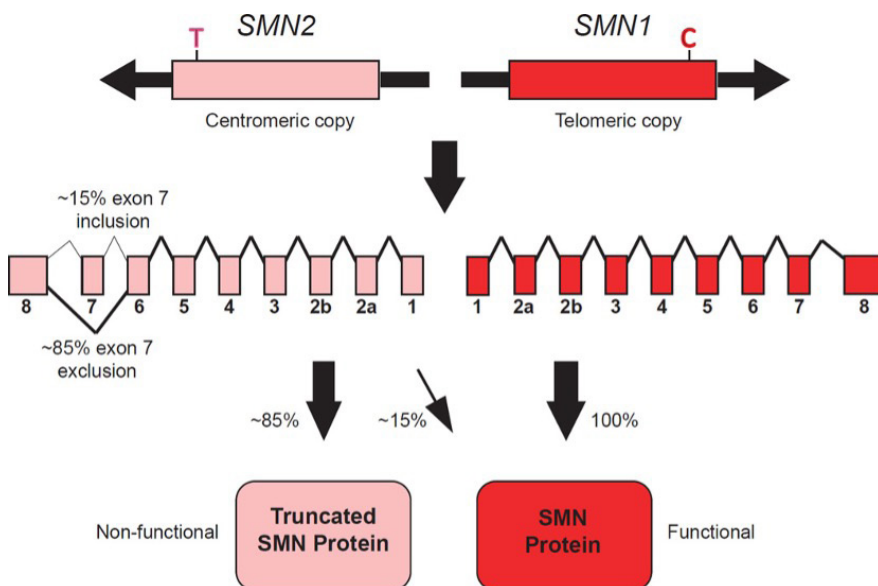
Rdzeniowy zanik mięśni pierwotnie został opisany w 1891 r. przez Wernikę u dwóch braci w wieku niemowlęcym [1], a następnie w latach 1893-1900 przez Hoffmanna u siedmiu innych dzieci [2-4]. W 1956 r. Kugelberg i Welander opisali lżejszą formę choroby, niemniej jednak wspólnymi cechami analizowanych przypadków był zanik komórek rogów przednich rdzenia

kręgowego oraz związane z tym objawy w postaci symetrycznie występującego osłabienia siły mięśniowej głównie proksymalnych mięśni kończyn i mięśni osiowych [5]. W 1967 r. Dubowitz przedstawił w zarysie podział choroby na trzy różne grupy [6], a w 1991 r. formalnie zdefiniowano i wyróżniono trzy fenotypy SMA w zależności od ostatecznie osiąganego rozwoju motorycznego oraz wieku ujawnienia pierwszych objawów choroby [7]. W kolejnych latach wprowadzano dalsze modyfikacje – dokonano podziału SMA typu III na podtypy w oparciu o czas powstania choroby, dodano typ IV dla pacjentów, u których choroba pojawia się dopiero w wieku dorosłym oraz uwzględniono typ 0 dla pacjentów z początkiem choroby w okresie prenatalnym i zgonem w pierwszych tygodniach życia. Pomimo tego praktycznego podziału klinicznego, szczegółowo definiującego ciężkość i rokowanie poszczególnych typów, nadal są pacjenci, których nie można precyzyjnie zakwalifikować do konkretnej grupy.

Dopiero w 1995 r., ponad sto lat od pierwszego opisu przypadku tego schorzenia, odkryto molekularną przyczynę SMA, opisując mutację genu *SMN1* (ang. survival motor neuron 1) na chromosomie 5q13 [8]. Poznanie tego defektu genetycznego, będącego potencjalnym punktem uchwytu w terapii, stanowiło podstawę do opracowania w ostatnich latach nowych leków przyczynowych, które zaczynają modyfikować dotychczasowy obraz kliniczny SMA, dając pacjentom nadzieję na znaczną poprawę ich rokowania.

2. ETIOPATOGENEZA

U ludzi istnieją dwie formy genu *SMN* – telomerowa forma (*SMN1*) i centromerowa forma (*SMN2*). W wyniku transkrypcji genu *SMN1* powstaje mRNA, które koduje funkcjonalne białko SMN. Gen *SMN2* jest niemal identyczny z genem *SMN1*, jednak niewielka różnica w kolejności zasad azotowych przekłada się na znaczne pominięcie egzonu 7. w procesie transkrypcji [9-12], przyczyniając się finalnie do powstania tylko ok. 15% białka SMN o prawidłowej budowie i funkcji (rycina 1.) [13]. Rdzeniowy zanik mięśni, spowodowany mutacją genu *SMN1* na chromosomie 5q13, prowadzi do niedoboru funkcjonalnego białka SMN, a deficyt tej proteiny skutkuje wybiórczą utratą motoneuronów w rogach przednich rdzenia kręgowego [14], co ma swoje implikacje kliniczne w postaci objawów nerwowo-mięśniowych o różnej ciężkości.



Rycina 1. Model ekspresji genów *SMN1* i *SMN2*. Pacjenci z SMA mają mutacje (najczęściej delecje) w obu kopiach genu *SMN1*. Chociaż ekspresja genu *SMN2* zachodzi prawidłowo, to z powodu zamiany zasad azotowych (C na T) w pozycji 6. egzonu 7. większość pre-mRNA powstaje z pominięciem tego egzonu. Skutkuje to skróceniem białka SMN, które jest przez to niestabilne i niefunkcjonalne. Jedynie niewielka część (ok. 15%) funkcjonalnego białka SMN o prawidłowej długości powstaje z *SMN2* pre-mRNA zawierającego sekwencję egzonu 7. [opracowanie własne], [13]

3. EPIDEMIOLOGIA

SMA to rzadka choroba genetyczna, a częstość jej występowania szacuje się na ok. 1:11000 urodzeń. Można przyjąć zatem, że populacyjnie nosicielem jest co 54. osoba [15]. Badania polskich naukowców sugerują jednak, że nosicielem SMA może być nawet co 35. osoba w populacji, a choroba może występować częściej niż uważano (zachorowalność 1:7127 w Warszawie oraz 1:9320 w skali kraju), przypuszczalnie nie będąc do końca należycie diagnozowana [16].

4. OBRAZ KLINICZNY

W przebiegu SMA dochodzi do utraty motoneuronów rdzenia kręgowego, a za rozpoznaniem przemawiają następujące objawy: symetrycznie osłabiona siła mięśniowa (najbardziej wyrażona w mięśniach obręczy biodrowej,

mięśniach osiowych i proksymalnych mięśniach kończyn), wiotkie napięcie i zaniki mięśni, osłabienie lub zniesienie głębokich odruchów ścięgniastych, fascykulacje mięśni języka czy drżenia rąk. Rozwój psychiczny i intelektualny jest w normie. Obraz kliniczny zależy od liczby kopii genu *SMN2*, kodującego analogiczne białko do białka kodowanego przez gen *SMN1*, chociaż posiadającego mniej stabilne mRNA. Im mniej kopii genu *SMN2*, tym choroba ujawnia się wcześniej, objawy są bardziej nasilone, a rokowanie jest gorsze [17, 18]. Wyróżniamy zatem następujące fenotypy choroby: SMA typu 0, czyli postać wrodzoną (okresu prenatalnego) o bardzo złym rokowaniu i często letalną jeszcze przed narodzeniem lub w pierwszych miesiącach życia; SMA typu I (choroba Werdniga-Hoffmanna) jako najczęstszą postać, o ciężkim przebiegu i złym rokowaniu z objawami pojawiającymi się w pierwszym półroczu życia (dziecko nigdy nie osiągnie zdolności samodzielnego siedzenia); SMA typu II (choroba Dubowitza) rozwijający się w pierwszych 18 miesiącach życia (dziecko nabywa umiejętności samodzielnego siadania, lecz nigdy nie będzie w stanie chodzić); SMA typu III (choroba Kugelberga-Welander) objawiający się po okresie niemowlęcym z osiągnięciem zdolności samodzielnego chodzenia; SMA typu IV jako najlepiej rokujący typ, ujawniający się u dorosłych (najczęściej w 3. dekadzie życia) z możliwością samodzielnego chodzenia w sposób porównywalny do populacji (tabela 1.) [19].

Tabela 1. Podział kliniczny fenotypów SMA u pacjentów leczonych standardową terapią objawową (przed erą nowych leków przyczynowych), ASD (ang. atrial septal defect) – ubytek w przegrodzie międzyprzedsionkowej [opracowanie własne], [19-21]

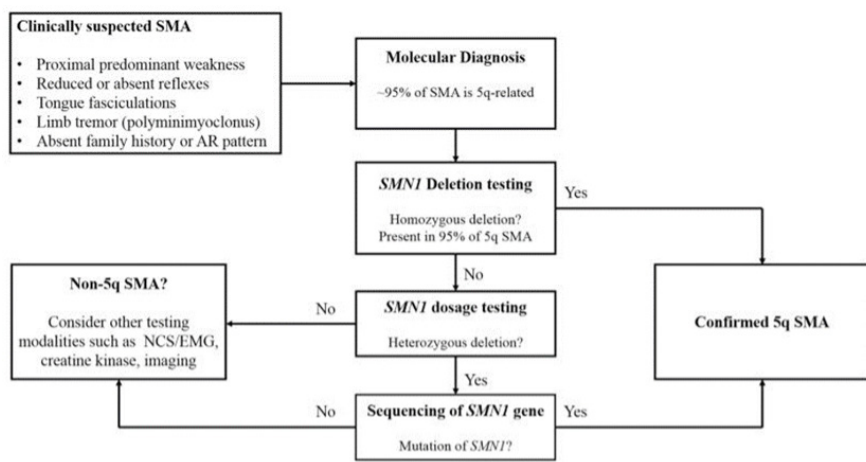
Typ	Częstość	Wiek zachorowania	Czas przeżycia	Rozwój ruchowy (kamienie milowe)	Inne cechy	Liczba kopii genu <i>SMN2</i>
0	Bardzo rzadko	Okres prenatalny	Kilka tygodni, < 6. m. ż.	Nieosiągnięty	- Osłabione ruchy płodu - Niewydolność oddechowa przy narodzeniu - Ciężka hipotonia noworodka - Ciężkie osłabienie siły mięśniowej - Nieobecne głębokie odruchy ścięgniaste - Obustronne porażenie nerwów twarzowych	1

					- ASD - Wrodzona sztywność stawów	
I	Ok. 45 %	> 6. m. ż.	Mediana przeżycia 8.-10. m. ż.	Częściowa kontrola główki, siedzi tylko z pomocą	- Brak całkowitej kontroli główki - Łagodna sztywność stawów - Minimalnie osłabiona siła mięśni twarzy (lub w normie) - Zmienna zdolność ssania i trudności w połykaniu	2
II	Ok. 20 %	6.-18. m. ż.	70% dożyje 25. m. ż.	Posadzone siedzi samodzielnie, nigdy nie wstanie, nigdy nie będzie chodzić	- Opóźnienie rozwoju ruchowego, utrata umiejętności motorycznych - Osłabienie lub zniesienie głębokich odruchów ścięgniastych - Osłabienie siły mięśni proksymalnych - Drżenia posturalne palców rąk	3-4
III	Ok. 30 %	> 18. m. ż. (podtyp III a < 3. r. ż.) (podtyp III b > 3. r. ż.)	Podobnie do populacji	Samodzielnie chodzi	- Osłabienie siły mięśni proksymalnych (trudności z chodzeniem po schodach i bieganiem) - Utrata umiejętności motorycznych - Zmęczenie - Drżenia posturalne palców rąk - Zniesienie odruchu kolanowego	3-4
IV	< 5 %	Okres dorosłości (20.-30. r. ż.)	Podobnie do populacji	Podobnie do populacji	- Zmęczenie - Osłabienie siły mięśni proksymalnych	4-8

5. ROZPOZNANIE

W wielu krajach, w których nie został wprowadzony program badań przesiewowych noworodków w kierunku SMA, badania genetyczne wykonywane są najczęściej dopiero wtedy, gdy pojawią się u pacjentów pierwsze objawy

nerwowo-mięśniowe. Najczęściej stosuje się test z wykorzystaniem techniki MLPA (ang. multiplex ligation-dependent probe amplification), który daje informację o liczbie kopii zarówno genu *SMN1*, jak i genu *SMN2* (ocenianych jako główny modyfikator fenotypu). W ok. 95% przypadków rutynowo wykonywane badanie genetyczne, wykazujące brak egzonu 7. w obu allelach genu *SMN1*, stanowi podstawę do rozpoznania choroby, natomiast obecność jednej kopii genu *SMN1* jest wskazaniem do dalszej diagnostyki, aby ewentualnie zidentyfikować dużo rzadziej występujące mutacje punktowe. W takich sytuacjach przeprowadza się dodatkowe badania, np. badanie elektromiograficzne (EMG) czy badanie elektroneurograficzne (ENG), natomiast odchodzi się już od wykonywania biopsji mięśni (rycina 2.) [21].

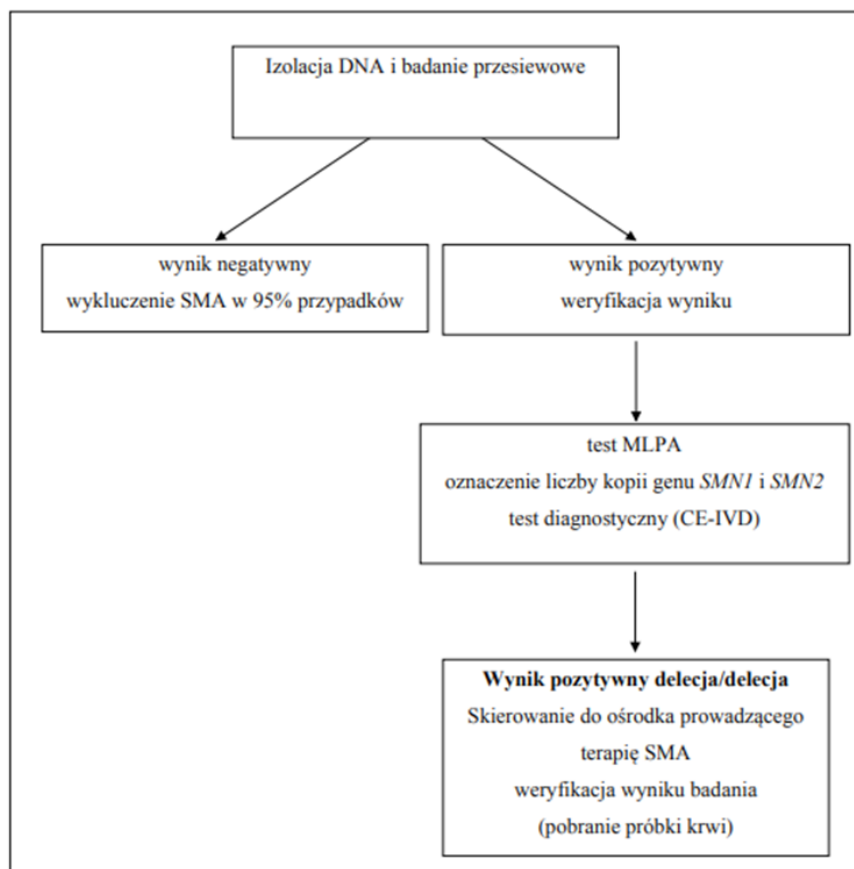


Rycina 2. Proponowany schemat postępowania w diagnostyce molekularnej SMA, NCS (ang. nerve conduction study) – elektroneurografia (ENG) [opracowanie własne], [21]

6. BADANIA PRZESIEWOWE

Screening populacyjny noworodków w niektórych państwach umożliwia wykrycie SMA już w pierwszych kilkunastu dniach życia, najczęściej jeszcze na etapie bezobjawowym tej rzadkiej choroby. Obecnie w Polsce w kolejnych regionach, począwszy od województwa mazowieckiego, zostaje wdrażany pilotażowy program przesiewowy noworodków, który jest oparty na badaniach genetycznych w dwustopniowym teście przesiewowym – RT-PCR (ang. reverse transcription-polymerase chain reaction) weryfikowany metodą MLPA

(rycina 3.). Do końca 2022 r. program badań przesiewowych docelowo powinien objąć swym zasięgiem wszystkie województwa w Polsce (tabela 2. i tabela 3.), co pozwoli dużo szybciej diagnozować, a dzięki temu bezzwłocznie rozpoczynać leczenie SMA, zwłaszcza w najczęściej występującym typie, czyli chorobie Werdniga-Hoffmanna o ciężkim i szybko postępującym przebiegu [22].



Rycina 3. Klasyfikacja wyników badań przesiewowych w kierunku SMA [opracowanie własne], [22]

Tabela 2. Harmonogram badań przesiewowych w kierunku SMA w 2021 r. [opracowanie własne], [22]

Badania przesiewowe SMA – plan na 2021 r. w oparciu o szacowaną liczbę urodzeń					
Lp.	Województwo	Planowana liczba urodzeń (na podstawie danych z 2019 r.)	Miesiąc startu	Liczba miesięcy	Liczba badań
1.	Mazowieckie	58078	II	10	48399
2.	Lubelskie	17013	IV	9	12760
3.	Łódzkie	20515	IV	9	15387
4.	Podlaskie	10842	IV	9	8132
5.	Warmińsko-mazurskie	12395	IV	9	9296
6.	Zachodniopomorskie	13902	IV	9	10426
7.	Pomorskie	24360	V	8	16240
8.	Kujawsko-pomorskie	18513	V	8	12342
9.	Lubuskie	8055	X	3	2014
10.	Wielkopolskie	36069	XI	2	6011
11.	Opolskie	8639	-	0	-
12.	Dolnośląskie	24446	-	0	-
13.	Śląskie	38908	-	0	-
14.	Podkarpackie	19628	-	0	-
15.	Małopolskie	35624	-	0	-
16.	Świętokrzyskie	9012	-	0	-
		356000		Suma:	141007

Tabela 3. Harmonogram badań przesiewowych w kierunku SMA w 2022 r. [opracowanie własne], [22]

Badania przesiewowe SMA – plan na 2022 r. w oparciu o szacowaną liczbę urodzeń					
Lp.	Województwo	Planowana liczba urodzeń (na podstawie danych z 2019 r.)	Miesiąc startu	Liczba miesięcy	Liczba badań
1.	Mazowieckie	58078	I	12	58078
2.	Lubelskie	17013	I	12	17013
3.	Łódzkie	20515	I	12	20515
4.	Podlaskie	10842	I	12	10842
5.	Warmińsko-mazurskie	12395	I	12	12395
6.	Zachodniopomorskie	13902	I	12	13902

7.	Pomorskie	24360	I	12	24360
8.	Kujawsko-pomorskie	18513	I	12	18513
9.	Lubuskie	8055	I	12	8055
10.	Wielkopolskie	36069	I	12	36069
11.	Opolskie	8639	III	10	7199
12.	Dolnośląskie	24446	IV	9	18335
13.	Śląskie	38908	IX	4	12969
14.	Podkarpackie	19628	X	3	4907
15.	Małopolskie	35624	X	3	8906
16.	Świętokrzyskie	9012	XI	3	2253
		356000		Suma:	274312

7. LECZENIE

7.1. Standardowa terapia objawowa

Nieleczony rdzeniowy zanik mięśni jest chorobą postępującą i uważaną za najczęstszą genetyczną przyczynę śmierci dzieci do 2. roku życia [23]. Jeszcze kilka lat temu nie istniała żadna metoda leczenia przyczynowego (podnoszącego poziom funkcjonalnego białka SMN), a po postawieniu diagnozy lekarze mogli jedynie stosować leczenie objawowe i rehabilitacyjne u pacjentów, których stan z czasem pogarszał się, zapobiegając lub spowalniając rozwój powikłań i wydłużając okres samodzielnego funkcjonowania przy zachowaniu jak najlepszego komfortu życia (opieka paliatywna). Powikłania SMA dotyczą zwykle układów oddechowego, pokarmowego oraz kostno-szkieletowego, a ich nasilenie zależy od typu schorzenia, który determinuje stopień niepełnosprawności, a z tym wiąże się zakres wielospecjalistycznych działań zapobiegawczo-usprawniających.

Układ oddechowy

Postępująca niewydolność oddechowa jest najczęstszą przyczyną zgonu w najcięższych postaciach SMA. Chorzy z osłabionymi mięśniami oddechowymi oraz zmniejszoną podatnością płuc są skazani na hipowentylację (szczególnie zagrażającą w czasie snu) i nieprawidłowe odkrztuszanie zalegającej treści śluzowej w drzewie oskrzelowym, co przyczynia się do nawracających zakażeń dolnych dróg oddechowych. W profilaktyce niewydolności oddechowej

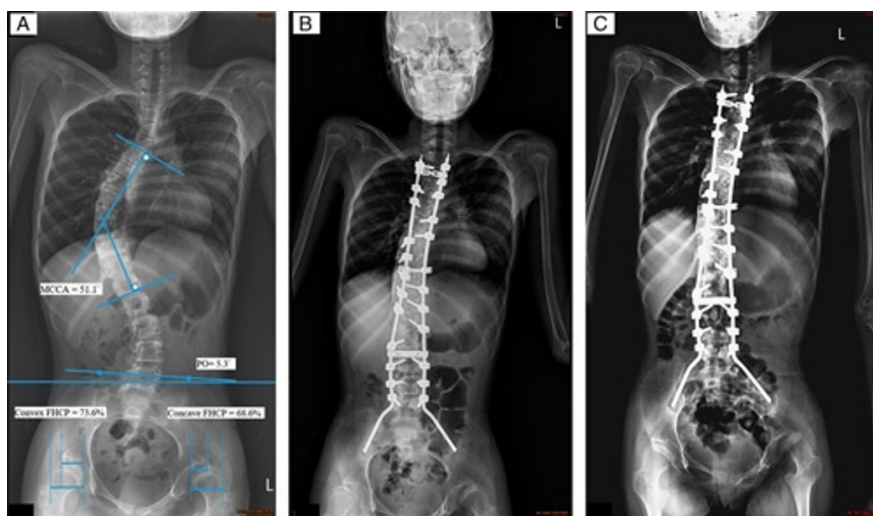
stosuje się codzienną fizykoterapię oddechową wraz z oczyszczaniem drzewa oskrzelowego z zalegającej wydzieliny oraz, w razie konieczności, nieinwazyjne wspomaganie oddechowe, wykorzystując aparaty generujące dodatnie ciśnienie w drogach oddechowych np. BiPAP (ang. bilevel positive airway pressure) [24].

Układ pokarmowy i odżywianie

Pacjenci często borykają się z dysfagią, opóźnionym opróżnianiem żołądka, potencjalnie zagrażającym życiu refluksem żołądkowo-przełykowym z ryzykiem aspiracji treści pokarmowej do dróg oddechowych oraz z zaparciami. Opisane dolegliwości uniemożliwiają prawidłowe przyjmowanie pokarmów, przyczyniając się do zaburzeń metabolicznych, niskorosłości i niedożywienia, chociaż literatura opisuje u niektórych pacjentów również skłonność do rozwoju otyłości. Rozwiązaniem dla pacjentów, którzy nie mogą przyjmować pokarmów drogą doustną, jest endoskopowa przezskórna gastrostomia (PEG – ang. percutaneous endoscopic gastrostomy) [25].

Układ kostno-szkieletowy

Codziennie stosowana intensywna rehabilitacja ruchowa, mająca na celu poprawę siły mięśniowej i zachowanie umiejętności ruchowych, które pacjent zdążył dotychczas rozwinąć, wydłuża okres samodzielnego funkcjonowania oraz opóźnia powstawanie skoliozy kręgosłupa czy bolesnych przykurczów w stawach. Leczenie ortopedyczne okazuje się niezbędne u pacjentów z rozwiniętymi już deformacjami kręgosłupa oraz dysfunkcją stawów. Operacyjne leczenie ciężkiej skoliozy nie tylko polepsza jakość życia, ale również odciąża uciskane narządy klatki piersiowej, poprawiając wentylację płuc oraz rzut serca, odwołując tym samym konieczność rozpoczęcia wspomagania oddechowego (rycina 4.) [25, 26].



Rycina 4. Rentgenografia w projekcji tyлно-przedniej u 12-letniej pacjentki chorej na SMA ułożonej twarzą do góry z głową, tułowiem i kończynami dolnymi w jak najbardziej możliwym do uzyskania wyprostie. A) Przedoperacyjny radiogram obrazujący skoliozę – kąt Cobba (MCCA) wynosi 51.1 stopni. B) Pacjentka przeszła operację segmentalnej instrumentacji kręgosłupa z wykorzystaniem śrub pedunkularnych oraz unieruchomienie miednicy techniką Galveston. Zakres połączenia objął odcinek od kręgu Th2 do miednicy. Pooperacyjny radiogram ukazujący korekcję deformacji – kąt Cobba (MCCA) wynosi 21.2 stopni. C) Kontrolny radiogram 24 miesiące po operacji bez widocznej progresji kąta Cobba [opracowanie własne], [26]

Wsparcie psychologiczne

Chociaż SMA nie wpływa bezpośrednio na pogorszenie rozwoju poznawczo-intelektualnego, a nawet może go kompensacyjnie stymulować [27], to z powodu postępującej niepełnosprawności ruchowej chorzy mogą napotykać na różne bariery w życiu społecznym. Ze względu na te trudności w codziennych funkcjonowaniu nie można zapominać o tak ważnym wsparciu psychologicznym, którego mogą potrzebować zarówno sami pacjenci, jak i ich rodziny [28-30].

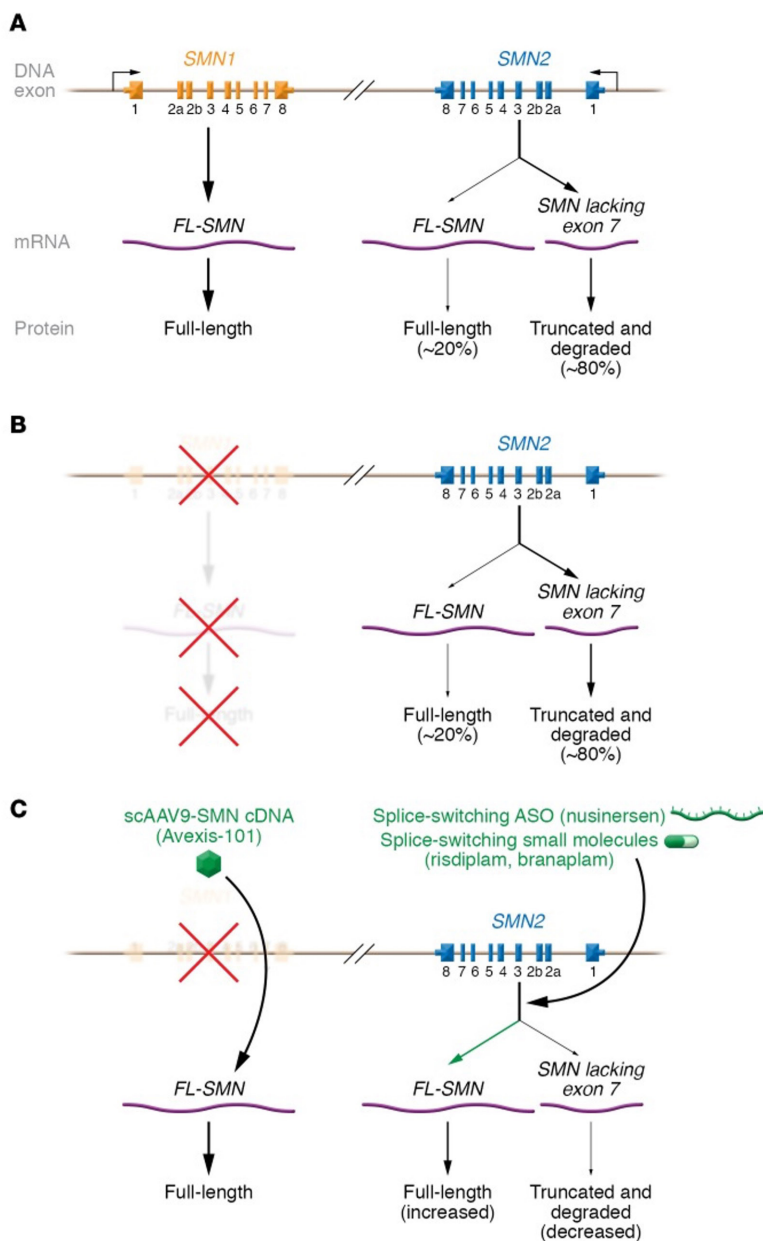
7.2. Nowoczesna terapia przyczynowa

W grudniu 2016 r. nastąpił przełom w terapii SMA, gdy amerykańska Agencja Żywności i Leków (FDA) dokonała rejestracji preparatu nusinersen (Spinraza®), będącego pierwszym lekiem przyczynowym [31]. W tej chwili

na świecie poza nusinersenem zatwierdzone są jeszcze przynajmniej dwa inne leki, czyli terapia genowa preparatem onasemnogen abeparwówek (Zolgensma®) [32] oraz preparat risdiplam (Evrysdi™), a kolejne (np. branaplam) są na etapie zaawansowanych przedrejestracyjnych badań klinicznych. Wymienione leki różnią się szczegółowymi mechanizmami działania, drogą podawania, schematem dawkowania oraz konkretnymi wskazaniami w zależności od typu choroby (tabela 4.), jednakże mają wspólny mianownik w postaci efektu terapeutycznego, czyli podniesienia poziomu funkcjonalnego białka SMN (rycina 5.) [33].

Tabela 4. Ogólna charakterystyka leków stosowanych w terapii podnoszącej poziom funkcjonalnego białka SMN u chorych na SMA, ASO (ang. antisense oligonucleotide) – antysensowny oligonukleotyd [opracowanie własne], [33]

Nazwa leku	Mechanizm działania	Droga podania/ schemat dawkowania		Dystrybucja tkankowa	Docelowa grupa pacjentów
Nusinersen (Spinraza®)	Modyfikacja splicingu (składania) genu <i>SMN2</i> [ASO]	Podanie do kanału kręgowego	4 dawki wysycające przez 2 miesiące, następnie jedna dawka co 4 miesiące	Ośrodkowy układ nerwowy (OUN)	Rejestracja FDA dla wszystkich chorych
Onasemnogen abeparwówek (Zolgensma®)	Terapia genowa zastępująca gen <i>SMN1</i> [kapsyd wirusa AAV9]	Dożylna (iniekcje do kanału kręgowego w fazie badań)	Jednokrotna iniekcja	Systemowa (z wyjątkiem komórek dzielących się)	SMA typ I
Risdiplam (Evrysdi™)	Modyfikacja splicingu (składania) genu <i>SMN2</i> [mikrocząstka]	Doustna	Codziennie (1x/d)	Systemowa	Wszyscy chorzy
Branaplam (NVS-SM1, LMI070)	Modyfikacja splicingu (składania) genu <i>SMN2</i> [mikrocząstka]	Doustna	Codziennie (1x/d)	Systemowa	SMA typ I (w trakcie badań przed rejestracją)



Rycina 5. Geny *SMN1* i *SMN2* mogą być punktem uchwytu dla nowoczesnych terapii przyczynowych. A) Model ekspresji genów *SMN1* i *SMN2* u zdrowego człowieka B) Schemat genetycznego podłoża SMA C) Mechanizmy terapeutyczne z wykorzystaniem terapii genowej preparatem onasemnogen abeparwówek (scAAV9-SMN1 cDNA), nusinersenu (antysensownego nukleotydu) oraz mikrocząsteczek – risdiplamu oraz branaplamu (cząsteczka eksperymentalna w fazie zaawansowanych przedrejestracyjnych badań klinicznych) [opracowanie własne], [33]

Nusinersen (Spinraza®)

Ten lek sierocy, będący syntetycznym antysensownym oligonukleotydem, zmienia gen *SMN2*, modyfikując jego składanie (splicing) na poziomie mRNA w taki sposób, że egzon 7. nie jest wycinany z transkryptu. Efektem tej interwencji jest zwiększenie poziomu w pełni funkcjonalnego białka SMN. W związku z tym, że lek nie przechodzi bariery krew-mózg, podawany jest w iniekcjach dokanałowych w zalecanej dawce 12 mg (5 ml) – początkowo 4 dawki wysycające (w dniach 0., 14., 28. oraz 63.), a następnie dawki podtrzymujące w odstępach czteromiesięcznych. Do działań niepożądanych należą głównie bóle głowy i pleców oraz wymioty, co jest łączone z procedurą punkcji lędźwiowej niezbędną do zaaplikowania leku. Opisywano również przypadki łagodnej trombocytopenii oraz proteinurii (potencjalne działanie nefrotoksyczne) [34].

Nusinersen znacząco poprawia funkcje motoryczne, jakość życia oraz rokowanie pacjentów, chociaż jeszcze do niedawna tę istotną poprawę, objawiającą się m.in. uniezależnieniem przeżycia od konieczności stałego wspomagania oddechowego, wykazywały jedynie badania kliniczne przeprowadzone na populacji niemowląt i dzieci [35, 36]. Lekarze nie dysponowali jednak danymi oceniającymi efekty takiej terapii w odniesieniu do populacji osób dorosłych. W 2019 r. opublikowano wyniki prospektywnego badania obserwacyjnego, w którym przeanalizowano efekty leczenia nusinersenem u 19 pacjentów dorosłych chorujących na SMA typu III w wieku od 18. do 59. roku życia, z których 17 ukończyło 10-miesięczny okres obserwacji [37]. To przytoczone jednośrodkowe badanie wykazało lekką, chociaż istotną statystycznie poprawę w zakresie pokonywanego dystansu w teście 6-minutowego marszu, uzyskanych punktów w poprawionym module oceny kończyny górnej (RULM – ang. revised upper limb module) oraz parametrów osiąganych w szczytowym przepływie podczas kaszlu (PCF – ang. peak cough flow), co do tej pory nigdy nie miało miejsca w naturalnej historii tego typu SMA. Niemniej jednak, z powodu ograniczeń w postaci mało licznej populacji pacjentów oraz braku włączenia do badania chorych z SMA typu II, dalsze badania były potrzebne [37]. Dopiero wielośrodkowa praca niemieckich naukowców, opublikowana w kwietniu 2020 r. w „The Lancet Neurology”, potwierdziła bezpieczeństwo i skuteczność terapii nusinersenem u nastolatków i osób dorosłych. W badaniu tym przeanalizowano dane 139 pacjentów w przedziale wieku od 16. do 65. roku życia głównie z typami SMA II i III, spośród których część przyjmowała nusinersen cyklicznie przez 14 miesięcy. Według badaczy zastosowanie tego

leku znacząco poprawiło funkcje motoryczne oraz ustabilizowało chorobę i to niezależnie od wieku. Ta poprawa odnosiła się zarówno do funkcji motorycznych kończyn górnych, jak i skal oceniających całościową sprawność ruchową. Wykazano również, że im wcześniej zastosowano leczenie u dorosłych pacjentów, tym było ono skuteczniejsze. Ponadto w wyniku zastosowanego leczenia istotnie zwiększył się dystans samodzielnego poruszania się u chorych, którzy wyjściowo słabiej radzili sobie z samodzielnym chodzeniem. Naukowcy podkreślają, że konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań wśród populacji pacjentów dorosłych, które byłyby ukierunkowane m.in. na długoterminowe efekty działania nusinersenu (włączając w to ewentualne odległe działania niepożądane) lub na inne czynności motoryczne pacjentów, jak np. połykanie czy oddychanie [38].

Od stycznia 2019 r. leczenie nusinersenem zostało w pełni objęte refundacją przez Narodowy Fundusz Zdrowia (NFZ) i obecnie jest dostępne w ramach ministerialnego programu lekowego dla całej populacji polskich pacjentów (dzieci i dorosłych), niezależnie od typu i zaawansowania choroby, a dokładne warunki stosowania terapii określone są w odpowiednim załączniku na stronie internetowej Ministerstwa Zdrowia [39]. W związku ze wspomnianą refundacją, w relatywnie krótkim czasie Polska stała się niemal europejskim liderem w leczeniu SMA, a planowane do końca 2022 r. wdrożenie ogólnopolskiego programu przesiewowego noworodków umożliwi wykrywanie tej rzadkiej choroby już w pierwszych kilkunastu dniach życia. Screening noworodków będzie miał szczególne znaczenie dla szybko postępującego SMA typu I, pozwalając zwiększyć pulę pacjentów rozpoczynających terapię jeszcze na etapie asymptomatycznym, bowiem wyniki badania klinicznego NURTURE potwierdzają, że im wcześniej zostanie podana pierwsza dawka nusinersenu, tym efekty terapeutyczne będą lepsze [40].

Chociaż koszty populacyjnych badań przesiewowych oraz leczenia nusinersenem są relatywnie wysokie (cena za jedną dawkę wynosi ok. 100 tys. USD) [41], to połączenie szybkiego diagnozowania asymptomatycznych pacjentów z objęciem ich bezzwłoczną terapią (w porównaniu do diagnozowania i leczenia dopiero pacjentów objawowych) nie tylko polepsza rokowanie chorych, ale szacuje się, że długofalowo przynosi również korzyści finansowe płatnikowi [42].

Terapia genowa – onasemnogen abeparwówek (Zolgensma®)

Terapia genowa preparatem onasemnogen abeparwówek (Zolgensma®) polega na jednokrotnym dożylnym podaniu fragmentu DNA, który zawiera sekwencję kodującą genu *SMN1*. Nośnikiem wykorzystywanym do dostarczenia równoważnika tego prawidłowego genu do motoneuronów pacjenta jest zmodyfikowany kapsyd adenowirusa serotypu 9. (AAV9 – ang. adeno-associated virus, serotype 9), który ma zdolność przenikania bariery krew-mózg [43]. Rekomendowana dawka to $1,1 \times 10^{14}$ genomów wektora (vg)/kg m.c. [32].

Do potencjalnych działań niepożądanych należą głównie wymioty oraz hepatotoksyczność (podwyższona aktywność aminotransferaz i/lub hiperbilirubinemia), którą można zniwelować, podając profilaktycznie prednizolon [44]. Ograniczeniem w stosowaniu tej terapii może być wrodzona lub nabyta odporność pacjenta na białko wirusa AAV9, którą określa się badaniem obecności przeciwciał na kilka dni przed podaniem leku (miano przeciwciał powinno być mniejsze niż 1:50). Powszechność występowania tego wirusa w przyrodzie powoduje, że nawet ok. 50% populacji może nabyć wobec niego odporność [32, 45, 46].

W wyniku zastosowanej terapii genowej finalnie w organizmie pacjenta powstaje prawidłowe białko SMN, co przekłada się na istotne efekty lecznicze, pierwotnie oceniane w populacji dzieci z ciężką i szybko postępującą formą choroby – SMA typu I. U 12 niemowląt z rozpoznaną chorobą Werdnigera-Hoffmanna przeprowadzano systematyczną obserwację przez 24 miesiące po zastosowaniu terapii genowej, a ocenie poddano m.in. zastosowane wsparcie oddechowe oraz żywieniowe, zdolność połykania oraz mowy, a także funkcjonowanie motoryczne oraz współczynnik hospitalizacji. Do czasu zakończenia obserwacji wszyscy pacjenci przeżyli, 7 pacjentów nie wymagało stosowania nieinwazyjnego wspomaganie oddechowego, u 11 pacjentów zdolność połykania (wyrażona jako doustne przyjmowanie pokarmów) była stabilna lub poprawiła się, 11 pacjentów było w stanie mówić, w pełni kontrolować główkę oraz siedzieć bez asysty, a 2 pacjentów chodziło samodzielnie. Na podstawie tych wyników badacze wnioskują, że po 24 miesiącach obserwacji zastosowana terapia genowa ograniczyła u pacjentów potrzebę wsparcia oddechowego i żywieniowego oraz polepszyła ich funkcje ruchowe, a to wiązało się z rzadszymi hospitalizacjami. Kontrastuje to z naturalną historią choroby przebiegającej z postępującą niewydolnością oddechową oraz obniżoną przeżywalnością, bowiem niewydolność oddechowa (związana z osłabieniem mięśni oddechowych) oraz aspiracja treści pokarmowej do drzewa oskrzelowego (wynikająca

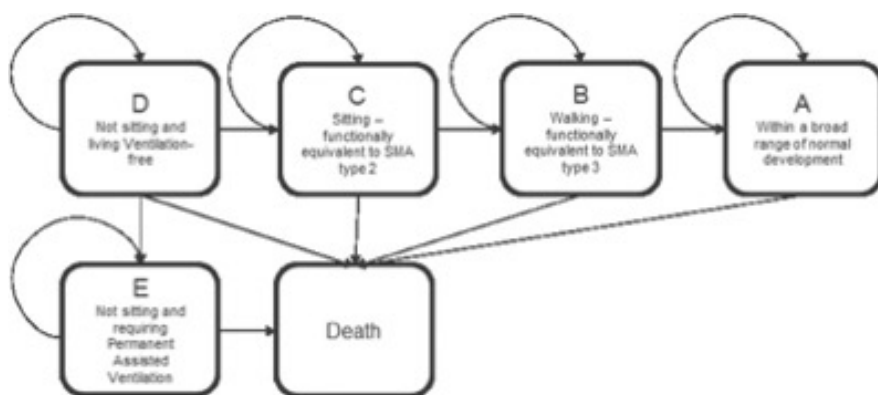
z zespołu opuszkowego) stanowią najczęstszą przyczynę zgonów wśród pacjentów z SMA typu I. Oczekuje się zatem, że poprawa tych funkcji u pacjentów w prezentowanym badaniu będzie korelowała z poprawą ich dalszej przeżywalności. Ponadto zmniejszona potrzeba korzystania z pomocy specjalistycznej u analizowanych pacjentów mogła potencjalnie złagodzić poczucie ciężaru choroby zarówno dla dzieci, jak i ich opiekunów, co może wskazywać na poprawę ogólnej jakości życia pacjentów i ich rodzin jako efekt zastosowanej terapii genowej [47, 48].

Obecnie trwają dwa badania kliniczne z wykorzystaniem preparatu onasemnogen abeparwówek: badanie 3. fazy (badanie SPiNT) oceniające podawanie leku drogą dożylną u pacjentów z przedobjawowym SMA posiadających dwie lub trzy kopie genu *SMN2* oraz badanie 1. fazy (badanie STRONG) wśród pacjentów chorych na SMA typu II z trzema kopiami genu *SMN2* (wiek 6-60 miesięcy), wykorzystujące dokanałową drogę podania w celu zmniejszenia ładunku wirusa AVV9 w porównaniu z dawką standardowo podawaną dożylnie. Pierwsze dane z badania STRONG z zastosowaniem niskich i średnich dawek podawanych dokanałowo pokazują, że spośród 16 pacjentów w wieku 6-24 miesięcy oraz 12 pacjentów w wieku 24-60 miesięcy ocenionych po 6-12 miesiącach od czasu zastosowania terapii genowej, żaden chory nie utracił uprzednio osiągniętych kamieni milowych w rozwoju ruchowym, a część nabyła nowe umiejętności motoryczne [49].

Lek ten został zarejestrowany w USA w maju 2019 r. dla dzieci z SMA typu I poniżej 2. roku życia, natomiast w Unii Europejskiej został warunkowo dopuszczony do stosowania w maju 2020 r. Niewykluczone, że ostateczne wyniki trwających obecnie badań klinicznych będą stanowić w przyszłości podstawę do rozszerzenia rejestracji terapii genowej o kolejne typy SMA, również u pacjentów powyżej 2. roku życia.

Pomimo swojej ekstremalnie wysokiej ceny (całkowity koszt terapii genowej wynosi ok. 2 mln USD), jednokrotnie podawany onasemnogen abeparwówek staje się obiecującą alternatywą dla przewlekłego leczenia nusinersenem, co ma swoje poparcie w modelowych analizach porównujących te dwie metody terapeutyczne w kontekście ich skuteczności i całkowitych kosztów w przeciągu całego życia u przeciętnego pacjenta cierpiącego na SMA typu I [50]. Model symuluje przeżycie niemowląt chorujących na SMA typu I z dwoma kopiami genu *SMN2*, zdiagnozowanych przed 6. miesiącem życia i leczonych albo jednokrotnym podaniem preparatu onasemnogen abeparwówek, albo regularnym aplikowaniem nusinersenu, jako dodatek do standardowej opieki objawowo-rehabilitacyjnej, a modelowa kohorta była obserwowana

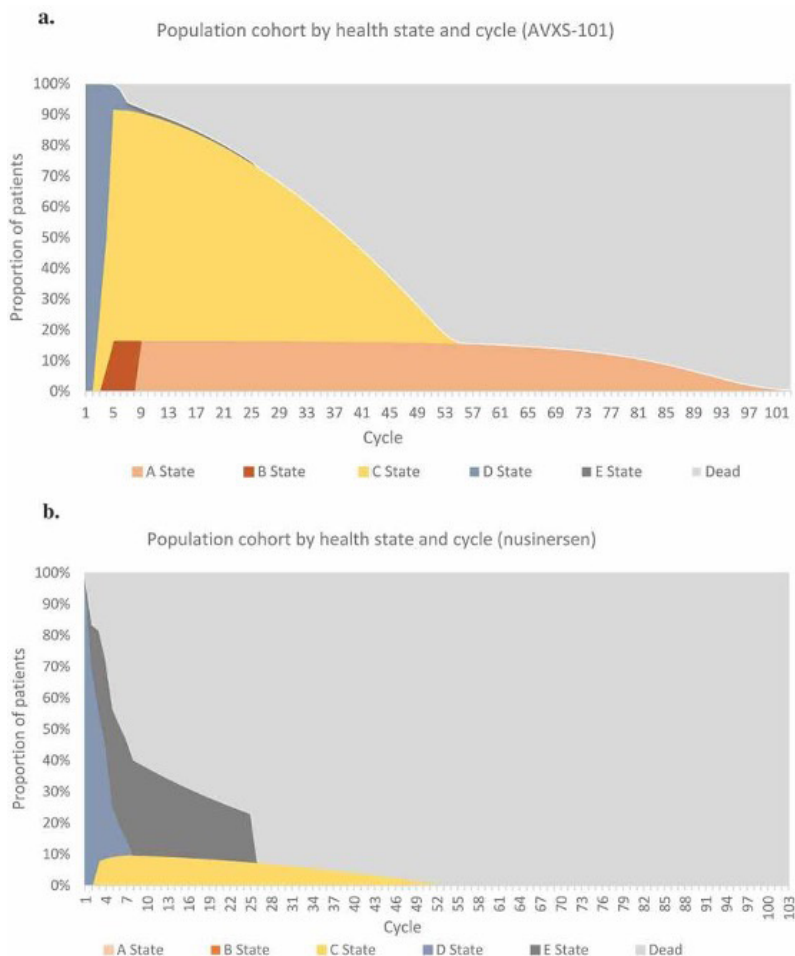
od momentu rozpoczęcia terapii aż do śmierci. Przed wprowadzeniem leków modyfikujących SMA typu I, pacjenci nigdy nie osiągnęliby kolejnych kamieni milowych rozwoju motorycznego (samodzielnego siedzenia, stania, chodzenia), natomiast wraz z opracowaniem leków przyczynowych mają oni teraz taką możliwość, która koreluje ze znaczną poprawą jakości ich życia. Struktura modelu dla SMA typu I została określona przez ekspertów m.in. na podstawie dostępnych badań klinicznych oraz w oparciu o analogiczne modelowanie w dystrofii mięśniowej Duchenne’a i polega na przechodzeniu pacjentów między 5 stanami czynnościowymi (A-E) oraz śmierci. Pacjenci wprowadzeni są do modelu jako niemowlęta w stanie czynnościowym D (nie siedzą i nie potrzebują wspomagania oddechowego). Pacjenci, będący w stanie D, mogą przejść do stanu E, zdefiniowanego przez konieczność stałej wentylacji oddechowej. Pacjenci, którzy przeżyją, mogą potencjalnie wykazywać poprawę, a pacjenci, którzy osiągną charakterystyczne dla łżejszych postaci SMA kamienie milowe rozwoju ruchowego (siedzenie – stan C, chodzenie – stan B) przechodzą do stanów o wyższej czynności. (rycina 6.) [50].



Rycina 6. Schemat przedstawiający poszczególne stany czynnościowe u chorych na SMA typu I. Model zakłada pięć stanów czynnościowych (A-E) oraz zgon pacjenta. E – wymaga stałego wsparcia oddechowego; D – funkcjonalny odpowiednik SMA typu I (stan wyjściowy); C – funkcjonalny odpowiednik SMA typu II, B – funkcjonalny odpowiednik SMA typu III, A – odpowiednik prawidłowego rozwoju dla populacji. [opracowanie własne], [50]

Zastosowany model wskazuje, że onasemnogen abeparwovek, w zestawieniu z cyklicznym stosowaniem nusinersenu, może skutkować znacznie korzystniejszym rokowaniem oraz generować mniejsze lub podobne koszty w przeciągu życia pacjenta. W ramieniu badania z terapią genową, uwzględniając w symulacji rozpoczęcie leczenia po urodzeniu, 50% pacjentów przeżyło

do 35. roku życia, natomiast w ramieniu z przewlekle stosowanym nusinersenem 50% pacjentów przeżyło do 3. roku życia. Według najbardziej optymistycznego scenariusza model przewiduje, że u niemowląt ze zdiagnozowanym SMA typu I, spełniających wszystkie założenia symulacji, oczekiwana długość życia może wynieść nawet ok. 37 lat w przypadku zastosowania terapii genowej oraz prawie 10 lat w przypadku przewlekłego przyjmowania nusinersenu (rycina 7.) [50].



Rycina 7. Model przejścia pacjentów z SMA typu I przez stany czynnościowe w funkcji czasu. Ilustracja przedstawia odsetki pacjentów leczonych preparatem onasemnogen abeparwówek (A) oraz nusinersenem (B) z uwzględnieniem poszczególnych stanów funkcjonalnych oraz zgonu. Czas zdefiniowany jest przez cykle rozwojowo-czynnościowe (odpowiadające kamieniom milowym rozwoju ruchowego). Z założenia 1 cykl trwa 6 miesięcy przez pierwsze 3 lata życia, a później każdy następny trwa 12 miesięcy [opracowanie własne], [50]

Podsumowując, onasemnogen abeparwovek jest potencjalną „deską ratunku” dla noworodków oraz niemowląt, które w przeciwnym razie byłyby skazane na krótkie i obciążone chorobą życie. Jest to pierwsza terapia genowa, stwarzająca możliwość przywrócenia normalnych funkcji motorycznych oraz oddechowych, co stanowi ważny krok w zaopatrzeniu najcięższej chorych pacjentów z SMA typu I [50].

Risdiplam (Evrysdi™)

Kolejną metodą terapeutyczną jest preparat risdiplam (Evrysdi™), będący mikrocząsteczką, która działa podobnie do nusinersenu – modyfikuje ona składanie (splicing) genu *SMN2*, co w efekcie przekłada się na podniesienie poziomu funkcjonalnego białka SMN. Od sierpnia 2020 r. ta mikromolekuła dopuszczona jest do leczenia w USA u wszystkich chorych, począwszy od 2. miesiąca życia, natomiast w Unii Europejskiej lek ten podawany jest w ramach programu dostępu przedrejestracyjnego. Risdiplam podaje się doustnie w formie syropu jeden raz dziennie po posiłku, najlepiej o tej samej porze, a rekomendowana dawka zależy od wieku i masy ciała pacjenta: 0,2 mg/kg/dobę poniżej 2. roku życia; od 2. roku życia u pacjentów ważących < 20 kg dawka wynosi 0,25 mg/kg/dobę, natomiast przy masie ciała 20 kg i większej sugerowana dawka to 5 mg/dobę. Lek w badaniach klinicznych ogólnie był dobrze tolerowany przez pacjentów, a do najczęstszych potencjalnych działań niepożądanych należały: gorączka, biegunka, afty czy infekcje układu moczowego, a u niemowląt dodatkowo obserwowano wymioty, zatwardzenia, infekcje górnych dróg oddechowych oraz zapalenie płuc [51].

Obecnie trwają kolejne fazy wieloośrodkowych badań klinicznych finansowanych przez koncern Hoffmann-La Roche oceniające skuteczność risdiplamu u pacjentów z SMA typu I (badanie FIREFISH), u chorych z SMA typu II i III (badanie SUNFISH), u zdiagnozowanych pacjentów na etapie przedobjawowym (badanie RAINBOWFISH) oraz u pacjentów, którzy wcześniej byli leczeni innymi lekami (badanie JEWELFISH) [49]. Z dotychczas prezentowanych wyników części 1. badania FIREFISH, w którym udział wzięło 21 niemowląt z SMA typu I i dwoma kopiami genu *SMN2* (mediana wieku – 6,7 miesiąca), wynika, że po 12 miesiącach terapii 90,5% (19/21) pacjentów przeżyło i żaden z nich nie wymagał stałego wspomagania oddechowego (definiowanego jako konieczność założenia tracheostomii lub nieinwazyjnej wentylacji przez min. 16 h/dobę w czasie min. 21 kolejnych dni, lub wykonania intubacji) ani nie utracił zdolności połykania. Po min. 23 miesiącach leczenia

81% (17/21) pacjentów nadal żyło bez konieczności stałej wentylacji i osiągnęło wiek 28 miesięcy lub więcej (mediana wieku – 32 miesiące), natomiast 7 pacjentów było w stanie siedzieć samodzielnie. Wyniki te wskazują na istotną klinicznie poprawę u leczonych pacjentów z SMA typu I, bowiem bez leczenia ci pacjenci nie osiągnęliby zdolności samodzielnego siedzenia i nie więcej niż 25% pacjentów byłoby w stanie przeżyć powyżej 14 miesięcy bez stałego wspomagania oddechowego. Wyniki części 2. badania FIREFISH przeprowadzonego na 41 niemowlętach potwierdziły tylko wspomnianą skuteczność terapii [51].

Skuteczność risdiplamu została wykazana również w prezentowanych wynikach badania SUNFISH, w którym udział wzięli pacjenci w wieku 2-15 lat z rozpoznaniem typu II lub typem III SMA. Część 2. tego badania była badaniem randomizowanym z podwójnie ślepą próbą, przeprowadzonym na 180 pacjentach, w którym porównano skuteczność risdiplamu z placebo. Pacjentów podzielono w stosunku 2:1 (risdiplam – 120 pacjentów, placebo – 60 pacjentów). W 12. miesiącu badania pacjenci otrzymujący lek, w porównaniu do chorych otrzymujących placebo, mieli statystycznie większą ($p=0,0156$) i klinicznie istotną, w stosunku do wartości wyjściowych, zmianę w punktacji skali MFM32 (ang. motor function measure 32), która ocenia wybrane funkcje motoryczne [51].

Branaplam (wcześniejsze nazwy cząsteczki: NVS-SM1, LMI070)

Inną badaną obecnie mikrocząsteczką jest branaplam, który wykazuje analogiczny mechanizm działania do risdiplamu, również modulując splicing egzonu 7. w genie *SMN2* [52]. Wykazano, że poprzez modyfikację składania genu *SMN2*, podnosi on poziom prawidłowo działającego białka SMN, poprawiając przeżywalność wśród modeli mysich z ciężką postacią SMA [53]. Podobnie do risdiplamu, tę mikromolekułę również podaje się drogą doustną. Działanie branaplamu jest obecnie poddawane ocenom klinicznym wśród niemowląt z SMA typu I. Dane z części 1. badania są trudne do interpretacji, ponieważ zostało ono chwilowo przerwane z powodu obaw o bezpieczeństwo powstałych na podstawie wyników badań przeprowadzonych u zwierząt. Wczesne wyniki części 2. badania pokazują, że u 8 pacjentów po 86 dniach leczenia wykazano poprawę w zakresie funkcji motorycznych ocenianych w skali CHOP INTEND (ang. The Children's Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disorders) z medianą na poziomie 4,5 punktów, natomiast u 5 pacjentów leczonych ponad 127 dni poprawa była wyrażona w postaci

mediany na poziomie 7,0 punktów. Ponadto potwierdzono bezpieczny profil działania cząsteczki [49]. Dalsze badania są potrzebne, aby dokładnie ocenić skuteczność działania branaplamu.

8. PODSUMOWANIE

Mając na względzie przedstawione dane dotyczące naturalnej historii choroby poszczególnych fenotypów SMA oraz biorąc pod uwagę skuteczność opisanych leków przyczynowych, modyfikujących przebieg tej choroby, pozostaje mieć nadzieję, że wyniki kolejnych badań klinicznych, korzystne analizy farmakoekonomiczne i malejące z biegiem czasu koszty stosowania tych terapii, pozwolą na rozszerzenie ich rejestracji oraz refundacji w kolejnych krajach. W przyszłości mogłoby to stanowić szansę dla wszystkich pacjentów cierpiących na SMA na jeszcze większe spowolnienie postępu choroby oraz na znaczące wydłużenie czasu przeżycia przy zachowaniu dobrej jakości życia. Prawdopodobnym jest, że przy odpowiednio szybkim diagnozowaniu, niezwłocznym wdrożeniu ukierunkowanego leczenia oraz intensywnych działaniach rehabilitacyjnych, SMA stanie się w przyszłości dobrze kontrolowaną chorobą przewlekłą, pozwalającą pacjentom cierpiącym nawet na jej najcięższe typy dożyć wieku, kiedy będą mogli zostać objęci opieką geriatryczną zupełnie z innych przyczyn.

REFERENCJE

1. Werdnig G. Zwei fruhinfantile hereditare Falle von progressiver Muskelatrophie unter dem Bilde der Dystrophie, aber auf neurotischer Grundlage. Arch Psychiatr Nervenkr. 1891;22:437–480. doi:10.1007/bf01776636
2. Hoffmann J. Über chronische spinale Muskelatrophie im Kindesalter auf familiärer Basis. Deut Zeitsch Nervenheilkd 1893;3:427–470. doi:10.1007/bf01668496
3. Hoffmann J. Weiterer Beiträge zur Lehre von der hereditären progressiven spinalen Muskelatrophie im Kindesalter. Deut Zeitsch Nervenheilkd 1897;10:292–320. doi:10.1007/bf01668174

4. Hoffmann J. Dritter Beitrag zur Lehre von der hereditären progressiven spinalen Muskelatrophie im Kindesalter. *Deut Zeitsch Nervenheilkd* 1900;18:217–24. Hoffmann, J. (1900). Dritter Beitrag zur Lehre von der hereditären progressiven spinalen Muskelatrophie im Kindesalter. *Deutsche Zeitschrift Für Nervenheilkunde*, 18(1), 217–224. doi:10.1007/bf01635796
5. Kugelberg E, Welander L. Heredofamilial juvenile muscular atrophy simulating muscular dystrophy. *Arch Neurol Psychiatry (Chic)* 1956;75:500–509. doi:10.1001/archneurpsyc.1956.02330230050005
6. Dubowitz V. Infantile muscular atrophy – a broad spectrum. *Clin Proc Child Hosp Dist Columbia*. 1967;23(8):223-239.
7. Munsat TL. Workshop report: international SMA collaboration. *Neuromuscul Disord*. 1991;1(2):81. doi: 10.1016/0960-8966(91)90052-T.
8. Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*. 1995;80(1):155-165. doi:10.1016/0092-8674(95)90460-3
9. Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(11):6307-6311. doi:10.1073/pnas.96.11.6307
10. Monani UR, Lorson CL, Parsons DW, et al. A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum Mol Genet*. 1999;8(7):1177-1183. doi:10.1093/hmg/8.7.1177
11. Cartegni L, Krainer AR. Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nat Genet*. 2002;30(4):377-384. doi:10.1038/ng854
12. Kashima T, Manley JL. A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nat Genet*. 2003;34(4):460-463. doi:10.1038/ng1207
13. Kolb SJ, Kissel JT. Spinal Muscular Atrophy. *Neurol Clin*. 2015;33(4):831-846. doi:10.1016/j.ncl.2015.07.004
14. Burghes AH, Beattie CE. Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick?. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(8):597-609. doi:10.1038/nrn2670

15. Sugarman EA, Nagan N, Zhu H, et al. Pan-ethnic carrier screening and prenatal diagnosis for spinal muscular atrophy: clinical laboratory analysis of >72,400 specimens. *Eur J Hum Genet.* 2012;20(1):27-32. doi:10.1038/ejhg.2011.134
16. Jedrzejowska M, Milewski M, Zimowski J, et al. Incidence of spinal muscular atrophy in Poland--more frequent than predicted?. *Neuroepidemiology.* 2010;34(3):152-157. doi:10.1159/000275492
17. Taylor JE, Thomas NH, Lewis CM, et al. Correlation of SMNt and SMNc gene copy number with age of onset and survival in spinal muscular atrophy. *Eur J Hum Genet.* 1998;6(5):467-474. doi:10.1038/sj.ejhg.5200210
18. Mailman MD, Heinz JW, Papp AC, et al. Molecular analysis of spinal muscular atrophy and modification of the phenotype by SMN2. *Genet Med.* 2002;4(1):20-26. doi:10.1097/00125817-200201000-00004
19. Prior TW, Leach ME, Finanger E. Spinal Muscular Atrophy. 2000 Feb 24 [Updated 2020 Dec 3]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2021. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1352/>
20. Kolb SJ, Kissel JT. Spinal muscular atrophy: a timely review. *Arch Neurol.* 2011;68(8):979-984. doi:10.1001/archneurol.2011.74
21. Arnold WD, Kassar D, Kissel JT. Spinal muscular atrophy: diagnosis and management in a new therapeutic era. *Muscle Nerve.* 2015;51(2):157-167. doi:10.1002/mus.24497
22. Ministerstwo Zdrowia. Program badań przesiewowych noworodków w Polsce na lata 2019-2020 – aktualizacja po zmianach dotyczących SMA. Warszawa, Polska: Ministerstwo Zdrowia; 2021. <https://www.gov.pl/attachment/e31d5df7-aa60-4731-a693-7a4af597af12> Opublikowano 02.11.2018. Zaktualizowano 18.02.2021. Dostęp 27.03.2021.
23. Butchbach ME. Copy Number Variations in the Survival Motor Neuron Genes: Implications for Spinal Muscular Atrophy and Other Neurodegenerative Diseases. *Front Mol Biosci.* 2016;3:7. Published 2016 Mar 10. doi:10.3389/fmolb.2016.00007

24. Finkel RS, Mercuri E, Meyer OH, et al. Diagnosis and management of spinal muscular atrophy: Part 2: Pulmonary and acute care; medications, supplements and immunizations; other organ systems; and ethics. *Neuromuscul Disord.* 2018;28(3):197-207. doi:10.1016/j.nmd.2017.11.004
25. Mercuri E, Finkel RS, Muntoni F, et al. Diagnosis and management of spinal muscular atrophy: Part 1: Recommendations for diagnosis, rehabilitation, orthopedic and nutritional care. *Neuromuscul Disord.* 2018;28(2):103-115. doi:10.1016/j.nmd.2017.11.005
26. Shen PC, Lu CC, Liang WC, et al. Predictors for Deformity Progression in a Spinal Muscular Atrophy Cohort After Scoliosis Correction Surgery. *Clin Spine Surg.* 2020;33(8):E407-E414. doi:10.1097/BSD.0000000000000989
27. von Gontard A, Zerres K, Backes M, et al. Intelligence and cognitive function in children and adolescents with spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord.* 2002;12(2):130-136. doi:10.1016/s0960-8966(01)00274-7
28. Fischer MJ, Asselman FL, Kruitwagen-van Reenen ET, et al. Psychological well-being in adults with spinal muscular atrophy: the contribution of participation and psychological needs. *Disabil Rehabil.* 2020;42(16):2262-2270. doi:10.1080/09638288.2018.1555864
29. Di Pede C, Agosto C, De Tommasi V, De Gregorio A, Benini F. Symptom management and psychological support for families are the cornerstones of end-of-life care for children with spinal muscular atrophy type 1. *Acta Paediatr.* 2018;107(1):140-144. doi:10.1111/apa.14086
30. Farrar MA, Carey KA, Paguinto SG, Chambers G, Kasparian NA. Financial, opportunity and psychosocial costs of spinal muscular atrophy: an exploratory qualitative analysis of Australian carer perspectives. *BMJ Open.* 2018;8(5):e020907. Published 2018 May 24. doi:10.1136/bmjopen-2017-020907
31. Aartsma-Rus A. FDA Approval of Nusinersen for Spinal Muscular Atrophy Makes 2016 the Year of Splice Modulating Oligonucleotides. *Nucleic Acid Ther.* 2017;27(2):67-69. doi:10.1089/nat.2017.0665
32. Hoy SM. Onasemnogene Apeparvovec: First Global Approval. *Drugs.* 2019;79(11):1255-1262. doi:10.1007/s40265-019-01162-5

33. Sumner CJ, Crawford TO. Two breakthrough gene-targeted treatments for spinal muscular atrophy: challenges remain. *J Clin Invest.* 2018;128(8):3219-3227. doi:10.1172/JCI121658
34. Chiriboga CA. Nusinersen for the treatment of spinal muscular atrophy. *Expert Rev Neurother.* 2017;17(10):955-962. doi:10.1080/14737175.2017.1364159
35. Finkel RS, Mercuri E, Darras BT, et al. Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med.* 2017;377(18):1723-1732. doi:10.1056/NEJMoa1702752
36. Chiriboga CA, Swoboda KJ, Darras BT, et al. Results from a phase 1 study of nusinersen (ISIS-SMN(Rx)) in children with spinal muscular atrophy. *Neurology.* 2016;86(10):890-897. doi:10.1212/WNL.0000000000002445
37. Walter MC, Wenninger S, Thiele S, et al. Safety and Treatment Effects of Nusinersen in Longstanding Adult 5q-SMA Type 3 - A Prospective Observational Study. *J Neuromuscul Dis.* 2019;6(4):453-465. doi:10.3233/JND-190416
38. Hagenacker T, Wurster CD, Günther R, et al. Nusinersen in adults with 5q spinal muscular atrophy: a non-interventional, multicentre, observational cohort study. *Lancet Neurol.* 2020;19(4):317-325. doi:10.1016/S1474-4422(20)30037-5
39. Ministerstwo Zdrowia. Programy lekowe w chorobach nieonkologicznych. Leczenie rdzeniowego zaniku mięśni. Warszawa, Polska: Ministerstwo Zdrowia; 2021. <https://www.gov.pl/attachment/e091b59b-391d-4644-962d-6b335dcd9d96> Opublikowano 27.12.2018. Zaktualizowano 01.2021. Dostęp 27.03.2021.
40. De Vivo DC, Bertini E, Swoboda KJ, et al. Nusinersen initiated in infants during the presymptomatic stage of spinal muscular atrophy: Interim efficacy and safety results from the Phase 2 NURTURE study. *Neuromuscul Disord.* 2019;29(11):842-856. doi:10.1016/j.nmd.2019.09.007
41. Pharmacoeconomic Review Report: Nusinersen (Spinraza): (Biogen Canada Inc.). Ottawa (ON): Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health; January 2018.

42. Jalali A, Rothwell E, Botkin JR, Anderson RA, Butterfield RJ, Nelson RE. Cost-Effectiveness of Nusinersen and Universal Newborn Screening for Spinal Muscular Atrophy. *J Pediatr*. 2020;227:274-280.e2. doi:10.1016/j.jpeds.2020.07.033
43. Foust KD, Nurre E, Montgomery CL, Hernandez A, Chan CM, Kaspar BK. Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nat Biotechnol*. 2009;27(1):59-65. doi:10.1038/nbt.1515
44. Chand D, Mohr F, McMillan H, et al. Hepatotoxicity following administration of onasemnogene abeparvovec (AVXS-101) for the treatment of spinal muscular atrophy. *J Hepatol*. 2021;74(3):560-566. doi:10.1016/j.jhep.2020.11.001
45. Boutin S, Monteilhet V, Veron P, et al. Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors. *Hum Gene Ther*. 2010;21(6):704-712. doi:10.1089/hum.2009.182
46. Samaranch L, Salegio EA, San Sebastian W, et al. Adeno-associated virus serotype 9 transduction in the central nervous system of nonhuman primates. *Hum Gene Ther*. 2012;23(4):382-389. doi:10.1089/hum.2011.200
47. Mendell JR, Al-Zaidy S, Shell R, et al. Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med*. 2017;377(18):1713-1722. doi:10.1056/NEJMoa1706198
48. Al-Zaidy S, Pickard AS, Kotha K, et al. Health outcomes in spinal muscular atrophy type 1 following AVXS-101 gene replacement therapy. *Pediatr Pulmonol*. 2019;54(2):179-185. doi:10.1002/ppul.24203
49. Ramdas S, Servais L. New treatments in spinal muscular atrophy: an overview of currently available data. *Expert Opin Pharmacother*. 2020;21(3):307-315. doi:10.1080/14656566.2019.1704732
50. Malone DC, Dean R, Arjunji R, et al. Cost-effectiveness analysis of using onasemnogene abeparvovec (AVXS-101) in spinal muscular atrophy type 1 patients. *J Mark Access Health Policy*. 2019;7(1):1601484. Published 2019 May 8. doi:10.1080/20016689.2019.1601484
51. Dhillon S. Risdiplam: First Approval. *Drugs*. 2020;80(17):1853-1858. doi:10.1007/s40265-020-01410-z

52. Singh RN, Ottesen EW, Singh NN. The First Orally Deliverable Small Molecule for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy. *Neurosci Insights*. 2020;15:2633105520973985. Published 2020 Nov 23. doi:10.1177/2633105520973985
53. Palacino J, Swalley SE, Song C, et al. SMN2 splice modulators enhance U1-pre-mRNA association and rescue SMA mice [published correction appears in *Nat Chem Biol*. 2015 Sep;11(9):741] [published correction appears in *Nat Chem Biol*. 2016 Apr;12(4):304]. *Nat Chem Biol*. 2015;11(7):511-517. doi:10.1038/nchembio.1837

ZASTOSOWANIE SYMULATORÓW USG W EDUKACJI MEDYCZNEJ

Julia Cieśla, Maciej Smreczak, Kinga Dworak, Natalia Trędotą,
Agnieszka Wiekiera-Kozińska, Agata Suleja

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

Abstrakt

Symulacja w edukacji medyków odgrywa znaczącą rolę, pozwalając na imitowanie warunków prawdziwego kontaktu z pacjentem. Na rynku znajduje się wiele nowoczesnych symulatorów umożliwiających lekarzom trening umiejętności diagnostycznych i terapeutycznych. Ważną rolę w tej grupie urządzeń pełnią symulatory ultrasonograficzne (USG), dzięki którym możliwe jest zapoznanie się z budową urządzeń, podstawami ultrasonografii poszczególnych narządów, nabywanie doświadczenia we właściwym lokalizowaniu narządów oraz zwiększenia pewności siebie przez lekarzy, którzy będą przeprowadzać takie badania rutynowo w gabinetach lekarskich. Nowoczesne symulatory USG umożliwiają osobom ćwiczącym trening skanowania wszystkich obszarów ciała. W grupie symulatorów USG wyróżnia się urządzenia, zawierające na wyposażeniu fantom oraz symulatory komputerowe. Obraz wyświetlany na ekranie symulatora może być generowany jako interpolacja obrazu pozyskanego ze skanowania żywych pacjentów, lub jako model wytwarzany poprzez oprogramowanie symulatora. W poniższej pracy przedstawione zostały rodzaje symulatorów USG, najistotniejsze technologie wykorzystane do ich budowy oraz zastosowanie tych urządzeń w wybranych dziedzinach medycyny. Ponadto podsumowano skuteczność i zalety treningu na symulatorach, a także przedstawiono problemy i wyzwania, jakie są stawiane przez użytkowników symulatorów USG konstruktorom i pomysłodawcom systemów symulacji ultrasonograficznej.

Słowa kluczowe: ultrasonografia, symulatory USG, edukacja medyczna, diagnostyka medyczna

Abstract

Simulation plays a vital role in medical education. It enables to imitate conditions of a real contact with a patient. There are many available modern simulators, that allow doctors to train their diagnostic and therapeutic skills. Ultrasonographic simulators play a crucial role in this group. Thanks to them it is possible to familiarize with device's construction, basis of ultrasonography of individual organs, gain experience in localising organs correctly and boost doctors' self-esteem, who will be performing such examinations routinely in their offices. Modern USG

simulators allow practitioners to train scanning of all body areas. The types of ultrasound simulators includes those that comprise phantoms or those that are based on computer simulators. The image displayed on simulator's screen can be generated as interpolation of image acquired from real patients' scans or as a model generated by simulator's software. The following work presents the types of the ultrasound simulators, crucial technologies used for their construction and their application in some fields of medicine. Moreover, the effectiveness and advantages of training on simulators were summarized. the problems and challenges poses by ultrasound simulator's users to constructors and originators of the ultrasound simulation's systems.

Keywords: ultrasonography, ultrasound simulators, medical education, medical diagnostics

1 WSTĘP

Obecnie w naukach medycznych jednym z najważniejszych etapów przygotowania lekarzy do pracy jest właściwe szkolenie z wykorzystaniem nowoczesnych urządzeń prezentujących wirtualny model pacjenta. Początki wykorzystania symulacji w medycynie sięgają czasów starożytnej Mezopotamii, w której kapłani szkolili swoich uczniów używając owczych płuc i wątroby. Przez wiele wieków symulacje były też wykorzystywane do obrazowania objawów różnych chorób [1]. Metody symulacji stopniowo ewoluowały i dzisiaj pozwalają na stosunkowo wierne odwzorowanie niektórych warunków klinicznych. Pozwala to służbie medycznej na zdobywanie umiejętności właściwego posługiwania się urządzeniami oraz indywidualny trening w celu wypracowania jak najlepszych umiejętności w realnej pracy z pacjentem [2]. Symulacja procedur medycznych znajduje coraz większe zastosowanie w edukacji przyszłych pracowników ochrony zdrowia, ponieważ zapewnia rozwijanie umiejętności w zakresie interpretowania uzyskanej informacji, samodzielne rozwiązywanie problemów i podejmowanie decyzji przez szkolące się osoby. Wykorzystując urządzenia mogące imitować chorego, jego reakcje oraz przedstawiane przez niego objawy, możliwe jest nie tylko efektywne ćwiczenie w celu zapewnienia coraz większego bezpieczeństwa i komfortu pacjenta oraz zwiększenia kompetencji zawodowych lekarza, ale też zmiana dotychczasowych zasad pracy w jednostkach ochrony zdrowia, w których podejmują pracę dobrze wyszkoleni lekarze [1].

Badanie ultrasonograficzne (USG) to jedno z najczęściej wykonywanych badań w gabinetach lekarskich. Jest to metoda obrazowania pozbawiona użycia promieniowania jonizującego, które może mieć negatywny wpływ na tkanki. Ponadto jest to technika tania i nieinwazyjna oraz pozwala na wykrycie zmian od 0,1 mm co stanowi o jej szerokim zastosowaniu [3-5]. W medycznych aparatach USG używane są fale dźwiękowe o bardzo wysokiej częstotliwości-

od 2 do 50 MHz, które wysyłane w postaci wiązek skanują badany obszar i wracają odbite do przetwornika w sondzie urządzenia [6]. Obecnie dzięki badaniom ultrasonograficznym możliwe jest wykrycie wielu chorób w ich wczesnym stadium. Jednak przy braku umiejętności wykonania badania oraz interpretacji uzyskanego obrazu, który zapewnia lekarzowi wcześniejszy trening na symulatorach USG, może dojść do postawienia niewłaściwej diagnozy [7]. Dowiedziono, że przebycie szkolenia na symulatorach USG jamy brzusznej nie tylko zwiększa umiejętności kliniczne w zakresie obrazowania, ale może również wpłynąć na lepsze wyniki w nauczaniu standardowego badania fizykalnego studentów medycyny [8].

Proces uczenia się prawidłowego wykonywania badania USG i jego właściwej interpretacji trwa długo i wymaga tysięcy przebadanych pacjentów [8]. Wiedza teoretyczna musi być uzupełniona wieloma godzinami zajęć praktycznych. W toku nauki lekarz musi nie tylko wykształcić umiejętność posługiwania się aparatem USG w poprawny sposób, ale też znajdować konkretne struktury oraz nabyć umiejętność interpretacji ich obrazu na monitorze urządzenia [9,10]. Przez wiele lat edukacja praktyczna w zakresie ultrasonografii opierała się na starej zasadzie *"see one, do one, teach one"* czyli "zobacz, zrób i naucz następnego" [11]. Jednakże, w porównaniu do innych metod obrazowania, ultrasonografia jest mniej standaryzowana i opis jej wyników jest bardziej subiektywny, dlatego skuteczność w stawianiu poprawnej diagnozy zależy od stopnia wytrenowania i doświadczenia lekarza wykonującego badanie [12,13]. Należy zaznaczyć, że metoda badań z zastosowaniem ultrasonografii bardzo szybko się rozwija, dlatego konieczne jest ustawiczne, kompleksowe szkolenie pracowników medycznych, i powiązanie zastosowania urządzenia symulującego z wykonywanymi działaniami lekarzy, którzy będą używać lub używają aparatów USG w codziennej pracy

Trening ultrasonograficzny może być wykonywany z wykorzystaniem szeregu różnych metod. Najszerzej stosowaną w praktyce medycznej jest bezpośrednio badanie pacjentów i zdobywanie doświadczenia w oparciu o tradycyjny model szkolenia pod nadzorem osób szkolących. Oprócz klasycznego zbierania doświadczenia podczas badania pacjentów w warunkach klinicznych, cennym materiałem do symulacji ultrasonograficznej są ludzkie zwłoki po odpowiedniej konserwacji [14,15]. Ten sposób szkolenia jest ograniczony m.in. dostępnością zwłok, możliwością ich zabezpieczenia *post mortem*, nierzadko wysokimi kosztami takiego zabiegu i brakiem możliwości na przykład obrazowania naczyń metodą Dopplera [14,15].

Z uwagi na zmiany organizacji pracy w szpitalach powodujące mniejsze możliwości zastosowania modelu szkolenia „mistrz-uczeń” oraz ograniczenia w wykorzystaniu zwłok coraz większego znaczenia w edukacji ultrasonograficznej nabierają symulatory, które pozwalają na wykonywanie ćwiczeń w zakresie skanowania rejonów ciała, możliwych do monitorowania w standardowym badaniu USG. Ważną cechą symulatorów USG jest możliwość ich wykorzystania zarówno przez studentów stawiających swoje pierwsze kroki w ultrasonografii, jak i przez doświadczonych lekarzy, chcących podnieść swoje kwalifikacje zawodowe [9]. Ponadto, symulacja ultrasonograficzna oprócz znaczenia klinicznego może wspomóc proces poznawania budowy ludzkiego ciała i orientacji topograficznej [16]. Cechami przemawiającymi na korzyść wykorzystania symulatorów USG w praktyce nauczania w porównaniu z nauczaniem na żywym pacjencie jest możliwość wielokrotnego oglądania danych struktur i przypadków klinicznych, bez konieczności przebywania pacjenta w gabinecie dłużej niż jest to konieczne [9,17]. Kolejnym argumentem przekonującym do użycia symulatorów szkoleniu medyków jest możliwość zobaczenia rzadkich przypadków medycznych. Na przykład niektóre anomalie płodu są incydentalne i lekarz wykonujący badania USG może spotkać się z nimi bardzo rzadko w praktyce zawodowej [12]. Zaletą symulatorów jest ćwiczenie posługiwania się głowicą USG nazywane koordynacją oko-ręka i umiejętność znajdowania w ten sposób zarówno prawidłowych, jak i patologicznych struktur tkankowych [10,17,18]. Celem pracy jest przedstawienie rodzajów symulatorów USG, głównych technologii wykorzystanych do ich budowy oraz wskazanie zastosowań tych urządzeń w wybranych dziedzinach medycyny.

2. RODZAJE SYMULATORÓW USG

Symulatory USG dzielą się na dwie grupy tj. działające w postaci programu komputerowego, w którym głowica jak i model są osadzone wirtualnie, a ruch głowicy skojarzony jest z ruchem myszki do komputera [10,19]. oraz symulatory szkoleniowe wykorzystujące fantom i rzeczywistą głowicę. W ostatniej grupie symulatorów USG wyróżnia się urządzenia posiadające wiele modułów szkoleniowych, które umożliwiają trening badania płuc, brzucha i miednicy oraz urządzenia ukierunkowane do zastosowania w wybranej specjalności medycznej, na przykład ginekologii, położnictwie czy dostosowane do ćwiczeń przeprowadzania zabiegów biopsji określonych narządów pod kontrolą USG.

2.1. Symulatory USG- programy komputerowe

Symulatory komputerowe w swoim wyposażeniu nie posiadają fantomatomii niektóre z nich pozwalają na generowanie realnego obrazu wyświetlanego na standardowym monitorze aparatu ultrasonograficznego. Klawiatura i myszka komputera PC to niezbędne wyposażenie multimedialnych symulatorów komputerowych nowej generacji [10,19,20].

Istotny w przypadku symulatorów komputerowych jest rodzaj obrazu i sposób jego generowania [21]. W symulatorach USG zastosowanie znalazły dwa rodzaje generowania obrazu tj. model interpolacyjny (ang. interpolative model-based) oraz model generatywny (ang. generative model-based) polegający na generowaniu obrazu na monitorze przez oprogramowanie symulatora [6,24], który często jest nie do odróżnienia od rzeczywistego obrazu uzyskanego od żywego pacjenta [17]. Na przykład w symulatorze komputerowym do USG czaszki dziecka, system reaguje w czasie rzeczywistym na przesuwaną wirtualnie sondę, a dodatkowo na ekranie pojawia się obraz trójwymiarowej anatomii danego obszaru, co znacznie pomaga w zrozumieniu istoty i zależności uzyskanego obrazu od wybranego przekroju [19].

Dzięki zastosowaniu modeli matematycznych zostały opracowane metody pozwalające z zarysu opisu tkanki stworzyć realnie wyglądający obraz ultrasonograficzny [22]. Modelami, będącymi źródłem obrazu wyświetlanego na monitorze w symulatorach są najczęściej realne obrazy USG uzyskane ze skanowania żywych pacjentów [9,17,23]. Takie modele pacjentów w niektórych urządzeniach, jak na przykład symulatorze do brachyterapii nowotworu gruczołu krokowego są wynikiem nałożenia na siebie obrazów uzyskanych przedoperacyjnie w USG (aby wyznaczyć właściwą zawartość wokseli - ang. volumetric picture element) i w rezonansie magnetycznym (aby wyznaczyć siatkową reprezentację anatomiczną) [3]. Reis i in. [22] opracowali komponenty, które są niezbędne do stworzenia symulatora echokardiografii. Dają one możliwość generowania matematycznego modelu serca z odpowiednią dynamiką na podstawie danych uzyskanych z siatki trójkątów i obrazu rezonansu magnetycznego. Pozwala to na utworzenie swoistego paradygmatu serca, z którego można uzyskać m.in. obraz patologiczny.

Niekwestionowaną zaletą symulatorów oferowanych w postaci multimedialnego programu wyświetlanego na własnym komputerze jest łatwa dostępność i możliwość treningu bez konieczności posiadania sprzętu, który bardzo często nie jest mobilny [9]. Symulatory takie posiadają bogatą bibliotekę przypadków oferowaną przez producentów programów multimedialnych

na płytach CD [10] lub już dostępną razem z pobranym programem [19]. W przypadku komputerowych symulatorów USG problemem może okazać się brak umiejętności sprawnego manewrowania głowicą, w celu uzyskania pożądanego przekroju skanowanego obiektu. Dlatego niektóre symulatory komputerowe są wyposażone w głowicę dopinaną do wejścia USB własnego komputera umożliwiającą właściwe posługiwanie się sondą ultradźwiękową za pomocą specjalnego oprogramowania [25,26]. pozwalającego na swobodne manewrowanie i śledzenie widoku na monitorze [25,26]. Inną propozycją dla zwiększenia wiarygodności prowadzonego treningu mogą być specjalne okulary migawkowe i półprzezroczyste lustro, zwiększające realizm symulacji [27]. Wadą wielu symulatorów komputerowych jest brak możliwości nauki manewrowania głowicą, w celu rozwinięcia koordynacji oko-ręka oraz fantoma imitującego ciało człowieka, co daje możliwość śledzenia na żywo zależności pomiędzy miejscem przyłożenia głowicy, a uzyskiwanym przekrojem [12,28].

Nie bez znaczenia dla doskonalenia umiejętności diagnostyki USG przez lekarzy jest fakt, że programy komputerowe mają wysoką cenę, dlatego poszukuje się tańszych rozwiązań alternatywnych. Jednym z nich jest zaproponowany przez Gunabushanama i in. [29] symulator, w którym osobisty smartfon imituje sondę USG, a laptop zastępuje aparat ultrasonograficzny. Dane o położeniu smartfona zbierane są za pomocą wbudowanego akcelerometru oraz żyroskopu i pozwalają na przetwarzanie i wyświetlanie obrazu na ekranie komputera w czasie rzeczywistym [29].

2.2. Symulatory USG współpracujące z fantomami

Niezwykle popularne w treningu umiejętności psychosomatycznych oraz w doskonaleniu diagnostyki i podejmowaniu decyzji klinicznych są symulatory, które przypominają typowy skaner ultrasonograficzny [28]. W ich skład wchodzi fizyczny fantom, którego struktura i budowa przypomina właściwości skanowanego ciała i który jest używany do ćwiczeń razem z prawdziwymi sondami ultrasonograficznymi wyposażonymi w przetworniki [12,28]. Zastosowanie w edukacji medycznej fantomów jest bardzo ważne, ponieważ umożliwia symulowanie właściwości tkanki, którą poddaje się powierzchniowemu skanowaniu lub jak w przypadku biopsji czy USG przezodbytniczego- również penetracji [23].

W symulatorach USG zastosowanie znalazły różne rodzaje fantomów. Część z nich ma imitować właściwości akustyczne symulowanego narządu, a pozostała część ma przybliżyć jego ultrasonograficzny obraz obserwowany

na monitorze (takie fantomy często są używane w treningu przeprowadzania biopsji pod kontrolą USG). Warto dodać, że fantomy znajdują zastosowanie nie tylko w symulatorach medycznych, ale także w testowaniu nowych aparatów ultrasonograficznych [31]. W ostatnich latach pojawiło się na rynku wiele różnych modeli fantomów, wytworzonych z materiałów (m.in. żelatyny) imitujących ludzką skórę [25,30,31].

Istotnymi elementami w budowie symulatorów USG są: optyczny system śledzenia, który pozwala na wykrywanie położenia i orientacji fantomu oraz sonda. Oba te elementy pracują niezależnie od siebie [9]. Chipy umieszczone pod „skórą” manekina reagują na częstotliwość fal wysyłanych przez sondę, a generowany obraz jest wyświetlany na monitorze urządzenia [32]. W symulatorach USG ważną rolę odgrywają źródło emisji i odbiornik fal, które są na stałe ustalone w konfiguracji urządzenia. W przypadku symulatorów używających metody Dopplera interakcja przetwornika z manekinem wywołuje pojawienie się na monitorze odpowiedniego dwuwymiarowego obrazu naczyń poprzez kolorowe kodowanie danych podlegających kontroli w oprogramowaniu symulatora [33].

Wyposażenie symulatorów USG różni się pomiędzy konkretnymi urządzeniami oraz modelami. Właściwe wyposażenie aparatu jest niezwykle istotne, ponieważ częstym problemem podczas wykonywania badań USG jest poprawne posługiwanie się urządzeniem. W tym celu zaczęto poszukiwać nowych rozwiązań, co spowodowało, że w 1996 r. symulator UltraTrainer został wyposażony w stację roboczą Silicon Graphics i system monitorowania ruchów dłoni lekarzy szkolących się na tym urządzeniu [9]. Niektóre współczesne urządzenia są wyposażone w inne dodatkowe narzędzia pozwalające m.in. na kontrolę jakości obrazu, możliwość wykonywania pomiarów, archiwizacji i drukowania wyników badania [28].

Symulatory USG mogą również imitować nie tylko obraz pokazywany na monitorze aparatu, ale też dają możliwość użycia funkcji, z których korzysta się podczas standardowego badania USG takich jak: zamrażanie obrazu w danym momencie, powiększenie i pomniejszenie obrazu, kompensacja wzmocnienia głębi, znaczniki okolic ciała czy wyświetlanie wielu obrazów na raz [17]. Ponadto, niektóre symulatory oferują szereg innych rozwiązań, aby zwiększyć realność badania. Na przykład w urządzeniu do symulacji ultrasonografii prenatalnej możliwy jest dobór różnych wymiarów głowic i głębokości penetracji [12], a oprogramowanie symulatora UltraSim wyposażone jest w dane dotyczące historii choroby pacjenta i ogólne informacje na jego temat [17].

Ogromną zaletą symulatorów USG współpracujących z fantomami jest szybka ewaluacja wyników nauczania i możliwość upewnienia się uczącego, czy właściwie zidentyfikował daną strukturę. W przypadku zaobserwowania zmian chorobowych możliwe jest też potwierdzenie diagnozy, ponieważ trenażery zawierają opisy i diagnozę patologicznych przypadków widocznych w czasie rzeczywistym podczas skanowania [17]. Wadą symulatorów USG wyposażonych w specjalistyczne fantomy jest ich wysoka cena, dlatego Kulyk i Olszynski [34] zaproponowali symulator USG pod nazwą edus2, który można skonstruować osobiście. Składa się on z laptopa oraz anteny RFID (ang. Radiofrequency Identification) ukrytej w sondzie skanującej. Dodatkowym elementem w tym urządzeniu są tagi RFID w postaci naklejek i punktów, które można przymocować do własnego fantoma lub badanego pacjenta. Tagi RFID skojarzone są z anteną w sondzie. W symulatorze edus2 możliwe jest wyświetlanie filmów obrazujących patologie w skanowanym obszarze [34]. Podstawowym ograniczeniem oprogramowania symulatora edus2 jest skorelowanie go jedynie z systemem operacyjnym Linux. Jednak Damjanovic i in. [35] przedstawili sposób zaadoptowania oprogramowania symulatora edus2 do systemu opartego na języku HTML, niezależnego od systemu operacyjnego własnego komputera, a przez to dostępnego dla szerszego grona medyków [35]

Tab.1 Przykłady niektórych symulatorów USG oraz ich charakterystyka i zastosowanie.

Nazwa symulatora	Wyposażenie	Charakterystyka i zastosowanie	Referencje
Symulatory oparte na programach komputerowych			
SonoSim	Komputerowy z podpinaną do wejścia USB głowicą, wielomodułowy	Możliwość zakupu modułów dedykowanych konkretnym strukturom jak nadgarstek lub tarczyca oraz szerszym zagadnieniom klinicznym jak moduł kardiologiczny czy FAST	[26]
DiSplay U/S	wielomodułowy	Możliwość treningów FAST I POCUS, skanowania całego ciała wirtualnego pacjenta, ewaluacji zdobytej wiedzy i stawiania diagnozy, możliwość dostępu do wersji próbnej.	[36]
CT2TEE	Komputerowy, przeznaczony do echokardiografii przezprzełykowej	Swobodne manewrowanie wirtualną sondą, brak skanowania w czasie rzeczywistym, ale możliwe jest uzyskanie wszystkich możliwych przekrojów Dostępny w dwóch opcjach: online i offline do pobrania	[42,78]

Symulatory USG skojarzone z fantomem			
Vaussim	Możliwość podpięcia głowicy do własnego komputera, wielomodułowy	Moduł kardiologiczny, płucny, ginekologiczno-położniczy, brzuszny, pediatryczny. Dostępność scenariuszy symulacyjnych	[37]
CAE Vimedix	wielomodułowy	Możliwość wyboru przy zakupie konkretnego modelu fantomu: kardiologicznego, brzusznego I ginekologicznego	[38]
SonoMan	wielomodułowy	Możliwość wyboru oprogramowania skojarzonego do modułu np. FAST, nerkowego, echokardiograficznego	[77]
edus2	wielomodułowy	Symulator z podpinaną sondą z anteną RFID kompatybilną z tagami RFID przypinanymi do własnego fantoma w formie naklejek	[34]
UltraSim	wielomodułowy	Interfejs obejmujący informacje o aktualnym położeniu sondy, obraz ultrasonograficzny uzyskany od żywych pacjentów	[79,80]
Echo Com-TEE	przeznaczony do echokardiografii przezprętkowej	Istnieje możliwość przestrzennego zobaczenia związku między położeniem sondy, a echokardiogramem	[47]
CranUS	przeznaczony do USG przeciemiążczkowego	Możliwość treningu wykrywania patologii, interfejs zawierający informacje o aktualnym położeniu sondy i przekroju	[52]
Biopsym	przeznaczony do treningu biopsji prostaty	Wizualizacja widoku 3D w wielu przekrojach, możliwość treningu w z użyciem klawiatury i myszy (bez urządzenia dotykowego)	[57]

3. ZASTOSOWANIE SYMULATORÓW USG W RÓŻNYCH DZIEDZINACH MEDYCyny

Wiele z symulatorów USG dostępnych na rynku pozwala poprzez dostępne moduły wybieralne przy zakupie urządzenia (tab. 1) na trening umiejętności rozpoznawania struktur wewnętrznych i diagnostykę w obrębie różnych części ciała [38]. Obecnie dostępne na rynku symulatory USG mają możliwości pracy z wieloma modułami przedstawiającymi wybrane przypadki chorobowe (tab. 1). W symulatorze USG CAE Vimedix (tab. 1) jedną z dostępnych opcji jest skanowanie jamy brzusznej. Dostępny jest również moduł kardiologiczny, ginekologiczny i pulmonologiczny [38]. Wyposażenie symulatorów USG

w wiele modułów ma bardzo istotne znaczenie, ponieważ z roku na rok coraz więcej uczelni medycznych decyduje się na włączenie do programu nauczania modułu związanego z treningiem ultrasonograficznym dzięki czemu na jednym urządzeniu mogą ćwiczyć studenci i lekarze różnych specjalizacji. [39]. Nowością stworzoną przez CAE Healthcare (producenta CAE Vimedix) jest symulator USG do nauczania lekarzy diagnostyki płuc u pacjentów zakażonych wirusem COVID-19 [40]. Symulatory znajdują zastosowanie również w nabywaniu praktycznych umiejętności w zakresie innych procedur wykorzystujących ultrasonografię. Przykładem może być symulator ultrasonografii duplexowej, wykorzystującą metodę Dopplera do wykrywania patologii w układzie naczyniowym, z klasyfikacją ciężkości choroby na podstawie m.in. szybkości przepływu krwi [33].

W ciągu ostatnich lat, oprócz symulatorów wielomodułowych, powstało też wiele urządzeń dedykowanych tylko jednej dziedzinie wiedzy medycznej. Do nich zalicza się symulatory elektrokardiograficzne (CT2TEE, EchoCom-TEE) i symulatory wykorzystywane w ginekologii i położnictwie (tab 1).

3.1 Symulatory echokardiograficzne

Pierwszy opis echokardiografii (EKG) jako metody diagnostycznej (echokardiografii M-mode - jednowymiarowej) przedstawili Inge Edler i Hellmuth Hertz w 1953 roku. Zastosowali ją do przedoperacyjnej diagnostyki zwężenia i niedomykalności zastawki mitralnej. Późniejsze badania i rozwój inżynierii medycznej pozwoliły na szersze zastosowanie m.in. echokardiografii dwuwymiarowej czy dopplerowskiej [41]. Dziś, badanie EKG jest szeroko wykorzystywane nie tylko przez kardiologów, ale też lekarzy innych specjalizacji [41,42]. Najbardziej rozpowszechnionymi rodzajami badania EKG są echokardiografia przekłatkowa (ang. transthoracic echocardiography-TTE) i przezprzełykowa (ang. transoesophagus echocardiography TEE) [42]. W literaturze opisano szereg różnych symulatorów echokardiografii TEE, które wykorzystują wirtualny model serca zobrazowany w trójwymiarze [43-46] Użytkownik symulatora badania TTE może manewrować wirtualną głowicą z przetwornikiem skanując wybrany obszar serca [45]. Z edukacyjnego punktu widzenia jest to szczególnie istotne ze względu na konieczność wyobrażenia sobie przez badającego trójwymiarowego obrazu serca i odniesienia tego do obrazu dwuwymiarowego widocznego na monitorze aparatu USG. Daje to możliwość wytrenowania lepszej koordynacji ręka-oko [46]. Podobne możliwości dają inne rodzaje takich trenażerów przeznaczone do badania

przezprzełykowego (TEE), które nie wymaga takich zdolności manualnych jak TTE, ale lepszej orientacji w przestrzeni skanowanego obiektu [42]. Jednym z takich symulatorów jest urządzenie EchoCom TEE stworzony do symulacji echokardiografii przezprzełykowej. Oprócz możliwości jednoczesnego kontrolowania zależności między położeniem sondy, a wyświetlanym obrazem, badający ćwiczy również technikę posługiwania się aparatem do tego typu badań dzięki manekinowi, wchodzącemu w skład symulatora [47]. Inny symulator do badań TEE jest dostępny w Internecie i opracowany został na podstawie danych z badań tomografii komputerowej, skonwertowanych do odpowiednich skali szarości, właściwych dla obrazu ultrasonograficznego. Urządzenie to nie oferuje badania w czasie rzeczywistym, natomiast jego niekwestionowaną zaletą są zestawy różnych danych zarówno fizjologicznych, jak i związanych z szeregiem wad serca, co nadaje treningowi wielokierunkowy i poznawczy charakter [42]

3.2. Symulatory USG w ginekologii i położnictwie

Badanie USG u kobiety w ciąży pozwala na zidentyfikowanie prawidłowego rozwoju lub występowania różnych patologii płodu [13]. Po raz pierwszy ważną rolę badań USG w skanowaniu płodu zauważono w latach 60 XX w., które wykonywano w celu zobrazowania anatomii rozwijającego się dziecka i jego położenia [48]. Kolejne lata przyniosły rozwój zastosowań badań USG umożliwiających skanowanie płodu w zakresie nieprawidłowości rozwoju i badania łożyska. Lata 70 i 80 XX w. to początek badań przesiewowych oraz użycia metody Dopplera w kolorze, a na przełomie lat 90 XX w i 2000 możliwe było oglądanie płodu w 3D/4D oraz badanie niedokrwistości. Istotę roli ultrasonografii w praktyce ginekologicznej podkreślają słowa byłego prezesa the Royal College of Obstetricians and Gynaecologists zapytanego o najważniejsze postępy w ginekologii XXw :*"Ultrasonografia, ultrasonografia, ultrasonografia"* [49]. Dowodzi to, jak ważną rolę przypisuje się USG w tej dziedzinie i jak ważne jest szkolenie młodych lekarzy ginekologów i położników, aby z największą dokładnością i precyzją potrafili używać dostępnych metod ultrasonograficznych w swojej pracy. Dane literaturowe wskazują, że aby posiadać należyte umiejętności podczas wykonywania badania przezpochwowego i przezbrzusznego, stażyści szkolący się w zakresie ginekologii bez zastosowania symulatorów potrzebowali więcej niż 24 miesiące doświadczenia klinicznego i 12-24 dni szkolenia w wyspecjalizowanych jednostkach ultrasonograficznych [50]. Wynik te wskazują, że właściwe szkolenie z wykorzystaniem nowoczesnych

urządzeń pozwoli nie tylko skrócić czas szkolenia, ale też wzmocni pewność siebie i zapewni poprawność wykonywania przez lekarza badania ultrasonograficznego. Szkolenie na symulatorach dodatkowo umożliwi ginekologom i położnikom zapoznanie się z możliwymi anomaliami płodu, które są tak rzadkie, że część lekarzy może je zobaczyć jedynie raz lub nie zobaczyć ich w praktyce zawodowej [12]. Pierwsze symulacje USG płodu koncentrowały się na treningu skanowania serca dziecka za pomocą interaktywnych multimedialnych dostępnych w postaci biblioteki dysków laserowych przedstawiających anomalie serca płodu połączonych z trójwymiarowym modelem tego narządu [51]. Technika ta w ocenie recenzujących ją pracowników ochrony zdrowia okazała się być cenną pomocą szczególnie w zakresie oceniania orientacji przestrzennej serca [51].

W przypadku niektórych badań rozwijającego się dziecka, istotą symulacji tkwi w zastosowaniu właściwego modelu badanej części ciała. Tak jest w przypadku symulatora amniopunkcji wykonywanej pod kontrolą USG, gdzie model utworzony z żelatynowej formy służy głównie do nabywania precyzji i zdolności stereotaktycznych, szczególnie istotnych podczas tego badania [31].

W nabywaniu umiejętności praktycznych przez ginekologów i położników wykorzystywane są również urządzenia imitujące badanie noworodków jak na przykład symulator badania USG przezciemiączkowego wykonywanego w celu obrazowania wnętrza czaszki dziecka. Symulatory te umożliwiają ćwiczenie skanowania głowy na specjalnie przygotowanym modelu [19,52]. Pierwszy symulator do takiego badania pod nazwą CranUS zaprezentowali Markov-Wetter i in. [52]. Urządzenie to zostało zastosowane między innymi w celu nauki właściwego pozycjonowania sondy USG, aby uzyskać jak najistotniejsze klinicznie informacje. Ułatwia to interfejs urządzenia, który oprócz widoku 2D skanowanego obiektu, zawiera również informację o aktualnym położeniu modelu [52]. Inny symulator, stworzony przez W. Arthusa i in. [19] umożliwia odnalezienie i oznaczenie nawet 30 struktur w mózgu dziecka [19].

Oprócz opisanych symulatorów badań USG płodu, powstały również urządzenia szkolące studentów i lekarzy ginekologów w standardowym badaniu ginekologicznym. USG przezpochwowe jest szczególnie ważnym badaniem, ponieważ umożliwia wykrycie szeregu nieprawidłowości i patologii macicy u pacjentki i w tym zakresie może stać się alternatywą dla rezonansu magnetycznego [53]. Należy podkreślić, że jest to badanie intymne i wymaga dużego profesjonalizmu i umiejętności od lekarza ginekologa. Jednym z urządzeń przygotowujących lekarzy do wykonywania badań symulator ScanTra-ner z modułem przeznaczonym do ultrasonografii przezpochwowej. Składa się

z monitora i sondy podłączonych do urządzenia dotykowego, który zapewnia kompatybilność poruszanej sondy z obrazem na monitorze, uzyskanym od rzeczywistych pacjentów [54]

3.3. Symulatory zabiegów pod kontrolą USG

Symulatory USG są również wykorzystane do nabywania umiejętności przez lekarzy w dziedzinach, gdzie ultrasonografia pozwala na kontrolę przeprowadzanego zabiegu inwazyjnego. Jednym z takich zabiegów jest brachyterapia, polegająca na wprowadzaniu ziarna radioaktywnego do guza. Pod kontrolą USG przeprowadzane są takie zabiegi w przypadku m.in. raka prostaty, szyjki macicy i odbytu [55]. W przypadku raka prostaty niewłaściwe wprowadzanie igły z ziarnem radioaktywnym może powodować zniszczenie sąsiednich tkanek, dlatego tak ważna jest duża precyzja podczas przygotowań do planowanego zabiegu [3,20]. Nowotwór gruczołu krokowego jest najczęściej występującym nowotworem w USA. W Polsce w roku 2018 odnotowano 16414 przypadków zachorowań [56]. W przypadku podejrzenia tego nowotworu wykonuje się biopsję pod kontrolą USG, pobierając wycinek prostaty. Wymaga to od lekarza skoordynowania ruchów ręki w trójwymiarowej anatomii prostaty w stosunku do dwuwymiarowego obrazu na monitorze. Stworzony do imitowania tego zabiegu symulator Biopsym pozwala na trenowanie przez lekarza umiejętności zarówno za pomocą specjalnego narzędzia dotykowego, jak i myszki standardowego komputera stacjonarnego co sprawia, że proces uczenia się jest łatwiejszy i bezpieczny dla pacjenta [57,58].

Symulatory wykonywania biopsji pod kontrolą USG mają często wysoką cenę, dlatego istnieje kilka rozwiązań, aby umożliwić symulację warunków tej procedury. W celu imitowania biopsji nerki pod kontrolą USG zaproponowano użycie nerki świni wszczepionej pod pierś indyka. Struktura ta naśladuje ludzką nerkę pod względem wielkości i głębokości narządu, echogeniczności i ogólnej struktury [59]. Inne tanie rozwiązanie mające symulować warunki wprowadzania cewnika nadłonowego pod kontrolą USG zaproponował Nonde i in. [60], a stworzenie takiego symulatora jest możliwe z prostych materiałów dostępnych w każdym gabinecie zabiegowym [60]. Rozwiązania te, mimo prymitywności budowy mogą wiernie odwzorowywać obraz uzyskany podczas skanowania żywego pacjenta i są szczególnie potrzebne w sytuacji ograniczonych zasobów finansowych [59,60].

Innym zabiegiem przeprowadzanym pod kontrolą USG jest dooskrzelowa aspiracja igłowa, w której proces zdobywania umiejętności przez operatora

wymaga długiego okresu uczenia się [61], dlatego symulator do tego typu badania wydaje się być niezbędnym narzędziem w edukacji pulmonologów i chirurgów klatki piersiowej. Takim symulatorem jest the AccuTouch Flexible Bronchoscopy Simulator zawierającym moduł do treningu ultrasonografii dooskrzelowej [62,63].

4. SKUTECZNOŚĆ ZASTOSOWANIA SYMULATORÓW USG W EDUKACJI MEDYCZNEJ

W ciągu wielu lat od powstania pierwszych symulatorów USG przeprowadzono szereg badań, które sprawdzały jak trening z użyciem takiej metody wpływa na postęp edukacyjny lekarzy, ratowników medycznych, studentów kierunków medycznych oraz innych użytkowników symulatorów. Wyniki tych ocen jednoznacznie wskazywały, że symulatory zostały uznane za cenne narzędzie w edukacji ze względu na szereg zalet [7,18,69].

Wykazano, że trening na symulatorach może znacząco podnieść u lekarzy poziom pewności siebie podczas wykonywania badania USG i w konsekwencji ograniczyć pobyt pacjenta w gabinecie lekarskim. Istotnym elementem, który o tym decyduje jest możliwość wielokrotnego powtarzania poszczególnych czynności na symulatorze [18]. Jest to szczególnie istotne przy wykonywaniu badań, które są mało komfortowe lub wstydlive zarówno dla pacjenta i dla lekarza, jak na przykład USG dopochwowe. Zastosowanie do edukacji lekarzy i studentów medycyny symulatorów USG zamiast badań żywych pacjentów, należy uważać za rozwiązanie korzystne, ponieważ nie powoduje znaczących różnic w skuteczności późniejszego diagnozowania, a daje możliwość właściwego przygotowania personelu medycznego do pracy zawodowej [64]. Podobne wnioski wyciągnięto używając do treningu protokołu FAST (ang. The Focused Assessment with Sonography for Trauma) symulatora SonoMan, sprawdzając w trakcie badania dwie grupy studentów tj. grupę badawczą, która używała do treningu ww. symulatora i grupę kontrolną, ćwiczącą na żywych pacjentach. Ewaluacja wyników osiągnięć edukacyjnych obu zespołów na żywych pacjentach wykazała, brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy porównywanymi grupami, co pozwala stwierdzić, że zastąpienie żywych modeli symulatorami nie wpływa negatywnie na proces zdobywania umiejętności w posługiwaniu się metodą ultrasonografii [7]. Należy również podkreślić, że w szkoleniu ultrasonograficznym istotne znaczenie ma liczba samodzielnie wykonanych skanów przez lekarzy, a nie ilość godzin dydaktycznych, która spędzają przy urządzeniu [65]. Dodatkową zaletą wykorzystania symulatorów USG w edukacji

medycznej jest wprowadzenie metod interaktywnego nauczania co w efekcie pozwala zmniejszyć czas poświęcony na przekazanie wiedzy przez prowadzących i sprawia, że studenci szybciej nabywają praktycznych umiejętności [66].

Bardzo istotne w kwestii wyciągania wniosków na temat trenażerów USG jest badanie poziomu satysfakcji ich użytkowników i uwag jakie zgłaszają. W 2013 Uniwersytet Zachodniej Anglii włączył do metod kształcenia podyplomowego w zakresie ultrasonografii użycie trenażera ScanTrainer. Dla wielu studentów wykonywanie badania na tym urządzeniu było lepszą metodą nauki niż jedynie zapoznawanie się z treściami teoretycznymi z podręcznika czy wykładu, co znacząco podniosło wiedzę szkolących się osób w zakresie stosowanie techniki USG. Istotną kwestią wymienianą przez badanych była również możliwość zobaczenia rzadko występujących patologii, które niemożliwe są do zaobserwowania w standardowych warunkach [18]. W przypadku symulatorów bronchoskopii pod kontrolą USG badania jednoznacznie wykazały, że trening za pomocą symulatorów przynosi szybsze efekty niż konwencjonalne nabywanie wiedzy, a ponadto pozwala na odciążenie pacjentów, na których zwykle odbywało się szkolenie lekarzy [63]. Inne badania przeprowadzone na grupie użytkowników symulatora CAE Vimedix pokazały, że 40 osób na 41 badanych uważa użycie trenażerów USG za wartościowe narzędzie w nauczaniu i ćwiczeniu umiejętności wykonywania badań przez lekarzy, a aż 100% badanych sądziło, że ich użycie powinno być na stałe wpisane w program nauczania szkół medycznych [67]. Użycie tego samego symulatora w przypadku treningu PoCUS (ang. Point of Care Ultrasound) sprawiło, że osoby poddane szkoleniu uzyskały pewien stopień kompetencji właściwy w zakresie zdobywania i interpretowania obrazów na monitorze aparatu USG [68]. Próby przeprowadzone na rezydentach radiologii przed ich pierwszymi nocnymi dyżurami wykazały, że trening symulacji ultrasonograficznej może być dobrym narzędziem w wykryciu słabych punktów badającego i ich korekty przed spotkaniem z pacjentem w warunkach klinicznych [29].

Na przykład symulator SonoTrainer został poddany szczegółowej ocenie przez lekarzy praktykujących na tym urządzeniu. Osiedmiesząt procent oceniających stwierdziło, że jakość generowanego obrazu jest dobra, a 96% badanych oceniało swoje efekty kształcenia na symulatorze jako dobre (w skali: zły/umiarkowany/dobry). Wszyscy z nich natomiast zgodzili się, że powinien on na stałe znaleźć się wśród urządzeń służących do edukacji medycznej [12]. Przeprowadzona przez Dromeya et al. [69] metaanaliza mająca na celu ustalenie czy symulacja jest skuteczną metodą nabywania umiejętności praktycznych w zakresie położnictwa jednoznacznie wskazała na fakt, że jest ona najlepszą

metodą w kształceniu studentów w zakresie ultrasonografii, a przynosi jeszcze lepsze rezultaty, gdy jest poszerzona o właściwe przygotowanie teoretyczne [69].

5. PROBLEMY, WYZWANIA I PERSPEKTYWY DALSZEGO STOSOWANIA SYMULATORÓW USG W EDUKACJI MEDYCZNEJ

Szereg badań sprawdzających użyteczność symulatorów USG w edukacji medycznej umożliwia wyciągnięcie wniosków na temat zastosowania i problemów, które należy rozwiązać w najbliższej przyszłości [62]. Jednakże, istotnym elementem w ocenianiu efektywności takiego rodzaju treningu jest późniejsze skonfrontowanie zdobytej wiedzy z realnym środowiskiem klinicznym i żywym pacjentem [68].

Jednym ze zgłaszanych problemów dotyczących użytkowania symulatorów USG były odstępstwa od rzeczywistego obrazu uzyskiwanego na monitorze aparatu USG. Wykazano, że w przypadku symulatora ultrasonografii dooskrzelowej, obraz uzyskiwany na wysokości strun głosowych odpowiada obrazowi obserwowanemu w zwykłym bronchoskopie elastycznym, co może być mylące dla studentów, szczególnie na początku edukacji w zakresie poprawności wykorzystania techniki USG [62]. Jednocześnie w omawianym symulatorze dooskrzelowym obrazowane węzły chłonne są lepiej widoczne niż w standardowym badaniu, co również może wpływać na wyniki procesu nauczania i wykonywania badań USG w realnych warunkach [62,63]. W niektórych symulatorach USG, pomimo dobrego obrazu na monitorze, studenci rozpoznawali inne struktury niż podawał klucz odpowiedzi w oprogramowaniu urządzenia, co skutkowało niezaliczeniem sesji treningowej [18]. Kolejnym zgłaszanym aspektem dotyczącym nieprawidłowości wyświetlanego obrazu na symulatorach USG były liczne artefakty powstające w wyniku procesu rekonstrukcji obrazu szczególnie podczas zmiany płaszczyzny skanowania, utrudniające studentom wnioskowanie [29]. Wadą niektórych symulatorów jest niedostatecznie dobry obraz, który nie urzeczywistnia deformacji obrazu pod wpływem kompresji sondy i nie zachowuje realizmu oddziaływania pomiędzy naciskiem sondy, a odkształceniem manekina. Problem ten wynika z różnicy w strukturze manekina i ciała człowieka, wykazujących inne właściwości fizyczne [70].

Ograniczenia w posługiwaniu się symulatorami USG dotyczą również kontaktów lekarz-pacjent, dlatego konieczne jest takie dobranie treningów symulacyjnych, aby uczący się (szczególnie studenci medycyny) mogli nabyć

jak najwięcej umiejętności komunikacyjnych dotyczących kontaktów międzyludzkich [71]. Często pojawiającym się problemem, w treningu z użyciem symulatorów USG jest brak w pobliżu doświadczonej osoby, której studenci mogliby zadawać dodatkowe pytania i zasięgać rad w przypadku pojawiających się wątpliwości [18].

Wyzwaniem dla nowych generacji symulatorów USG jest lepsza porównywalność obrazu na urządzeniu do warunków rzeczywistych, zaprojektowanie manekinów w największym stopniu oddających funkcjonowanie ludzkiego ciała i jego poszczególnych organów oraz wyeliminowanie błędów pojawiających się w oprogramowaniu [63,72]. Przy konstruowaniu nowych urządzeń warto również zwrócić uwagę na specyficzne wyposażenie i możliwości symulatora dostosowane do przeprowadzania konkretnych badań lub biopsji w warunkach kontroli USG. Na przykład przy testowaniu symulatora do USG przezodbytniczego szczególną uwagę zwrócono na potrzebę rozbudowania tego urządzenia o moduły symulacyjne do biopsji prostaty i pulsacji tętniczych podczas zastosowania metody Dopplera [23]. Wyzwaniem dla konstruktorów symulatorów USG jest poprawienie i ciągłe udoskonalanie urządzeń, aby możliwie najwierniej oddawały warunki panujące podczas badania USG [63,72]. Ponadto symulatory powinny odzwierciedlać jak najwięcej zarówno fizjologicznych, jak i patologicznych przypadków dla lepszego oswojenia się personelu medycznego z różnymi sytuacjami spotykanymi podczas badania USG [7]. Należy jednak podkreślić, że wykorzystanie symulatorów USG jest tylko jedną z możliwości kształcenia lekarzy, a każda sesja treningowa powinna być skojarzona dla maksymalizacji umiejętności z wiedzą książkową oraz z kontaktem z żywym pacjentem [9,10,29,72]. Konieczne jest zatem sprawdzenie wielu symulatorów USG pod kątem skuteczności treningu w przełożeniu na realne warunki kliniczne [68,73], które bezpośrednio przełożą się na poprawę kompetencji zawodowych szkolących się lekarzy [74-76]

6. PODSUMOWANIE

Nie ulega wątpliwości, że symulatory USG wniosły nową jakość do kształcenia studentów, lekarzy, ratowników medycznych i innych pracowników służby zdrowia. W przypadku ultrasonografii trening na żywych pacjentach jest bardzo czasochłonny i kłopotliwy oraz wielokrotnie nie daje możliwości zapoznania się z rzadko występującymi patologiami oraz możliwości ćwiczenia na przykład biopsji pod kontrolą USG. W celu przyspieszenia edukacji pracowników medycznych w zakresie prawidłowego wykonywania

i interpretowania badań USG zwraca się coraz większą uwagę na wykorzystanie urządzeń symulujących proces i przebieg badania w toku nauczania na studiach medycznych. Narzędziami, które pomagają w nabywaniu umiejętności praktycznych w zakresie ultrasonografii są symulatory USG. Nie wpływają one negatywnie na proces kształcenia się w zakresie poznawania zasad ultrasonografii, a nawet poprawiają umiejętności ćwiczących zarówno w zakresie poprawnego skanowania, jak i posługiwania się urządzeniem. Pomimo, że na rynku oferowanych jest wiele różnych symulatorów USG, to jednak niektóre z nich wymagają dopracowania m.in. w zakresie wierności przekazywanego obrazu. Alternatywą dla urządzeń stacjonarnych są oprogramowania dostępne w Internecie, które pozwalają na trening badania USG w każdych warunkach, jednak brak sondy w wyposażeniu niektórych z tych oprogramowań ogranicza zakres wykonywania wielu ćwiczeń. Należy podkreślić, że symulatory USG powinny stanowić wyposażenie każdej uczelni kształcącej studentów medycyny oraz szpitali klinicznych, w których wykonuje się skomplikowane zabiegi z wykorzystaniem tej techniki. Praca z symulatorami USG powinna stanowić ważny etap przygotowujący lekarzy do wykonywania zabiegów, pozwalający zapoznać się z nowoczesnymi urządzeniami rutynowo stosowanymi w medycynie, ale nie może być traktowana jako podstawowe źródło wiedzy lekarskiej w zakresie wykonywania badań USG.

REFERENCJE

- 1 Kunkler, Kevin. "The role of medical simulation: an overview." *The International Journal of Medical Robotics and Computer Assisted Surgery* 2.3 (2006): 203-210.
- 1 Bradley, Paul. "The history of simulation in medical education and possible future directions." *Medical education* 40.3 (2006): 254-262.
- 2 Goksel, O., & Salcudean, S. E. (2010, January). Haptic simulator for prostate brachytherapy with simulated ultrasound. In *International Symposium on Biomedical Simulation* (pp. 150-159). Springer, Berlin, Heidelberg.
- 3 Starkov, R., Zhang, L., Bajka, M., Tanner, C., & Goksel, O. (2019). Ultrasound simulation with deformable and patient-specific scatterer maps. *International journal of computer assisted radiology and surgery*, 14(9), 1589-1599.

- 4 Mircea, P. A., Badea, R., Fodor, D., & Buzoianu, A. D. (2012). Using ultrasonography as a teaching support tool in undergraduate medical education-time to reach a decision. *Medical ultrasonography*, 14(3), 211-216.
- 5 Köhn, S., Van Lengen, R. H., Reis, G., Bertram, M., & Hagen, H. (2004). Ves: virtual echocardiography system. In The 4th IASTED International Conference on Visualization, Imaging, and Image Processing (VIIP-04).
- 6 Bentley, S., Mudan, G., Strother, C., & Wong, N. (2015). Are live ultrasound models replaceable? Traditional versus simulated education module for FAST exam. *Western Journal of Emergency Medicine*, 16(6), 818 .
- 7 Butter, J., Grant, T. H., Egan, M., Kaye, M., Wayne, D. B., Carrión-Carire, V., & McGaghie, W. C. (2007). Does ultrasound training boost Year 1 medical student competence and confidence when learning abdominal examination?. *Medical education*, 41(9), 843-848.
- 8 Stallkamp, J., & Wapler, M. (1998). UltraTrainer--a training system for medical ultrasound examination. *Studies in health technology and informatics*, 50, 298-301.
- 9 Ehricke, H. H. (1998). SONOSim3D: a multimedia system for sonography simulation and education with an extensible case database. *European journal of ultrasound*, 7(3), 225-230.
- 10 Meller, G. (1997). A typology of simulators for medical education. *Journal of digital imaging*, 10(1), 194-196.
- 11 Maul, H., Scharf, A., Baier, P., Wüstemann, M., Günter, H. H., Gebauer, G., & Sohn, C. (2004). Ultrasound simulators: experience with the SonoTrainer and comparative review of other training systems. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 24(5), 581-585.
- 12 Tolsgaard, M. G. (2017). *Assessment and learning of ultrasound skills in Obstetrics & Gynecology*. University of Copenhagen, Faculty of Health and Medical Sciences.
- 13 Sawhney, C., Lalwani, S., Ray, B. R., Sinha, S., & Kumar, A. (2017). Benefits and pitfalls of cadavers as learning tool for ultrasound-guided regional anesthesia. *Anesthesia, essays and researches*, 11(1), 3.

- 14 Hoyer, R., Means, R., Robertson, J., Rappaport, D., Schmier, C., Jones, T., ... & Amini, R. (2016). Ultrasound-guided procedures in medical education: a fresh look at cadavers. *Internal and emergency medicine*, 11(3), 431-436.
- 15 Canty, D. J., Hayes, J. A., Story, D. A., & Royse, C. F. (2015). Ultrasound simulator-assisted teaching of cardiac anatomy to preclinical anatomy students: A pilot randomized trial of a three-hour learning exposure. *Anatomical sciences education*, 8(1), 21-30.
- 16 Aiger, D., & Cohen-Or, D. (1998). Real-time ultrasound imaging simulation. *Real-Time Imaging*, 4(4), 263-274.
- 17 Gibbs, V. (2014). An investigation into sonography student experiences of simulation teaching and learning in the acquisition of clinical skills. *Ultrasound*, 22(3), 173-178.
- 18 Arkhurst, W., Pommert, A., Richter, E., Frederking, H., Kim, S. I., Schubert, R., & Höhne, K. H. (2001, June). A virtual reality training system for pediatric sonography. In *International congress series* (Vol. 1230, pp. 483-487). Elsevier.
- 19 Alterovitz, R., Pouliot, J., Taschereau, R., Hsu, I. C. J., & Goldberg, K. (2003). Simulating needle insertion and radioactive seed implantation for prostate brachytherapy. *Studies in health technology and informatics*, 19-25
- 20 Blum, T., Rieger, A., Navab, N., Friess, H., & Martignoni, M. (2013). A review of computer-based simulators for ultrasound training. *Simulation in Healthcare*, 8(2), 98-108.
- 21 Reis, G., Lappé, B., Köhn, S., Weber, C., Bertram, M., & Hagen, H. (2008). Towards a virtual echocardiographic tutoring system. In *Visualization in Medicine and Life Sciences* (pp. 99-119). Springer, Berlin, Heidelberg.
- 22 Persoon, M. C., Schout, B., Martens, E. J., Tjiam, I. M., Tielbeek, A. V., Scherpbier, A. J., ... & Hendriks, A. J. (2010). A simulator for teaching transrectal ultrasound procedures: How useful and realistic is it?. *Simulation in Healthcare*, 5(5), 311-314.
- 23 Chalouhi, G. E., Bernardi, V., & Ville, Y. (2015). Ultrasound simulators in obstetrics and gynecology: state of the art. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 46(3), 255-263.

- 24 Bernard, S., Richardson, C., Hamann, C. R., Lee, S., & Dinh, V. A. (2015). Head and neck ultrasound education—a multimodal educational approach in the predoctoral setting: a pilot study. *Journal of Ultrasound in Medicine*, 34(8), 1437-1443.
- 25 Strona internetowa producenta symulatora SonoSim: <https://sonosim.com> Informacje uzyskane w dniu 06.04.21r.
- 26 Vidal, F. P., Chalmers, N., Gould, D. A., Healey, A. E., & John, N. W. (2005, May). Developing a needle guidance virtual environment with patient-specific data and force feedback. In *International Congress Series* (Vol. 1281, pp. 418-423). Elsevier.
- 27 Monsky, W. L., Levine, D., Mehta, T. S., Kane, R. A., Ziv, A., Kennedy, B., & Nisenbaum, H. (2002). Using a sonographic simulator to assess residents before overnight call. *American Journal of Roentgenology*, 178(1), 35-39
- 28 Gunabushanam, G., Nautsch, F., Mills, I., & Scoutt, L. M. (2019). Accessible personal ultrasound training simulator. *Journal of Ultrasound in Medicine*, 38(6), 1425-1432.
- 29 Smith Jr, J. F., Bergmann, M., Gildersleeve, R., & Allen, R. (1998). A simple model for learning stereotactic skills in ultrasound-guided amniocentesis. *Obstetrics & Gynecology*, 92(2), 303-305.
- 30 Bude, R. O., & Adler, R. S. (1995). An easily made, low-cost, tissue-like ultrasound phantom material.
- 31 McLean, D., Hewitson, L., Atkinson, P., Lewis, D., Fraser, J., Verheul, G., ... & Robinson, B. (2019). ULTRASIM: ultrasound in trauma simulation. *Canadian Journal of Emergency Medicine*, 21(1), 125-128
- 32 Zierler, R. E., Leotta, D. F., Sansom, K., Aliseda, A., Anderson, M. D., & Sheehan, F. H. (2016). Development of a duplex ultrasound simulator and preliminary validation of velocity measurements in carotid artery models. *Vascular and endovascular surgery*, 50(5), 309-316.
- 33 Strona internetowa symulatora edus2 <http://www.edus2.com>. Dostęp z dnia 06.04.21r.

- 34 Damjanovic, D., Goebel, U., Fischer, B., Huth, M., Breger, H., Buerkle, H., & Schmutz, A. (2017). An easy-to-build, low-budget point-of-care ultrasound simulator: from Linux to a web-based solution. *Critical ultrasound journal*, 9(1), 1-6.
- 35 Strona internetowa producenta symulatora diSplay Ultrasound Simulator- firmy Insimo <https://www.insimo.com/display-ultrasound/>. Dostęp z dnia 06.04.21r.
- 36 Strona internetowa producenta symulatora Vaussim: [https://vaussim. accuratesolutions.eu](https://vaussim accuratesolutions.eu). Dostęp z dnia 06.04.21r.
- 37 Strona internetowa producenta symulatora Vimedix: CEA Healthcare: <https://caehealthcare.com/ultrasound-simulation/vimedix/> Dostęp z dnia 07.04.21r.
- 38 Orr, K. E., Hamilton, S. C., Clarke, R., Adi, M. Y., Gutteridge, C., Suresh, P., & Freeman, S. J. (2019). The integration of transabdominal ultrasound simulators into an ultrasound curriculum. *Ultrasound*, 27(1), 20-30.
- 39 Strona internetowa modułu treningowego COVID-19 producenta symulatorów CAE Healthcare z użyciem symulatora Vimedix <https://caehealthcare.com/covid19/ultrasound-training-suite/>
- 40 Singh, S., & Goyal, A. (2007). The origin of echocardiography: a tribute to Inge Edler. *Texas Heart Institute Journal*, 34(4), 431.
- 41 Kempny, A., & Piórkowski, A. (2010). CT2TEE-a novel, internet-based simulator of transoesophageal echocardiography in congenital heart disease. *Kardiologia Polska (Polish Heart Journal)*, 68(3), 374-379.
- 42 Weidenbach, M., Wick, C., Pieper, S., Quast, K. J., Fox, T., Grunst, G., & Redel, D. A. (2000). Augmented reality simulator for training in two-dimensional echocardiography. *Computers and biomedical research*, 33(1), 11-22.
- 43 Weidenbach, M., Trochim, S., Kreutter, S., Richter, C., Berlage, T., & Grunst, G. (2004). Intelligent training system integrated in an echocardiography simulator. *Computers in biology and medicine*, 34(5), 407-425.
- 44 Berlage, T., Fox, T., Grunst, G., & Quast, K. J. (1996, June). Supporting ultrasound diagnosis using an animated 3D model of the heart. In *Proceedings of the Third IEEE International Conference on Multimedia Computing and Systems* (pp. 34-39). IEEE.

- 45 Weidenbach, M., Wild, F., Scheer, K., Muth, G., Kreutter, S., Grunst, G., ... & Schneider, P. (2005). Computer-based training in two-dimensional echocardiography using an echocardiography simulator. *Journal of the American Society of Echocardiography*, 18(4), 362-366.
- 46 Weidenbach, M., Drachsler, H., Wild, F., Kreutter, S., Razek, V., Grunst, G., ... & Janousek, J. (2007). EchoComTEE—a simulator for transoesophageal echocardiography. *Anaesthesia*, 62(4), 347-353.
- 47 Donald, I., Macvicar, J., & Brown, T. G. (1958). Investigation of abdominal masses by pulsed ultrasound. *The Lancet*, 271(7032), 1188-1195.
- 48 Campbell, S. (2013). A short history of sonography in obstetrics and gynaecology. *Facts, views & vision in ObGyn*, 5(3), 213.
- 49 Tolsgaard, M. G., Rasmussen, M. B., Tappert, C., Sundler, M., Sorensen, J. L., Ottesen, B., ... & Tabor, A. (2014). Which factors are associated with trainees' confidence in performing obstetric and gynecological ultrasound examinations?. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 43(4), 444-451.
- 50 Lee, W., Ault, H., Kirk, J. S., & Comstock, C. H. (1995). Interactive multimedia for prenatal ultrasound training. *Obstetrics & Gynecology*, 85(1), 135-141.
- 51 Markov-Vetter, D., Muehl, J., Schmalstieg, D., Sorantin, E., & Riccabona, M. (2001). 3D augmented reality simulator for neonatal cranial sonography. *Comput Assist Radiol Surg*, 1230, 483-487.
- 52 Szkodziak, P., Woźniak, S., Czuczwar, P., Paszkowski, T., Milart, P., Woźniakowska, E., & Szlichtyng, W. (2014). Usefulness of three dimensional transvaginal ultrasonography and hysterosalpingography in diagnosing uterine anomalies. *Ginekologia polska*, 85(5).
- 53 Madsen, M. E., Konge, L., Nørgaard, L. N., Tabor, A., Ringsted, C., Klemmensen, Å. K., ... & Tolsgaard, M. G. (2014). Assessment of performance measures and learning curves for use of a virtual-reality ultrasound simulator in transvaginal ultrasound examination. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 44(6), 693-699.
- 54 Banerjee, S., Kataria, T., Gupta, D., Goyal, S., Bisht, S. S., Basu, T., & Abhishek, A. (2017). Use of ultrasound in image-guided high-dose-rate brachytherapy: enumerations and arguments. *Journal of contemporary brachytherapy*, 9(2), 146.

- 55 Wojciechowska Urszula, Didkowska Joanna. Zachorowania i zgony na nowotwory złośliwe w Polsce. Krajowy Rejestr Nowotworów, Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy. Dostępne na stronie <http://onkologia.org.pl/raporty/> dostęp z dnia 23/02/2021
- 56 Sclaverano, S., Chevreau, G., Vadcard, L., Mozer, P., & Troccaz, J. (2009, January). BiopSym: a simulator for enhanced learning of ultrasound-guided prostate biopsy. In *MMVR* (pp. 301-306).
- 57 Ni, D., Chan, W. Y., Qin, J., Qu, Y., Chui, Y. P., Ho, S. S., & Heng, P. A. (2008, September). An ultrasound-guided organ biopsy simulation with 6dof haptic feedback. In *International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention* (pp. 551-559). Springer, Berlin, Heidelberg.
- 58 Dawoud, D., Lyndon, W., Mrug, S., Bissler, J. J., & Mrug, M. (2012). Impact of ultrasound-guided kidney biopsy simulation on trainee confidence and biopsy outcomes. *American journal of nephrology*, 36(6), 570-574.
- 59 Nonde, J., Adam, A., & Laher, A. E. (2018). Validation of a low cost, disposable, and ultrasound-guided suprapubic catheter insertion trainer. *Urology*, 115, 45-50.
- 60 Konge, L., Clementsen, P. F., Ringsted, C., Minddal, V., Larsen, K. R., & Annema, J. T. (2015). Simulator training for endobronchial ultrasound: a randomised controlled trial. *European Respiratory Journal*, 46(4), 1140-1149.
- 61 Stather, D. R., MacEachern, P., Rimmer, K., Hergott, C. A., & Tremblay, A. (2011). Validation of an endobronchial ultrasound simulator: differentiating operator skill level. *Respiration*, 81(4), 325-332.
- 62 Stather, D. R., Maceachern, P., Rimmer, K., Hergott, C. A., & Tremblay, A. (2011). Assessment and learning curve evaluation of endobronchial ultrasound skills following simulation and clinical training. *Respirology*, 16(4), 698-704.
- 63 Heer, I. M., Middendorff, K., Müller-Egloff, S., Dugas, M., & Strauss, A. (2004). Ultrasound training: the virtual patient. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 24(4), 440-444.

- 64 Costantino, T. G., Satz, W. A., Stahmer, S. A., & Dean, A. J. (2003). Predictors of success in emergency medicine ultrasound education. *Academic emergency medicine*, 10(2), 180-183.
- 65 Maloney, E., Hippe, D. S., Paladin, A., Chew, F. S., & Ha, A. S. (2016). Musculoskeletal ultrasound training for radiology residents: lecture versus interactive learning module. *Academic radiology*, 23(7), 789-796.
- 66 Hani, S., Chalouhi, G., Lakissian, Z., & Sharara-Chami, R. (2019). Introduction of ultrasound simulation in medical education: exploratory study. *JMIR medical education*, 5(2), e13568.
- 67 Parks, A. R., Atkinson, P., Verheul, G., & LeBlanc-Duchin, D. (2013). Can medical learners achieve point-of-care ultrasound competency using a high-fidelity ultrasound simulator?: a pilot study. *Critical ultrasound journal*, 5(1), 1-6.
- 68 Dromey, B. P., Peebles, D. M., & Stoyanov, D. V. (2021). A systematic review and meta-analysis of the use of high-Fidelity simulation in obstetric ultrasound. *Simulation in Healthcare*, 16(1), 52.
- 69 Ourahmoune, A., Larabi, S., & Hamitouche-Djabou, C. (2012, August). A survey of echographic simulators. In *CompIMAGE* (pp. 273-276).
- 70 Elley, C. R., Clinick, T., Wong, C., Arroll, B., Kennelly, J., Doerr, H., ... & Kerse, N. (2012). Effectiveness of simulated clinical teaching in general practice: randomised controlled trial. *Journal of primary health care*, 4(4), 281-287.
- 71 Juo, Y. Y., Quach, C., Hiatt, J., Hines, O. J., Tillou, A., & Burruss, S. (2017). Comparative analysis of simulated versus live patient-based FAST (Focused Assessment with Sonography for Trauma) training. *Journal of surgical education*, 74(6), 1012-1018.
- 72 Almestehi, M., Alomaim, W., Rainford, L., Stokes, D., Stanton, M., & Moran, M. (2019). Role of the virtual reality simulator (ScanTrainer) as a multidisciplinary training tool in transvaginal ultrasound: A systematic review and narrative synthesis. *Radiography*, 25(3), 260-268.
- 73 Sidhu, H. S., Olubaniyi, B. O., Bhatnagar, G., Shuen, V., & Dubbins, P. (2012). Role of simulation-based education in ultrasound practice training. *Journal of Ultrasound in Medicine*, 31(5), 785-791.

- 74 Ourahmoune, A., Larabi, S., & Hamitouche-Djabou, C. (2012, August). A survey of echographic simulators. In *CompIMAGE* (pp. 273-276).
- 75 Mackay, F. D., Zhou, F., Lewis, D., Fraser, J., & Atkinson, P. R. (2018). Can you teach yourself point-of-care ultrasound to a level of clinical competency? Evaluation of a self-directed simulation-based training program. *Cureus*, 10(9).
- 76 Strona internetowa producenta symulatora SonoMan - Simulab. <https://www.simulab.com/products/sonoman> Dostęp z dnia 07.04.21r.
- 77 Strona internetowa symulatora CT2TEE <http://www.ct2tee.agh.edu.pl>. Dostęp z dnia 07.04.21r.
- 78 Strona internetowa producenta symulatora Ultrasim- Medsim: <https://medsim.com>. Dostęp z dnia 08.04.21r.
- 79 Broszura informacyjna symulatora Ultrasim- *Knowledge through experience*: https://medsim.com/ultrasim_73_4064402069.pdf

INNOWACJE W LECZENIU GUZÓW LITYCH - ZASTOSOWANIE TERAPII CAR-T

Magdalena Świątko, Magdalena Wątroba, Nadia Woźniak,
Aurelia Malczyk, Michał Nicze

Wydział Nauk Medycznych w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Abstrakt:

W ostatnim czasie nastąpił istotny postęp w diagnostyce i leczeniu szeregu guzów litych. Wśród najbardziej innowacyjnych strategii leczenia nowotworów szczególne miejsce zajmuje immunoterapia, która opiera swój mechanizm działania na pobudzaniu układu odpornościowego, posiadającego wrodzone przeciwnowotworowe strategie obronne. Najnowszą jej odmianą jest terapia CAR-T, wykorzystująca chimeryczne receptory antygenowe (ang. chimeric antigen receptors – CARs). Osiągnęła ona ogromny sukces kliniczny w terapii nowotworów hematologicznych, szczególnie w leczeniu ostrej białaczki limfoblastycznej (acute lymphoblastic leukemia – ALL) oraz chłoniaka rozlanego z dużych komórek B (diffuse large B-cell lymphoma – DLBCL). Komórki CAR-T są limfocytami T pacjenta, poddanymi procesom inżynierii genetycznej. Modyfikacja in-vitro genomu limfocytów T zapewnia im nowe przeciwnowotworowe właściwości, przez co nowo powstałe reprogramowane limfocyty T (CAR-T) nazywane są 'żywym lekiem'. Mimo niewątpliwego postępu, jaki terapia CAR-T dokonała w zakresie hematologii, wyzwaniem dalej pozostaje terapia guzów litych. Poprawa skuteczności tej formy immunoterapii są obecnie obiektem wielu badań klinicznych. Znamienita większość z nich skupia się przede wszystkim na poprawie właściwości komórek CAR-T oraz przezwycięzeniu niekorzystnego, immunosupresyjnego wpływu mikrośrodowiska guza na ich aktywność. Kluczowymi wyzwaniami w zastosowaniu komórek CAR-T w leczeniu innych nowotworów stanowią trzy obszary: rozpoznanie, migracja oraz przeżycie w odniesieniu do komórki nowotworowej. Niniejszy rozdział poświęcony jest omówieniu podstawowych zagadnień związanych z terapią CAR-T guzów litych, przedstawieniu głównych przeszkód w jej optymalizacji i zwiększeniu potencjału antynowotworowego, a także opisaniu przyszłych strategii terapeutycznych, kierunku zmian oraz rozwoju terapii CAR-T w przyszłości.

Słowa kluczowe: guz lity, immunoterapia, CAR-T, receptor

Abstract:

Recently, some significant progress has been made in the field of diagnosis and treatment the number number of solid tumors. Immunotherapy occupies a special place among the most innovative cancer treatment strategies as its mechanism of action is based on a stimulation of the immune system together with its innate anti-cancer defense responses. Its latest version is CAR-T-T therapy which uses chimeric antigen receptors (chimeric antygen receptors - CARs). It has achieved great clinical success in the treatment of hematological malignancies, especially in the treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL) and diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). The CAR-T cells are the patient's T cells that have been genetically engineered. In-vitro modification of the T lymphocytes' genome provides them with new anti-cancer properties, making the newly created reprogrammed T lymphocytes (CAR-T) called 'living medicine'. Despite the undoubted progress made by CAR-T therapy in the field of hematooncology, the treatment of solid tumors remains a challenge. Improving the effectiveness of this form of immunotherapy is currently the target of many clinical trials. The vast majority of them focus primarily on improving the properties of CAR-T cells and overcoming the negative, immunosuppressive influence of the tumor microenvironment on their activity. The key challenges in the use of CAR-T cells in the treatment of other cancers are three areas: recognition, migration and cancer cell survival. This chapter discusses the fundamental issues of CAR-T therapy for solid tumors, describes the main obstacles to its optimization and enhancement of anti-cancer potential, as well as describes future therapeutic strategies, direction of change and future development of CAR-T therapy.

Keywords: solid tumor, immunotherapy, CAR-T, receptor

1. WSTĘP

Immunoterapia z wykorzystaniem hybrydowych receptorów CAR (Chimeric Antigen Receptors) to młoda, innowacyjna strategia leczenia nowotworów. W ostatnim czasie amerykańska Agencja Żywności i Leków (FDA, Food and Drug Administration) zarejestrowała oficjalnie dwie terapie, z których jedna wykorzystuje lek Kymriah (Novartis) w leczeniu chłoniaka rozlanego z dużych komórek B (DLBCL - diffuse large B-cell lymphoma) oraz nawrotowej i opornej na leczenie ostrej białaczki limfoblastycznej z komórek B (B-ALL, acute lymphoblastic leukemia), a druga lek Yescarta (Kite Pharma) w leczeniu chłoniaka pierwotnego śródpiersia z dużych komórek B (PBBCL - primary mediastinal large B-cell lymphoma) oraz nawracającego lub opornego na leczenie DLBCL [1]. Wyposażone w chimeryczne receptory limfocyty T zyskują nowe właściwości oraz nabywają zdolność do efektywniejszego rozpoznawania specyficznych antygenów na komórkach nowotworowych [2]. Główną ideą terapii jest uzyskanie w stosunkowo krótkim czasie komórek nie tylko odporniejszych, ale też zdolnych do wzbudzenia w organizmie pacjenta silniejszej odpowiedzi immunologicznej. Fakt, iż komórkami bazowymi, poddanymi procesom inżynierii genetycznej, są naturalne i nieobce dla pacjenta jego własne limfocyty T, sprawia, że działają one jak 'żywy lek', zapewniający szybki i długotrwały efekt terapeutyczny [3]. Jednakże heterogeniczność

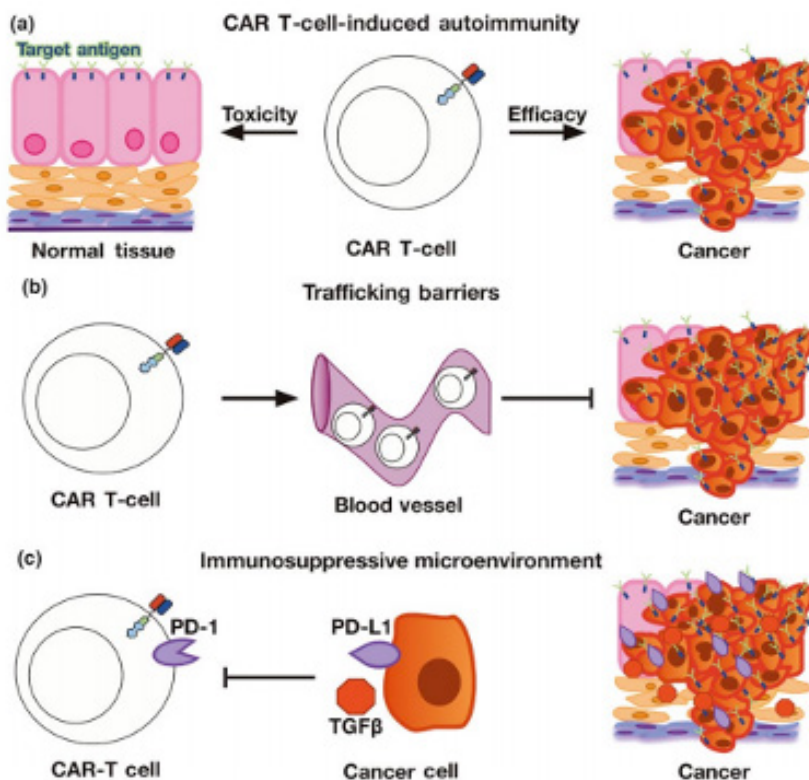
komórek nowotworowych guzów litych oraz ich różnorodna lokalizacja w organizmie sprawiają, iż zastosowanie terapii CAR-T w ich leczeniu napotyka wiele przeszkód. Należą do nich immunosupresyjne mikrośrodowisko nowotworu, toksyczność on-target i off-target, związana z obecnością antygenów nowotworowych na zdrowych komórkach oraz odmienny poziom ekspresji antygenów powierzchniowych [4]. W celu przezwyciężenia przeszkód, jakie leżą na drodze implementacji tej terapii do programów leczenia guzów litych, wykorzystano wiele możliwości oferowanych przez inżynierię genetyczną. Jedną ze strategii jest inaktywacja receptora programowanej śmierci 1 (ang. programmed death receptor 1, PD-1), który naturalnie występuje na powierzchni limfocytów T. Częsteczka ta odpowiada za hamowanie odpowiedzi przeciwnowotworowej oraz znacznie zwiększa podatność limfocytów T na supresję, a nawet apoptozę. Jej związanie z ligandami PD-L1 i PD-L2 hamuje aktywację układu odpornościowego, a sam szlak PD-1/PD-L1 uznawany jest za mechanizm ucieczki komórek nowotworowych spod nadzoru immunologicznego [5]. Dodatkowo, aby zniwelować niekorzystne działanie receptora PD-1, wykorzystywane są specyficzne przeciwciała skierowane przeciwko tym cząsteczkom. Poprzez redukcję populacji komórek supresorowych w mikrośrodowisku guza, odpowiedź przeciwnowotworowa komórek CAR-T ulega zwiększeniu [6]. Najtrudniejszą jednak kwestią, która stoi na drodze przeniesienia sukcesu terapii nowotworów hematologicznych do terapii guzów litych jest wybór targetowego antygenu dla komórek CAR-T. Trwające obecnie na całym świecie liczne badania kliniczne mają na celu odnalezienie takich antygenów, które z jednej strony będą wykazywać ekspresję na wszystkich komórkach nowotworowych, a z drugiej nie będą obecne na powierzchni komórek zdrowych. Mimo wielu starań, jak dotąd żadna z terapii CAR-T w leczeniu guzów litych nie została oficjalnie zarejestrowana. Optymistycznym wydaje się jednak fakt, iż w samych Chinach trwa obecnie ponad 40 badań klinicznych, które skoncentrowane są wokół guzów narządowych i możliwościach wdrożenia terapii CAR - T do ich leczenia (rycina 1.) [7]. Poniższy rozdział poświęcony jest analizie badań klinicznych nad terapią guzów litych, przeszkód, które należy pokonać, aby tę terapię wdrożyć oraz przedstawieniu kierunku przyszłych zmian oraz strategii rozwoju nowatorskiej immunoterapii CAR -T.

Antigen	Tumor target	Sponsor	Phase
CD133	Liver cancer; pancreatic cancer; brain tumor; breast cancer; ovarian tumor; colorectal cancer; acute myeloid lymphoid leukemias	Chinese PLA General Hospital	Phase 1
CD138	Multiple myeloma	Chinese PLA General Hospital	Phase 1/Phase 2
CD19	Recurrent or refractory B-cell tumor	Second Military Medical University	Phase 1/Phase 2
CEA	Lung cancer; colorectal cancer; gastric cancer; breast cancer; pancreatic cancer	Southwest Hospital	Phase 1
Claudin 18.2	Advanced gastric adenocarcinoma, pancreatic adenocarcinoma	Changhai Hospital	NA
EGFR	Advanced EGFR-positive solid tumors	Chinese PLA General Hospital	Phase 1/Phase 2
EGFR	Advanced glioma	Renji Hospital	Phase 1
EGFR	Advanced solid tumor	Shanghai Cell Therapy Research Institute	Phase 1/Phase 2
EGFR	EGFR-positive colorectal cancer	Shenzhen Second People's Hospital	Phase 1/Phase 2
EGFRvIII	Recurrent glioblastoma multiforme	Beijing Sanbo Brain Hospital	Phase 1
EGFRvIII	Glioblastoma multiforme	Shenzhen Geno-Immune Medical Institute	Phase 1/Phase 2
EphA2	EphA2-positive malignant glioma	Fuda Cancer Hospital	Phase 1/Phase 2
EpCAM	Liver neoplasms	Sinobiway Cell Therapy Co., Ltd.	NA
EpCAM	Stomach neoplasms	Sinobiway Cell Therapy Co., Ltd.	NA
EpCAM	Malignant neoplasms of the nasopharynx, TNM staging, distant metastasis and breast cancer recurrence	Sichuan University	Phase 1
EpCAM	Colon cancer, esophageal carcinoma, pancreatic cancer, prostate cancer, gastric cancer, hepatic carcinoma	First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College	Phase 1/Phase 2
GD2	Neuroblastoma	Zhujiang Hospital	Phase 2
GD2	Relapsed or refractory neuroblastoma	Sinobiway Cell Therapy Co., Ltd.	NA
GD2	Solid tumor	Shenzhen Geno-Immune Medical Institute	Phase 1/Phase 2
GPC3	Hepatocellular carcinoma	Renji Hospital	Phase 1
GPC3	Hepatocellular carcinoma and liver metastases	Shanghai GeneChem Co., Ltd.	Phase 1/Phase 2
GPC3	GPC3-positive hepatocellular carcinoma	Funda Cancer Hospital, Guangzhou	Phase 1/Phase 2

Rycina 1. Chiny - wybrane badania kliniczne oceniające skuteczność terapii CAR-T w leczeniu guzów litych [Źródło: <https://www.clinicaltrials.gov>]

2. PRZESZKODY W LECZENIU GUZÓW LITYCH TERAPIĄ CAR-T

Sukces terapii CAR-T wywodzi się z hematologii, w której wykazano wysoką skuteczność w leczeniu ALL oraz DLCLB a także innych nowotworów hematologicznych, z ekspresją antygenu powierzchniowego CD-19. W ośrodkach medycznych na całym świecie trwa obecnie ponad 100 badań klinicznych, których celem jest powielenie sukcesu terapeutycznego terapii CAR-T w guzach litych [8]. Mimo wielu toczących się badań nad odnalezieniem odpowiednich antygenów, jak dotąd nie udało się przenieść tej strategii leczenia na inne nowotwory niehematologiczne. Liczne bariery, wynikające z heterogeniczności tych guzów oraz ich mikrośrodowiska są przyczyną wolniejszego i trudniejszego procesu projektowania takich komórek CAR-T, które po infuzji do organizmu pacjenta przyniosłyby oczekiwany efekt terapeutyczny - remisję choroby [rycina 2.] [8].



Rycina 2. Schemat przedstawiający 3 największe bariery w zastosowaniu terapii CAR-T do leczenia guzów litych: a) identyfikacja odpowiednich antygenów docelowych oraz autoimmunizacja wywołana komórkami CAR-T; b) dotarcie komórek CAR-T do komórek nowotworowych i infiltracja guza; c) pokonanie bariery immunosupresyjnego mikrośrodowiska guza; [Źródło: <https://ascpt.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cpt.1280>]

2.1 Transport komórek CAR-T i infiltracja guza

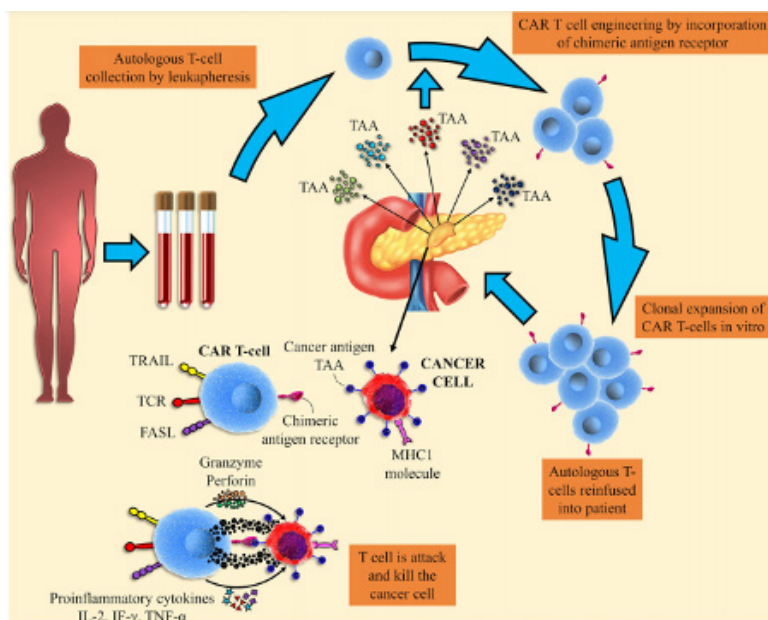
Terapia komórkami CAR-T w przypadku nowotworów hematologicznych jest mniej ograniczona w porównaniu do guzów litych, ponieważ komórki CAR-T krążące w krwiobiegu mają stały kontakt z komórkami nowotworowymi. W drugim przypadku, komórki nie zawsze są w stanie spenetrować tkanki guza przed śródbłonek naczyńiowy [13]. Dodatkowo, szereg mechanizmów supresorowych w obrębie tkanki guza znacznie ogranicza możliwości infiltracji komórek CAR-T do jego wnętrza. Jednym z nich jest nadekspresja

receptora dla endoteliny B, prowadząca w konsekwencji do mechanizmu ‘regulacji w dół’ dla cząsteczki ICAM-1, uniemożliwiając przeniknięcie komórek CAR-T poza naczynie krwionośne. Z drugiej strony migracja komórek CAR-T zależy od poziomu ekspresji chemokin tj.: CCL11 i CCL1, który zmniejszony jest w przypadku komórek guzów litych [14]. Skutkiem wszystkich wyżej opisanych procesów, migracja i infiltracja masy guza przez komórki CAR-T jest w dużym stopniu ograniczona [15]. Ze względu na trudności w dotarciu do komórek guza, opracowano strategię miejscowego podawania zmodyfikowanych limfocytów T jako alternatywę dla drogi ogólnoustrojowej, stosowanej w terapii guzów hematologicznych. Pozytywną odpowiedź w badaniach przedklinicznych uzyskano w wyniku wewnątrzczaszkowego podania leku w terapii glejaka wielopostaciowego. Podobny wynik otrzymano w terapii międzybłoniaka opłucnej, wybierając zamiast drogi systemowej, drogę doopłucnową [16]. Komórki CAR-T modyfikowane są w ten sposób, że na ich powierzchni pojawiają się specyficzne receptory dla chemokin, w szczególności CCR2 i CCR4, których znaczną ekspresję obserwuje się na komórkach nowotworowych guza, co w oczywisty sposób wzmacnia adhezję zmodyfikowanych limfocytów (rycina 3.) [17]. Aby zwiększyć szanse komórek CAR-T na dotarcie i infiltrację masy nowotworowej w guzach litych, w dalszym stopniu modyfikuje się strukturę receptora CAR lub łączy z wektorem w postaci wirusa onkolitycznego, doprowadzając ostatecznie do wzmacnienia odpowiedzi zapalnej w obrębie guza [18]. Zamiast rutynowego modyfikowania limfocytów T i dostosowywania struktury ich receptorów do specjalnego profilu chemokin wydzielanych przez komórki nowotworowe, bardziej preferowaną metodą jest zmiana profilu wydzielanych chemokin na takie, na które limfocyty T wcześniej reagowały. Do tej transformacji profilu chemokin guza używany jest właśnie wirus onkolityczny, powodujący, że komórki guza zdolne są do wydzielania cząsteczki CCL5. Do grupy receptorów, których ekspresja rutynowo zachodzi na powierzchni komórek CAR-T należą cząsteczki z grupy RANTES: CCR1, CCR3, CCR5. Połączenie ekspresji CCR5 i wirusa onkolitycznego, jako wektora genu dla chemokiny swoistej dla tego receptora - CCL5, dało pozytywną odpowiedź w badaniach przedklinicznych, zmniejszając populację komórek nowotworowych [18,19].

2.2 Bariera immunosupresyjnego środowiska

Kolejnym ważnym wyzwaniem w efektywnym namierzeniu komórek nowotworowych przez komórki CAR-T jest pokonanie immunosupresyjnego

środowiska guza (TME - tumor microenvironment). W przeciwieństwie do nowotworów hematologicznych, w których nie występują lokalne szlaki supresji immunologicznej, guzy lite mogą być naciekane w dużym stopniu przez komórki promujące ich proliferację, angiogenezę oraz tworzenie przerzutów w innych tkankach [20]. Limfocyty T regulatorowe (Tregs), komórki supresyjne pochodzące z linii mieloidalnej (MDSCs - myeloid-derived suppressor cells) oraz populacje makrofagów M2 (TAMs- tumor-associated macrophages) są czołowym przykładem komórek supresorowych w mikrośrodowisku guza [21]. Komórki te odpowiadają za wzrost i proliferację komórek nowotworowych, dzięki lokalnej produkcji czynników wzrostu, cytokin i chemokin tj.: VEGF, IL-4, IL-10 oraz TGFβ, tym samym znacznie ograniczając odpowiedź przeciwnowotworową [19]. Tak niekorzystne warunki z licznymi czynnikami supresorowymi panującymi w najbliższym otoczeniu guza, znacząco ograniczają możliwości zastosowania terapii CAR-T w ich leczeniu. Liczne badania naukowe skupiły się więc na próbach wzmocnienia funkcji komórek CAR-T poprzez modyfikację ich szlaków metabolicznych. Ich celem było zapewnienie komórkom większej aktywności i odporności w niesprzyjających warunkach panujących w mikrośrodowisku guza. Jak wiadomo, wysoki poziom adenozyiny zewnątrzkomórkowej oraz reaktywnych form tlenu (ROS - reactive oxygen species) należą do czynników zakłócających efektywne funkcjonowanie limfocytów T. Analogicznie do nich działa wysokie stężenie potasu zewnątrzkomórkowego w obrębie guza, które hamuje fosforylację kinazy Akt-mTOR zależnej od receptora TCR limfocytów T, zmniejszając wtórnie ich aktywność efektorową. Obecne działania inżynierii genetycznej skupiły się na zwiększeniu ekspresji białka kanałowego dla potasu, mającego zapewnić większy pozakomórkowy wpływ jonów, niwelując tym samym niekorzystny wpływ ich wysokiego stężenia [22]. Badania wykazały, że inhibicja aktywności supresorowych komórek w mikrośrodowisku guza jest niezbędnym czynnikiem do uzyskania pożądanego efektu terapii CAR-T w guzach litych. Działania wykorzystujące przeciwciała supresorowe w połączeniu z deplecją limfocytów T regulatorowych oraz MDSCs przyniosły pożądaną efekt w badaniach na modelach zwierzęcych [23,24]. Inną grupą komórek, wykazujących ekspresję białka aktywującego fibroblasty (FAP- fibroblast activation protein) są fibroblasty związane z nowotworem (CAFs - cancer-associated fibroblasts). Są one subpopulacją komórek podścieliska, które nie tylko sprzyjają wzrostowi guza, ale też nasilają angiogenezę oraz przyczyniają się do przebudowy macierzy międzykomórkowej. Odgrywają one kluczową rolę w kształtowaniu immunosupresyjnego charakteru TME poprzez uwalnianie białek macierzy



Rycina 3. Schemat przedstawiający wyizolowanie limfocytów T z krwi obwodowej pacjenta na drodze leukaferozy oraz interakcje komórek CAR-T z antygenami swoistymi nowotworowo na powierzchni tkanek guza. Po pobraniu od pacjenta limfocytów T poddane są one procesom inżynierii genetycznej, w wyniku czego na ich powierzchni dochodzi do ekspresji receptorów CAR, których targetem są markery nowotworowe komórek docelowych. Przed infuzją do organizmu pacjenta, ulegają one proliferacji w warunkach in-vitro. Po infuzji, dzięki obecności receptora CAR, łączą się one z odpowiednim ligandem na powierzchni guza, prowadząc do sekrecji cytokin oraz czynników indukujących apoptozę. W konsekwencji, wszystkie te mechanizmy prowadzą do śmierci komórek nowotworowych [Źródło: <https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-020-02128-1>]

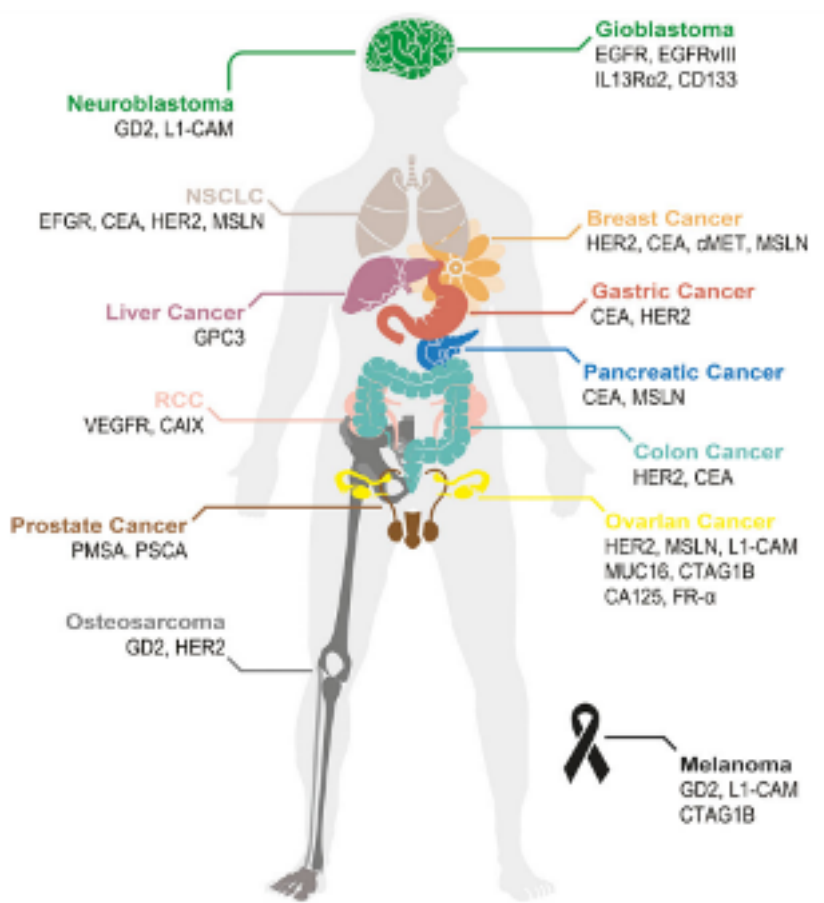
pozakomórkowej (ECM - extracellular matrix), osłabiających zdolność do penetracji komórek T. Przedmiotem obecnych badań jest stworzenie komórek CAR-T, których targetem będzie białko FAP oraz stworzenie populacji komórek CAR-T zdolnych do wydzielania enzymów rozkładających ECM, a wtórnie do lizy samego guza [25]. Drugą strategią rozwoju jest zaprogramowanie komórek CAR-T zdolnych do syntezy prozapalnej IL-12, doprowadzając tym samym do modyfikacji TME oraz zwiększonej aktywacji i rekrutacji makrofagów [26]. Liczne zespoły badawcze próbowały wzmocnić aktywność komórek CAR-T, wykorzystując zarówno adoptywny transfer limfocytów T, jak i czynniki modulujące ECM. Inną strategią terapeutyczną, która wykazała znaczącą skuteczność jest wykorzystanie inhibitorów punktów kontrolnych,

których celem są szlaki: PD1/PD-L1 oraz CTLA-4 [27]. W tym przypadku modyfikacja komórek CAR-T polega na uwalnianiu przeciwciał anty-PD-L1 skierowanych przeciwko cząsteczkom PD-1 oraz LAG3, wykorzystując metodę CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) [28]. Podczas gdy przeciwciała anty-CTLA-4 wzmacniają odpowiedź przeciwnowotworową endogennych limfocytów T w sposób znany, to analogiczny mechanizm, w jakim stymulują one egzogenne komórki CAR-T do tej samej odpowiedzi nie został wyjaśniony. Co więcej, przeciwciała anty-CTLA-4 mogą wywołać odpowiedź immunologiczną na drodze zewnątrzkomórkowej, poprzez redukcję liczby limfocytów T regulatorowych CLTA4+, towarzyszących komórkom CAR-T [29].

2.3. Specyficzność antygenowa w guzach litych

Największym wyzwaniem we wdrożeniu terapii CAR-T do leczenia guzów litych jest odnalezienie odpowiedniego antygenu powierzchniowego na komórce docelowej. Jedną z dominujących właściwości komórek nowotworowych w guzach litych jest ich wysoka heterogeniczność, co oznacza, że wykazują one różną morfologię i odmienną profil fenotypowy. Ta niejednorodność populacji komórek nowotworowych wpływa niekorzystnie na skuteczność immunoterapii, ze względu na ograniczone możliwości identyfikowania ich przez układ odpornościowy. Aby wyeliminować problem niskiej swoistości antygenowej oraz różnej ekspresji antygenów na różnych komórkach, konieczne jest wyposażenie komórek CAR w jeszcze bardziej swoiste dla tych antygenów receptory. Jednym z proponowanych antygenów dla komórek CAR-T jest specyficzny receptor naskórkowego czynnika wzrostu EGFRvIII (ang. epidermal growth factor variant III), uznawany za jedyny antygen swoisty dla nowotworu, rozpoznawany przez komórki CAR-T. Wykazano, że jego ekspresja zachodzi wyłącznie na powierzchni komórek nowotworowych raka, jednak nie na komórkach zdrowych organizmu, co czyni go idealnym kandydatem docelowym dla reprogramowanych limfocytów T [9,10]. Tak zaprojektowane limfocyty, ukierunkowane na cząsteczkę EGFR, znacznie zmniejszają toksyczność oraz zwiększają efektywność odpowiedzi immunologicznej. Stosunkowo mała ilość antygenów swoistych nowotworowo znacząco ogranicza możliwości wykorzystania komórek CAR-T. Większość obecnych badań skupia się więc na zidentyfikowaniu odpowiedniego antygeny, który posłużyłby jako idealny target dla komórek CAR-T (rycina 4.).

W celu pokonania bariery heterogeniczności antygenowej podjęto próbę wykorzystania koekspresji kilku receptorów na pojedynczym limfocycie T, zaprogramowania poziomu ich ekspresji na powierzchni samej komórki oraz zwiokrotnienia ilości domen rozpoznających antygen w obrębie jednego receptora CAR [11]. Potencjalnym celem dla komórek CAR-T są również markery macierzystych komórek nowotworowych, jak w przypadku cząsteczki CD133, której to ekspresja warunkuje ową heterogeniczność komórek guzów litych. Wykorzystanie jej jako komórki targetowej dla komórek CAR-T znacznie ograniczyłoby różnorodność fenotypową, a przez to polepszyło przeciwnowotworową odpowiedź immunologiczną [12].



Rycina 4. Grafika przedstawiająca najważniejsze guzy łone oraz ich antygeny nowotworowe, będące obecnie przedmiotem badań nad wdrożeniem terapii CAR-T [Źródło: <https://science.sciencemag.org/content/359/6382/1361/tab-article-info>]

SOLID CAR T CLINICAL TRIALS - PER TARGET

SOLID CAR T CLINICAL TRIALS - PER APPROACH

3.1 Rak jajnika

351

raka jajnika. Ograniczyły też znacząco potencjał proliferacyjny komórek nowotworowych, a badania prowadzone na modelach zwierzęcych potwierdziły wydłużenie długości życia [31]. Kolejnym przykładem komórek CAR-T wykazujących silny potencjał przeciwnowotworowy w badaniach in-vitro były komórki ukierunkowane na marker MUC-16. Wykazano, że dożylne lub dootrzewnowe wstrzyknięcie komórek MUC16-CAR-T może całkowicie zahamować progresję raka jajnika lub doprowadzić do redukcji złośliwych komórek w badaniach na modelach mysich. Tym samym pokazano, jak bardzo kluczowym markerem jest cząsteczka MUC-16, mogąca zostać wykorzystana jako potencjalny target w terapii raka jajnika. Inne badania wykazały również skuteczność w działaniu komórek CAR-T ukierunkowanych na receptor Her2 w mechanizmie hamowania wzrostu komórek linii raka jajnika SKOV 3, wykazujących ekspresję tego receptora na swojej powierzchni [32]. Innymi komórkami CAR-T, które doprowadziły do zahamowania wzrostu i progresji komórek raka jajnika były komórki CAR-T nakierowane na cząsteczki 5T4, FR α , CD19 oraz MSN. Ekspresję receptorów na powierzchni limfocytów T nakierowanych na dwie ostatnie cząsteczki uzyskano z wykorzystaniem transferu genów przez wektor w postaci lentiwirusa. Badania w warunkach in-vitro dały pozytywną odpowiedź, doprowadzając do redukcji liczby komórek nowotworowych raka jajnika [33].

3.2. Rak piersi

Badania nad markerami targetowymi dla komórek CAR-T w terapii potrójnie ujemnego raka piersi (TNBC - Triple-Negative Breast Cancer) wykazały skuteczną odpowiedź po infuzji zmodyfikowanych limfocytów T. Po rozpoznaniu markera MUC1, znajdującego się na powierzchni komórek TNBC, obserwowano wzmożoną syntezę substancji tj.: granzymu B, INF- γ oraz innych cytokin i chemokin przez limfocyty T pomocnicze. W badaniach wykazano, że pojedyncza infuzja komórek MUC28z-CAR-T spowodowała istotne ograniczenie proliferacji komórek TNBC na modelach zwierzęcych po ksenotransplantacji [34]. Podobny efekt osiągnięty został w badaniach przedklinicznych z wykorzystaniem komórek CAR-T przeciwko antygenowi HRG1 β . Perspektywa wykorzystania receptorów z rodziny HER w projektowaniu komórek CAR-T mogłaby znacząco ułatwić pokonanie bariery oporności na terapię bazującą na inhibitorach owych receptorów [35]. Poza wyżej wymienionymi targetami dla komórek CAR-T obiecującą alternatywą wydaje się być mezotelina. Jej identyfikacja przez zmodyfikowane limfocyty CAR T

ze swoistymi receptorami powierzchniowymi stanowi prekursorowy nowy cel immunoterapii w leczeniu raka piersi [36].

3.3. Rak prostaty

Dwoma najbardziej powszechnymi celami terapeutycznymi w immunoterapii CAR-T raka gruczołu krokowego są antygeny: swoisty antygen gruczołu krokowego (PSA - prostate specific antigen) oraz antygen macierzystych komórek nowotworowych raka prostaty (PSCA- prostate stem cell antigen) [37]. Udowodniono, że komórki PSCA-CAR-T wykazują silną migrację w kierunku komórek nowotworowych wraz z silnym efektem cytotoksycznym. Badania kliniczne przeprowadzone przez Junghans i wsp. oraz Slovin i in. potwierdziły bezpieczeństwo i skuteczność tej terapii w leczeniu raka prostaty [38,39].

3.4. Rak nerki

Według ostatnich badań najnowszym celem terapii komórkami CAR-T w raku nerki jest anhidraza węglanowa IX (CA-IX, carboxy-anhydrase-IX). CA-IX to metaloproteaza katalizująca odwracalną reakcję uwadniania dwutlenku węgla. CA-IX jest również jednym z dwóch izoenzymów transbłonowych, które są silnie ekspresjonowane w niektórych nowotworach. Mogą być one zaangażowane w zakwaszanie środowiska zewnątrzkomórkowego otaczającego komórki nowotworowe, tworząc mikrośrodowisko sprzyjające wzrostowi i rozprzestrzenianiu się nowotworu. Ekspresja CA-IX wiąże się również z gorszym rokowaniem u pacjentów nie tylko z rakiem nerki, ale też z rakiem płuc, piersi, szyjki macicy i mózgu [40]. To niepozorne białko daje dużą nadzieję dla immunoterapii z powodu ekspresji także w obrębie komórek: śluzówki żołądka, nabłonka dwunastnicy, jelita cienkiego oraz dróg żółciowych. Co ciekawe, zaobserwowano, że hipoksja stymuluje zwiększoną ekspresję CA-IX na powierzchni wielu tkanek oraz że sama zwiększona ekspresja CA-IX jest niezależnym markerem prognostycznym gruczolaka przełyku i żołądka [41]. W badaniach z wykorzystaniem komórek CAR-T skierowanych na to białko uzyskano pozytywną odpowiedź w postaci efektu cytotoksycznego w stosunku do komórek nowotworowych raka nerki.

3.5. Rak żołądka

Ostatnie badania wykazały, że bezpośrednia, donowotworowa iniekcja bispecyficznych komórek Trop2/PDL1 CAR-T znacząco ograniczyła wzrost guza, osiągając silniejszy efekt supresyjny, w porównaniu z iniekcją komórek CAR-T specyficznych tylko dla Trop2. Oznacza to zatem, że nowatorskie komórki Trop2/PDL1 CAR-T uczestniczą w szlaku Trop2/PDL1 oraz blokadzie punktów kontrolnych w obrębie komórek raka żołądka. Wywierają pozytywny wpływ na cytotoksyczność obserwowaną nie tylko w raku żołądka, ale też innych guzach litych [42]. Podobny efekt zahamowania wzrostu guza osiągnięto po iniekcji komórek CAR-T specyficznych dla mezoteliny, obejmując cząsteczki: scFv, CD3ζ, CD28. W terapii raka żołądka brane pod uwagę są także komórki CAR-T specyficzne dla antygenów, do których zaliczamy: kładynę 18.2, NKG2D, FOLR1 oraz Her-2 [43,44]. W ostatnim badaniu Jung i in. wykazali skuteczność infuzji limfocytów CAR-T specyficznych dla ICAM-1 podanych samodzielnie lub w połączeniu z chemioterapeutykami - paklitakselem. Ta terapia stanowi obiecujące podejście, które może znacznie poprawić rokowania pacjentów, zwłaszcza z wysoko zaawansowanym rakiem żołądka [45].

3.6. Rak trzustki

Wykazano w najnowszych badaniach, że komórki CAR-T wykazujące na swojej powierzchni ekspresję receptora dla CXCR2 szybciej migrują w kierunku mikrośrodowiska guza z ekspresją IL-8. W badaniach *in vitro* oraz na mysich modelach udowodniono także skuteczność terapii komórkami B7-H3 CAR-T w leczeniu gruczolakoraka trzustki. Co więcej, badania kliniczne pierwszej fazy na grupie pacjentów cierpiących na: raka wątrobowokomórkowego, raka trzustki, raka żołądka oraz raka jelita grubego wykazały supresorowy potencjał komórek CD133-CAR-T na tworzenie przerzutów odległych w nowotworach [46]. Oprócz cząsteczki CD-133 badane są także inne antygeny docelowe dla komórek CAR-T tj.: CD24, CEA, PSCA, MUC-1, FAP, mezotelina oraz Her-2. Trwające obecnie badania przedkliniczne i kliniczne mają ocenić w najbliższej przyszłości skuteczność terapii z wykorzystaniem ich jako swoistych targetów dla zmodyfikowanych limfocytów T [47,48].

3.7. Rak płuc

Udowodniono pozytywny wpływ limfocytów ROR1-CAR-T na wzmocnienie odpowiedzi przeciwnowotworowej w obrębie komórek ludzkiego gruczolaka płuc linii A549. Co ciekawe, komórki te, infiltrując masę guza oraz jego mikrośrodowisko, doprowadzają do stopniowej redukcji licznych warstw komórek nowotworowych [49]. Podobny efekt przeciwnowotworowy uzyskano w odpowiedzi na podanie komórek EGFRvIII-CART, które to po infuzji sprawnie zidentyfikowały, dotarły oraz doprowadziły do zniszczenia komórek linii A549, uwalniając jednocześnie cytokiny tj.: granzym B, IFN- γ oraz TNF- α . Co więcej, badania na modelach mysich pokazały, że komórki EGFRvIII-CART znacząco zmniejszyły ilość przerzutów pochodzących z komórek ludzkiego gruczolaka płuc linii A549 z jednoczesnym wydłużeniem długości życia modelu, bez towarzyszących jakichkolwiek skutków ubocznych [50]. Wykazano również, że pożądaný cel terapeutyczny w leczeniu raka płuc można osiągnąć dzięki wykorzystaniu antygenów tj.: mezotelina, EphA2, PCSA oraz mucyna-1 [51]. Pojawiły się doniesienia o skuteczności limfocytów PD-L1-CAR-T w stosunku do komórek raka niedrobnokomórkowego płuc (NSCLC - non-small cell lung carcinoma), wykazujące ekspresję PDL-1 oraz EGFR. Oprócz zaobserwowanego efektu cytotoksycznego, u części pacjentów z PDL-1+ NSCLC doszło do pełnego wyzdrowienia [52]. W ostatnich badaniach przeprowadzonych przez Chen i in. wskazano na potencjał cząsteczki DLL3 jako atrakcyjnego targetu dla komórek CAR w leczeniu raka drobnokomórkowego płuc (SCLC - small cell lung carcinoma). Odpowiednio zmodyfikowane komórki CAR-T wykazywały silny efekt cytotoksyczny w stosunku do linii komórkowych SCLC: H82, H196 oraz H446 [53].

3.8. Rak jelita grubego

Według najnowszych wyników badań terapia komórkami CAR-T może okazać się skuteczną formą leczenia także raka jelita grubego. Do grupy najbardziej obiecujących antygenów, które mogłyby zapewnić sukces terapeutyczny zaliczamy cząsteczki: NKG2D, CD133, GUCY2C, TAG-72 [46, 54]. Zgodnie z badaniami Humbach i in. mezenchymalne komórki macierzyste poddane inżynierii genetycznej tak, aby uwalniać cytokiny IL-7/12 także zwiększały przeciwnowotworową aktywność komórek CAR-T. Mechanizm ich działania polegał na zmianie profilu wydzielanych cząsteczek biorących udział w powstawaniu procesu zapalnego z limfocytów Th2 na limfocyty Th1 i Th17 w obrębie

mikrośrodowiska guza [55]. Zgodnie z wynikami wcześniejszych badań wiemy, że zwiększona ekspresja kinazy DCLK 1 na komórkach raka jelita grubego jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym, zwiększającym śmiertelność. Wykorzystując ten fakt, najnowsze badania wykazały, że komórki CAR-T ukierunkowane na ww. antygen, kinazę DCLK, są w stanie skutecznie wyeliminować komórki raka jelita grubego zarówno z ogniska pierwotnego, jak i z przerzutów [56].

3.9. Rak wątroby

Według stanu na rok 2020, badania nad możliwościami zastosowania terapii CAR-T w leczeniu raka wątrobowokomórkowego (HCC - hepatocellular carcinoma) są dopiero na swoich początkowych etapach. Badaniom poddawane są komórki CAR-T, dla których targetem są antygeny tj.: CEA, gliptkan 3 (GPC3), mucyna-1, cząsteczka adhezji komórek nabłonkowych oraz antygen rakowo-łożyskowy (CEA - carcinoembrionic antigen). W badaniach przedklinicznych ich skuteczność oraz potencjalna późniejsza możliwość dalszych badań pod kątem wykorzystania ich w terapii raka wątroby zostały potwierdzone [57]. Zastosowanie przeciwciał anti-GPC3 w połączeniu z terapią CAR-T może stać się innowacyjną strategią leczenia złośliwych nowotworów tego narządu. W wyniku badań *in vitro* oraz *in vivo* na modelach zwierzęcych, przeprowadzonych przez Liu i in. wykazano, że przeciwciało monoklonalne 32A9 w połączeniu z terapią CAR-T prowadzi do śmierci GPC3+ komórek raka wątrobowokomórkowego oraz regresji choroby na mysich modelach raka [58]. Kolejne badania potwierdziły również skuteczność terapii komórkami GPC3/CAR-T wydzielającymi cytokiny IL-15 i IL-21, zdolne do wywołania odpowiedzi przeciwnowotworowej w stosunku do komórek raka wątrobowokomórkowego [59].

4. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Badania przedkliniczne i kliniczne pokazały, że terapia CAR-T stanowi obiecującą alternatywę dla leczenia guzów litych. Jest to niewątpliwie najbardziej innowacyjna, dostępna obecnie, opcja terapeutyczna w leczeniu zaawansowanych nowotworów, zwłaszcza w hematologii. Ta nowatorska immunoterapia jest owocem interdyscyplinarnej, międzynarodowej współpracy lekarzy, bioinżynierów genetycznych oraz biotechnologów z całego świata. Jednak sukces tej terapii jak na razie ograniczony jest do nowotworów

hematologicznych. Dalszy rozwój badań nad wdrożeniem terapii CAR-T do programów leczenia nowotworów nie hematologicznych wymagać będzie wielu nowych badań oraz pokonania wielu istniejących już barier, takich jak: immunosupresyjne mikrośrodowisko guza, heterogenność komórek nowotworowych oraz identyfikacja najwłaściwszego antygenu, będącego targetem dla komórek CAR-T. Konieczne są nie tylko nowe badania, ale i dalszy postęp już trwających w zakresie następujących płaszczyzn: 1. optymalizacja komórek CAR-T poprzez usprawnienie ich aktywacji, 2. efektywniejsze rozpoznawanie i docieranie do komórek nowotworowych oraz 3. zmniejszenie toksyczności terapii. Dalsze poszukiwania nowych, bardziej optymalnych domen sygnalizacyjnych i stymulujących dla receptora CAR stanowi kolejny cel badań. Zastosowanie bispecyficznego receptora CAR jest obiecującą drogą, mogącą doprowadzić do wzmocnienia odpowiedzi swoistej na antygen nowotworowy, ograniczając jednocześnie szkodliwy wpływ na zdrowe komórki. Ze względu na znaczną heterogeniczność komórek, dalsze perspektywy udoskonalenia terapii CAR-T zakładają personalizację projektowanych komórek pod kątem każdego pacjenta osobno. Taka strategia - strategia odpowiedniego dostosowania do indywidualnego profilu antygenowego nowotworu jest kierunkiem, w którym zmierza i dalej podąża innowacyjna immunoterapia CAR-T.

REFERENCJE

1. Seimetz D, Heller K, Richter J. Approval of First CAR-Ts: Have we Solved all Hurdles for ATMPs?. *Cell Med.* 2019; 11:2155179018822781. Published 2019 Jan 22.
2. Curran KJ, Pegram HJ, Brentjens RJ. Chimeric antigen receptors for T cell immunotherapy: current understanding and future directions. *J Gene Med.* 2012; 14:405–15.
3. Sadelain M, Brentjens R, Rivière I. The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discov.* 2013; 3:388–98.
4. Androulla M, Lefkothea P. CAR T-cell Therapy: A New Era in Cancer Immunotherapy. *Current Pharmaceutical Biotechnology.* 2018; 19(1): 5–18.
5. Heczey A, Louis CU, Savoldo B, Dakhova O, Durett A, Grilley B, et al. CAR T Cells Administered in Combination with Lymphodepletion and PD-1 Inhibition to Patients with Neuroblastoma. *Mol Ther.* 2017; 25:2214–24.

6. Chen N, Morello A, Tano Z, et al. CAR T-cell intrinsic PD-1 checkpoint blockade: A two-in-one approach for solid tumor immunotherapy. *OncoImmunology*. 2017; 6(2): e1273302.
7. Luo C, Wei J, Han W. Spotlight on chimeric antigen receptor engineered T cell research and clinical trials in China. *Sci China Life Sci*. 2016; 59: 349-59.
8. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?recrs=&cond=Solid+Tumor&term=car-t&cntry=&state=&city=&dist=>
9. Li G, Wong AJ. EGF receptor variant III as a target antigen for tumor immunotherapy. *Expert Rev Vaccines*. 2018; 7: 977-85
10. Choi BD, Archer GE, Mitchell DA, Heimberger AB, McLendon RE, Bigner DD, et al. EGFRvIII-targeted vaccination therapy of malignant glioma. *Brain Pathol*. 2019; 19: 713-23.
11. J.F. Khan, A.S. Khan, R.J. Brentjens, Chapter Eight - Application of CAR T cells for the treatment of solid tumors, in: D.B. Teplow (Ed.) *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Academic Press, 2019, 293–327
12. Bagley SJ, O'Rourke DM. Clinical investigation of CAR T cells for solid tumors: lessons learned and future directions. *Pharmacol Ther*. 2020; 205:107419.
13. Salmon H, Franciszkiewicz K, Damotte D, Dieu-Nosjean M-C, Validire P, Trautmann A, Mami-Chouaib F, Donnadieu E. Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. *J Clin Invest*. 2012; 122:899–910.
14. Poznansky MC, Olszak IT, Evans RH, Wang Z, Foxall RB, Olson DP, Weibrecht K, Luster AD, Scadden DT. Thymocyte emigration is mediated by active movement away from stroma-derived factors. *J Clin Invest*. 2002; 109:1101–10
15. Li J, Li W, Huang K, Zhang Y, Kupfer G, Zhao Q. Chimeric antigen receptor T cell (CAR-T) immunotherapy for solid tumors: lessons learned and strategies for moving forward. *J Hematol Oncol*. 2018; 11:22.

16. Adusumilli PS, Cherkassky L, Villena-Vargas J, Colovos C, Servais E, Plotkin J, Jones DR, Sadelain M. Regional delivery of mesothelin-targeted CAR T cell therapy generates potent and long-lasting CD4-dependent tumor immunity. *Sci Transl Med.* 2014; 6:261ra151.
17. Craddock JA, Lu A, Bear A, Pule M, Brenner MK, Rooney CM, Foster AE. Enhanced tumor trafficking of GD2 chimeric antigen receptor T cells by expression of the chemokine receptor CCR2b. *J Immunotherapy.* 2010;33: 780–8.
18. Nishio N, Diaconu I, Liu H, Cerullo V, Caruana I, Hoyos V, Bo-uchier-Hayes L, Savoldo B, Dotti G. Armed oncolytic virus enhances immune functions of chimeric antigen receptor-modified T cells in solid tumors. *Cancer Res.* 2014; 74:5195–205.
19. Guo F, Cui J. CAR-T in solid tumors: blazing a new trail through the brambles. *Life Sci.* 2020; 260:118300.
20. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell.* 2012; 21:309–22.
21. Zhao Z, Xiao X, Saw PE, Wu W, Huang H, Chen J, Nie Y. Chimeric antigen receptor T cells in solid tumors: a war against the tumor microenvironment. *Sci China Life Sci.* 2020; 63:1–26.
22. Eil R, Vodnala SK, Clever D, Klebanoff CA, Sukumar M, Pan JH, Palmer DC, Gros A, Yamamoto TN, Patel SJ, Guittard GC, Yu Z, Carbonaro V, Okkenhaug K, Schrumph DS, Linehan WM, Roychoudhuri R, Restifo NP. Ionic immune suppression within the tumour microenvironment limits T cell effector function. *Nature.* 2016; 537:539–43.
23. Burga RA, Thorn M, Point GR, Guha P, Nguyen CT, Licata LA, DeMatteo RP, Ayala A, Joseph Espat N, Junghans RP, Katz SC. Liver myeloid-derived suppressor cells expand in response to liver metastases in mice and inhibit the anti-tumor efficacy of anti-CEA CAR-T. *Cancer Immunol Immunotherapy.* 2015; 64:817 –29.
24. Zhou Q, Munger ME, Highfill SL, Tolar J, Weigel BJ, Riddle M, Sharpe AH, Vallera DA, Azuma M, Levine BL, June CH, Murphy WJ, Munn DH, Blazar BR. Program death-1 signaling and regulatory T cells collaborate to resist the function of adoptively transferred cytotoxic T lymphocytes in advanced acute myeloid leukemia. *Blood.* 2010; 116:2484 –93.

25. Caruana I, Savoldo B, Hoyos V, Weber G, Liu H, Kim ES, Ittmann MM, Marchetti D, Dotti G. Heparanase promotes tumor infiltration and antitumor activity of CAR-redirected T lymphocytes. *Nat Med.* 2015; 21:524–9.
26. Kerkar SP, Muranski P, Kaiser A, Boni A, Sanchez-Perez L, Yu Z, Palmer DC, Reger RN, Borman ZA, Zhang L, Morgan RA, Gattinoni L, Rosenberg SA, Trinchieri G, Restifo NP. Tumor-specific CD8⁺ T cells expressing interleukin12 eradicate established cancers in lymphodepleted hosts. *Cancer Res.* 2010; 70:6725–34.
27. Simon B, Harrer DC, Schuler-Thurner B, Schaft N, Schuler G, Dorr J, Uslu U. The siRNA-mediated downregulation of PD-1 alone or simultaneously with CTLA-4 shows enhanced in vitro CAR-T-cell functionality for further clinical development towards the potential use in immunotherapy of melanoma. *Exp Dermatol.* 2018; 27:769–78.
28. Zhang Y, Zhang X, Cheng C, Mu W, Liu X, Li N, Wei X, Liu X, Xia C, Wang H. CRISPR-Cas9 mediated LAG-3 disruption in CAR-T cells. *Front Medicine.* 2017; 11:554–62.
29. Simpson TR, Li F, Montalvo-Ortiz W, Sepulveda MA, Bergerhoff K, Arce F, Roddie C, Henry JY, Yagita H, Wolchok JD, Peggs KS, Ravetch JV, Allison JP, Quezada SA. Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J Exp Med.* 2013; 210:1695–710.
30. Stewart C, Ralyea C, Lockwood S. Ovarian Cancer: An Integrated Review. *Semin Oncol Nurs.* 2019;35(2):151-156.
31. Murad JP, Kozłowska AK, Lee HJ, Ramamurthy M, Chang WC, Yazaki P, Colcher D, Shively J, Cristea M, Forman SJ, Priceman SJ. Effective targeting of TAG72(+) peritoneal ovarian tumors via regional delivery of CAR-Engineered T cells. *Front Immunol.* 2018; 9:2268.
32. Chekmasova AA, Rao TD, Nikhamin Y, Park KJ, Levine DA, Spriggs DR, Brentjens RJ. Successful eradication of established peritoneal ovarian tumors in SCID-Beige mice following adoptive transfer of T cells genetically targeted to the MUC16 antigen. *Clin Cancer Res.* 2010; 16:3594–606.
33. Cao B, Liu M, Wang L, Liang B, Feng Y, Chen X, Shi Y, Zhang J, Ye X, Tian Y. Use of chimeric antigen receptor NK-92 cells to target mesothelin in ovarian cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020; 524:96–102.

34. Zhou R, Yazdanifar M, Roy LD, Whilding LM, Gavril A, Maher J, Mukherjee P. CAR T cells targeting the tumor MUC1 glycoprotein reduce triple-negative breast cancer growth. *Front Immunol.* 2019; 10:1149
35. Zuo BL, Yan B, Zheng GX, Xi WJ, Zhang X, Yang AG, Jia LT. Targeting and suppression of HER3-positive breast cancer by T lymphocytes expressing a heregulin chimeric antigen receptor. *Cancer Immunol Immunotherapy.* 2018; 67:393–401
36. Tchou J, Wang LC, Selven B, Zhang H, Conejo-Garcia J, Borghaei H, Kalos M, Vondeheide RH, Albelda SM, June CH, Zhang PJ. Mesothelin, a novel immunotherapy target for triple negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012; 133:799–804
37. Hillerdal V, Essand M. Chimeric antigen receptor-engineered T cells for the treatment of metastatic prostate cancer. *BioDrugs.* 2015; 29:75–89
38. Junghans RP, Ma Q, Rathore R, Gomes EM, Bais AJ, Lo AS, Abedi M, Davies RA, Cabral HJ, Al-Homsi AS, Cohen SI. Phase I trial of anti-PSMA designer CAR-T cells in prostate cancer: possible role for interacting interleukin 2-T cell pharmacodynamics as a determinant of clinical response. *Prostate.* 2016; 76:1257–70.
39. Slovin SF, Wang X, Hullings M, Arauz G, Bartido S, Lewis JS, Schöder H, Zanzonico P, Scher HI, Sadelain M, Riviere I. Chimeric antigen receptor (CAR+) modified T cells targeting prostate-specific membrane antigen (PSMA) in patients (pts) with castrate metastatic prostate cancer (CMPC). *J Clin Oncol.* 2013; 31:72.
40. Bui MH, Seligson D, Han KR, Pantuck AJ, Dorey FJ, Huang Y, Horvath S, Leibovich BC, Chopra S, Liao SY, Stanbridge E, Lerman MI, Palotie A, Figlin RA, Belldegrun AS. Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced renal clear cell carcinoma: implications for prognosis and therapy. *Clin Cancer Res.* 2003; 9:802–11.
41. Yeku O, Li X, Brentjens RJ. Adoptive T-cell therapy for solid tumors. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2017; 37:193–204.
42. Zhao W, Jia L, Zhang M, Huang X, Qian P, Tang Q, Zhu J, Feng Z. The killing effect of novel bi-specific Trop2/PD-L1 CAR-T cell targeted gastric cancer. *Am J Cancer Res.* 2019; 9:1846–56.

43. Ahn DS, Lee HJ, Hwang J, Han H, Kim B, Shim B, Kim SH. Lam-bertianic acid sensitizes non-small cell lung cancers to TRAIL-induced apop-tosis via inhibition of XIAP/NF-kappaB and activation of caspases and death receptor 4. *Int J Molecular Sci.* 2018; 19:1476
44. Song Y, Tong C, Wang Y, Gao Y, Dai H, Guo Y, Zhao X, Wang Y, Wang Z, Han W, Chen L. Effective and persistent antitumor activity of HER-2-directed CAR-T cells against gastric cancer cells in vitro and xenotransplan-ted tumors in vivo. *Protein Cell.* 2018; 9:867–78.
45. Jung M, Yang Y, McCloskey JE, Zaman M, Vedvyas Y, Zhang X, Stefanova D, Gray KD, Min IM, Zarnegar R. Chimeric antigen receptor T cell therapy targeting ICAM-1 in gastric cancer. *Molecular Therapy-Oncoly-tics.* 2020;18: 587–601.
46. Wang Y, Chen M, Wu Z, Tong C, Dai H, Guo Y, Liu Y, Huang J, Lv H, Luo C, Feng KC, Yang QM, Li XL, Han W. CD133-directed CAR T cells for advanced metastasis malignancies: a phase I trial. *Oncoimmunology.* 2018;7: e1440169
47. Gansauge S, Gansauge F, Beger HG. Molecular oncology in pancre-atic cancer. *J Mol Med (Berl).* 1996; 74:313–20
48. Qu CF, Li Y, Song YJ, Rizvi SM, Raja C, Zhang D, Samra J, Smith R, Perkins AC, Apostolidis C, Allen BJ. MUC1 expression in primary and metastatic Marofi et al. *Stem Cell Research & Therapy* (2021) 12:81 Page 14 of 16 pancreatic cancer cells for in vitro treatment by (213) Bi-C595 radio-immunoconjugate. *Br J Cancer.* 2004; 91:2086–93.
49. Wallstabe L, Gottlich C, Nelke LC, Kuhnemundt J, Schwarz T, Ner-reter T, Einsele H, Walles H, Dandekar G, Nietzer SL, Hudecek M. ROR-1-CAR T cells are effective against lung and breast cancer in advanced micro-physiologic 3D tumor models, *JCI insight* 2019;4: e126345.
50. Zhang Z, Jiang J, Wu X, Zhang M, Luo D, Zhang R, Li S, He Y, Bian H, Chen Z. Chimeric antigen receptor T cell targeting EGFRvIII for metastatic lung cancer therapy. *Front Med.* 2019; 13:57–68.
51. Li N, Liu S, Sun M, Chen W, Xu X, Zeng Z, Tang Y, Dong Y, Chang AH, Zhao Q. Chimeric antigen receptor-modified T cells redirected to EphA2 for the immunotherapy of non-small cell lung cancer. *Transl Oncol.* 2018; 11:11–7.

52. . Liu M, Wang X, Li W, Yu X, Flores-Villanueva P, Xu-Monette ZY, Li L, Zhang M, Young KH, Ma X. Targeting PD-L1 in non-small cell lung cancer using CAR T cells. *Oncogenesis*. 2020; 9:1–11.
53. Chen X, Amar N, Zhu Y, Wang C, Xia C, Yang X, Wu D, Feng M. Combined DLL3-targeted bispecific antibody with PD-1 inhibition is efficient to suppress small cell lung cancer growth. *J Immunotherapy Cancer*. 2020. p. 8.
54. Deng X, Gao F, Li N, Li Q, Zhou Y, Yang T, Cai Z, Du P, Chen F, Cai J. Antitumor activity of NKG2D CAR-T cells against human colorectal cancer cells in vitro and in vivo. *Am J Cancer Res*. 2019; 9:945–58.
55. Hombach AA, Geumann U, Günther C, Hermann FG, Abken H. IL7-IL12 engineered mesenchymal stem cells (MSCs) improve a CAR T cell attack against colorectal cancer cells. *Cells*. 2020; 9:873
56. . Sureban SM, Berahovich R, Zhou H, Xu S, Wu L, Ding K, May R, Qu D, Bannerman-Menson E, Golubovskaya V. DCLK1 monoclonal antibody-based CAR-T cells as a novel treatment strategy against human colorectal cancers. *Cancers*. 2020; 12:54.
57. Katz SC, Hardaway J, Prince E, Guha P, Cunetta M, Moody A, Wang LJ, Armenio V, Espat NJ, Junghans RP. HITM-SIR: phase Ib trial of intraarterial chimeric antigen receptor T-cell therapy and selective internal radiation therapy for CEA (+) liver metastases. *Cancer Gene Ther*. 2019; 27:341–55.
58. Liu X, Gao F, Jiang L, Jia M, Ao L, Lu M, Gou L, Ho M, Jia S, Chen F. 32A9, a novel human antibody for designing an immunotoxin and CAR-T cells against glypican-3 in hepatocellular carcinoma. *J Transl Med*. 2020; 18:1–12
59. Batra SA, Rath P, Guo L, Courtney AN, Fleurence J, Balzeau J, Shaik RS, Nguyen TP, Wu M-F, Bulsara S. Glypican-3-specific CAR T cells coexpressing IL15 and IL21 have superior expansion and antitumor activity against hepatocellular carcinoma. *Cancer Immunology Research*. 2020; 8:309–20.

PERSPEKTYWY WYKORZYSTANIA KOMÓREK MACIERZYSTYCH W GOJENIU RAN BEZ POWSTANIA BLIZNY

Kinga Dworak, Natalia Trędota, Julia Cieśla, Aneta Rasińska

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

Abstrakt

Gojenie się rany jest złożonym procesem obejmującym kilka faz: zapalenie, proliferację i przebudowę tkanki. Warunkiem prawidłowej regeneracji skóry jest harmonijna współpraca między komórkami, czynnikami wzrostu, cytokinami i chemokinami. Zaburzenie równowagi w którejkolwiek z faz skutkuje powstaniem blizny. Gojenie rany, które prowadzi do wytworzenia zbliźnowacialej tkanki może być wynikiem m.in. przedłużającego się stanu zapalnego, nieprawidłowej syntezy włókien kolagenowych lub nadprodukcji macierzy zewnątrzkomórkowej. Obecność blizn w obrębie skóry prowadzi do zaburzeń zarówno fizycznych, jak i psychicznych. Obecnie wyróżniamy szereg metod leczenia, jednakże żadna z nich nie przynosi satysfakcjonujących rezultatów. W związku z tym, zaistniała potrzeba szukania nowych rozwiązań, które polepszyłyby jakość życia pacjentów. Obiecującym celem terapeutycznym są komórki macierzyste ze względu na ich ogromny potencjał rozrodczy i zdolność do inicjacji rozwoju w kierunku wielu typów komórek. W gojeniu rany najistotniejsze jest ich różnicowanie do keratynocytów, fibroblastów i komórek śródbłonna naczyń. Dodatkowo wydzielają różne czynniki wzrostu, które mogą stymulować endogenne komórki rezydujące w łóżysku rany. Dokładne mechanizmy, dzięki którym przeszczepione komórki mogą stymulować proces gojenia nie zostały wyjaśnione. Próby stosowania komórek macierzystych są w trakcie badań przedklinicznych i klinicznych. W pracy zostały przedstawione rodzaje komórek, których zastosowanie daje największe nadzieje na skuteczną terapię. Zanim staną się powszechną metodą leczenia muszą przejść szereg szczegółowych badań, w celu oceny bezpieczeństwa ich stosowania.

Słowa kluczowe: blizna, gojenie rany, mezenchymalne komórki macierzyste z galarety Whartona, ludzkie komórki macierzyste płynu owodniowego, komórki macierzyste z tkanki tłuszczowej,

Abstract

Wound healing is a complex process, which involves several phases: inflammation, proliferation and tissue remodelling. The condition for proper skin regeneration is a harmonical cooperation

between cells, growth factors, cytokines and chemokines. Any kind of imbalance in any of the phase's results in a scar formation. Scars can be a result of prolonging inflammation, faulty synthesis of collagen fibers or overproduction of the extracellular matrix. Forming scars lead to both physical and psychological disorders. Nowadays, there are various treatments methods, however, none of them provide in satisfactory results. Therefore, there is a need for a search of new solutions, which would improve patient's life quality. Stem cells are promising therapeutic target, which have immense reproductive potential and an ability to differentiate into many types of tissues. They can support wound healing through differentiation into keratocytes, fibroblasts and endothelial cells. Additionally, by secreting various growth factors they can stimulate endogenous cells residing directly in the wound. Precise mechanisms, thanks to which transplanted cells can stimulate wound healing process, have not been explained. The attempts of the usage of the stem cells are under preclinical and clinical trials. The paper outlines the types of cells whose application offer tremendous hope for effective therapy. Before they become a common treatment method, they must undergo several in-depth studies in order to evaluate safety of their use.

Keywords: scar, wound healing, Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells, human amniotic fluid stem cells, adipose-derived mesenchymal stem cells

1. WSTĘP

Co roku, u milionów pacjentów na świecie pojawiają się blizny po oparzeniach, urazach i operacjach [1]. Obecność blizn w obrębie skóry niesie ze sobą konsekwencje fizyczne (upośledzenie funkcji narządu, ograniczenie ruchu), jak również wiąże się z oddziaływaniem w sferze psychicznej [2,3]. Związane jest to ze zmniejszoną akceptacją siebie i obniżoną samooceną, co ma implikacje w funkcjonowaniu w społeczeństwie [4].

Obecnie medycyna oferuje kilka schematów leczenia blizn, w tym: kortykosteroidy, krioterapię, radioterapię, laseroterapię, terapię uciskową, żel siliikonowy, ale żadna z tych metod nie prowadzi do całkowitego usunięcia blizny [5,6].

Regeneracja uszkodzonej skóry z wytworzeniem w miejscu urazu blizny jest skutkiem współdziałania różnych rodzajów komórek, czynników wzrostu, chemokin i cytokin [2,7]. Skóra niektórych gatunków zwierząt charakteryzuje się ogromnymi możliwościami regeneracyjnymi, ma zdolność naprawy uszkodzenia bez wytworzenia blizny [8]. Pełna regeneracja skóry zachodzi również u płodu. Skóra płodu do 24 tygodnia ciąży jest w stanie wygoić się nie pozostawiając żadnego śladu. W późniejszym okresie rozwoju właściwości regeneracyjne skóry maleją [8-10]. Wykorzystanie metod naśladujących proces gojenia ran u płodu może być pomocne w opracowaniu skutecznej terapii minimalizującej lub eliminującej powstawanie blizn [11]. Nowatorskim podejściem

do leczenia blizn mogłyby być terapie bazujące na właściwościach regeneracyjnych komórek macierzystych [8].

2. BUDOWA I FUNKCJE SKÓRY

Skóra jest największym organem ludzkiego ciała, której powierzchnia może wynosić nawet 2 m² [12,13]. Nieuszkodzona stanowi barierę między środowiskiem wewnętrznym organizmu, a światem zewnętrznym [14]. Do najważniejszych jej funkcji należą: ochrona (zapobieganie urazom mechanicznym, termicznym, chemicznym, uniemożliwianie wnikania mikroorganizmów), naprawa i adaptacja (gojenie ran), odbieranie bodźców (obecność termoreceptorów, mechanoreceptorów, nocycceptorów), regulacja temperatury ciała (zapobieganie wychłodzeniu i przegrzaniu ciała) [13,15].

Skóra jest zbudowana z dwóch głównych warstw: naskórka i skóry właściwej. Naskórek stanowi najbardziej zewnętrzną oraz najcieńszą warstwę. W jego skład wchodzi kilka rodzajów komórek: keratynocyty, melanocyty, komórki dendrytyczne, komórki Langerhansa, komórki odpornościowe oraz zakończenia czuciowe aksonów [16]. Najgłębiej położona jest warstwa podstawna, obejmująca komórki o właściwościach rozrodczych, które są odpowiedzialne za proces odnowy naskórka. Keratynocyty są dominującym typem komórek naskórka, które w warstwie podstawnej, kolczystej i ziarnistej posiadają jądro komórkowe i są komórkami żywymi. W miarę dojrzewania keratynocytów w ich cytoplazmie syntezowane są białka strukturalne i lipidy, co stopniowo powoduje szereg zmian w ich morfologii. Migrują one z warstwy podstawnej w stronę powierzchni. Końcowym etapem ich dojrzewania jest przekształcenie się w płaskie, pozbawione jądra komórkowego, komórki warstwy rogowej, które w miarę upływu czasu ulegają rogowaceniu [13,17]. Czas odnowy naskórka w zdrowej skórze wynosi 28 dni [8].

Skórę właściwą tworzą włókna kolagenowe i elastyczne, zatopione w macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. extracellular matrix ECM), które zorganizowane są w przestrzenne sieci, zapewniając wytrzymałość i elastyczność skóry. Do komórek rezydujących w obrębie tej warstwy zalicza się: fibroblasty syntezujące składniki ECM oraz makrofagi odpowiedzialne za usuwanie obcych mikroorganizmów i fragmentów uszkodzonej tkanki [8,15,17,18]. W obrębie skóry właściwej obecna jest gęsta sieć naczyń krwionośnych i limfatycznych oraz umiejscowione są gruczoły potowe, łojowe oraz mieszki włosowe [17]. Urazy towarzyszące uszkodzeniom tej warstwy są przyczyną powstawania blizn [8].

Pod skórą właściwą jest obecna tkanka podskórna, w której skład wchodzi adipocyty. Ich zadaniem jest zapobieganie wychłodzeniu i przegrzaniu oraz ochrona przed urazami mechanicznymi [15,17].

3. GOJENIE SIĘ RANY

Proces gojenia jest niezbędny do przywrócenia prawidłowych funkcji skóry. Złożony jest z kilku etapów, które obejmują: hemostazę, stan zapalny, proliferację i przebudowę tkanki. Przebieg trzech ostatnich etapów ma kluczową rolę w określeniu czy regeneracja uszkodzenia przebiegnie z nadmierną produkcją ECM i procesem włóknienia [11].

W naprawie uszkodzonej tkanki biorą udział jednojądrzaste komórki krwi obwodowej, rezydentne komórki skóry, ECM, cytokiny, chemokiny, czynniki wzrostu i cząsteczki regulatorowe [16].

3.1. Hemostaza i faza zapalna

W wyniku uszkodzenia dochodzi do podrażnienia zakończeń nerwów czuciowych skóry oraz receptorów nocyceptywnych keratynocytów, komórek tucznych, komórek dendrytycznych, komórek śródbłonna. Z zakończeń nerwowych uwalniana jest substancja P i peptyd związany z genem kalcytoniny (ang. calcitonin gene-related peptide CGRP). Wynikiem działania tych neuropeptydów jest: rozszerzenie naczyń krwionośnych, zwiększenie przepuszczalności naczyń (obrzęk), rekrutacja komórek układu odpornościowego i degranulacja mastocytów [2]. Uszkodzenie śródbłonna naczyniowego i odsłonięcie kolagenu prowadzi do aktywacji płytek krwi, które uruchamiają kaskadę krzepnięcia. Powstający skrzep zapobiega dalszemu wynaczynieniu krwi [19]. Ziarnistości wydzielane przez płytki krwi mają właściwości chemotaktyczne, które rekrutują komórki układu odpornościowego, dlatego trombocyty wykazują dwojaką funkcję: hemostatyczną i zapalną [20].

Głównymi komórkami efektorowymi w inicjacji zapalenia są neutrofile, które stanowią 50% wszystkich komórek w pierwszym dniu po urazie [19]. Razem z neutrofilami współdziałają makrofagi rozpoznające struktury molekularne związane z uszkodzeniem (ang. damage associated molecular patterns DAMP) i wzorce molekularne związane z patogenami (ang. pathogen associated molecular patterns PAMP) poprzez receptory PRR. Kooperacja tych komórek powoduje usunięcie bakterii, martwych komórek, resztek tkanek i obcego

materiału. Oczyszczenie rany jest czynnikiem inicjującym ustąpienie fazy zapalnej. Ta współpraca mielomonocytowa jest kluczowa w gojeniu się rany [21].

Innymi komórkami biorącymi udział w reakcji zapalnej są: ILC2 (promujące reepitelizację i zamknięcie rany), komórki NKT (pobudzające różnicowanie miofibroblastów i angiogenezę), limfocyty T CD8+ (uwalniające media-tory prozapalne, immunoregulujące i mikrobójcze), niecyrkulujące tkankowe limfocyty T pamięci (limfocyty T obecne w skórze w spoczynku, stanowiące pierwszą linię pamięci immunologicznej skóry), limfocyty Treg (hamujące nadmierną aktywność komórek odpornościowych), limfocyty TCD4+ (uwalniające cytokiny prozapalne), limfocyty B (wytwarzające cytokiny wzmacniające proces gojenia się rany) [16].

3.2. Proliferacja

Na fazę proliferacyjną składa się z kilku procesów: fibroplazja (prolifera-cja fibroblastów i różnicowanie się w miofibroblasty, odkładanie ECM), reepi-telializacja i interakcje nabłonkowo-mezenchymalne między keratynocytami i fibroblastami, angiogeneza i naprawa nerwów obwodowych [16].

Fibroplazja

Fibroblasty są niejednorodną i dynamiczną linią komórek, które cechują się różnorodnością zarówno między tkankami organizmu, jak i w obrębie jed-nej tkanki.

W skórze właściwej fibroblasty powierzchowne i głębokie różnią się ro-dzajem wytwarzanego kolagenu oraz fibroblasty warstwy głębokiej wytwarzają mniej kolagenazy.

Fibroblasty odznaczają się również plastycznością, czyli adaptacją do zmian fizjologicznych pod wpływem mikrośrodowiska i cząsteczek sygnało-wych [22].

W tym procesie główną rolę odgrywają makrofagi, które wydzielają m.in. TGF- β , PDGF, kontrolując wydzielanie ECM przez regulację metaloprote-inaz i ich inhibitorów [23]. ECM zapewnia rusztowanie dla napływających komórek, adhezję i różnicowanie [7].

W regulacji procesu fibroplazji uczestniczą również neutrofile, płytki krwi, monocyty, keratynocyty, miofibroblasty, które wydzielają: IL-1, TNF- α , EGF, FGF-2, CTGF, IGF-1, VEGF [7]. Dojrzałe fibroblasty wytwarzają kolagen oraz mogą przekształcać się do miofibroblastów, które posiadają cechy

komórek mięśniowych gładkich, umożliwiając skurcz rany [24]. Bodźce mechaniczne odbierane przez fibroblasty mogą stanowić sygnał do modyfikacji ich fenotypu i wydzielania czynników wzrostu [25].

Reepitelializacja

Termin reepitelializacja oznacza pokrycie uszkodzonej skóry nabłonkiem. Rozpoczyna się między 16 a 24 godziną, która upłynęła od urazu i trwa do fazy przebudowy. Uszkodzenia skóry są klasyfikowane w dwóch kategoriach: rany częściowej lub pełnej grubości. W przypadku reepitelializacji ran częściowej grubości komórki nowego nabłonka pochodzą głównie z komórek macierzystych gruczołów potowych i z jednostek włosowo-łojowych, w mniejszym stopniu natomiast z komórek rozrodczych warstwy podstawnej naskórka [26]. Rany pełnej grubości, których uszkodzeniu uległy przydatki skóry odbudowują się z keratynocytów obecnych na brzegach rany, mogące odzyskać zdolność do podziałów [27]. Komórki nadpodstawne warstwy kolczystej naskórka stanowią krawędź rany i tworzą tzw. język naskórka

Aktywowane keratynocyty charakteryzują się odmienną organizacją cytoszkieletu, w porównaniu do tych w zdrowym naskórku. Aktywacja keratynocytów prowadzi do migracji komórek i przesuwania się języka naskórka położysku rany. Komórki migrują poza krawędzie rany, proliferują i prowadzą do odnowienia naskórka na powierzchni uszkodzenia [26,27]. W kolejnym etapie gojenia pojawiają się białka tworzące połączenia skórno-naskórkowe, zakotwiczone keratynocyty, które następnie wracają do stanu spoczynku. Bardzo ważną rolę w reepitelializacji odgrywa ECM, cytokiny, czynniki wzrostu wydzielane przez keratynocyty, fibroblasty, neutrofile, makrofagi i komórki śródbłona [28].

Angiogeneza

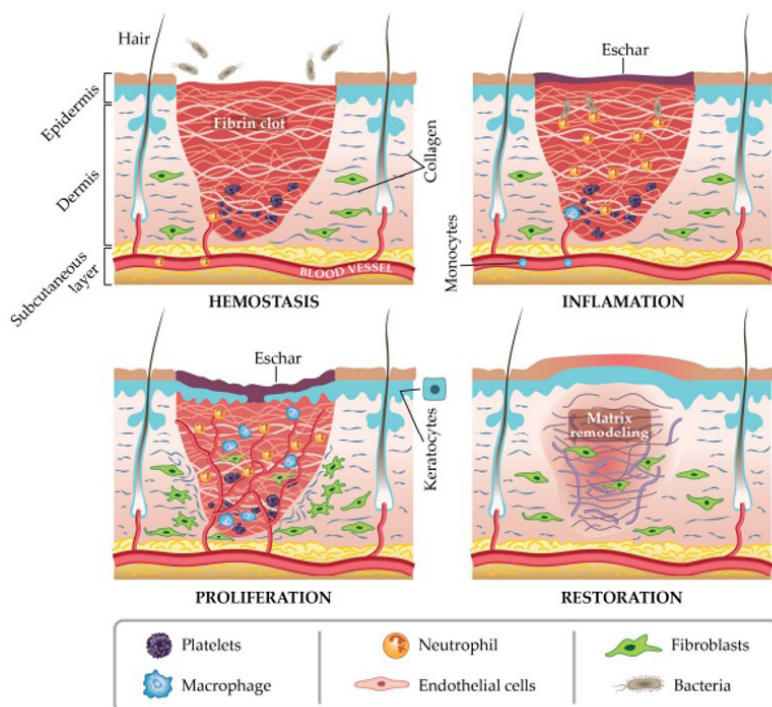
Głównym bodźcem stymulującym angiogenezę jest hipoksja tkanek, wynikająca ze zwiększonego metabolizmu komórek naprawiających uszkodzoną tkankę i zmniejszonego przepływu krwi. Do komórek biorących największy udział w tym procesie można zaliczyć: makrofagi, fibroblasty, komórki śródbłona naczyniowego i keratynocyty. W odpowiedzi na hipoksję syntezują one czynnik 1 indukowany hipoksją (ang. hypoxia-inducible factor 1 HIF1) [29]. Do czynników inicjujących powstawanie nowych naczyń krwionośnych zalicza się: VEGF, VEGFA, FGF2, PDGF, TGF- β 1 [30].

Naprawa nerwów obwodowych

Nerwy obwodowe są w stanie zregenerować się dzięki odrastaniu końców przerwanego nerwu. Prowadzi to do ponownego połączenia uszkodzonego nerwu. Komórki biorące udział w tym procesie to: makrofagi, komórki Schwanna, fibroblasty oraz cytokiny prozapalne, czynniki transkrypcyjne, dopełniacz i metabolity kwasu arachidonowego [16].

3.3. Przebudowa tkanki

Ostatnią fazą gojenia się rany jest przebudowa tkanki. Trwa od kilku tygodni do kilku miesięcy i jej celem jest przywrócenie integralności bariery przez modernizację utworzonej tkanki [2]. Proces ten obejmuje: przebudowę naczyń krwionośnych, odkładanie się ECM oraz zastąpienie tkanki ziarninowej przez bliznę. Kolagen typu III, obecny w tkance ziarninowej, jest degradowany przez metaloproteiny kolagenowe i jego miejsce zajmuje silniejszy – kolagen typu I. Towarzyszy temu reorganizacja ECM [16,31].



Rycina 1. Etapy gojenia się rany [32]

4. MECHANIZM POWSTAWANIA BLIZN

Blizna powstaje w wyniku zastąpienia uszkodzonej tkanki gęstą siecią włókien kolagenowych, często z nadprodukcją ECM, nie obserwuje się natomiast występowania gruczołów i włosów [33,34]. Nadprodukcja kolagenu jest charakterystyczna dla blizn przerostowych (ang. hypertrophic scars) i bliznowców (ang. keloid scars) [35]. Powstają one jako odpowiedź tkanki łącznej na uraz, stan zapalny, zabieg chirurgiczny lub oparzenia [6].

Blizny przerostowe są zwykle wypukłe, czerwone lub różowe, mogą powodować swędzenie. Tworzą się w granicach rany. Z upływem czasu ulegają spłaszczeniu, blednięciu, a ich wielkość może się zmniejszyć [22,36]. Budowa histologiczna ujawnia, że w obrębie blizny występują wiązki kolagenowe zbudowane głównie z kolagenu typu III, o falistym wzorze, przebiegające równolegle do powierzchni naskórka. Obecne są również miofibroblasty i małe naczynia [6].

Bliznowce w trakcie tworzenia wykraczają poza brzeg rany i ulegają ewolucji z biegiem czasu. Obecne w ich obrębie włókna kolagenowe typu I i III nie tworzą wiązek, są losowo zorientowane na powierzchni nabłonka. Obecność miofibroblastów nie jest obserwowana we wszystkich bliznach keloidowych. Naczynia krwionośne są zwykle niedrożne [6,34]. Za przyczynę tych zmian jest odpowiedzialne długotrwałe utrzymywanie się sygnałów gojenia i braku ujemnej regulacji [6].

Procesy obserwowane w trakcie powstawania blizn to: zwiększona synteza kolagenu, zwiększony stosunek występowania kolagenu I do III (szczególnie w bliznowcach), wysoka aktywność proliferacyjna fibroblastów. Czynnikiem, który w głównej mierze jest odpowiedzialny za występowanie tych zmian jest TGF- β , który nie podlega inhibicji przez autokrynne mechanizmy sygnalizacyjne. Fibroblasty bliznowców posiadają większą ilość receptorów czynników wzrostu, przez co wykazują większą aktywność niż ta obserwowana w normalnych tkankach. Ich nadmierna proliferacja jest związana również z nieefektywną apoptozą. Nadprodukcja i nieprawidłowy skład ECM spowodowany jest małą aktywnością metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej (ang. matrix metalloproteinases MMP) [6,35].

5. EMBRIONALNE KOMÓRKI MACIERZYSTE

Embrionalne komórki macierzyste (ang. embryonic stem cells ESCs) są komórkami pluripotencjalnymi tzn. mogą różnicować się we wszystkie typy

tkanek, które pochodzą z trzech listków zarodkowych: endodermy, mezodermy i ektodermy [37,38]. Udowodniono, że ESCs mogą przekształcać się do keratynocytów, głównego typu komórek budujących naskórek, a ich podanie w miejscu uszkodzenia wspomagało gojenie się rany [39,40]. W badaniu przedklinicznym, w którym do rany pełnej grubości u szczurów z cukrzycą zostały wstrzyknięte miejscowo ESCs, zaobserwowano szybsze gojenie się skóry [41].

ESCs nie są komórkami często wykorzystywanymi w badaniach, ponieważ są trudne do wyizolowania oraz kontrowersje etyczne związane z ich pozyskiwaniem ograniczają kliniczne zastosowanie [38]. Kolejną barierą stosowania ich w terapiach komórkowych jest możliwość odrzucenia przez układ odpornościowy gospodarza i wysokie ryzyko transformacji nowotworowej [42,43].

6. MEZENCHYMALNE KOMÓRKI MACIERZyste

Mezenchymalne komórki macierzyste (ang. Mesenchymal stem cells MSCs) są obecne w wielu tkankach dorosłego organizmu. Stanowią pulę odnawialnych komórek o dużych możliwościach regeneracyjnych i proliferacyjnych, umożliwiając odnowę uszkodzonych tkanek. Są multipotencjalne, co oznacza, że mogą różnicować się w komórki różnych linii mezenchymalnych [44]. Głównym ich źródłem jest szpik kostny, ale ze względu na wysoce inwazyjną procedurę pobierania, w badaniach są wykorzystywane alternatywne źródła tych komórek [45]. MSCs mogą być pozyskiwane m.in. z: galarety Whartona (ang. Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells WJ-MSCs), płynu owodniowego (ang. human amniotic fluid stem cells hAFS), tkanki tłuszczowej (ang. adipose-derived stem cells ASCs) [45,46].

6.1. Komórki mezenchymalne z galarety Whartona

Galareta Whartona z ludzkiej pępowiny jest łatwo dostępnym źródłem MSCs. Badania z wykorzystaniem tych komórek nie budzą kontrowersji etycznych [47], dlatego mogą być pomocne w opracowaniu nowej strategii terapeutycznej wspomagającej gojenie się ran [48].

W badaniach przedklinicznych, na modelach mysich badane były właściwości WJ-MSCs pod kątem leczenia uszkodzonej skóry. Najlepsze rezultaty uzyskano, gdy zastosowano WJ-MSCs na rusztowaniu z bezkomórkowej błony owodniowej. Rana uległa całkowitej regeneracji bez wytworzenia blizny. Oprócz dobrego efektu estetycznego, skóra charakteryzowała się bardzo

dobrymi właściwościami biomechanicznymi [46]. Inne badania prowadzone na modelach zwierzęcych potwierdzają gojenie się rany bez oznak bliznowacenia tkanki [47-50]. Regeneracja skóry była wynikiem działania m.in. mechanizmów parakrynnych [47,48,50] oraz czynników stymulujących angiogenezę [51], jednak w celu poznania dokładnego schematu działania niezbędne jest prowadzenie dalszych badań [46]. Otrzymane wyniki wskazują na perspektywę wykorzystania WJ-MSCs w leczeniu trudno gojących się ran, wpływając na znaczną poprawę jakości życia pacjentów [48,49].

6.2. Ludzkie komórki macierzyste płynu owodniowego

Dotychczasowe badania sugerują, że na proces gojenia się rany u płodu, oprócz czynników wewnętrznych, mogą mieć wpływ komórki obecne w płynie owodniowym [52,53]. hAFS są atrakcyjnymi kandydatami do terapii komórkowych leczenia ran. Badania prowadzone z ich udziałem nie budzą kontrowersji etycznych. Atutami tych komórek są: łatwość pobierania z płynu owodniowego, możliwość ich przechowywania do badań prowadzonych w późniejszym terminie, duży potencjał różnicowania, który nie niesie ze sobą ryzyka transformacji nowotworowej [54,55].

Badania na modelach zwierzęcych, którym w miejscu rany zostały podane hAFS, potwierdzają wyjątkowy potencjał tych komórek, bowiem stymulowały naprawę skóry bez widocznych oznak blizny. Mechanizmy, które były odpowiedzialne za regenerację to bezpośrednie różnicowanie się komórek naskórka i keratynocytów oraz parakrynnie działanie czynników uwalnianych przez hAFS. Wynikiem ich działania było przyspieszenie angiogenezy, immunomodulacja i rekrutacja endogennych komórek macierzystych. Ponadto, zwiększona ekspresja kolagenu III, zmniejszona liczba miofibroblastów i przebudowa ECM nie spowodowały wytworzenia blizny po przebudowie tkanki. Do uzyskania tego efektu kluczowa była niska reakcja zapalna tocząca się w pierwszej fazie po urazie, która wynikała z intensywnego wydzielania przez komórki IL-10. Obserwowane zmiany są podobne do tych, które występują podczas gojenia się skóry płodu [54,56]. Wstrzyknięte hAFS do rany pooparzeniowej przyspieszyły gojenie się tkanki, hamowały apoptozę komórek obecnych w skórze oraz promowały ich proliferację przez aktywację szlaku PI3K/AKT [55].

Wyniki uzyskane podczas badań na modelach zwierzęcych skłaniają do myślenia perspektywicznego w odniesieniu do hAFS jako nowoczesnej terapii komórkowej.

6.3. Komórki macierzyste z tkanki tłuszczowej

Komórki macierzyste pochodzące z tkanki tłuszczowej, dzięki swoim właściwościom biologicznym, cieszą się ogromnym zainteresowaniem w medycynie regeneracyjnej [57]. ADSCs mają działanie immunosupresyjne, mogą różnicować się w komórki różnych linii mezenchymalnych np. komórki tkanki chrzęstnej, kostnej i tłuszczowej. Występują w dużej obfitości w tkance tłuszczowej, pobieranie ich jest mało inwazyjne, ich hodowla w standardowych warunkach hodowli tkankowej nie jest problematyczna [45, 57-59]. Wydaje się, że jedynym ograniczeniem stosowania ADSCs jest występowanie różnych fenotypów tych komórek, dlatego przed przeszczepem ważne jest ich sortowanie [60].

Terapie oparte na wykorzystaniu ADSCs obecnie są wykorzystywane m.in. w ortopedii do leczenia choroby zwyrodnieniowej stawów, choroby zwyrodnieniowej kręgosłupa, chorób ścięgien i mięśni. Wyniki leczenia są zadowalające [57]. Autologiczny przeszczep tkanki tłuszczowej jest stosowany jako wypełniacz w chirurgii plastycznej np. w rekonstrukcji piersi. Zabiegi te są skuteczne i bezpieczne [38].

W badaniach wykazano, że ADSCs umieszczone na rusztowaniu i dostarczone w miejsce uszkodzenia mają zdolność do różnicowania w fibroblasty, keratynocyty, komórki naskórka oraz komórki śródbłónka naczyń. Dzięki tym ostatnim możliwa była stymulacja angiogenezy w łożysku rany. Neowaskularyzacja była pobudzana przez cytokiny przeciwzapalne. Komórki macierzyste wspomagały gojenie rany również przez wydzielanie czynników o działaniu parakrynnym, takich jak: FGF-2, IGF-1, HGF, VEGF, TGF- β 1. Zaobserwowano, że w naprawie uszkodzonej skóry brały udział endogenne komórki macierzyste, które zostały zrekrutowane czynnikami wydzielanymi przez ADSCs [61-64].

Istotnym czynnikiem stymulującym ADSCs do migracji, proliferacji i różnicowania jest niedotlenienie w łożysku rany [1]. Hipoksja zwiększa zdolność adhezji ADSCs do VCAM-1 i ICAM-1, dzięki czemu zostają one kierowane w miejsce uszkodzenia [65]. Przeszczepione komórki wykazywały działanie przeciwapoptotyczne i przeciwutleniające, usprawniając proces gojenia [1,66]. Przeszczep ADSCs do łożyska rany na uchu królika, wykazało różnicowanie się komórek do fibroblastów, aktywację rezydualnych fibroblastów, rekrutację makrofagów i zwiększenie tworzenia tkanki ziarninowej [67]. Badania przedkliniczne wykazały, że medium kondycjonowane z ADSCs

przyspiesza gojenie, zmniejsza odkładanie się kolagenu, zmniejsza ekspresję α -aktyny mięśni gładkich fibroblastów, co zapobiega powstaniu blizny [68].

ADSCs mają potencjał do zastosowania ich w terapiach komórkowych w medycynie regeneracyjnej do szybszego leczenia ran. Wyniki przeprowadzonych badań i prób klinicznych wydają się być obiecujące, jednakże w celu zapewnienia bezpieczeństwa terapii należy przeprowadzać dalsze badania eksperymentalne i większe randomizowane badania kontrolne [38,69].

7. PODSUMOWANIE

Obecnie medycyna nie dysponuje terapiami, które w znaczący sposób przyspieszyłyby gojenie rany i zapobiegałyby powstawaniu blizn. Idealne leczenie powinno przynosić satysfakcjonujący efekt zarówno kliniczny jak i kosmetyczny. Do osiągnięcia tego celu niezbędne jest poszukiwanie nowych terapii. Nowatorskim podejściem byłoby wykorzystanie komórek macierzystych. Komórki pozyskane z galarety Whartona, płynu owodniowego i tkanki tłuszczowej stanowią najbardziej obiecujące źródło komórek do badań oraz nie wzbudzają kontrowersji etycznych. Ich potencjał terapeutyczny wynika zarówno ze zdolności do różnicowania w komórki obecne w skórze (keratynocyty, fibroblasty, komórki śródbłónka), jak również z wydzielanych przez nie czynników przyspieszających gojenie rany. Efekt ten może być osiągnięty przez przeszczep komórek do łóżyska rany, podaż na specjalnym rusztowaniu lub podanie medium kondycjonowanego. Badania nad doborem najskuteczniejszej formy terapii oraz ocena bezpieczeństwa stosowania komórek macierzystych wymaga dalszych, bardziej szczegółowych badań.

REFERENCJE

1. Lee EY, Xia Y, Kim W-S, et al. Hypoxia-enhanced wound-healing function of adipose-derived stem cells: Increase in stem cell proliferation and up-regulation of VEGF and bFGF. *Wound Repair Regen.* 2009;17(4):540-547. doi:10.1111/j.1524-475X.2009.00499.x
2. El Ayadi A, Jay JW, Prasai A. Current approaches targeting the wound healing phases to attenuate fibrosis and scarring. *Int J Mol Sci.* 2020;21(3). doi:10.3390/ijms21031105

3. Monavarian M, Kader S, Moeinzadeh S, Jabbari E. Regenerative Scar-Free Skin Wound Healing. *Tissue Eng - Part B Rev.* 2019;25(4):294-311. doi:10.1089/ten.teb.2018.0350
4. Brown BC, McKenna SP, Siddhi K, McGrouther DA, Bayat A. The hidden cost of skin scars: quality of life after skin scarring. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg.* 2008;61(9):1049-1058. doi:10.1016/j.bjps.2008.03.020
5. Park JW, Hwang SR, Yoon I-S. molecules Advanced Growth Factor Delivery Systems in Wound Management and Skin Regeneration. doi:10.3390/molecules22081259
6. Wolfram D, Tzankov A, Pu"lzl P, Pu"lzl P, Piza-Katzer H. Hypertrophic Scars and KeloidsFA Review of Their Pathophysiology, Risk Factors, and Therapeutic Management. doi:10.1111/j.1524-4725.2008.34406.x
7. Greaves NS, Ashcroft KJ, Baguneid M, Bayat A. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. *J Dermatol Sci.* 2013;72(3):206-217. doi:10.1016/j.jdermsci.2013.07.008
8. Giri S, Machens HG, Bader A. Therapeutic potential of endogenous stem cells and cellular factors for scar-free skin regeneration. *Drug Discov Today.* 2019;24(1):69-84. doi:10.1016/j.drudis.2018.10.014
9. Lo DD, Zimmermann AS, Nauta A, Longaker MT, Lorenz HP. Scarless fetal skin wound healing update. *Birth Defects Res Part C Embryo Today Rev.* 2012;96(3):237-247. doi:10.1002/bdrc.21018
10. Li M, Zhao Y, Hao H, Han W, Fu X. Theoretical and practical aspects of using fetal fibroblasts for skin regeneration. *Ageing Res Rev.* 2017;36:32-41. doi:10.1016/j.arr.2017.02.005
11. Stoica AE, Grumezescu AM, Hermenean AO, Andronesu E, Vasile BS. Scar-Free Healing : Current Concepts and Future Perspectives. :1-18.
12. Dąbrowska AK, Spano F, Derler S, Adlhart C, Spencer ND, Rossi RM. The relationship between skin function, barrier properties, and body-dependent factors. *Ski Res Technol.* 2018;24(2):165-174. doi:10.1111/srt.12424
13. Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: An indispensable barrier. *Exp Dermatol.* 2008;17(12):1063-1072. doi:10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x

14. Ramos-e-Silva M, Jacques C de MC. Epidermal barrier function and systemic diseases. *Clin Dermatol.* 2012;30(3):277-279. doi:10.1016/j.clindermatol.2011.08.025
15. Dabrowska AK, Rotaru GM, Derler S, et al. Materials used to simulate physical properties of human skin. *Ski Res Technol.* 2016;22(1):3-14. doi:10.1111/srt.12235
16. Cañedo-Dorantes L, Cañedo-Ayala M. Skin Acute Wound Healing: A Comprehensive Review. Published online 2019. doi:10.1155/2019/3706315
17. Baroni A, Buommino E, De Gregorio V, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin Dermatol.* 2012;30(3):257-262. doi:10.1016/j.clindermatol.2011.08.007
18. Lam MT, Nauta A, Meyer NP, Wu JC, Longaker MT. Effective delivery of stem cells using an extracellular matrix patch results in increased cell survival and proliferation and reduced scarring in skin wound healing. *Tissue Eng - Part A.* 2013;19(5-6):738-747. doi:10.1089/ten.tea.2012.0480
19. Yun SH, Sim EH, Goh RY, Park JI, Han JY. Platelet activation: The mechanisms and potential biomarkers. *Biomed Res Int.* 2016;2016:10-14. doi:10.1155/2016/9060143
20. Herter JM, Rossaint J, Zarbock A. Platelets in inflammation and immunity. *J Thromb Haemost.* 2014;12(11):1764-1775. doi:10.1111/jth.12730
21. Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(6):427-439. doi:10.1038/nri2779
22. Tracy LE, Minasian RA, Caterson EJ. Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. *Adv Wound Care.* 2016;5(3):119-136. doi:10.1089/wound.2014.0561
23. Wynn T, Barron L. Macrophages: Master Regulators of Inflammation and Fibrosis. *Semin Liver Dis.* 2010;30(03):245-257. doi:10.1055/s-0030-1255354
24. Hinz B. The role of myofibroblasts in wound healing. *Curr Res Transl Med.* 2016;64(4):171-177. doi:10.1016/j.retram.2016.09.003
25. Chiquet M, Gelman L, Lutz R, Maier S. From mechanotransduction to extracellular matrix gene expression in fibroblasts. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2009;1793(5):911-920. doi:10.1016/j.bbamcr.2009.01.012

26. Rousselle P, Braye F, Dayan G. Re-epithelialization of adult skin wounds: Cellular mechanisms and therapeutic strategies ☆. Published online 2018. doi:10.1016/j.addr.2018.06.019
27. Rittié L. Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals. *J Cell Commun Signal*. Published online 2019. doi:10.1007/s12079-016-0330-1
28. Rousselle P, Montmasson M, Garnier C. Extracellular matrix contribution to skin wound re-epithelialization. Published online 2018. doi:10.1016/j.matbio.2018.01.002
29. Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1α. *Cell Death Differ*. 2008;15(4):621-627. doi:10.1038/cdd.2008.12
30. Tonnesen MG, Feng ² Xiaodong, Clark RAF. *Angiogenesis in Wound Healing*. Vol 5.; 2000.
31. Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, Gurtner GC. Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiol Rev*. 2019;99:665-706. doi:10.1152/physrev.00067.2017.-Wound
32. Negut I, Grumezescu V, Grumezescu AM. Treatment Strategies for Infected Wounds. *Molecules*. 2018;23(9). doi:10.3390/molecules23092392
33. Rippa AL, Kalabusheva EP, Vorotelyak EA. cells Regeneration of Dermis: Scarring and Cells Involved. *Cells*. 2019;8:607. doi:10.3390/cells8060607
34. Martin P, Nunan R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. *Br J Dermatol*. 2015;173:370-378. doi:10.1111/bjd.13954
35. Ghazawi FM, Zargham R, Gilardino MS, Sasseville D, Jafarian F. Insights into the Pathophysiology of Hypertrophic Scars and Keloids: How Do They Differ? *Adv Skin Wound Care*. 2018;31(1):582-595. doi:10.1097/01.ASW.0000527576.27489.0f
36. Sorg H, Tilkorn DJ, Hager S, Hauser J, Mirastschijski U. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. *Eur Surg Res*. 2017;58(1-2):81-94. doi:10.1159/000454919
37. Sikora MA, Olszewski WL. Komórki macierzyste - biologia i zastosowanie terapeutyczne. *Postpy Hig i Med Doświadczalnej*. 2004;58:202-208.

38. Hassanshahi A, Hassanshahi M, Khabbazi S, et al. Adipose-derived stem cells for wound healing. *J Cell Physiol.* 2019;234(6):7903-7914. doi:10.1002/jcp.27922
39. Uluer ET, Vatansever HS, Aydede H, Ozbilgin MK. Keratinocytes derived from embryonic stem cells induce wound healing in mice. *Biotech Histochem.* 2019;94(3):189-198. doi:10.1080/10520295.2018.1541479
40. Kasap Ş, Barutçu A, Güç H, Yazgan Ş, Kıvanç M, Vatansever HS. Effects of Keratinocytes Differentiated from Embryonic and Adipogenic Stem Cells on Wound Healing in a Diabetic Mouse Model. *Wounds a Compend Clin Res Pract.* 2017;29(11):297-305. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28976339>
41. Lee K-B, Choi J, Cho S-B, et al. Topical embryonic stem cells enhance wound healing in diabetic rats. *J Orthop Res.* 2011;29(10):1554-1562. doi:10.1002/jor.21385
42. Kanji S, Das H. Advances of Stem Cell Therapeutics in Cutaneous Wound Healing and Regeneration. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:1-14. doi:10.1155/2017/5217967
43. Salibian AA, Widgerow AD, Abrouk M, Evans GR. Stem Cells in Plastic Surgery: A Review of Current Clinical and Translational Applications. *Arch Plast Surg.* 2013;40(6):666. doi:10.5999/aps.2013.40.6.666
44. Pittenger MF. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science (80-).* 1999;284(5411):143-147. doi:10.1126/science.284.5411.143
45. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Klüter K, Bieback K. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. doi:10.1634/stemcells.2005-0342
46. Sabapathy V, Sundaram B, Vm S, Mankuzhy P, Kumar S. Human wharton's jelly mesenchymal stem cells plasticity augments scar-free skin wound healing with hair growth. *PLoS One.* 2014;9(4). doi:10.1371/journal.pone.0093726
47. Zhao G, Liu F, Lan S, et al. Large-scale expansion of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on gelatin microbeads, with retention of self-renewal and multipotency characteristics and the capacity for enhancing skin wound healing. Published online 2012. doi:10.1186/s13287-015-0031-3

48. Arno AI, Amini-Nik S, Blit PH, et al. *Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells Promote Skin Wound Healing through Paracrine Signaling*; 2014. <http://stemcellres.com/content/5/1/28>
49. Millán-Rivero JE, Martínez CM, Romecín PA, et al. Silk fibroin scaffolds seeded with Wharton's jelly mesenchymal stem cells enhance re-epithelialization and reduce formation of scar tissue after cutaneous wound healing. doi:10.1186/s13287-019-1229-6
50. Yamamoto A, Shohara R, Takikawa S, et al. Mesenchymal stromal cells of human umbilical cord Wharton's jelly accelerate wound healing by paracrine mechanisms. Published online 2012. doi:10.3109/14653249.2012.706705
51. Edwards SS, Zavala G, Prieto CP, et al. Functional analysis reveals angiogenic potential of human mesenchymal stem cells from Wharton's jelly in dermal regeneration. doi:10.1007/s10456-014-9432-7
52. Hu MS, Maan ZN, Wu J-C, et al. Tissue Engineering and Regenerative Repair in Wound Healing. doi:10.1007/s10439-014-1010-z
53. Klein JD, Turner CGB, Steigman SA, et al. Amniotic Mesenchymal Stem Cells Enhance Normal Fetal Wound Healing. *Stem Cells Dev.* 2011;20(6):969-976. doi:10.1089/scd.2010.0379
54. Fukutake M, Ochiai D, Masuda H, et al. Human amniotic fluid stem cells have a unique potential to accelerate cutaneous wound healing with reduced fibrotic scarring like a fetus. 2019;32:51-63. doi:10.1007/s13577-018-0222-1
55. Li J-Y, Ren K-K, Zhang W-J, et al. Human amniotic mesenchymal stem cells and their paracrine factors promote wound healing by inhibiting heat stress-induced skin cell apoptosis and enhancing their proliferation through activating PI3K/AKT signaling pathway. doi:10.1186/s13287-019-1366-y
56. Xiao S, Huang G, Wei Z, et al. IL-10 Gene-Modified Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells Augment Regenerative Wound Healing by Multiple Synergistic Effects. Published online 2019. doi:10.1155/2019/9158016

57. Brzezicka A, Kondej K, Błazyńska-Spychalska A, Spychalski P, Jankau J, Pikula M. Medical applications of adipose-derived stem cells – the latest trends. *Chir Plast i Oparzenia*. Published online 2018;79-86. <https://evereth.pl/zastosowanie-komorek-macierzystych-tkanki-tluszczowej-w-medy-cynie-najnowsze-trendy/>
58. Minteer D, Marra KG, Peter Rubin J. Adipose-derived mesenchymal stem cells: Biology and potential applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2013;129(July 2012):59-71. doi:10.1007/10_2012_146
59. 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). Published online 2017. doi:10.1155/2017/4740709
60. Schumacher A, Cichorek M, Pikula M. Adipose-derived stem cells for tissue engineering and therapy of non-healing wounds | Komórki macierzyste tkanki tłuszczowej w inżynierii tkankowej i terapii trudno gojących się ran. *Postępy Hig Med Dosw*. 2018;72:806-821.
61. Expert Opinion on Biological Therapy Adipose-derived stem cells for wound repair and regeneration Yoshiaki Shingyochi (PhD student), Hakan Orbay (Visiting Project Scientist) & Hiroshi Mizuno. Published online 2015. doi:10.1517/14712598.2015.1053867
62. Ebrahimian TG, Pouzoulet F, Squiban C, et al. Cell Therapy Based on Adipose Tissue-Derived Stromal Cells Promotes Physiological and Pathological Wound Healing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(4):503-510. doi:10.1161/ATVBAHA.108.178962
63. Rehman J, Traktuev D, Li J, et al. Secretion of Angiogenic and Antiapoptotic Factors by Human Adipose Stromal Cells. *Circulation*. 2004;109(10):1292-1298. doi:10.1161/01.CIR.0000121425.42966.F1
64. Cerqueira MT, Pirraco RP, Santos TC, et al. Human Adipose Stem Cells Cell Sheet Constructs Impact Epidermal Morphogenesis in Full-Thickness Excisional Wounds. Published online 2013. doi:10.1021/bm4011062
65. Amos PJ, Bailey AM, Shang H, Katz AJ, Lawrence MB, Peirce SM. Functional Binding of Human Adipose-Derived Stromal Cells. *Ann Plast Surg*. 2008;60(4):437-444. doi:10.1097/SAP.0b013e318095a771

6. Kim W-S, Park B-S, Sung J-H. Expert Opinion on Biological Therapy The wound-healing and antioxidant effects of adipose-derived stem cells The wound-healing and antioxidant effects of adipose-derived stem cells. *Expert Opin Biol Ther.* 2009;9(7):879-887. doi:10.1517/14712590903039684
67. Hong SJ, Jia S-X, Xie P, et al. Topically Delivered Adipose Derived Stem Cells Show an Activated-Fibroblast Phenotype and Enhance Granulation Tissue Formation in Skin Wounds. Eisenberg L, ed. *PLoS One.* 2013;8(1):e55640. doi:10.1371/journal.pone.0055640
68. Li Y, Zhang W, Gao J, et al. Adipose tissue-derived stem cells suppress hypertrophic scar fibrosis via the p38/MAPK signaling pathway. *Stem Cell Res Ther.* 2016;7(1):102. doi:10.1186/s13287-016-0356-6
69. Gir P, Oni G, Brown SA, Mojallal A, Rohrich RJ. Human Adipose Stem Cells. *Plast Reconstr Surg.* 2012;129(6):1277-1290. doi:10.1097/PRS.0b013e31824ecae6

MATERIAŁY HYDROŻELOWE JAKO SKAFOLDY ORAZ SYSTEMY TRANSPORTU ZWIĄZKÓW CHEMICZNYCH W PROCESIE REGENERACJI KOŚCI

Magdalena Lisik, Aleksandra Kwiatkowska, Magda Nowak, Martyna Żurek

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

Abstrakt:

Częstotliwość występowania urazów i stanów chorobowych w obrębie kości wzrasta zwłaszcza w społeczeństwach starzejących się, otyłych i unikających aktywności fizycznej. Przeszczepy kostne jako konwencjonalna metoda leczenia urazów posiada wady w postaci ograniczonej podaży materiałów, ryzyka przeniesienia chorób od dawcy, odrzucenia przeszczepu oraz innych powikłań. Inżynieria tkanek kostnych, poprzez indukcję funkcjonalnej regeneracji kości przez uzupełniające się połączenie funkcji komórek i biomateriałów, m.in. hydrożeli, jest postrzegana jako alternatywa dla przeszczepów kostnych. Hydrożele jako materiały o wysokiej zawartości wody, przygotowane z usieciowanych polimerów, są w stanie zapewnić stałe, lokalne dostarczanie środków terapeutycznych oraz tworzą swoiste rusztowania, które zastępując ECM pozwalają na skuteczne zastąpienie uszkodzonych tkanek z uniknięciem wymienionych, charakterystycznych dla przeszczepów kostnych wad. Użycie hydrożeli jako skafoldów oraz systemu transportu związków chemicznych może usprawnić proces regeneracji kości, co zachęca do stosowania tych materiałów w praktyce klinicznej.

Słowa kluczowe: inżynieria tkankowa, regeneracja kości, hydrożel,

Abstract:

The incidence of bone injuries and conditions is increasing especially in societies that are aging, obese, and avoid physical activity. Bone transplantation, as a conventional method of treating trauma has disadvantages in terms of limited supply of materials, risk of disease transmission from the donor, transplant rejection and other complications. Bone tissue engineering, through the induction of functional bone regeneration using complementary combinations of cell function and biomaterials, such as hydrogels, is seen as an alternative to bone transplantation. Hydrogels, as high-water content materials prepared from cross-linked polymers, are able to provide continuous local delivery of therapeutic agents and form specific scaffolds that, by replacing

the ECM, allow effective replacement of damaged tissues with avoidance of the previously mentioned disadvantages characteristic of bone grafts. Thus, the use of hydrogels as capsules and chemical transport system can improve the bone regeneration process, which encourages the use of these materials in clinical practice.

Keywords: tissue engineering, bone regeneration, hydrogel

1. WSTĘP

Inżynieria tkankowa jest dziedziną łączącą elementy laboratoryjnego przetwarzania komórek, syntezy czynników wzrostowych oraz macierzy biologicznej, które po wszczępieniu stymulują procesy regeneracji [1]. Produkt inżynierii tkankowej zawiera bądź składa się ze zmodyfikowanych komórek lub całych tkanek oraz posiada właściwości regeneracji, naprawy lub zastępowania tkanek. Może również zawierać dodatkowe substancje, m.in. produkty komórkowe, biomolekuły, biomateriały, podłoże lub matrycę. Komórki lub tkanki mogą być żywotne lub nieżywotne [2].

Obecnie, złotym standardem przeszczepów kostnych są autoprzeszczepy, ponieważ są one histokompatybilne, nieimmunogenne oraz posiadają zasadnicze elementy niezbędne do osiągnięcia osteoindukcji [3]. Autologiczne przeszczepy kości są bardzo kosztownymi procedurami i mogą powodować ból w miejscu pobrania lub różnego rodzaju powikłania miejscowe, takie jak krwiak lub złamanie [4]. Wysoka częstość występowania zachorowalności podczas przeszczepu autogenego sprawia, że pozyskiwanie materiału z innych źródeł jest bardziej pożądane [5]. Alloprzeszczepy stanowią drugą co do częstości technikę przeszczepiania kości. W porównaniu do autoprzeszczepów, alloprzeszczepy wiążą się z większym ryzykiem wystąpienia reakcji immunologicznych oraz zmniejszonymi właściwościami osteoindukcyjnymi [6]. Inne powszechnie stosowane techniki naprawy kości mogą obejmować osteogenezę dystrykcyjną, cement kostny, wypełniacze i białka morfogeniczne kości [7]. Mimo, że wymienione wcześniej interwencje kliniczne poprawiają naprawę kości, żadna z nich nie posiada wszystkich cech idealnego BTM (bone tissue materials) [8].

Do wspomnianych cech idealnego BTM zalicza się: (i) biokompatybilne rusztowanie, jak najbardziej zbliżone do naturalnie występującej ECM, (ii) biogodność, (iii) bioaktywność, (iv) biofunkcyjność, (v) brak reakcji toksycznych oraz alergicznych, (vi) występowanie komórek osteogenicznych, które umożliwiają tworzenie macierzy tkanki kostnej, (vii) wytwarzanie morfogenicznych

sygnałów, które pomagają nakierować komórki na fenotypowo pożądaną typ, (viii) wysoki potencjał angiogeny, (ix) długi okres przechowywania, (x) niskie koszty [9,10]. Znalezienie związku chemicznego posiadającego wszystkie wymienione powyżej właściwości jest wyzwaniem dla świata naukowego. Biorąc pod uwagę, że produkt inżynierii tkankowej może powstać z więcej niż jednej substancji, wysiłki naukowców mogą zostać skierowane na dopracowanie BTM stworzonego z kilku różnych związków chemicznych, posiadających różne cechy. Wyjątkowo obiecującym materiałem wydają się być zarówno naturalne, jak i syntetyczne polimery. Wszystkie naturalne polimery (biopolimery) są biokompatybilne, biodegradowalne i bioaktywne, jednak jednocześnie są słabe mechanicznie. Istnieją trudności w kontrolowaniu ich zmienności w poszczególnych partiach [11]. Co więcej, polimery naturalne pochodzenia zwierzęcego mogą być źródłem potencjalnych reakcji immunologicznych [12] oraz zakażeń [13]. Zaletami stosowania polimerów syntetycznych są: (i) unikanie infekcji, transfekcji oraz immunogenności; (ii) zwiększona kontrola nad właściwościami chemicznymi i mechanicznymi; (iii) biodegradowalność. Biorąc pod uwagę różnice w cechach materiałów, w celu uzyskania lepszego efektu terapeutycznego stosuje się różnego rodzaju mieszanki, np. chitozanu oraz polieteroimidu [14]. Wykorzystanie polimerów jako substytutów kości ma pewne potencjalne wady, m.in. wytwarzanie toksycznych produktów degradacji, w tym jonów wodorowych w miejscu implantu [15].

Pomimo wymienionych wcześniej różnic w cechach fizycznych i chemicznych poszczególnych hydrożeli, wszystkie one składają się z sieci polimerowych, które posiadają dużą liczbę domen lub grup hydrofilowych. Sieci te mają wysokie powinowactwo do wody, ale nie ulegają rozprowadzeniu z powodu wiązań utworzonych pomiędzy poszczególnymi łańcuchami polimerowymi. Woda, przenikając przez sieć powoduje pęcznienie hydrożelu. Możliwość pęcznienia oraz struktura sieci powodują, że hydrożele stosunkowo łatwo dopasowują się do kształtu przestrzeni, w której są zamknięte [16]. Hydrożele mają pewne właściwości zbliżone do natywnej macierzy pozakomórkowej, takie jak elastyczna, miękka i plastyczna struktura oraz niskie napięcie międzyfazowe z wodą lub płynami biologicznymi [17]. Stwierdzono, że struktura hydrożeli może zminimalizować podrażnienie otaczających tkanek po implantacji, z kolei niskie napięcie międzyfazowe pomiędzy powierzchnią hydrożelu a płynem ustrojowym minimalizuje adsorpcję protein i adhezję komórek, co zmniejsza szanse na wystąpienie negatywnej reakcji immunologicznej [18]. Ponieważ właściwości fizykochemiczne hydrożelu są zbliżone do natywnej macierzy pozakomórkowej, hydrożele mogą działać dwojako. Po pierwsze, mogą

tworzyć skafoldy, czyli rusztowania służące jako syntetyczna i tymczasowa replika ECM, wspierając przyłączanie komórek i wytwarzanie trójwymiarowej struktury tkanki kostnej [19]. Po drugie, hydrożele mogą być wykorzystywane do kontrolowanego dostarczania leków bezpośrednio do obszaru wymagającego leczenia.

Pomimo odkrycia dużej liczby aktywnych związków usprawniających regenerację tkanek, niewiele z nich odniosło sukces kliniczny. Porażki na tym polu przypisywane są niskiej biodostępności, tzn. poziomemu stężenia i szybkości z jaką środek terapeutyczny dociera do tkanki docelowej i na nią oddziałuje. W przypadku podania ogólnoustrojowego, biodostępność leku jest zazwyczaj bardzo niska, a stężenie leku w osoczu krwi może szybko spaść poniżej poziomu skutecznego poziomu, co wymaga ponownego podania leku. To z kolei zwiększa prawdopodobieństwo przedawkowania. Systemy kontrolowanego dostarczania leków (DDS) stanowią alternatywne podejście do regulowania biodostępności środków terapeutycznych. W systemach kontrolowanego dostarczania leków, aktywny środek leczniczy jest włączony w strukturę hydrożelu tworzącego skafold w taki sposób, że lek jest uwalniany z materiału w określony sposób i pod wpływem określonych czynników [20]. Mnogość dostępnych leków i różnorodność materiałów hydrożelowych, przy równoczesnej możliwości precyzyjnego dopasowania ich właściwości fizycznych i chemicznych tak, aby stężenie i czas uwalniania leku były optymalne sprawia, że DDS oparte na hydrożelach znajdują swoje zastosowanie w inżynierii tkanek kostnych.

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie zastosowania hydrożeli w inżynierii tkanek kostnych jako wszechstronnego materiału umożliwiającego jednocześnie pełnienie funkcji rusztowania o odpowiednich właściwościach mechanicznych dla odbudowującej się tkanki, jak i systemu kontrolowanego transportu leków.

2. HYDROŻELE JAKO SKAFOLDY

Trójwymiarowe sztuczne rusztowanie jest zaprojektowane tak, aby nie tylko zapewniało komórkom początkową integralność strukturalną, do czasu, aż tkanka kostna zostanie naprawiona lub zregenerowana i przywrócona zostanie jej prawidłowa funkcja biomechaniczna, ale także kierowało różnicowaniem i proliferacją komórek, co ostatecznie prowadzi do powstania funkcjonalnej tkanki [21]. Oczywiście więc jest, że chemiczne, fizyczne i mechaniczne właściwości rusztowań mają zasadnicze znaczenie dla funkcjonalnej regeneracji

tkanek. Rusztowanie kostne jest zwykle wykonane z porowatych biodegradowalnych materiałów, które zapewniają mechaniczne wsparcie podczas naprawy i regeneracji uszkodzonej lub chorej kości. Badania nad inżynierią tkanki kostnej w ciągu ostatnich dekad zainspirowały innowacje w zakresie nowych materiałów, technik wytwarzania, oceny wydajności i zastosowań. Znaczący postęp dokonał się w dziedzinie materiałów tworzących rusztowania wspierające osteogenezę i angiogenezę. Obecnie możliwe jest tworzenie bioresorbowalnych rusztowań o określonej porowatości i dostosowanych właściwościach [24]. Naturalnymi polimerami stosowanymi w inżynierii tkankowej są przede wszystkim związki cukrowe oraz białkowe. Są one nie tylko materiałem budującym rusztowanie, ale też składnikami odżywczymi dla komórek. Wiele naturalnych polimerów, cechuje się wrodzoną bioaktywnością z sekwencjami peptydowymi, które wpływają na adhezję, proliferację i różnicowanie komórek. Kolagen, żelatyna, jedwab, chitozan i inne są powszechnie stosowanymi naturalnymi polimerami do wytwarzania rusztowań, jednak należy mieć na uwadze fakt, że mogą ulec denaturacji w przypadku stosowania białek [25]. Do polimerów syntetycznych, biorących udział w tworzeniu rusztowań należą polikaprolakton (PCL), polilaktyd (PLA), poliglikolid (PGA), kopolimer poli(laktyd-co-glikolid) (PLGA) oraz kopolimery (PPF) [26].

Budowa w skali mikro i nano odgrywa kluczową rolę w fizjologii kości, dlatego naukowcy badają nowe techniki wytwarzania, które pozwoliłyby na jak najwierniejsze odwzorowanie naturalnej struktury elementów szkieletu. W ostatnich latach testowane są działania polegające na połączeniu mechanicznie mocnych, porowatych rusztowań z nano-funkcjonalnymi, samoskładającymi się hydrożelami peptydowymi jako systemem rusztowań osteoindukcyjnych [22]. Połączenie silnego mechanicznego komponentu rusztowania, stabilizującego miejsce uszkodzenia oraz komponentu hydrożelowego umożliwi efektywne dostarczanie komórek do miejsca implantacji, utworzenie niszy komórkowej i promocję mineralizacji. Co więcej, obecność komponenty hydrożelowej pozwala na regulację biodostępności leków poprzez ich włączanie i uwalnianie z sieci polimerowej, oraz na dostarczenie do uszkodzonych miejsc komórek i czynników niezbędnych do osteogenezy [23].

2.1. Cechy mające wpływ na zastosowanie i działanie skafoldów

Okres półtrwania

Kluczową cechą rusztowań BTE jest zapewnienie tymczasowej integralności mechanicznej w miejscu uszkodzenia do czasu, aż tkanka kostna zostanie naprawiona lub zregenerowana i przywrócona zostanie prawidłowa funkcja biomechaniczna. Aby rusztowanie do inżynierii tkankowej kości było "funkcjonalne" natychmiast po wszczepieniu, jego właściwości biomechaniczne muszą odpowiadać fizycznym wymaganiom zdrowej, otaczającej go kości [27]. Wśród czynników wpływających na kinetykę degradacji znajdują się między innymi: skład chemiczny, konfiguracja struktury, sposób przetwarzania materiału, masa molowa, czynniki środowiskowe, naprężenia, odkształcenia, krystaliczność oraz różne dodatki i wypełniacze. Kontrolowany proces degradacji materiału wszczepionego do żywego organizmu jest jednym z najważniejszych zagadnień, nad którym ciągle prowadzone są prace badawcze [28]. Okres półtrwania ma duży wpływ na szybkość uwalniania substancji chemicznych zawartych w hydrożelu. Ponadto, materiały o szybszej degradacji często generują produkty uboczne i mogą powodować deformację rusztowania [29].

Porowatość

Struktura porów rusztowania, tj. ich wielkość i wzajemne powiązania, jest niezwykle istotnym czynnikiem dla prawidłowego wzrostu i rozmieszczenia komórek, tempa ich migracji, możliwości wytwarzania ECM [30]. Średnia wielkość porów rusztowania jest decydującym czynnikiem determinującym prawidłowy rozwój unaczynienia tkanki- badania wykazały, że do wrastania naczyń krwionośnych niezbędne jest zaprojektowanie takiego rusztowania, żeby średnia wielkość porów była większa niż 300 μm [31]. Rusztowania o wysokiej porowatości są zalecane w inżynierii tkankowej ze względu na ich zwiększoną powierzchnię, która pozwala na zwiększenie gęstości zasiewu komórek przed implantacją, oraz na optymalny transport substancji odżywczych i tlenu. Co więcej, zmiany porowatości mają wpływ na szybkość biodegradacji oraz ogólną wytrzymałość mechaniczną rusztowania. Wytrzymałość mechaniczna rusztowania wpływa na mechanotransdukcję przylegających do rusztowania komórek kostnych, co odgrywa kluczową rolę w procesach naprawy i remodelingu kości [32]. Pory o większych rozmiarach sprzyjają wrastaniu tkanki i jej unaczynieniu [33].

Relaksacja naprężeń

Różne tkanki, m.in szpik kostny, regenerujące się kości są lepkosprężyste i wykazują częściową relaksację naprężeń przy zastosowaniu stałego odkształcenia- 15% [34]. Dla porównania, komórki w hodowlach 2D wywierają zwykle odkształcenia bliskie 3-4% [35], a w hodowlach 3D wynoszą średnio 20-30% [36]. Zmniejszenie naprężenia odpowiada zmniejszeniu modułu relaksacji lub odporności na odkształcenia w czasie. Właściwości mechaniczne materiałów regulują zachowanie komórek do nich przylegających [37], oraz zdolność podłoża do reagowania na bodźce mechaniczne. Zmiana lepkosprężystości podłoża, niezależnej od jego sztywności, ma wpływ na różne zachowania pojedynczych komórek, m.in promowanie ich rozprzestrzeniania, proliferacji, oraz różnicowania co przyczynia się do powstawania całych tkanek [38,39].

Usieciowanie

Kluczowym czynnikiem warunkującym kontrolowane uwalnianie zawartych w hydrożelach związków jest szybkość jego degradacji. O stopniu pęcznienia hydrożeli decyduje stopień usieciowania. Stopień ten określa się jako stosunek moli czynnika sieciującego do moli powtarzających się jednostek polimeru. Hydrożele, które były sieciowane przez krótszy czas, tj miały mniej zwartą strukturę, a większą zawartość wody, ulegały szybszej degradacji w porównaniu z hydrożelami, które wykazywały większą gęstość usieciowania. Gęstość usieciowania można określić poprzez wykonanie próby rozciągania arkuszy żelatyny [40], lub określenie zawartości wody, którą definiuje się jako procentowy udział wody w spęcznionym hydrożelu [41]. Zasadniczo, szybsze tempo degradacji hydrożeli wynika z mniejszego stopnia usieciowania, które powoduje zwiększoną ruchliwość łańcuchów polimerowych [42].

3. HYDROŻELE W SYSTEMACH PODAWANIA LEKÓW

Systemy kontrolowanego dostarczania leków stanowią nowatorskie podejście do regulowania biodostępności środków terapeutycznych. W systemach kontrolowanego dostarczania leków (DDS), aktywny środek leczniczy jest na różne sposoby włączany i uwalniany z sieci polimerowej. Hydrożele mogą być wykorzystywane do kontrolowanego dostarczania wielu związków chemicznych, począwszy od małocząsteczkowych leków, aż po duże biomolekuły takie jak kwasy nukleinowe, peptydy i białka. DDS-y wykorzystują ich

szerokie spektrum składników hydrofobowych i hydrofilowych, a także ich połączenia polimer-polimer, polimer-lek, oddziaływania polimer-polimer, polimer-lek, polimer-rozpuszczalnik lub polimer-środowisko fizjologiczne. Ze względu na różnorodność składu chemicznego i wielkości dostarczanych cząstek, sposób dostarczenia oraz kontrolowanego uwalniania leku może się znacznie różnić w zależności od zastosowania oraz cech hydrożelu. Jedynymi ograniczeniami dla badaczy są biokompatybilność, obecność toksycznych produktów ubocznych oraz koszty produkcji [43]. Podawanie leków za pomocą DDS może być niezwykle pomocne podczas leczenia niektórymi czynnikami wzrostu, które mają krótki terapeutyczny czas półtrwania. Konwencjonalna metoda wymagałaby częstego podawania czynników w celu utrzymania skutecznego stężenia substancji czynnej. Hydrożele z powodzeniem są wykorzystywane w roli DDS- mikrosfery hydrożelowe chitozano-albuminowe wykazały ciągłe uwalnianie czynników wzrostu ponad trzy tygodnie po implantacji podskórnej u szczurów [44].

3.1. Sposoby transportu związków aktywnych do hydrożeli

Transport bezpośredni

Fizyczna enkapsulacja czynników wzrostu w celu ich kontrolowanego uwalniania jest jedną z głównych strategii lokalnego dostarczania czynników wzrostu [45]. Bezpośredni ładunek terapeutyczny do hydrożelu może być dostarczony poprzez enkapsulację, podczas której łańcuchy polimerowe są usieciowane w obecności leku, białka lub makrocząsteczki [46]. Enkapsulacja jest również wykorzystywana do transportu odpowiednich komórek do miejsca objętego procesem terapeutycznym. Enkapsulacja komórek, polegająca na zamknięciu komórek wewnątrz hydrożelu, jest powszechnie stosowana w celu ochrony komórek przed układem immunologicznym [47]. Stosując tę metodę, komórki mogą być enkapsulowane indywidualnie lub w określonej objętości materiału, w postaci sferycznej lub włókien [48]. Obecnie głównym ograniczeniem enkapsulacji komórek jest równowaga pomiędzy odpowiednim współczynnikiem dyfuzji dla transportu tlenu i składników odżywczych do komórek, a zachowaniem właściwości immunoprotekcyjnych [49]. Badania przeprowadzone na szczurach dowiodły, że hydrożele z enkapsulowanymi osteoblastami mają duży potencjał terapeutyczny. Obecnie, chociaż mechanika sieci hydrożelowych może być niewystarczająca dla dużych ubytków w kościach narażonych na znaczne obciążenia, materiały i techniki enkapsulacji osteoblastów

w hydrożelach mogą być odpowiednie dla naprawy ubytków kostnych w obrębie twarzoczaszki [50]. Innym sposobem jest dyfuzja związków do porów hydrożelu już po jego usieciowaniu [51]. Dyfuzja oraz enkapsulacja stanowią najłatwiejsze sposoby dodawania substancji aktywnych do hydrożelu, jednak uwalnianie załadowanych cząsteczek nie może być precyzyjnie kontrolowane. Typowy schemat polega na szybkim uwalnianiu leków podczas początkowego pęcznienia hydrożelu tuż po przeniesieniu *in vivo*, po czym następuje przedłużone uwalnianie pozostałych leków zamkniętych w sieci żelowej. Taki przebieg procesu może prowadzić do utraty większości substancji terapeutycznej, jednak przy zwiększonym usieciowaniu polimeru, wartość ta może się zmniejszyć do jedynie 10-25% [52,53].

Umieszczenie w hydrożelu oddzielnych układów uwalniających

Terapeutyki mogą być również ładowane do małych nośników wtórnego uwalniania (np. mikrocząsteczek, mikrożeli, liposomów i miceli) przed enkapsulacją w hydrożelach. Uwalnianie substancji z nośnika zależne jest m.in. od dyfuzji. Oznacza to, że na szybkość uwalniania będzie miał wpływ stosunek powierzchni do objętości nośnika- nanosfery (1 - 100 nm) lub mikrocząstki (1 - 100 μm), jako nośniki substancji będą prowadzić do zróżnicowanego czasu dostarczania [54]. Dzięki dostosowaniu wielkości nośnika można dostosować prędkość uwalniania substancji do otoczenia, co pozwoli na udoskonalenie procesu terapeutycznego. Na przykład, uwalnianie TGF-beta1 może być precyzyjnie regulowane przez kilka tygodni poprzez enkapsulację mikrocząsteczek żelatyny obciążonych tym związkiem [55]. W miarę degradacji hydrożelu, enkapsulowane leki lub białka są uwalniane z hydrożelu i mogą powoli dyfundować do środowiska zewnętrznego. Zastosowanie nośników w nano- skali, poza precyzyjnym dostrojeniem czasu uwalniania, pozwala również na zwiększenie biodostępności poprzez zwiększenie stabilności ładunku. Mniejsze rozmiary cząstek ułatwiają głębszą penetrację do naczyń włosowatych, a w rezultacie zwiększoną absorpcję komórkową- cząstki o rozmiarze 100 nm wykazują skuteczność absorpcji *in situ* 15-250-krotnie większą w porównaniu z małymi mikrocząsteczkami (1 i 10 μm) [56].

Mikrocząsteczki i mikrożele hydrożelowe

Opracowano techniki wytwarzania hydrożeli w postaci mikroskalowych cząstek (~1-1,000 μm), zwanych mikrocząstkami hydrożelowymi (HMPs) lub

mikrożelami. Mikrocząsteczki hydrożelowe są obiecującym materiałem używanym do terapeutycznego dostarczania komórek i leków. Substancje biologiczne (komórki i leki) mogą być zamknięte w HMP o predefiniowalnych kształtach i rozmiarach przy użyciu różnych technik wytwarzania (mikrofluidyka, litografia, natryskiwanie elektrohydrodynamiczne emulsja porcjowa, i fragmentacja mechaniczna). HMP mogą być dostarczone jako agregaty cząstek (hydrożele ziarniste) w celu utworzenia mikroporowatych rusztowań sprzyjających infiltracji komórek lub osadzone wewnątrz hydrożelu, w celu uzyskania zachowań wieloskalowych. HMP mogą być wytwarzane zarówno z naturalnych, jak i syntetycznych polimerów oraz mogą być wytwarzane w różnych kształtach i rozmiarach przy użyciu technik, które są kompatybilne z kapsułkowaniem substancji biologicznych (np. komórek i leków) [57]. Cząsteczki w skali mikro i nano poprawiają biodostępność poprzez zwiększenie rozpuszczalności i stabilności ładunku. Mniejsze rozmiary cząstek ułatwiają głębszą penetrację tkanek oraz zwiększone wchłanianie przez komórki- cząstki o rozmiarze 100 nm wykazują skuteczność absorpcji in situ 15-250-krotnie większą niż te wielkości 1 i 10 μm [58]. W przypadku degradacji mikro i nanocząstek, należy jednak wziąć pod uwagę, że produkty degradacji mogą tworzyć mikroobszary o podwyższonej kwasowości, co mogłoby negatywnie wpłynąć na cząsteczki sygnalizacyjne (np. punkt izoelektryczny, fałdowanie, aktywność itp.) [59].

Liposomy i egzosomy

Liposomy są są badane i analizowane od ponad pięciu dekad i stały się uznanym sposobem dostarczania leków, co zaowocowało dopuszczeniem do obrotu wielu zatwierdzonych klinicznie produktów opartych na liposomach w leczeniu różnych chorób [60]. Najczęstszym sposobem podawania liposomów i egzosomów obciążonych lekami jest iniekcja. Nie jest to skuteczna metoda, ponieważ cząsteczki trudno jest utrzymać w miejscu docelowym, a zatem nieuniknionym efektem jest szybkie usunięcie leku. Jednym z możliwych rozwiązań jest uniknięcia wielokrotnych wstrzyknięć i uwalniania leku przez długi okres jest osadzenie liposomów i egzosomów w systemie hydrożelowym. W przeciwieństwie do liposomów, egzosomy osadzone w hydrożelach są najczęściej wykorzystywane jako cząsteczki bioaktywne, a nie jako nanocząsteczki do kontrolowanego dostarczania leków i molekuł. Kontrolowane uwalnianie egzosomów z systemów hydrożelowych zwiększa ich skuteczność terapeutyczną poprzez tworzenie rezerwuaru egzosomów w miejscu urazu, zmniejszając

tym samym szybkość ich wydalania z organizmu. Egzosomy osadzone w HA, żelatynie, chitozanie i hydrożelach na bazie polipeptydów były używane m.in. do naprawy ubytków i niedokrwienia kości [61].

Kowalencyjne przyłączenie do polimeru tworzącego hydrożel

W celu lepszej kontroli uwalniania leków, mogą one być również kowalencyjnie związane z matrycą hydrożelową. Dzięki koniugacji kowalencyjnej wydłużono czas uwalniania leków do kilku miesięcy. W ten sposób można transportować czynniki ułatwiające osteogeniczne różnicowanie mezenchymalnych komórek macierzystych [62]. Terapeutyki przyłączone kowalencyjnie są uwalniane z sieci hydrożelowych w wyniku hydrolizy wiązań chemicznych pomiędzy cząsteczkami leku a polimerem lub w wyniku całkowitej degradacji hydrożelu. Badania Karageorgiou i wsp. wykazały, że kowalencyjne sprzężenie fibroiny oraz białka morfogenetycznego kości-2 (BMP-2) zintensyfikowały różnicowanie ludzkich komórek zrębu szpiku kostnego [63]. Porównując próbkę BMP-2 sprzężonego kowalencyjnie z próbką, w której BMP-2 był adsorbowany przez fibroinę zauważono, że sprzężenie kowalencyjne umożliwiło wolniejsze i stabilniejsze uwalnianie białka morfogenetycznego kości- pod koniec czwartego tygodnia badania tylko 10% zaadsorbowanego BMP-2 pozostało w próbce, podczas gdy 50% kowalencyjnie sprzężonego BMP-2 było nadal w niej obecne.

3.2. Sposoby uwalniania substancji z hydrożeli

Ze względu na wysoką zawartość wody w hydrożelach, ich molekularne mechanizmy uwalniania cząsteczek różnią się znacznie od innych DDS-ów składających się z mniej hydrofilowych lub hydrofobowych polimerów. Wyzwalacze środowiskowe lub enzymatyczne mogą wywołać trzy rodzaje zmian struktury hydrożelu: pęcznienie, rozpuszczanie lub degradację. Pęcznienie hydrożelu "otwiera" sieć polimerową, co pozwala na szybszą dyfuzję uwieczonych materiałów. Kontrolowana dyfuzja przez siatkę hydrożelu jest podstawowym mechanizmem uwalniania wielu leków. Rozpuszczanie i degradacja powodują fizyczny rozpad hydrożelu. Uwalnianie substancji może być zależne m.in. od pH, obecności specyficznych enzymów, pola elektrycznego i magnetycznego oraz enzymów [64].

Uwalnianie zależne od pH

Hydrożele mogą reagować na zmiany siły jonowej, co powoduje objętościowe przejście fazowe (np. pęcznienie prowadzące do uwolnienia leku). Neutralne lub anionowe polimery nie wykazują znaczącej wrażliwości na niskie pH, natomiast kationowy chitozan (jeden z niewielu naturalnych polimerów o ładunku dodatnim) jest na nie wrażliwy, co objawia się jego rozpuszczeniem [65]. Na bioaktywność związku wpływ ma również pH nośnika. Podawane tej samej substancji za pomocą hydrożeli o różnym pH powoduje zmiany strukturalne i agregację transportowanej substancji [66]. Uwięziony w hydrożelu rhBMP-2, może wykazywać różną aktywność osteoindukcyjną nie tylko w zależności od nośnika, ale również pH środowiska. Jak wykazano na podstawie ektopowego tworzenia kości u szczurów, hydrożele są w stanie zwiększać retencję rhBMP-2 w miejscu wstrzyknięcia, co indukowało tworzenie kości. Zaobserwowano tendencję do większego tworzenia kości przy niskim pH w porównaniu do wysokiego pH dla hydrożeli z rhBMP-2. Zmniejszenie bioaktywności rhBMP-2 przy wysokim pH może być związane z agregacją i zmianami konformacyjnymi białka. Przewiduje się, że przesunięcie pH z niższego, w kierunku pH fizjologicznego sprzyja agregacji, a co za tym idzie obniża bioaktywność białka [67]. Wyniki te podkreślają znaczenie doboru hydrożelu o odpowiednim punkcie izoelektrycznym w procesie projektowania optymalnego nośnika dla danego leku w konkretnym środowisku oraz możliwość użycia substancji o różnym pH jako środków powodujących przejście fazowe nośnika, a co za tym idzie, mających wpływ na uwalnianie leków z hydrożelu.

Uwalnianie elektroczułe

Metoda elektroczułego uwalniania jest zewnętrznym sposobem uwalniania leku. Standardowy przebieg reakcji uwalniania obejmuje podskórną implantację biodegradowalnego preparatu hydrożelowo-lekowego. Pole elektryczne stymuluje nośnik leku znajdujący się pod skórą, a w odpowiedzi hydrożel uwalnia lek. Główne mechanizmy uwalniania leku obejmują wyrzucanie roztworu leku podczas rozpuszczenia, dyfuzję, elektroforezę naładowanych leków oraz elektroindukowaną elektroforezą erozję żelu. Uwolnienie leku następuje dopiero po kilku minutach, jedynie wtedy, gdy zastosowane pole elektryczne jest wystarczająco wysokie, by spowodować zmiany w strukturze żelu. Uwalnianie leku jest hamowane, gdy następuje zatrzymanie przepływu prądu.

Dzięki możliwości dostrojenia liczby i czasu trwania impulsów, wysokości pola elektrycznego, a także składu samego nośnika jakim jest hydrożel, metoda ta może być niezwykle precyzyjna [68].

Uwalnianie zależne od enzymów

Proteazy mogą być wykorzystane jako mechanizm wyzwalający w procesie uwalniania związków. Najpopularniejsze systemy oparte są na katalitycznym oddziaływaniu metaloproteinaz macierzy (MMP). Do wrażliwych na MMP substancji zaliczają się m.in żel PEG oraz gąbki kolagenowe. Skuteczności tego typu uwalniania dowiodły badania na szczurach. Syntetyczne matryce hydrożelowe wspomogły gojenie ubytków kostnych o dużych rozmiarach. Gąbki kolagenowe zawierające rhBMP-2, wrażliwe na MMP prowadziły do zwiększenia infiltracji komórek i zintensyfikowanego tworzenia kości. Syntetyczne żele na bazie PEG wymagały degradacji z udziałem MMP do inwazji komórek. Cecha ta może być wykorzystana do precyzyjnego, lokalnego uwalniania rhBMP-2. Zaleta ta znacznie zyskuje na wartości podczas stosowania BMP w regionach podatnych na kostnienie heterotropowe, takie jak stawy [69]. Biodegradowalność syntetycznej matrycy i jej właściwości biofunkcjonalne mogą być regulowane poprzez chemiczną modyfikację sieci hydrożelowej oraz modulację proteaz. Właściwości te wykorzystuje się m.in w celu zwiększenia efektywności dostarczania VEGF w celu kontrolowanej indukcji angiogenezy [70].

4. DYSKUSJA

Szeroki zakres struktur molekularnych, zróżnicowane właściwości mechaniczne, możliwości modyfikacji poziomu usieciowania, porowatości, okresu półtrwania, relaksacji naprężeń itp czynią z hydrożeli atrakcyjny materiał do projektowania zaawansowanych rusztowań pozwalających na sterowanie naprawą tkanek, funkcjonalną inżynierię tkankową oraz na kontrolowane dostarczanie leków. Istnieje szereg możliwości dopasowania sposobu transportu i uwalniania substancji czynnych z hydrożelu. Umożliwia to efektywne i precyzyjne uwalnianie leku w pobliżu miejsca docelowego, zapobiegając toksyczności ogólnoustrojowej.

Nadal istnieje szereg wyzwań, z którymi trzeba się zmierzyć. Większość konwencjonalnych metod stosowanych do wytwarzania porowatych rusztowań zazwyczaj nie pozwala na dostosowanie porowatości lub wielkości porów po utworzeniu rusztowania do potrzeb pacjenta. Użycie rusztowań, które

nie ulegają wystarczająco szybkiej degradacji, skutkuje ograniczoną migracją i proliferacją komórek oraz niedoborem składników odżywczych i tlenu w rozwijającej się tkance. Z drugiej strony, rusztowanie, które ulega degradacji zbyt szybko, może zagrozić mechanicznej i strukturalnej integralności implantu, zanim tkanka będzie wystarczająco dobrze rozwinięta. W obu przypadkach regeneracja tkanki jest zahamowana z powodu niedopasowania między tempem wzrostu tkanki i degeneracją rusztowania. Opracowanie technologii "inteligentnych", przestrajalnych rusztowań, które mogą zapewnić bardzo różne tempo regeneracji różnych tkanek ze względu na indywidualne różnice w wieku, stosowanej diecie, szybkości gojenia i czynników związanych ze stylem życia wydaje się więc być niezbędne. Takie rusztowania z możliwością postfabrykacji są konieczne, aby zapewnić odpowiednie mikrośrodowisko dla tych dynamicznych zmian, na przykład migracji i różnicowania komórek. Precyzyjny dobór materiałów, z których wykonane są rusztowania, ich geometria, wielkość porów, długość okresu półtrwania oraz zwiększenie stabilności enkapsulowanych związków tak, aby umożliwić ich uwalnianie przez dłuższy, pożądany czas będzie odgrywało kluczową rolę w przyszłości rusztowań kostnych.

Przyszłe badania powinny być ukierunkowane na lepsze odwzorowanie naturalnych procesów regeneracji tkanki kostnej, takich jak sprzężenie pomiędzy angiogenezą i osteogenezą, co może wymagać rekrutacji i różnicowania komórek progenitorowych. Ostatnie odkrycia naukowe i technologiczne wskazują na możliwość uzyskania rusztowań kostnych, które intensywniej wspierałyby lokalne i ogólnoustrojowe funkcje biologiczne, co jest niezbędne dla uzyskania pożądanych efektów terapeutycznych w regeneracji kości.

REFERENCJE

1. Kryst Leszek. *Chirurgia szczękowo-twarzowa*. Warszawa, Polska: Wydawnictwo Lekarskie PZWL; 2012:518-519
2. Bal Jerzy. *Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej*. Warszawa, Polska: Wydawnictwo Naukowe PWN; 2011:74-75
3. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Crit Rev Biomed Eng*. 2012;40(5):2-3. doi:10.1615/critrevbiomedeng.v40.i5.10

4. Ahlmann E, Patzakis M, Roidis N, Shepherd L, Holtom P. Comparison of anterior and posterior iliac crest bone grafts in terms of harvest-site morbidity and functional outcomes. *J Bone Joint Surg [Am]* 2002;84(5):716-720. doi:10.2106/00004623-200205000-00003
5. Delloye C, Cornu O, Druez V, Barbier O. Bone allografts: What they can offer and what they cannot. *J Bone Joint Surg Br.* 2007;89-B(5):574-580. doi:10.1302/0301620X.89B5.19039
6. Kim S, Bruyas A, Pan C-C, Stahl AM, Yang Y. Vascularized Tissue Regenerative Engineering Using 3D Bioprinting Technology. W: *Encyclopedia of Biomedical Engineering*. Elsevier; 2019:696-706. doi:10.1016/b978-0-12-801238-3.99902-1
7. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Crit Rev Biomed Eng.* 2012;40(5):2-3. doi:10.1615/critrevbiomedeng.v40.i5.10
8. Young S, Wong M, Tabata Y, Mikos A. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. *Journal of Controlled Release.* 2005;109(1-3):256-274. doi:10.1016/j.jconrel.2005.09.023
9. Laska Anna. *Biomateriały stosowane w inżynierii tkankowej do regeneracji tkanek*. Kraków, Polska: Zeszyty Naukowe Towarzystwa Doktorantów UJ; 2017:189-190
10. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Crit Rev Biomed Eng.* 2012;40(5):2-3. doi:10.1615/critrevbiomedeng.v40.i5.10
11. Malafaya PB, Silva GA, Reis RL. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Adv Drug Del Rev.* 2007;59(4-5):207-233. doi:10.1016/j.addr.2007.03.012
12. Lynn AK, Yannas IV, Bonfield W. Antigenicity and immunogenicity of collagen. *J Biomed Mater Res.* 2004;71B(2):343-354. doi:10.1002/jbm.b.30096
13. Cremer MA, Rosloniec EF, Kang AH. The cartilage collagens: a review of their structure, organization, and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease. *Journal of Molecular Medicine.* 1998;76(3-4):275-288. doi:10.1007/s001090050217

14. Baroli B. From natural bone grafts to tissue engineering therapeutics: Brainstorming on pharmaceutical formulative requirements and challenges. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009;98(4):1317-1375. doi:10.1002/jps.21528
15. Khan F, Tare RS, Oreffo Richard OC, Bradley M. Versatile Biocompatible Polymer Hydrogels: Scaffolds for Cell Growth. *Angew Chem Int Ed*. 2009;48(5):978-982. doi:10.1002/anie.200804096
16. Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012;64:18-23. doi:10.1016/j.addr.2012.09.010
17. Hennink WE, van Nostrum CF. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002;54(1):13-36. doi:10.1016/s0169-409x(01)00240-x
18. Bhattarai N, Gunn J, Zhang M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010;62(1):83-99. doi:10.1016/j.addr.2009.07.019
19. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Crit Rev Biomed Eng*. 2012;40(5):2-3. doi:10.1615/critrevbiomedeng.v40.i5.10
20. Misra, A., Jogani, V., Jinturkar, K. and Vyas, T., 2008. Recent Patents Review on Intranasal Administration for CNS Drug Delivery. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 2(1), pp.25-40.
21. Goldberg M, Langer R, Jia X. Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2007;18(3):241-268. doi:10.1163/156856207779996931
22. Semino C. Self-assembling Peptides: From Bio-inspired Materials to Bone Regeneration. *J Dent Res*. 2008;87(7):606-616. doi:10.1177/154405910808700710
23. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Crit Rev Biomed Eng*. 2012;40(5):2-3. doi:10.1615/critrevbiomedeng.v40.i5.10
24. Gong T, Xie J, Liao J, Zhang T, Lin S, Lin Y. Nanomaterials and bone regeneration. *Bone Research*. 2015;3(1). doi:10.1038/boneres.2015.29

25. Ifuku S, Saimoto H. Chitin nanofibers: preparations, modifications, and applications. *Nanoscale*. 2012;4(11):3308-3318. doi:10.1039/c2nr30383c
26. Baroli B. From natural bone grafts to tissue engineering therapeutics: Brainstorming on pharmaceutical formulative requirements and challenges. *J Pharm Sci*. 2009;98(4):1317-1375. doi:10.1002/jps.21528
27. Butler DL, Goldstein SA, Guilak F. Functional Tissue Engineering: The Role of Biomechanics. *Journal of Biomechanical Engineering*. 2000;122(6):570-575. doi:10.1115/1.1318906
28. Murdan S. Electro-responsive drug delivery from hydrogels. *Journal of Controlled Release*. 2003;92(1-2):1-17. doi:10.1016/s0168-3659(03)00303-1
29. Young S, Wong M, Tabata Y, Mikos A. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. *Journal of Controlled Release*. 2005;109(1-3):256-274. doi:10.1016/j.jconrel.2005.09.023
30. Zeltinger J, Sherwood J, Graham D, Müller R, Griffith L. Effect of Pore Size and Void Fraction on Cellular Adhesion, Proliferation, and Matrix Deposition. *Tissue Eng*. 2001;7(5):557-572. doi:10.1089/107632701753213183
31. KARAGEORGIOU V, KAPLAN D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 2005;26(27):5474-5491. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.02.002
32. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Crit Rev Biomed Eng*. 2012;40(5):2-3. doi:10.1615/critrevbiomedeng.v40.i5.10
33. Zignani M. Improved biocompatibility of a viscous bioerodible poly(ortho ester) by controlling the environmental pH during degradation. *Biomaterials*. 2000;21(17):1773-1778. doi:10.1016/s0142-9612(00)00065-x
34. Young S, Wong M, Tabata Y, Mikos A. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. *Journal of Controlled Release*. 2005;109(1-3):256-274. doi:10.1016/j.jconrel.2005.09.023
35. Chaudhuri O, Gu L, Klumpers D et al. Hydrogels with tunable stress relaxation regulate stem cell fate and activity. *Nat Mater*. 2015;15(3):326-334. doi:10.1038/nmat4489

36. Discher D. Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate. *Science* (1979). 2005;310(5751):1139-1143. doi:10.1126/science.1116995
37. Legant W, Miller J, Blakely B, Cohen D, Genin G, Chen C. Measurement of mechanical tractions exerted by cells in three-dimensional matrices. *Nat Methods*. 2010;7(12):969-971. doi:10.1038/nmeth.1531
38. Kong H, Liu J, Riddle K, Matsumoto T, Leach K, Mooney D. Non-viral gene delivery regulated by stiffness of cell adhesion substrates. *Nat Mater*. 2005;4(6):460-464. doi:10.1038/nmat1392
39. Cameron A, Frith J, Cooper-White J. The influence of substrate creep on mesenchymal stem cell behaviour and phenotype. *Biomaterials*. 2011;32(26):5979-5993. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.04.003
40. Cameron A, Frith J, Gomez G, Yap A, Cooper-White J. The effect of time-dependent deformation of viscoelastic hydrogels on myogenic induction and Rac1 activity in mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2014;35(6):1857-1868. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.11.023
41. Iwanaga K, Yabuta T, Kakemi M, Morimoto K, Tabata Y, Ikada Y. Usefulness of microspheres composed of gelatin with various cross-linking density. *J Microencapsul*. 2003;20(6):767-776. doi:10.3109/02652040309178087
42. Tabata Y, Nagano A, Ikada Y. Biodegradation of Hydrogel Carrier Incorporating Fibroblast Growth Factor. *Tissue Eng*. 1999;5(2):127-138. doi:10.1089/ten.1999.5.127
43. Bhattarai N, Gunn J, Zhang M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010;62(1):83-99. doi:10.1016/j.addr.2009.07.019
44. Elçin Y, Dixit V, Gitnick G. Controlled Release of Endothelial Cell Growth Factor from Chitosan-Albumin Microspheres for Localized Angiogenesis: In Vitro and in Vivo Studies. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*. 1996;24(3):257-271. doi:10.3109/10731199609117438
45. Lee K, Silva E, Mooney D. Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. *Journal of The Royal Society Interface*. 2010;8(55):153-170. doi:10.1098/rsif.2010.0223

46. Bhattarai N, Gunn J, Zhang M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62(1):83-99. doi:10.1016/j.addr.2009.07.019
47. Orive G, Hernández R, Gascón A et al. Cell encapsulation: Promise and progress. *Nat Med.* 2003;9(1):104-107. doi:10.1038/nm0103-104
48. Diaspro A, Silvano D, Krol S, Cavalleri O, Gliozzi A. Single Living Cell Encapsulation in Nano-organized Polyelectrolyte Shells. *Langmuir.* 2002;18(13):5047-5050. doi:10.1021/la025646e
49. de Vos P, Marchetti P. Encapsulation of pancreatic islets for transplantation in diabetes: the untouchable islets. *Trends in Molecular Medicine.* 2002;8(8):363-366. doi:10.1016/s1471-4914(02)02381-x
50. de Vos P, Marchetti P. Encapsulation of pancreatic islets for transplantation in diabetes: the untouchable islets. *Trends Mol Med.* 2002;8(8):363-366. doi:10.1016/s1471-4914(02)02381-x
51. Young S, Wong M, Tabata Y, Mikos A. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. *Journal of Controlled Release.* 2005;109(1-3):256-274. doi:10.1016/j.jconrel.2005.09.023
52. Huang X, Brazel C. Analysis of burst release of proxiphylline from poly(vinyl alcohol) hydrogels. *Chem Eng Commun.* 2003;190(4):519-532. doi:10.1080/00986440302081
53. Jeong B, Bae Y, Kim S. Drug release from biodegradable injectable thermosensitive hydrogel of PEG-PLGA-PEG triblock copolymers. *Journal of Controlled Release.* 2000;63(1-2):155-163. doi:10.1016/s0168-3659(99)00194-7
54. Lee K, Silva E, Mooney D. Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. *Journal of The Royal Society Interface.* 2010;8(55):153-170. doi:10.1098/rsif.2010.0223
55. Holland T, Tessmar J, Tabata Y, Mikos A. Transforming growth factor- β 1 release from oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogels in conditions that model the cartilage wound healing environment. *Journal of Controlled Release.* 2004;94(1):101-114. doi:10.1016/j.jconrel.2003.09.007
56. Desai M, Labhasetwar V, Amidon G, Levy R. Journal search results - Cite This For Me. *Pharm Res.* 1996;13(12):1838-1845. doi:10.1023/a:1016085108889

57. Daly A, Riley L, Segura T, Burdick J. Hydrogel microparticles for biomedical applications. *Nature Reviews Materials*. 2019;5(1):20-43. doi:10.1038/s41578-019-0148-6
58. Desai M, Labhasetwar V, Amidon G, Levy R. Journal search results - Cite This For Me. *Pharm Res*. 1996;13(12):1838-1845. doi:10.1023/a:1016085108889
59. Baroli B. From natural bone grafts to tissue engineering therapeutics: Brainstorming on pharmaceutical formulative requirements and challenges. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009;98(4):1317-1375. doi:10.1002/jps.21528
60. Bulbake U, Doppalapudi S, Kommineni N, Khan W. Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review. *Pharmaceutics*. 2017;9(4):12. doi:10.3390/pharmaceutics9020012
61. Yang S, Zhu B, Yin P et al. Integration of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells-Derived Exosomes with Hydroxyapatite-Embedded Hyaluronic Acid-Alginate Hydrogel for Bone Regeneration. *ACS Biomater Sci Eng*. 2020;6(3):1590-1602. doi:10.1021/acsbiomaterials.9b01363
62. Hoare T, Kohane D. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer (Guildf)*. 2008;49(8):1993-2007. doi:10.1016/j.polymer.2008.01.027
63. Karageorgiou V, Meinel L, Hofmann S, Malhotra A, Volloch V, Kaplan D. Bone morphogenetic protein-2 decorated silk fibroin films induce osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Biomed Mater Res*. 2004;71A(3):528-537. doi:10.1002/jbm.a.30186
64. Bhattarai N, Gunn J, Zhang M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010;62(1):83-99. doi:10.1016/j.addr.2009.07.019
65. Lee K, Silva E, Mooney D. Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. *Journal of The Royal Society Interface*. 2010;8(55):153-170. doi:10.1098/rsif.2010.0223
66. Luca L, Rougemont A, Walpoth B, Gurny R, Jordan O. The effects of carrier nature and pH on rhBMP-2-induced ectopic bone formation. *Journal of Controlled Release*. 2010;147(1):38-45. doi:10.1016/j.jconrel.2010.06.011

67. Luca L, Rougemont A, Walpoth B, Gurny R, Jordan O. The effects of carrier nature and pH on rhBMP-2-induced ectopic bone formation. *Journal of Controlled Release*. 2010;147(1):36-50. doi:10.1016/j.jconrel.2010.06.011
68. Murdan S. Electro-responsive drug delivery from hydrogels. *Journal of Controlled Release*. 2003;92(1-2):1-17. doi:10.1016/s0168-3659(03)00303-1
69. Lutolf M, Weber F, Schmoekel H et al. Repair of bone defects using synthetic mimetics of collagenous extracellular matrices. *Nat Biotechnol*. 2003;21(5):513-518. doi:10.1038/nbt818
70. Zisch A, Lutolf M, Ehrbar M et al. Cell-demanded release of VEGF from synthetic, biointeractive cell-ingrowth matrices for vascularized tissue growth. *The FASEB Journal*. 2003;17(15):2260-2262. doi:10.1096/fj.02-1041fe

DIAGNOSTYKA HISTOLOGICZNA I MOLEKULARNA NAGŁEJ ŚMIERCI SERCOWEJ W PRAKTYCE SĄDOWO-LEKARSKIEJ¹

Piotr Lewandowski^{1,2}, Tomasz Furgo¹, Oliwia Warmusz¹

1. Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze Histologii i Patologii Komórki,
Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

2. Śląski Park Technologii Medycznych Kardio-Med Silesia sp. z o.o., Zabrze

Abstrakt:

Nagłe zgony sercowe (NZS) stanowią jedną z głównych przyczyn nagłej śmierci spowodowanej chorobami układu krążenia. Dominującą przyczyną NZS są zaburzenia rytmu i przewodnictwa, natomiast podłożem tych zaburzeń jest zwykle ostre niedokrwienie mięśnia sercowego w przebiegu choroby niedokrwiennej serca. Brak jednoznacznych, morfologicznych wykładników NZS stanowi poważne wyzwanie dla diagnostyki mikroskopowej w praktyce sądowo-lekarskiej. Celem pracy było omówienie dotychczasowych wyników badań w zakresie diagnostyki immunohistochemicznej i molekularnej autopsyjnych wycinków mięśnia sercowego w przebiegu NZS.

Słowa kluczowe: nagły zgon sercowy, immunohistochemia, wycinki autopsyjne, diagnostyka medyczno-sądowa

Abstract:

Sudden cardiac death (SCD) is one of the main causes of an unexpected death due to cardiovascular pathology. The dominant reason of SCD is rhythm and conduction disturbances, but the ground of these pathologies is mostly acute myocardial ischemia in course of ischemic heart disease. Lack of unambiguous, morphological exponents of SCD poses a serious challenge for microscopic diagnostics in forensic-medical practice. The aim of this review is to discuss results of existing studies in a field of immunohistochemical and molecular diagnostics of autopsy myocardial sections in SCD.

Keywords: sudden cardiac death, immunohistochemistry, autopsy, diagnostics, post mortem study

¹ Badania sfinansowano ze środków Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w związku realizacją projektu „Badania nad przydatnością oznaczeń immunohistochemicznych w diagnostyce sądowo-lekarskiej zgonów nagłych”; nr umowy KNW-1-185/K/5/0.

1. WSTĘP

Definicja nagłego zgonu sercowego (NZS) obejmuje nagły zgon z przyczyn sercowych pojawiający się w czasie krótszym niż jedna godzina od początku objawów u osób, u których nie występowały letalne schorzenia pozasercowe [1]. Wśród najczęstszych przyczyn NZS wymienia się obecność przewlekłej choroby niedokrwiennej serca, niewydolność serca oraz wrodzone zaburzenia funkcji kanałów jonowych predysponujące do występowania letalnych zaburzeń rytmu serca [2]. W prospektywnym badaniu Bowkera i wsp., obejmującego przypadki NZS u osób w przedziale wieku 16-64 lata bez udokumentowanej klinicznej choroby wieńcowej stwierdzono obecność choroby niedokrwiennej u 86% [3]. Brak wykładników morfologicznych NZS w rutynowym badaniu histologicznym stanowi impuls do zastosowania innych metod diagnostyczno-badawczych w tym immunohistochemicznych oraz molekularnych dla celów pośmiertnego badania sądowo-lekarskiego [4]. Celem pracy było omówienie rezultatów dotychczasowych badań obejmujących diagnostykę immunohistochemiczną i molekularną autopsyjnych wycinków mięśnia sercowego w przebiegu NZS.

2. NAGŁA ŚMIERĆ SERCOWA O PODŁOŻU HIPOKSYJNYM

Hipoksja to stan, gdy dochodzi do deficytu tlenu w komórkach. W przebiegu hipoksji dochodzi do zaburzeń funkcji kardiomiocytów (m.in. generowania arytmii wskutek nieskoordynowanej depolaryzacji), a w dalszej kolejności do ich martwicy. Główną przyczyną hipoksji jest choroba niedokrwiennej sercowego. Stanowi ona dominującą przyczynę NZS (nawet 70% przypadków). Do rzadszych przyczyn NZS o podłożu hipoksyjnym należą schorzenia prowadzące do niewydolności serca: choroba nadciśnieniowa, kardiomiopatia przerostowa czy patologie zastawkowe serca.

3. OSTRY ZAWAŁ MIĘŚNIA SERCOWEGO

Zgodnie z aktualnymi wytycznymi EHA (*European Heart Association*) terminem ostry zawał serca (OZS) definiujemy każde uszkodzenie komórek miokardium spowodowane przedłużającym się niedotlenieniem. Aktualne wytyczne ponadto dzielą ostre zawały serca na 5 typów różnych od mechanizmów i etiologii:

- Typ 1 – spowodowany zmianami miażdżycowymi lub skrzepem powodującymi krytyczne zmniejszenie dopływu krwi;
- Typ 2 – spowodowany uszkodzeniem wynikającym z deficytu tlenu, ale spowodowanego przez inne przyczyny niż miażdżycy;
- Typ 3 – nagła śmierć sercowa z objawami sugerującymi zawał (ból w klatce piersiowej, zmiany w EKG), ale bez dowodów uszkodzenia mięśnia (wzrost cTNT);
- Typ 4 i 5 – zawały wynikające z procedur z zakresu kardiologii inwazyjnej [5].

Diagnostyka sądowo-lekarska zgonu w mechanizmie ostrego zawału serca obejmując przede wszystkim zebranie wszystkich danych klinicznych takich jak obecność bólu stenokardialnego, zmiany w EKG oraz wzrost enzymów uszkodzenia serca a także środowiskowych pozwalających na ustalenie rozpoznania. W przypadku śmierci poza placówkami ochrony zdrowia nieodzowny staje się wywiad środowiskowy oraz zeznania świadków, co do okoliczności zgonu [6].

Klasyczna diagnostyka mikroskopowa OZS obejmuje badanie skrawków barwionych z wykorzystaniem hematoksyliny i eozyliny. W wybarwionym preparacie poszukuje się falujących włókien mięśniowych, hipereozynofili, zmian w obrazie jąder komórkowych. Poszczególne zmiany cytologiczne w trakcie postępowania MI są dobrze opisane w literaturze [6, 7]. Wspomagającą metodą histochemiczną stosowaną w części ośrodków w diagnostyce OZS jest metoda Nielsena i Selye'ego polegająca na wykrywaniu fuksynochłonności włókien mięśniowych. Dotychczasowe wyniki badań wskazują, że jest to metoda mało specyficzna, nie pozwalająca na jednoznaczna interpretacje ostrego uszkodzenia mięśnia sercowego w przebiegu OZS [4]. Niestety pierwsze zmiany histologiczne pod postacią segmentarnej hipereozynofilii, ogniskowej martwicy oraz krwinkotoków a także nacieków neutrofilowych w śródmiąszu można zaobserwować w mikroskopie świetlnym dopiero w okresie 4-12 godzin od początku ostrego niedokrwienia [6, 7]. Tym samym klasyczne badanie histologiczne nie pozwala zwykle wskazanie na OZS jako przyczyny NZS.

Wykorzystanie metod immunohistochemicznych (IHC) do diagnostyki OZS opiera się na ocenie markerów, których ekspresja wzrasta we wczesnej fazie OZS. Należą do nich: (1) fibronektyna (białko występujące w surowicy); (2) terminalny kompleks układu dopełniacza C5C9; (3) kompleks troponin (białka strukturalne serca). Barranco i Ventura, na podstawie przeprowadzonego przeglądu systematycznego literatury zalecają uwzględnienie w analizie wy-cinków minimum 3 markerów zawałów, by uniknąć zafałszowania wyników [8]. Ci sami autorzy podkreślają, że metody IHC pozwalają zwiększyć czułość

detekcji OZS, jednak metoda nie jest pozbawiona możliwości uzyskania wyników zarówno fałszywie dodatnich, jak i fałszywie ujemnych. Przydatność odczynów IHC w diagnostyce post-mortem potwierdzają badania Rzepeckiej-Woźniak [4]. Autorka potwierdziła, że stosowanie barwienia anty-C9 dopełniacza pozwala z większą czułością wykryć OZS w porównaniu z klasycznymi metodami histologicznymi. Ahmed-Amin i wsp. [9], potwierdzili, że barwienie IHC w kierunku cTnT, mioglobiny czy kaspazy-3 stanowi metodę pozwalającą wykryć OZS nawet bez występowania śladów w klasycznym badaniu histopatologicznym.

Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM) jest narzędziem pozwalającym wykryć ślady zawału już w pierwszych minutach po jego wystąpieniu. W toku analizy metodą TEM poszukujemy obrzęku mitochondriów czy uszkodzeń w obrębie sarkolemy [10]. Metoda niestety wymaga właściwego zabezpieczenia próbki do badań bezpośrednio po śmierci, gdyż inaczej zmiany nekrotyczne szybko zafałszują wynik. TEM ma ograniczone zastosowanie kliniczne, jednak w szczególnych przypadkach może pomóc potwierdzić lub wykluczyć zawał.

4. KARDIOMIOPATIA PRZEROSTOWA

Kardiomiopatia przerostowa jest chorobą, w której dochodzi do przerostu mięśnia sercowego obejmującego najczęściej lewą komorę serca. Przyczyną kardiomiopatii przerostowej są najczęściej dziedziczne mutacje w obrębie białek strukturalnych kardiomiocytów, rzadziej natomiast choroby metaboliczne [11]. Szacuje się, że kumulatywne 5-letnie ryzyko NZS u dzieci w przebiegu kardiomiopatii przerostowej wynosi 9,1% [12]. Badania autopsyjne serca pozwoliły na wykazanie zmian w naczyniach wieńcowych < 300µm średnicy u około 80% przypadków autopsyjnych pod postacią pogrubienia warstwy wewnętrznej oraz środkowej [13]. Przy różnicowaniu z innymi jednostkami chorobowymi przebiegającymi z przerostem serca pomocne są badania genetyczne potwierdzające występowanie mutacji genowych obecnych w tym schorzeniu. Brak jest jednak jednoznacznych wytycznych, co do zakresu testów molekularnych, jednak standardowo wykonuje się sekwencjonowanie 5-10 genów obejmujących: MYH7, MYBPC3, TNNT2, TNNT2, MYL2, TPM1, TNNT2, MYL2, MYL3, ACTC, CSRP3, and TCAP [14]. Ostateczne stwierdzenie NZS w przebiegu kardiomiopatii przerostowej musi obejmować całość obrazu klinicznego, wyniki badań dodatkowych w tym ww. diagnostyki molekularnej [15, 16].

5. NAGŁA ŚMIERĆ SERCOWA O PODŁOŻU ZAPALNYM

Zapalenie mięśnia sercowego (ZMS) jest chorobą, w której dochodzi do uszkodzenia komórek miokardium na skutek infekcji, działania substancji toksycznych a także reakcji autoimmunologicznych. Najczęstszą przyczyną ZMS w krajach rozwiniętych są wirusowe infekcje wsierdzia, w szczególności związane z enterowirusami (w tym Coxsackie) i wirusami grypy. Trwające ZMS może z czasem przekształcić się w przewlekłe ZMS prowadzące ostatecznie do rozwinięcia się kardiomiopatii rozstrzeniowej (DCM, *Dilated Cardiomyopathy*) [17]. Nagły zgon sercowy w przebiegu ZMS w jednym badaniu wystąpił u 5% przypadków [18].

Nadal „złotym standardem” potwierdzającym obecność ZMS jest diagnostyka histologiczna biopsatów mięśnia sercowego. Podstawową rozpoznania ZMS wg aktualnych zaleceń towarzystw kardiologicznych są obecnie metody immunohistochemiczne. Aby potwierdzić obecność ZMS należy w wycinkach serca wykazać [19]:

- Obecność nacieków limfocytarnych składających się z komórek CD3 i/lub leukocytarnych z komórek CD68 w ilości ≥ 14 komórek w 1mm²
- Obecność wzrostu ekspresji antygenów układu HLA klasy II (DR)
- Obecność cech uszkodzania kardiomiocytów

Wśród szeregu klasyfikacji ZMS opierających się na diagnostyce immunohistologicznej wycinków mięśnia sercowego na podkreślenie zasługuje Klasyfikacja ZABRZE, obejmująca ocenę nacieków z komórek zapalnych, obecności ogniskowej martwicy kardiomiocytów oraz wzrostu ekspresji obu klas układu HLA [20]. Istotną częścią morfologicznej diagnostyki MCI jest wykazanie obecności wirusów w mięśniu sercowym metodą RT-PCR (*real time polymerase chain reaction*) [21]. Niestety na chwilę obecną nie są dostępne żadne gotowe panele do detekcji wirusów w wycinkach sercach, a stosowane metody zwykle opierają się na sekwencjach sond i starterów do zastosowań naukowych. Dla metody RT-PCR nie dysponujemy również kryteriami interpretacji ilościowej poziomu wirerii dla istotności klinicznej uzyskanego wyniku. Wskazane ograniczenia ograniczają rutynowe stosowanie RT-PCR do diagnostyki ZMS. Innymi metodami służącymi do detekcji wirusów w tkankach serca są: (1) hybrydyzacja *in-situ* FISH/CISH; (2) mikroskopia elektronowa oraz (3) hodowla wirusa z próbek serca [22]. W przypadku podejrzenia ZMS o etiologii bakteryjnej czy grzybowej kluczowym badaniem uzupełniającym będzie posiew fragmentu serca oraz badania serologiczne z surowicy.

6. NAGŁA ŚMIERĆ SERCOWA O PODŁOŻU GENETYCZNYM

Po wykluczeniu NZS w następstwie ww. schorzeń w diagnostyce różnicowej szczególnie w młodym wieku należy wziąć pod uwagę obecność zaburzeń genetycznych mogących predysponować do wystąpienia NZS. Do najczęstszych zaburzeń o podłożu genetycznym należą kanałopatie, a w szczególności zespół długiego QT, choroba Brugadów czy katecholaminergicznej polimorficznej tachykardii komorowej [23]. Niestety, kanałopatie nie dają uchwytnych zmian pozwalających na rozpoznanie mikroskopowe. Zgodnie z aktualnymi wytycznymi APHRS (*Asia Pacific Heart Rhythm Society*) kluczowe znaczenie ma wywiad rodzinny z uwzględnieniem występowania chorób genetycznych do minimum 3 pokoleń wstecz. Ponadto podczas każdej sekcji obowiązkowo powinno zabezpieczyć się próbkę pod kątem badań genetycznych (krew pobrana do probówki z EDTA, zamrożona próbka serca lub zamrożona próbka trzustki/wątroby/grasicy; zamrożone próbki należy przechowywać w temp. -20°C lub -80°C ; jeśli jest dostępny bufor utrwalający np. RNAlater dopuszcza się przechowywanie zabezpieczonej w nim tkanki w temp. pokojowej). Testy genetyczne zaleca się wykonywać u chorych z fenotypem wskazującym występowanie NZS o podłożu genetyczny oraz u chorych nie udało się ustalić przyczyny zgonu. Aktualne wytyczne nie wskazują zalecanego zakresu testów molekularnych. Przeprowadzone testy powinny obejmować choroby bezpośrednią związaną relacją przyczynowo skutkową z wystąpieniem NZS [24]. Warto zwrócić uwagę, że nieco starsze, lecz bardziej szczegółowe wytyczne kanadyjskie (*Canadian Cardiovascular Society / Canadian Heart Rhythm Society*) przewidują nieco inne kryteria i zasady przeprowadzania testów genetycznych [25]. Opracowania innych organizacji i autorów są w znacznej mierze tożsame, potrafią się jednak różnić w szczególności co do zakresu wykonywanych testów [26-30]. W wypadku wykrycia NZS o podłożu genetycznym zaleca się przeprowadzenie badań genetycznych u krewnych [24]. Metodą do diagnostyki mutacji jest z wyboru sekwencjonowanie metodą Sangera lub metodami sekwencjonowania nowej generacji (NGS).

Wśród dostępnych paneli diagnostycznych z pewnością na uwagę zasługuje stosowany przez Mayo Clinic PMARP (*Postmortem arrhythmia Panel*) obejmujących 20 genów związanych z wystąpieniem Choroby Brugadów i zespołu długiego QT [31]. Zdaniem autorów wskazany zestaw jest dobrym punktem wyjścia w razie konieczności wykonywania testów w kierunku NZS o podłożu genetycznym.

7. PODSUMOWANIE

Nagły zgon sercowy stanowi duże wyzwanie dla diagnostyki mikroskopowej w praktyce sądowo-lekarskiej. Podstawą rozpoznania NZS stanowi przede wszystkim szczegółowa analiza wszystkich dostępnych danych klinicznych oraz wywiadu środowiskowego. Zastosowanie dodatkowych metod diagnostycznych takich jak metody immunohistochemiczne, elektronmikroskopowe oraz techniki biologii molekularnej pozwala na uzyskanie dodatkowych danych. U części przypadków metody te pozwalają na ostateczne ustalenie przyczyny NZS. Niestety, brak opracowania szeroko akceptowanych protokołów oraz kryteriów diagnostycznych ogranicza ich zastosowanie w rutynowej diagnostyce medyczno-sądowej.

BIBLIOGRAFIA

1. Wannamethee G, Shaper AG, Macfarlane PW, Walker M. Risk factors for sudden cardiac death in middle-aged British men. *Circulation*. Mar 15 1995;91(6):1749-56. doi:10.1161/01.cir.91.6.1749
2. Antezano ES, Hong M. Sudden Cardiac Death. *Journal of Intensive Care Medicine*. 2003;18(6):313-329. doi:10.1177/0885066603258140
3. Bowker TJ, Wood DA, Davies MJ, et al. Sudden, unexpected cardiac or unexplained death in England: a national survey. *QJM: An International Journal of Medicine*. 2003;96(4):269-279. doi:10.1093/qjmed/hcg038
4. Rzepecka-Woźnika E. Diagnostyka immunohistochemiczna wczesnego zawału mięśnia sercowego dla celów pośmiertnego badania sądowo-lekarskiego. *Arch Med Sąd Krym*. 2008;LVIII:5-16.
5. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *European Heart Journal*. 2019;40(3):237-269. doi:10.1093/eurheartj/ehy462
6. Michaud K, Basso C, d'Amati G, et al. Diagnosis of myocardial infarction at autopsy: AECVP reappraisal in the light of the current clinical classification. *Virchows Archiv*. 2020/02/01 2020;476(2):179-194. doi:10.1007/s00428-019-02662-1

7. Ghafoor M, Kamal M, Nadeem U, Husain AN. Educational Case: Myocardial Infarction: Histopathology and Timing of Changes. *Acad Pathol.* 2020;7:2374289520976639-2374289520976639. doi:10.1177/2374289520976639
8. Barranco R, Ventura F. Immunohistochemistry in the Detection of Early Myocardial Infarction: Systematic Review and Analysis of Limitations Because of Autolysis and Putrefaction. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology.* 2020;28(2)
9. Amin HAA, El-Hennawy AMY, Nakhla GAA, Tabak SA-H, Hassan HH. Immuno-histochemistry in the detection of early myocardial infarction (a post-mortem study). *Egyptian Journal of Forensic Sciences.* 2011/03/01/ 2011;1(1):5-12. doi:https://doi.org/10.1016/j.ejfs.2011.04.003
10. Collins HE, Kane MS, Litovsky SH, et al. Mitochondrial Morphology and Mitophagy in Heart Diseases: Qualitative and Quantitative Analyses Using Transmission Electron Microscopy. Review. *Frontiers in Aging.* 2021-May-06 2021;2(9)doi:10.3389/fragi.2021.670267
11. Makavos G, Kairis C, Tselegkidi M-E, et al. Hypertrophic cardiomyopathy: an updated review on diagnosis, prognosis, and treatment. *Heart Failure Reviews.* 2019/07/01 2019;24(4):439-459. doi:10.1007/s10741-019-09775-4
12. Miron A, Lafreniere-Roula M, Steve Fan C-P, et al. A Validated Model for Sudden Cardiac Death Risk Prediction in Pediatric Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation.* 2020/07/21 2020;142(3):217-229. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047235
13. Maron BJ, Wolfson JK, Epstein SE, Roberts WC. Morphologic evidence for "small vessel disease" in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Z Kardiol.* 1987;76 Suppl 3:91-100.
14. Roma-Rodrigues C, Fernandes AR. Genetics of hypertrophic cardiomyopathy: advances and pitfalls in molecular diagnosis and therapy. *Appl Clin Genet.* 2014;7:195-208. doi:10.2147/TACG.S49126
15. Tejado BSM, Jou C. Histopathology in HCM. *Glob Cardiol Sci Pract.* 2018;2018(3):20-20. doi:10.21542/gcsp.2018.20

16. Singravel S, Veideswar P. Heart. Cardiomyopathy. Hypertrophic Cardiomyopathy. Accessed 15.10.2021, <https://www.pathologyoutlines.com/topic/heartHCM.html>
17. Tschöpe C, Ammirati E, Bozkurt B, et al. Myocarditis and inflammatory cardiomyopathy: current evidence and future directions. *Nature Reviews Cardiology*. 2021/03/01 2021;18(3):169-193. doi:10.1038/s41569-020-00435-x
18. Fabre A, Sheppard MN. Sudden adult death syndrome and other non-ischaemic causes of sudden cardiac death. *Heart*. Mar 2006;92(3):316-20. doi:10.1136/hrt.2004.045518
19. Baccouche H, Mahrholdt H, Meinhardt G, et al. Diagnostic synergy of non-invasive cardiovascular magnetic resonance and invasive endomyocardial biopsy in troponin-positive patients without coronary artery disease. *Eur Heart J*. Dec 2009;30(23):2869-79. doi:10.1093/eurheartj/ehp328
20. Wojnicz R. Zapalenie mięśnia sercowego. <https://podyplomie.pl/wiedza/wielka-interna/1012,zapalenie-miesnia-sercowego#>
21. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: Developed by the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) With the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European Heart Journal*. 2021;doi:10.1093/eurheartj/ehab368
22. Dennert R, Crijns HJ, Heymans S. Acute viral myocarditis. *European heart journal*. 2008;29(17):2073-2082. doi:10.1093/eurheartj/ehn296
23. Magi S, Lariccia V, Maiolino M, Amoroso S, Gratteri S. Sudden cardiac death: focus on the genetics of channelopathies and cardiomyopathies. *J Biomed Sci*. 2017;24(1):56-56. doi:10.1186/s12929-017-0364-6
24. Stiles MK, Wilde AAM, Abrams DJ, et al. 2020 APHRS/HRS expert consensus statement on the investigation of decedents with sudden unexplained death and patients with sudden cardiac arrest, and of their families. *Heart Rhythm*. 2021;18(1):e1-e50. doi:10.1016/j.hrthm.2020.10.010

25. Gollob MH, Blier L, Brugada R, et al. Recommendations for the Use of Genetic Testing in the Clinical Evaluation of Inherited Cardiac Arrhythmias Associated with Sudden Cardiac Death: Canadian Cardiovascular Society/Canadian Heart Rhythm Society Joint Position Paper. *Canadian Journal of Cardiology*. 2011/03/01/ 2011;27(2):232-245. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cjca.2010.12.078>
26. Ackerman MJ, Priori SG, Willems S, et al. HRS/EHRA expert consensus statement on the state of genetic testing for the channelopathies and cardiomyopathies this document was developed as a partnership between the Heart Rhythm Society (HRS) and the European Heart Rhythm Association (EHRA). *Heart Rhythm*. Aug 2011;8(8):1308-39. doi:10.1016/j.hrthm.2011.05.020
27. Stattin EL, Westin IM, Cederquist K, et al. Genetic screening in sudden cardiac death in the young can save future lives. *Int J Legal Med*. Jan 2016;130(1):59-66. doi:10.1007/s00414-015-1237-8
28. Semsarian C, Ingles J. Molecular autopsy in victims of inherited arrhythmias. *J Arrhythm*. Oct 2016;32(5):359-365. doi:10.1016/j.joa.2015.09.010
29. Tester DJ, Ackerman MJ. Postmortem long QT syndrome genetic testing for sudden unexplained death in the young. *J Am Coll Cardiol*. Jan 16 2007;49(2):240-6. doi:10.1016/j.jacc.2006.10.010
30. Basso C, Aguilera B, Banner J, et al. Guidelines for autopsy investigation of sudden cardiac death: 2017 update from the Association for European Cardiovascular Pathology. *Virchows Archiv*. 2017/12/01 2017;471(6):691-705. doi:10.1007/s00428-017-2221-0
31. Laboratories MC. Test ID: PMARP; Postmortem Arrhythmia Panel, Varies. Accessed 15.09.2021, <https://www.mayocliniclabs.com/test-catalog/Specimen/65559>

Medycyna niewątpliwie stanowi naukę interdyscyplinarną, a najciekawsze odkrycia dokonują się na styku z innymi dziedzinami. Piąty tom monografii „Innowacje w Medycynie. Przegląd wybranych technologii XXI w.” poświęcony został opracowaniom dotyczącym odkryciom ze styku nauk klinicznych z biotechnologią, inżynierią materiałową, biologią molekularną, inżynierią genetyczną, chemią, farmacją, lecz także informatyką i zdrowiem publicznym. Wśród omawianych w książce tematów nie zabrakło metod terapii nowej generacji (CAR-T, terapia biologiczna i genetyczna), zastosowania komórek macierzystych. Dodatkowo, cztery rozdziały poświęcone zostały odkryciom, diagnostyce oraz całościowemu wpływowi COVID-19 na organizm człowieka. Monografia stanowi cenne kompendium dla wszystkich zainteresowanych szeroko rozumianymi naukami medycznymi.