

INNOWACJE W MEDYCYNIE

PRZEGLĄD WYBRANYCH
TECHNOLOGII XXI W.

TOM X

REDAKCJA
JAKUB KUFEL
PIOTR LEWANDOWSKI

ARCHAEGRAPH
Wydawnictwo Naukowe

Innowacje w medycynie

- przegląd wybranych technologii XXI w.

Tom 10

Redakcja

Jakub Kufel

Piotr Lewandowski

INNOWACJE W MEDYCYNIE

PRZEGLĄD WYBRANYCH
TECHNOLOGII XXI W.

TOM X

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. Maciej Cebula

lek. Sugarmaa Baasansuren

lek. Wikotria Bartnikowska

lek. Anna Grześkiewicz

mgr Karol Krystek

lek. Dominika Kondoł

lek. Jakub Kufel

lek. Anna Ledwoń

Korekta redaktorska

Karol Łukomiak

Diana Łukomiak

Skład i projekt okładki

Karol Łukomiak

© Copyright by Authors & ArchaeGraph

ISBN: 978-83-67527-60-6

Wersja elektroniczna dostępna na stronie internetowej wydawcy:
www.archaeograph.pl

ARCHAEGRAPH
Wydawnictwo Naukowe

Łódź, maj 2023

SPIS TREŚCI

| | |
|---|-----|
| Przedmowa | 7 |
| Innowacje w leczeniu mukowiscydozy | 15 |
| Paulina Książopolska, Aleksandra Spychał, Natalia Hajok, Grażyna Waśka, Mateusz Blaut | |
| Zastosowanie metod uczenia maszynowego w analizie wyników wybranych obiektywnych badań słuchu | 35 |
| Nikodem Pietrzak, Jakub Roman, Wiktoria Haberko, Przemysław Bugajski, Daniel Gondko | |
| Problem zwłóknienia wątroby u pacjentów pediatrycznych po transplantacji – perspektywa przeszczepu mikrobiomu kałowego | 57 |
| Natalia Zawronek, Barbara Sławińska, Wiktoria Sokołowska, Maja Kruplewicz, Karolina Kruk, Wojciech Jaworski | |
| Zastosowanie sztucznej inteligencji w radiologicznej ocenie obrazów ultrasonograficznych | 87 |
| Marcin Rojek, Michał Azierski | |
| Potrójnie ujemne raki piersi — leczenie i nowe strategie terapeutyczne | 103 |
| Martyna Żurek, Zofia Graca, Łukasz Czogalik, Jakub Kołodziej, Oliwia Pluta | |
| Terapia celowana na PSMA w raku prostaty | 123 |
| Agnieszka Nowotarska, Michalina Masternak, Łukasz Grajcarek, Julia Gawron, Martyna Nowak, Tola Kotkiewicz | |
| Głęboka stymulacja mózgu w chorobie Parkinsona | 141 |
| Dominika Majer, Szymon Warwas, Emilia Słabońska, Krzysztof Krukowski, Oliwia Jewuła, Gabriela Mysłək | |

Dystrofia mięśniowa Duchenne’a - nowe metody leczenia 157

Paulina Jaruga, Michał Tutaj, Marcin Jezierzański,
Karolina Grodkowska, Oskar Fogiel, Marlena Grzybek

Neuromonitoring śródoperacyjny w tyroidektomii 183

Aleksandra Kaluża, Julia Kaczmarczyk, Piotr Granatowski,
Karolina Gancarczyk, Krzysztof Gładkowski, Barbara Grochowska

**Szczepionki antynikotynowe
jako metoda leczenia uzależnienia od nikotyny** 193

Magdalena Stencel, Michał Janik, Błażej Pilarski,
Małgorzata Planer, Natalia Denisiewicz, Piotr Dudek

**Toksyna botulinowa – zagrożenie czy przyszłość leczenia?
Przykładowe zastosowania w medycynie** 211

Anna Krawczyk, Agata Pokrzywa, Michał Maćkowski,
Sara Długosz, Klaudia Gryczka, Kacper Ruchała

**Zastosowanie osocza bogatopłytkowego oraz fibryny
bogatopłytkowej, jako obiecująca innowacja
w dziedzinach stomatologii** 229

Sara Długosz, Kacper Ruchała, Klaudia Gryczka,
Michał Maćkowski, Anna Krawczyk, Agata Pokrzywa

**Perspektywy leczenia farmakologicznego
tętniczego nadciśnienia płucnego** 251

Witold Kimla, Daniel Kiełtyka

**Ksenotransplantacja i biodruk 3D
jako przyszłość kardiologii** 277

Katarzyna Grudnik, Anna Krakowczyk, Joanna Bączyk,
Dariusz Kucias, Eliza Barczyk, Wojciech Dobczyński

Z CZEGO SIĘ SKŁADA... WSZYSTKO?

Dawno temu, nawet bardzo, Demokryt wykombinował, że jeśli coś uchwycę i będę dzielił bez końca to nawet jakbym potem z powrotem nie skończył dodawał, składał z powrotem w całość, to i tak na początku musi być coś, czyli atom. Materia składa się zatem od tego czasu z atomów, a jeśli ktoś nie wierzy, to może dzisiaj zobaczyć zdjęcie wykonane za pomocą mikroskopu sił atomowych. Atomy składają się z jądra, które zawiera protony i neutrony oraz elektronów, które się go trzymają gdzieś na dozwolonej orbicie. Ale w sensie naszego greckiego filozofa atom przestał być elementarną cząstką, skoro znaleźliśmy w nim to i tamto. W latach 30-tych uznawano za elementarne (niepodzielne) elektron, proton, neutron i foton. Jednak znowu się czegoś nauczyliśmy, obecnie takich jest ponad 200, więc ... zmieniono definicję i te już naprawdę elementarne będą teraz fundamentalne. Każda jest ważna i niezbędna, bo „tzw. hipoteza demokracji cząstek zakłada, że wszystkie cząstki są sobie nawzajem potrzebne i nawzajem tłumaczą się teoretycznie” - co piszę za Wiki, która wie wszystko.

Wszystko, czyli ja i Ty, ten komputer i fotel, w którym siedzę, ten kwiat, pies i kosmos składają się (wg. modelu standardowego) z 12 cząstek zwanych hadronami (6 kwarków i 6 leptonów) połączonych siłami reprezentowanymi przez kolejne 12 cząstek przenoszących oddziaływania (bozony). Kwarki trudno zobaczyć osobno (tu by się Demokryt mógł zdziwić), a leptony, do których należy elektron - jak najbardziej tak (dzięki temu mój komputer działa). Do bozonów np. należą fotony, który, jak wiemy, w postaci fali łączy elektromagnetycznie.

Jeśli jednak ktoś chciałby wysunąć z tego wnioski, że skoro serce człowieka składa się z kwarków, tak jak pompka z pralki, to można ją spokojnie implantować i połączyć z układem krążenia - to się myli, bo już ewolucja

o to zadbała, byśmy jednak i człowiek od człowieka, i zwierzęta od nas, a tym bardziej pralka, się różnili.

CZŁOWIEK

Człowiek składa się z komórek, które tworzą tkanki i narządy, potrzebne na różne sposoby. Gdybyśmy jednak chcieli podać przepis na zbudowanie człowieka, to musiałby on zawierać takie proporcje: tlen – 65%, węgiel – 18.5%, wodór – 9.5%, azot – 3.2%, wapń – 1.5%, fosfor – 1%, potas – 0.4%, siarka – 0.3%, sód – 0.2%, chlor – 0.2%, magnez – 0.1%. Reszta, czyli pozostałe mniej niż 1%: bor, chrom, kobalt, miedź, fluor, jod, żelazo, mangan, molibden, selen, krzem, cyna, wanad i cynk. Ilu z tego można stworzyć różnych ludzi? Trzeba zacząć od przeczytania instrukcji, czyli DNA.

Człowiek też jest wynikiem tego „wielkiego wybuchu”, który zapoczątkował Wszechświat jaki znamy. Węgiel i wiele innych z wymienionych wyżej atomów, z którego jesteśmy stworzeni, powstały w wyniku procesów zachodzących w gwiazdach. Wodorowa i helowa materia, z której składa się większość materii we Wszechświecie, ulegają jądrowym reakcjom termojądrowym, które powodują powstanie cięższych pierwiastków. Jesteśmy, więc z kosmosu jak najbardziej.

KSIĄŻKA

Książka składa się ze zdań, a te z liter. Niepodzielną cząstką elementarną naszych zdań są litery. Są też kropki i inne postojowe znaki - ale tak jak na drodze, nie pełnią takiej roli kreatywnej jak słowa. Liczba liter zależy od konkretnego alfabetu. Na przykład, alfabet łaciński, który jest używany w językach takich jak angielski, polski, hiszpański czy francuski, składa się z 26 liter: A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, V, W, X, Y, Z. No tak, ale z powodu ogonków, w polskim mamy więcej, bo 32 litery: A, Ą, B, C, Ć, D, E, Ę, F, G, H, I, J, K, L, Ł, M, N, Ń, O, Ó, P, R, S, Ś, T, U, W, Y, Z, Ź, Ż.

Ile można z nich ułożyć słów? Musimy ustalić, czy pozwalamy na powtarzanie się liter i zastosować kombinatorykę. Dla przykładu, jeśli rozważamy jednoliterowe słowa, to istnieje 32 możliwości, natomiast dla dwuliterowych słów istnieje $32 * 32 = 1024$ możliwości, dla trzyliterowych słów istnieje $32 * 32 * 32 = 32768$ możliwości, dla czteroliterowych słów istnieje $32 * 32 * 32 * 32 = 1048576$ możliwości itd. Podaję za OpenAI, z którym

sobie gawędzę (*chat*), bo komu by dziś chciało się liczyć? Część z tych tworzonych „słów” będzie zupełnie pozbawiona sensu. Lub czekała na sensu nadanie przez wynalazców czy poetów. W praktyce, liczba słów używanych w języku polskim jest znacznie mniejsza i wynosi około 200-300 tysięcy słów. Największym polskim słownikiem jest Słownik języka polskiego PWN, który w swojej najnowszej wersji zawiera ponad 240 000 haseł. Podobno średnio wykształcony Anglik używa około 20 000-30 000 słów, ten mniej - mniej. Zresztą od znajomości słów ważniejsza jest umiejętność łączenia ich w sensowne zdania. A lekarz? Można szacować, że polski lekarz używa co najmniej kilkudziesięciu tysięcy słów w swojej pracy, a może nawet więcej, w zależności od specjalizacji i zakresu działalności. I byłoby lepiej, gdyby zawsze składały na zdrowie pacjenta.

Słowa wypowiedziane, gdy zapamiętane, istnieją dłużej. Jeśli zaś zamkniemy je w okładki książek, jak z zamrażarki możemy wyjąć, gdy potrzebne i są świeże, jak wtedy, kiedy pisane były.

Książki to praca w sensu układanie i proces dzielenia się. Książki to skarby ludzkości, bo zawierają odpowiedzi. Ta wiedza śpi ukryta w zaciszu bibliotek. Od niej zależy nasze rozumienie rzeczywistości i naszej w niej roli, ale także umiejętności np. jak się robi samochód czy omlet. Tam znajdujemy przepisy jak żyć w zgodzie z sąsiadami i jak leczyć choroby czy unikać zagrożeń natury. Nic dziwnego, że wszystkie ataki na cywilizacje zaczynają się od niszczenia bibliotek i książek.

Historia wojen jest pełna przykładów zniszczenia ważnych bibliotek na świecie. Biblioteka Aleksandryjska, uważana za jedno z największych skarbów kulturowych świata starożytnego, została całkowicie zniszczona w wyniku arabskiej inwazji w VII wieku. Założona w IX wieku przez kalifę Abbasidskiego biblioteka Bagdadzka została zniszczona w wyniku najazdu mongolskiego w 1258 roku. Jeśli myślicie, że teraz jak już wszyscy czytać umieją to już tylko szacunek bibliotekom jest oddawany, to się mylicie. Biblioteka Sarajewskiej Akademii Nauk i Sztuk - najważniejszy ośrodek naukowy w Bośni i Hercegowinie została zniszczona podczas wojny w Bośni w 1992 roku, gdy wojska serbskie ostrzelały i spalili budynek, niszcząc tysiące rękopisów i książek. Biblioteka w Timbuktu - ta biblioteka przechowywała wiele ważnych rękopisów z Afryki subsaharyjskiej - w 2013 roku została zaatakowana przez islamskich ekstremistów, którzy podpalili wiele budynków i zniszczyli tysiące rękopisów. Jak jest wojna, jak pojawia się nienawiść, to pierwsza ginie kultura i te dziedzictwo ludzkości.

W historii cywilizacji wielka jest również rola tych co tłumaczą, przepi-
sują, podsumowują, przeglądają i dokumentują. Bo pierwsze źródła często
wysychają, znikają, tak jak dorobek starożytnych Greków, a od nich przecież
zaczęliśmy ten mój tekst. Założona w IX wieku przez kalifa Abd ar-Rahmana
III biblioteka w Kordobie była jednym z symboli potęgi arabskiej kultury
i cywilizacji w Europie. Z kolei po zdobyciu Konstantynopola przez Turków
Osmańskich w 1453 roku wielu greckich uczonych uciekło do Włoch, za-
bierając ze sobą rękopisy i książki. I te zbiory z Kordoby i z Konstantynopola
zbudowały włoski renesans transferując greckie odkrycia nauki, filozofii i sztuki
do Włoch, gdzie teksty były następnie tłumaczone na łacinę i stały się źró-
dłem wielu nowych idei i koncepcji, które wpłynęły na rozwój nauki i kultury
w Europie. No i oczywiście, powstały nowe biblioteki: Biblioteka Watykańska
i Biblioteka Medyceuszy we Florencji. Jak się domyślicie pewnie biblioteka
w Kordobie została też zniszczona, co się stało w wyniku wojen i konfliktów
religijnych w XVII wieku.

Skoro źli ludzie niszczą książki, a głupi ich nie czytają, to my ... piszemy.

PRZEGLĄD

Żeby napisać książkę trzeba odpowiedzieć sobie na pytanie, dlaczego?
Dla kogo? Jak i o czym. Trzeba sobie wyrobić własne zdanie, zanim napisze-
my ich więcej. Żeby mieć pogląd trzeba zrobić przegląd. A każdy przegląd
składa się z fragmentów „na temat”.

Do poszukiwaniu sensu w słowach służy rozum. Do szukania tych treści,
które nasz artykuł ma zmieścić, dzisiaj służą, głównie wyszukiwarki inter-
netowe. Bo dzisiaj zamieniliśmy drukowane na cyfrowe, więc łatwiej, szybciej,
bezpieczniej jest. Wyszukiwanie jest jak śledztwo naukowe, które stosujemy
próbując znaleźć: kto jest winny tych zasług, jakie są fakty, reguły i skutki.

Do tego śledztwa potrzebujemy metod opartych na logice i nauce, takich
jak dedukcja i indukcja. Dedukcja polega na wnioskowaniu z ogólnych za-
sad, aksjomatów lub faktów do bardziej szczegółowych wniosków. Indukcja
to proces wnioskowania, który polega na wyciąganiu ogólnych wniosków na
podstawie ograniczonej liczby faktów lub obserwacji. Dedukcja jest wnisko-
waniem od ogólnego do szczegółowego, podczas gdy indukcja to wnioskowa-
nie od szczegółowego do ogólnego. Dedykujemy więc lub indukujemy sami
lub algorytmami.

Listę znanych wyszukiwarek otwiera oczywiście Google, ale niektórzy
może wolą: Bing, Yahoo!, DuckDuckGo, Yandex, Baidu, AOL Search,

Ask Jeeves (obecnie Ask.com) czy Wolfram Alpha. Są też jeszcze specjalistyczne wyszukiwarki w różnych dziedzinach naukowych. W medycynie stosujemy np. PubMed [darmowa wyszukiwarka publikacji medycznych opracowana przez Narodowe Centrum Biotechnologii Informacyjnej (NCBI) i Narodowe Centrum Biotechnologii (NCB)], MedlinePlus czy UpToDate, Cochrane Library czy ClinicalKey. Od kilku miesięcy jednak zaczyna wypierać je wszystkie ChatGPT firmy OpenAI, który jest już tak inteligentny, że zdał egzaminy końcowe z medycyny czy prawa, a im częściej go stosujemy tym inteligencja jego jeszcze rośnie. Ta platforma miała pierwszy milion użytkowników już po 5 dniach. Teraz ma 200 mln - i te dwieście milionów dba każdego dnia, by karmić tą bestię danymi, na których się uczy. Ale pewnie najbardziej pozytywistyczne było (i jest mam nadzieję) pospolite ruszenie Wikipedia. Wikipedia to chyba najczęściej odwiedzana witryna, wielojęzyczna, darmowa encyklopedia internetowa, do której każdy może dodawać, którą każdy może edytować i zmieniać jej treść. Nie odegrała jednak takiej roli jak jej poprzedniczka, encyklopedia czasów oświecenia, która oprócz oczywistego pokazania i wyjaśnienia wszystkiego co ważne przygotowała podłoże intelektualne rewolucji francuskiej. Powracając do OpenAI, gdzie jest świetna polska delegacja pod kierunkiem Wojciecha Zaremba, to jej struktura pytania i odpowiedzi (trochę jak u Platona czy Kubusia Fatalisty) - daje szansę na tworzenie on-line „własnej” książki, w której są tylko te rozdziały, które nas żywo interesują. OpenAI już tyle sam przeczytał (on?), że z dużą sprawnością, opierając się na utartych związkach między słowami zgaduje jakie będzie następne słowo w odpowiedzi (jak w tych testach z angielskiego, gdzie w wolne miejsca trzeba wpisać brakujące słowo). I tak jak z dziećmi - zlecając zadanie - nie używaj słowa „nie” do sztucznej inteligencji, bo może go nie zauważyć.

KSIĄŻKI „INNOWACJE W MEDYCYNIE. PRZEGLĄD WYBRANYCH TECHNOLOGII XXI W.”

No tak. Teraz powinienem napisać, że seria książek, które redagowali Jakub Kufel i Piotr Lewandowski składa się z 10 książek, czyli 160 rozdziałów, czyli 3319 stron..., i że około 100 osób było zaangażowanych w ich przygotowanie - autorów, kolejnych kilkadziesiąt w recenzowanie ... Tandem redaktorów napisał jeszcze dwie książki poza tą serią, więc znajdziecie efekty pracy pod ich przywództwem w 12 książkach - co podsumowujemy rzetelnie znaczy: liczba rozdziałów 193, a stron 4185. Są ogólnodostępne,

czyli za darmo, dla każdego (do znalezienia na portalu naukowego wydawnictwa <https://www.archaeograph.pl/>)

To jest absolutnie niezwykle, w czasie, gdy większość studentów odgradzona od sal wykładowych Alma Mater i innych studentów przez rygory walki z pandemią minimalizowała swoje aktywności (zgodnie z przyzwoleniem) Jakub Kufel zdołał zapalić studentów pod hasłem „napiszmy książkę”. Zróbmy to i dodajmy - za własne pieniądze (studenci sami sfinansowali wszystkie książki).

Napiszmy sami, takie książki jakie cenimy i lubimy czytać, jakie są nam potrzebne, by rozwijać się jako lekarze, którzy muszą sprostać wyzwaniom XXI w. Czyli o innowacyjnej medycynie. I dajmy je za darmo wszystkim. Jakub szybko znalazł świetnego partnera, mistrza organizacji (nie na darmo został wybrany nie tylko szefem mojego koła naukowego, ale wszystkich w STN w SUM). Obydwaj są zresztą świetnymi naukowcami - już w czasie studiów rozpoczęli swoje doktoraty. Mają charyzmę i dorobek, czyli zasłużony szacunek. Zapamiętajcie ich nazwiska - Jakub Kufel i Piotr Lewandowski, pociągnęli za sobą koleżanki i kolegów, i odnieśli niesamowity sukces, opłacony ogromnym wysiłkiem i osobistym poświęceniem dla wspólnej sprawy. W 3 lata 12 książek!! Ważnych, mądrych i sprzyjających mądrości tych, którzy po nie sięgają.

No tak - powinienem jeszcze raz napisać, że to co świętujemy składa się 4185 stron. I to jest tak jakby każdego dnia moi studenci pisali 4 strony - ...

Ale nie. Przecież wszyscy wiemy, że nie o liczbę stron czy liter tu idzie, że ta seria książek składa się z marzeń i wiary studentów w możliwość współudziału w aktywności naukowej, tworzenia lepszej medycyny, sprawniejszej, precyzyjnej, efektywnej i powszechnie dostępnej (czyli tańszej), w to, że można i warto być lekarzem, nie tylko dlatego, że czekają pacjenci, ale też dlatego, że to jest pasjonująca przygoda na całe życie. Bo lekarz nie leczy pacjenta, tylko naprawia kawałek świata. Musi go zatem rozumieć. Wiemy, że te książki składają się ze wielu godzin szukania i składania słów w większą całość przez autorów tak, byś Ty Czytelniku uzyskał wiedzę, czyli informacje ułożone w sens i potencjał użyteczności.

W takim razie korzystajmy!! Zasiądźmy do lektury, bo w niej jest wartość pracy mierzona tym co oszczędzimy sobie sami. Są cenne jak fotografie zrobione przez podróżnika z miejsc, gdzie niekoniecznie możemy dotrzeć sami, ale wiedzieć powinniśmy.

P.S.

W przedmowie do pierwszej książki tej serii napisałem „Powstała książka zaskakująco - jak na wiek jej twórców - dojrzała, inspirująca, zarówno tych przyszlých jak i obecnych, inżynierów oraz lekarzy. Książki poświęcone innowacjom starzeją się najprędzej. Już teraz bowiem ktoś dopisuje kolejne rozdziały postępow medycyny. Spieszmy się zatem czytać to dzieło i zabierzmy się do roboty. Kolejni pacjenci czekają na pomoc, nowe wyzwania, jeszcze nienazwane, pojawiają się gdzieś daleko czy blisko. By gdzieś też pojawiły się na te wyzwania odpowiedzi trzeba pielegnować ciekawość i uważność, czułość i odwagę. Trzeba rozwijać i chronić dobre idee, szacunek dla pionierów, wiedzy i nauki ... i być gotowy na zmian tworzenie.” Kto z nas, by wpadł na myśl, że będzie kolejna, a nawet dziesiąta?

Dzisiaj już wiemy, że ta seria może trwać bez końca. Jak ciekawość. Jak potrzeba pomocy tym, którym los przestał sprzyjać.

Polska 22 kwietnia 2023

dr hab. n. med. Zbigniew Nawrat, prof. IPS
Dyrektor Kreatywny w Fundacji Rozwoju Kardiochirurgii im. Prof. Zbigniewa Religi,
adiunkt w Katedrze Biofizyki, Wydziału Nauk Medycznych w Zabrze,
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
prezydent Międzynarodowego Stowarzyszenia Robotyki Medycznej,
redaktor *Medical Robotics Reports*
opiekun Studenckiego Koła Naukowego im. prof. Zbigniewa Religi
przy Katedrze Biofizyki SUM

INNOWACJE W LECZENIU MUKOWISCOZOZY

Paulina Księżopolska¹, Aleksandra Spychała¹,
Natalia Hajok¹, Grażyna Waśka², Mateusz Blaut¹

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

2. Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Klinice Pediatrii,
Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Abstrakt: Mukowiscydoza, nazywana inaczej zwłóknieniem torbielowatym, jest najczęściej występującą chorobą genetyczną wśród osób rasy kaukaskiej. Jest to bardzo ciężkie schorzenie obejmujące wiele układów i narządów organizmu - w szczególności dotyczy układu oddechowego, i to właśnie choroba płuc jest najczęstszą przyczyną zgonu chorych. Do niedawna mukowiscydoza pozostawała chorobą śmiertelną, a leczenie opierało się jedynie na łagodzeniu objawów. W ostatniej dekadzie nastąpił dynamiczny rozwój przełomowych leków umożliwiających leczenie przyczyny choroby – nieprawidłowego białka CFTR. Ich skuteczność, potwierdzona licznymi badaniami klinicznymi daje szansę wszystkim chorym pacjentom, tym samym zmieniając mukowiscydozę z choroby śmiertelnej w przewlekłą. Obecnie na rynku dostępnych jest kilka substancji w różnych kombinacjach oraz dawkach umożliwiających dostosowanie do pacjenta oraz typu mutacji. Potrzebne jest jednak rozpowszechnianie i szeroka refundacja modulatorów CFTR, aby wyrównać szanse wszystkich chorych, a także badania obejmujące wieloletnie stosowanie modulatorów, aby jednoznacznie ocenić ich wpływ na długość życia pacjentów z mukowiscydozą. W niniejszym rozdziale autorzy przedstawiają przegląd aktualnej wiedzy o chorobie oraz przegląd dostępnych nowoczesnych terapii wraz z badaniami klinicznymi.

Słowa kluczowe: mukowiscydoza, mutacja, modulatory CFTR

Abstract: Cystic fibrosis, otherwise known as cystic fibrosis, is the most common genetic disease among Caucasians. It is a very serious disease affecting many systems and organs of the body - in particular, it affects the respiratory system, and it is lung disease that is the most common cause of death of patients. Until recently, cystic fibrosis remained a fatal disease, and treatment was based only on relieving symptoms. In the last decade, there has been a dynamic development of breakthrough drugs that enable the treatment of the cause of the disease - the abnormal CFTR protein. Their effectiveness, confirmed by numerous clinical trials, gives all patients a chance, thus changing cystic fibrosis from a fatal disease into a chronic one. Currently, several substances are available on the market in various combinations and doses that allow adaptation to the patient and mutation type. However, there is a need to disseminate and widely reimburse CFTR modulators to equalize the chances of all patients, as well as studies involving long-term use of modulators in order to unequivocally assess their impact

on the life expectancy of patients with cystic fibrosis. In this chapter, the authors present an overview of the current knowledge about the disease and an overview of available modern therapies along with clinical trials.

Key words: cystic fibrosis, mutation, CFTR modulators

1. WSTĘP

1.1. Patogeneza

Zwłóknienie torbielowate to choroba genetyczna dziedziczona autosomalnie recesywnie. Związana jest z mutacją genu regulującego przewodnictwo przez błonowe znajdującego się na ramieniu długim chromosomu 7. Gen ten koduje białko błonowe CFTR (ang. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) będące kanałem chlorkowym komórek nabłonka, a także regulujące egzocytozę, endocytozę i inne kanały jonowe [1,2]. Opisano ponad 2000 wariantów danej mutacji, a najczęstszą z nich, występującą u ponad 90% chorych na co najmniej jednym allelu jest delecja fenyloalaniny w pozycji 508 (mutacja p.F508del). Wskutek mutacji upośledzeniu ulega wydzielanie chlorków, resorpcja zwrotna sodu i transport wody, co z kolei prowadzi do zagęszczenia wydzieliny gruczołów zewnątrzwydzielniczych. Skutkuje to upośledzeniem funkcji licznych narządów i układów organizmu – szczególnie układów oddechowego i pokarmowego [3,4,5].

1.2. Epidemiologia

Mukowiscydoza jest najczęściej występującą chorobą dziedziczną rasy kaukaskiej i jedną z najczęstszych dziedzicznych chorób śmiertelnych na całym świecie [5]. W Europie występuje z częstością ok. 1 na 2500 urodzeń, przy czym najwięcej urodzeń przypada na Irlandię (1:1353) a najmniej na Finlandię (1:25000). Mutacja ta występuje porównywalnie w Stanach Zjednoczonych (1:3500), natomiast znacznie rzadziej pojawia się w populacji Azji czy Afryki [4]. W Polsce ok. 1 na 5000 dzieci rodzi się z mukowiscydozą [6], a całkowita ilość chorych jest większa niż 1500. Spośród nich powyżej 500 ma więcej niż 18 lat, natomiast w Europie 50% pacjentów ma mniej niż 19 lat. Średni wiek polskich chorych w chwili śmierci wynosi 24 lata, co stanowi porównywalny wynik do średniej europejskiej (21-30 lat). W grupie tej wykazano niewielką przewagę zgonów wśród płci męskiej [2,7]. Dzięki rozwojowi nowych terapii średni czas przeżycia osób z mukowiscydozą stale się wydłuża.

1.3. Kryteria rozpoznania i diagnostyka

Aby postawić rozpoznanie choroby, należy kierować się charakterystycznym obrazem klinicznym, wywiadem rodzinnym w kierunku mukowiscydozy, wreszcie testami przesiewowymi krwi noworodków, które w Polsce dotyczą wszystkich nowo narodzonych dzieci po lipcu 2009 roku^[8]. Złotym standardem w diagnostyce zwłóknienia torbielowatego pozostaje próba potowa, czyli pomiar stężeń anionów chlorkowych w pocie uzyskanym za pomocą jonoforezy pilokarpinowej. Za wynik dodatni uznaje się poziom stężenia anionów chlorkowych powyżej 60 mmol/l w dwóch osobno zbadanych próbkach^[1]. Dostępne są również badania molekularne wykrywające mutację genu CFTR oraz pomiary potencjałów elektrycznych błony śluzowej nosa. Każdy dodatni wynik testu przesiewowego musi zostać potwierdzony przynajmniej jednym dodatkowym badaniem diagnostycznym. Ponadto, należy zwrócić uwagę na objawy kliniczne, takie jak biegunki tłuszczowe, zespół złego wchłaniania, przewlekły kaszel czy niedrożność smółkowa u noworodków^[9]. Według raportu European Cystic Fibrosis Society z 2020 roku tylko 65% dzieci chorych na mukowiscydozę zostało zdiagnozowanych przed 1 rokiem życia. Wynika to z tego, iż nie wszystkie kraje europejskie przeprowadzają badania przesiewowe noworodków. 79% wszystkich dzieci w Europie w wieku 5 lat lub mniej w roku 2020 zostało przebadanych pod kątem mukowiscydozy po urodzeniu^[7].

2. MANIFESTACJA KLINICZNA

Ze względu na specyfikę i patogenezę (zaburzenia transportu jonowego, zaburzenia transportu wody) mukowiscydoza manifestuje się przede wszystkim w narządach, w których dochodzi do produkcji i uwalniania śluzu. Dotyczy ona więc płuc, trzustki, jelita, nerek, wątroby, układu rozrodczego – zarówno męskiego, jak i żeńskiego. Ponadto większość chorych prezentuje wysoce zróżnicowany obraz kliniczny, na który składają się nietypowe objawy oraz różny wiek w momencie ujawnienia się choroby^[10]. Aspekt wieku również wpływa na różnorodność objawów, ponieważ te są zupełnie inne u noworodków, a inne u osób dorosłych. Mimo to główną przyczyną śmierci u chorych pozostaje postępujące pogorszenie funkcji płuc i niewydolność oddechowa. Ze względu na rozległość zagadnienia poniżej zostaną omówione jedynie niektóre z aspektów klinicznych zwłóknienia torbielowatego.

Główną manifestacją płucną mukowiscydozy jest patologiczne gromadzenie się śluzu i komórek zapalnych w drogach oddechowych i płucach. Stan taki sprzyja różnym infekcjom wirusowym i bakteryjnym dróg oddechowych (*H. influenzae*, *B. cepacia complex*, *S. aureus*) które mają charakter nawracający, i w efekcie prowadzą do rozstrzenia oskrzeli. Na typowe objawy składa się kaszel z odkasztuszaniem dużej ilości gęstej, ropnej wydzieliny, duszność, krwioplucie, natomiast badania czynnościowe wskazują na obturację dróg oddechowych. W miarę postępu choroby osoby z mukowiscydozą cierpią na nawracające zapalenia płuc, zwykle wywołane przez *Pseudomonas aeruginosa*. Zarówno ostre jak i przewlekłe infekcje prowadzą z czasem do destrukcji oskrzeli, niszczenia mięszu płuc i postępującej niewydolności oddechowej [8,10,11].

Jak wspomniano wcześniej, mukowiscydoza dotyczy także innych narządów – kolejnym z nich dotkniętym chorobą w znaczącym stopniu jest trzustka wraz z innymi elementami układu pokarmowego. Ze względu na upośledzenie funkcji komórek wysp trzustkowych chorzy zmagają się z niedoborem insuliny, prowadzącym do rozwoju cukrzycy. Szacuje się, iż cukrzyca dotyczy nawet 40% osób chorych na mukowiscydozę, natomiast u aż 85% rozwija się niewydolność trzustki [11]. Skutkuje to m. in. biegunkami tłuszczowymi i słabym przyrostem masy ciała. Wiele pacjentów cierpi także na marskość żółciową wątroby spowodowaną zaleganiem żółci. Niekiedy choroba postępuje wywołując marskość wątroby, objawowe nadciśnienie wrotne i krwawienie z żyłaków przełyku. Zaburzone jest także wchłanianie tłuszczów z przewodu pokarmowego, prowadzące do niedoboru witamin rozpuszczalnych w tłuszczach. Ponadto, słaby przyrost masy ciała wynika często z czynnościowych zaburzeń żołądkowo-jelitowych, obejmujących nudności, wymioty, zaburzenia defekacji oraz czynnościowe bóle brzucha. Jednak objawy tej jednostki chorobowej mogą się manifestować wielorako, np. jako ból w klatce piersiowej, zgaga czy dysfagia. Wywołany powyższymi objawami dyskomfort może wpływać na znaczne pogorszenie apetytu wśród chorych [12].

Zarówno kobiety, jak i mężczyźni cierpiący na mukowiscydozę znacznie częściej mają obniżoną płodność lub są bezpłodni. Problem ten dotyczy 35% kobiet i aż 95% mężczyzn. U kobiet dochodzi do wytwarzania patologicznie gęstego śluzu szyjkowego, który hamuje ruchliwość plemników, a tym samym utrudnia zapłodnienie. Ciąża wśród tej grupy kobiet jest traktowana jako ciąża wysokiego ryzyka. Natomiast u mężczyzn występuje defekt w transporcie plemników, bez wpływu na spermatogenezę [10, 13].

3. STRATEGIE LECZENIA

Ze względu na specyfikę mukowiscydozy i opisaną wcześniej różnorodność i rozległość objawów leczenie musi odbywać się kompleksowo, a pacjenci muszą być pod stałą kontrolą szeregu specjalistów. W celu poprawy jakości życia chorych pożądane są nowoczesne terapie wydłużające życie oraz łagodzące objawy choroby przy najmniejszych możliwych skutkach ubocznych. Dotychczasowe terapie opierały się na łagodzeniu objawów choroby układu oddechowego i zapobieganiu zakażeniom, terapii żywieniowej, leczeniu chorób towarzyszących i fizjoterapii, natomiast uznanym sposobem leczenia pacjentów z krańcową niewydolnością oddechową pozostaje transplantacja płuc [2, 14].

3.1. Przewlekłe leczenie objawowe

Choroba płuc w mukowiscydozie charakteryzuje się okresami zaostrzeń i remisji. Niezwykle ważne jest szybkie wyłapanie danego zaostrzenia i wdrożenie leczenia. Podstawą są antybiotyki – zwykle w inhalacji lub dożylnie. Antybiotykoterapia wziewna jest skuteczna jako długotrwała terapia podtrzymująca, poprawia czynność płuc i zmniejsza ciężkość zaostrzeń, dodatkowo jest skuteczna w zakażeniu *P. aeruginosa*. Najczęściej stosowanymi preparatami są azytromycyna, tobramycyna, lewofloksacylna i aztreonam. Antybiotykoterapia wziewna może być także podawana na zmianę z antybiotykami dostępnymi (zwykle makrolidami). Wszyscy chorzy na mukowiscydozę powinni mieć regularnie przeprowadzane badania bakteriologiczne [15, 16].

W celu zmniejszenia patologicznej lepkości wydzieliny oskrzelowej stosuje się leki mukolityczne – dornaza alfa, hipertoniczne roztwory NaCl, manitol drobnocząsteczkowy. U osób cierpiących na obturację oskrzeli zastosowanie znajdują betamimetyki, zwykle krótkodziałające. Podaje się je w celu rozszerzenia oskrzeli np. przed wysiłkiem fizycznym lub podaniem antybiotyku wziewnego. Chorzy przyjmują także długotrwałe leki przeciwzapalne – ibuprofen, makrolidy, glikokortykosteroidy wziewne i ogólnoustrojowe. Te ostatnie nie są przeznaczone do długotrwałego stosowania ze względu na liczne działania niepożądane. Konieczne jest także ciągłe usuwanie wydzieliny z dróg oddechowych – w tym celu chorzy stosują techniki drenażu oraz oklepywanie lub wibracje klatki piersiowej [2, 8].

3.2. Leczenie żywieniowe

Dieta u chorych na mukowiscydozę jest niezwykle ważna ze względu na duże ryzyko niedożywienia. Powinna ona być wysokobiałkowa, wysokotłuszczowa i uzupełniona o suplementację. Ze względu na dużą przeskórną utratę soli konieczna jest suplementacja sodu, zwłaszcza podczas gorączki, letnich upałów czy wysiłku fizycznego w celu zapobieganiu odwodnienia. Zaburzone wchłanianie tłuszczu może spowodować także niedobory cynku koniecznego do utrzymania odpowiedniej odporności i wzrostu, więc suplementacja cynku również jest zalecana. Z tego samego powodu niezbędna jest także podaż witamin rozpuszczalnych w tłuszczach (A, D, E, K). Niekiedy konieczne jest zastosowanie metod inwazyjnych, jakimi są żywienie dojelitowe i pozajelitowe. Pacjenci z objawami niewydolności trzustki dodatkowo muszą przyjmować enzymy trzustkowe – najczęściej przed i po żywieniu dojelitowym ^[17].

4. NOWOCZESNE TERAPIE

Na przestrzeni ostatniej dekady nastąpił dynamiczny rozwój leków na mukowiscydozę znanych jako modulatory CFTR. Ich działanie obejmuje korygowanie patologii w białku CFTR na poziomie strukturalnym i funkcjonalnym. Obecnie dostępne są modulatory: iwakaftor, lumakaftor, eleksakaftor i tezakaftor, stosowane w różnych kombinacjach oraz najczęściej w terapii skojarzonej. Działają one w sposób wielokierunkowy – prowadzą do zmniejszenia stężenia chlorków w pocie, redukują częstość zaostrzeń płucnych, wpływają na zwiększenie wskaźnika natężonej objętości wydechowej pierwszosekundowej, a także wspierają wzrost BMI. Ich skuteczność została potwierdzona badaniami klinicznymi, tym samym zmieniając mukowiscydozę z choroby śmiertelnej w przewlekłą ^[18]. Mimo to, obok skutecznej farmakoterapii nierozłącznym elementem leczenia pozostają wcześniej wspomniane leki objawowe, fizjoterapia i leczenie żywieniowe. Należy także podkreślić, że leki nie umożliwiają całkowitego wyleczenia mukowiscydozy, a chorzy muszą je przyjmować do końca życia.

4.1. Iwakaftor

Iwakaftor (Kalydeco) został opracowany przez firmę Vertex Pharmaceuticals i zatwierdzony przez FDA i EMA do użytku w 2012 roku. Był on

pierwszym skutecznym lekiem na mukowiscydozę działającym bezpośrednio na przyczynę choroby, przeznaczonym pierwotnie dla dzieci w wieku od 6 roku życia ^[15]. Iwakaftor jest substancją pobudzającą działanie białka CTFR w liniach komórkowych wykazujących ekspresję mutacji G551D (tzw. mutacji bramkującej), występującej u około 5% chorych na mukowiscydozę ^[19]. Wzmacnia on kanał w sposób zależny od fosforylacji i niezależny od ATP, co skutkuje nasileniem transportu chlorków. Wykazano, iż jest on skuteczny także u dzieci w wieku 2-5 lat ^[20], jednak większość pacjentów nie odnieśli korzyści z monoterapii ze względu na rzadkość występowania mutacji G551D. Nie jest on skuteczny w przypadku najczęstszej z mutacji występujących w mukowiscydozie (F508del) ^[15]. Mimo to, niedawno rozszerzono stosowanie iwakaftoru na inne mutacje bramkujące, a także dla dzieci w wieku od 4 miesięcy. Szczegółowa lista mutacji, dla których Kalydeco jest odpowiednim lekiem znajduje się w tabeli 1.

Iwakaftor skutecznie i długoterminowo poprawia wyniki pacjentów. Prowadzi do wolniejszego pogarszania czynności płuc, poprawy nasilonej pierwszosekundowej objętości wydechowej (FEV1) i innych parametrów płucnych ^[21]. W randomizowanych badaniach klinicznych z udziałem osób posiadających przynajmniej jedną kopię mutacji G551D wykazano poprawę w FEV1 u zarówno u dorosłych (o 10,5 punktów procentowych) jak i u dzieci w wieku 6-11 lat (10 punktów procentowych) otrzymujących iwakaftor przed 48 tygodni w porównaniu do grupy otrzymującej placebo ^[22]. Chorzy rzadziej przechodzą zakażenia groźnymi patogenami, takimi jak *Pseudomonas aeruginosa* oraz zaostrzenia płucne – są one średnio o 55% rzadsze do 48 tygodnia przyjmowania leku. Stężenie chlorków w pocie osób leczonych iwakaftorem maleje o ok. 48.1 mmol/l w porównaniu do osób nieprzyjmujących leku. Pacjenci ponadto przybierają na wadze, poprawiając swoje BMI – średnio 2,7 kg w ciągu 48 tygodni leczenia iwakaftorem ^[23]. Przeżywalność rośnie przy jednoczesnym spadku zapotrzebowania na transplantacje płuc. Ponadto zaobserwowano poprawę czynności trzustki i zmniejszenie poziomu biomarkerów stanu zapalnego we krwi ^[24]. Pomimo szeregu korzyści iwakaftor nie gwarantuje całkowitej poprawy funkcji płuc czy braku zaostrzeń. Jednak jakość życia pacjentów objętych leczeniem znacznie się polepsza, wzrasta ich wydolność, a samopoczucie ulega poprawie ^[25, 26].

Lek Kalydeco może być stosowany w monoterapii u pacjentów powyżej 4 miesiąca życia, mających określone mutacje bramkujące. Najczęściej jednak stosuje się go w terapii skojarzonej z lekiem zawierającym iwakaftor oraz tezakaftor, a także lekiem zawierającym iwakaftor, tezakaftor i eleksakaftor.

Tabela 1. Przedstawia wykaz mutacji obecnych w genotypach chorych na mukowiscydozę i leków odpowiednich dla typu mutacji ^[33]

CFTR gene mutations approved for each type of CFTR modulator therapy

| | | | | | |
|-------------------|-----------------|--------|-------------------|--------|--------|
| S46insCTA | E403D | G628R | L346P | R117H | S912L |
| 711+3A>G | E474K | G970D | L453S | R117L | S945L |
| 2789+5G>A | E588V | G1061R | L967S | R117P | S977F |
| 3141del9 | E822K | G1069R | L997F | R170H | S1159F |
| 3272-26A>G | E831X | G1244E | L1077P | R258G | S1159P |
| 3849+10kbC>T | F191V | G1249R | L1324P | R334L | S1251N |
| A46D | F311del | G1349D | L1335P | R334Q | S1255P |
| A120T | F311L | H139R | L1480P | R347H | T338I |
| A234D | F508C | H199Y | M152V | R347L | T1036N |
| A349V | F508C;S1251N | H939R | M265R | R347P | T1053I |
| A455E | F508del* | H1054D | M952I | R352Q | V201M |
| A554E | F575Y | H1085P | M952T | R352W | V232D |
| A1006E | F1016S | H1085R | M1101K | R553Q | V456A |
| A1067T | F1052V | H1375P | P5L | R668C | V456F |
| D110E | F1074L | I148T | P67L | R751L | V562I |
| D110H | F1099L | I175V | P205S | R792G | V754M |
| D192G | G27R | I336K | P574H | R933G | V1153E |
| D443Y | G85E | I502T | Q98R | R1066H | V1240G |
| D443Y;G576A;R668C | G126D | I601F | Q237E | R1070Q | V1293G |
| D579G | G178E | I618T | Q237H | R1070W | W361R |
| D614G | G178R | I807M | Q359R | R1162L | W1098C |
| D836Y | G194R | I980K | Q1291R | R1283M | W1282R |
| D924N | G194V | I1027T | R31L | R1283S | Y109N |
| D979V | G314E | I1139V | R74Q | S13F | Y161D |
| D1152H | G463V | I1269N | R74W | S341P | Y161S |
| D1270N | G480C | I1366N | R74W;D1270N | S364P | Y563N |
| E56K | G551D | K1060T | R74W;V201M | S492F | Y1014C |
| E60K | G551S | L15P | R74W;V201M;D1270N | S549N | Y1032C |
| E92K | G576A | L165S | R75Q | S549R | |
| E116K | G576A;R668C | L206W | R117C | S589N | |
| E193K | G622D | L320V | R117G | S737F | |

Color key:

- Approved for ELX-TEZ-IVA, TEZ-IVA, and IVA
- Approved for ELX-TEZ-IVA and TEZ-IVA
- Approved for ELX-TEZ-IVA only
- Approved for IVA and TEZ-IVA but not ELX-TEZ-IVA[†]

A patient is eligible for ELX-TEZ-IVA if they have 1 or more of the above mutations (except for the 5 mutations noted), with any disease-causing mutation at the other allele. In general, if a patient has a genotype that is eligible for more than 1 therapy, we suggest starting on the maximal therapy available for their age group (ie, triple therapy > dual therapy > monotherapy). As of June 2021, IVA is approved in the United States for children ≥4 months old, TEZ-IVA for ≥6 years, and ELX-TEZ-IVA for ≥6 years.

CFTR: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; ELX-TEZ-IVA: elxacaftor-tezacaftor-ivacaftor; TEZ-IVA: tezacaftor-ivacaftor; IVA: ivacaftor.

* F508del is the most common CFTR gene mutation in most populations. Drug eligibility considerations are:

- F508del heterozygotes – To be eligible for ELX-TEZ-IVA, only 1 copy of F508del is required. To be eligible for TEZ-IVA, patients must have 2 copies of a responsive mutation (eg, F508del with any other responsive mutation on the other allele).
- F508del homozygotes – Patients who are homozygotes for F508del are eligible for several drug combinations. We recommend triple therapy (elxacaftor-tezacaftor-ivacaftor) rather than dual therapy (tezacaftor-ivacaftor or lumacaftor-ivacaftor) as soon as they reach an eligible age (≥6 years). We suggest lumacaftor-ivacaftor for children ages 1 to <6 years.

[†] ELX-TEZ-IVA has not been approved for use in these 5 “splice site” mutations, because the assay used as a predictor of efficacy is not valid for this type of mutation. Clinical studies of ELX-TEZ-IVA have not included sufficient numbers of patients with these rare mutations to assess efficacy in this population. However, the demonstrated efficacy of IVA and TEZ-IVA for patients with these mutations suggests that ELX-TEZ-IVA would also be effective.

Data from:

1. KALYDECO® (ivacaftor) Tablets and Oral Granules, Vertex Pharmaceuticals Incorporated. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2020/201188s034_207925s013lbl.pdf (Accessed on December 20, 2020).
2. SYMDEKO® (tezacaftor/ivacaftor; ivacaftor) Tablets, Vertex Pharmaceuticals Incorporated. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2020/210491s007lbl.pdf (Accessed on December 20, 2020).
3. TRIKAFTA® (elxacaftor/tezacaftor/ivacaftor; ivacaftor) Tablets, Vertex Pharmaceuticals Incorporated. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/212273s094lbl.pdf (Accessed on June 11, 2021).

UpToDate®

Jest on dostępny wyłącznie na receptę i powinien być przepisywany jedynie pacjentom posiadającym dane typy mutacji. Jest dostępny w postaci tabletek jak i granulatu, a dawkowanie zależne jest od rodzaju terapii, wagi i wieku pacjenta. U osób dorosłych oraz dzieci powyżej 6 roku życia i o masie ciała >25kg stosuje się lek w postaci tabletek w dawce 150 mg, dwa razy na dobę. U młodszych dzieci oraz niemowląt należy stosować granulaty co 12 godzin, w dawce odpowiedniej dla wagi dziecka ^[27].

4.2. Tezakaftor/iwakaftor

Lek składający się z tezakaftoru i iwakaftoru nosi nazwę Symkevi/Symdeco. Został on opracowany przez tę samą firmę, co Kalydeco, i zatwierdzony do użytku w Unii Europejskiej w roku 2018. Przeznaczony jest dla osób z mutacją F508del, która polega na nieprawidłowym fałdowaniu białka CFTR i zaburzonej aktywności bramkowania kanałów. Jak wspomniano wcześniej, iwakaftor koryguje mutacje bramukjące, podczas gdy tezakaftor częściowo koryguje nieprawidłowo pofałdowane białko. Symkevi jest przeznaczony dla osób dotkniętych mutacją F508del będących homozygotami w wieku powyżej 6 lat. Mutacja ta dotyczy około 45% chorych na mukowiscydozę i wiąże się ze stosunkowo ciężkim przebiegiem choroby. Lek można stosować także u pacjentów heterozygotycznych pod względem danej mutacji, którzy posiadają również przynajmniej jedną mutację białka CFTR wykazującą wrażliwość na tezakaftor-iwakaftor ^[28]. Mutacje objęte leczeniem Symkevi przedstawione zostały w tabeli 1.

Połączenie tych substancji skutkuje poprawą poszczególnych parametrów, potwierdzoną badaniami klinicznymi. Wykazano, iż u pacjentów będących homozygotami powyżej 12 roku życia przyjmujących tezakaftor i iwakaftor w ciągu 24 tygodni doszło do poprawy wskaźnika FEV1 o 4 punkty procentowe w porównaniu do grupy otrzymującej placebo. Podobny wynik uzyskano badając pacjentów heterozygotycznych – poprawa FEV1 wynosiła 6,8 punktów procentowych ^[29, 30]. Częstość zaostżeń płucnych w grupie badawczej pacjentów homozygotycznych była niższa o 35%, natomiast jakość życia wszystkich poddanych leczeniu pacjentów wyraźnie się poprawiła. W innym randomizowanym badaniu klinicznych wykazano spadek stężenia chlorków w pocie osób przyjmujących lek o 12,3 mmol/l ^[31]. Połączenie tezakaftoru i iwakaftoru nie cechowało się szczególnym profilem działań niepożądanych, tym samym lek uznano za bezpieczny. Ponadto cechuje się on długoterminowymi korzyściami wynikającymi z terapii – roczna szybkość

pogarszania się czynności płuc jest niższa o 61,5% u pacjentów leczonych w porównaniu do pacjentów nie przyjmujących tego leku ^[32].

Lek Symkevi stosuje się w terapii podwójnej z iwakaftorem, lecz nie wykorzystuje się go do terapii potrójnej. Dostępny jest w dwóch postaciach, zawierających różne dawki tezakaftoru i iwakaftoru – odpowiednio 50 mg/75 mg oraz 100mg/150mg, stosowane w zależności od wagi pacjenta. Przyjmuje się go zgodnie ze schematem, w którym rano pacjent zażywa lek złożony, a wieczorem sam iwakaftor ^[33].

4.3. Lumakaftor/iwakaftor

Kolejnym lekiem skutecznie leczącym mukowiscydozę jest Orkambi (Vertex) – połączenie iwakaftoru z lumakaftorem. Przeznaczony jest dla dzieci w wieku od 2 lat, szczególnie dla osób homozygotycznych pod względem mutacji F508del oraz starszych pacjentów, jednak w przypadku pacjentów od 6 do 11 roku życia preferowana jest terapia skojarzona z eleksakaftorem, tezakaftorem i iwakaftorem ^[33]. Lumakaftor to nowo zatwierdzona substancja chemiczna, pomagająca w komórkowym przetwarzaniu zmutowanego białka CFTR i prowadzącą do poprawy jego aktywności w płucach ^[34]. Wykaz mutacji objętych leczeniem Orkambi znajduje się w tabeli 1.

Zatwierdzenie połączenia lumakaftoru i iwakaftoru odbyło się w oparciu o 2 duże badania kliniczne 3 fazy (TRAFFIC and TRANSPORT Study Groups). Przeprowadzono dwa randomizowane badania z podwójnie ślepą próbą. W badaniu 1108 pacjentów powyżej 12 roku życia będących homozygotami zostało poddane randomizacji i otrzymywało lek przez 24 tygodnie, w dwóch różnych dawkach (600 mg lumakaftoru raz na dobę lub 400 mg co 12 godzin). Na początku badania średnia wartość FEV1 wynosiła 61% wartości oczekiwanej. W obu badaniach nastąpiła znacząca poprawa parametrów płucnych w obu grupach dawek podawanego leku. Średnia bezwzględna poprawa odsetka przewidywanej FEV1 wynosiła od 2,6 do 4,0 punktów procentowych w grupie aktywnie leczonej w porównaniu do grupy otrzymującej placebo. Doszło również do spadku zaostreżeń płucnych o 30-39% oraz obniżenia konieczności hospitalizacji czy antybiotykoterapii w grupie leczonej. Zgłoszono także poprawę wskaźnika masy ciała i jakości życia. Z powodu działań niepożądanych 4,2% pacjentów otrzymujących lek musiało zrezygnować z badania, analogicznie do 1,6% pacjentów z grupy placebo. Tym samym potwierdzone zostały korzyści płynące ze stosowania terapii u danej grupy pacjentów ^[35]. W innych, mniejszych badaniach klinicznych angażujących

młodszych pacjentów (6-11 lat oraz 2-5 lat) również wykazano korzyści płynące z leczenia. W pierwszym z badań doszło do poprawy wskaźnika klirensu płuc będącego miarą zmian czynności płuc, poprawy FEV1 w porównaniu do grupy placebo, stężenia chlorków w pocie i wskaźnika masy ciała ^[36]. Drugie badanie młodszych dzieci wykazało poprawę funkcji trzustki, spadek stężenia chlorków w pocie i poprawę parametrów wzrostu ^[37]. W obu badaniach tolerancja leku była zbliżona. W przypadku heterozygot dla mutacji F508del nie doszło do wzrostu wskaźnika FEV1, tym samym Orkambi nie został dopuszczony do leczenia tych pacjentów ^[38].

U pacjentów chorujących na mukowiscydozę powyżej 12 roku życia zalecana dawka w USA oraz UE to dwie tabletki zawierające substancje lecznicze w dawce 200/125 mg, przyjmowane co 12 godzin w monoterapii. Lek powinien być przyjmowany wraz z pokarmem bogatym w tłuszcze. Jeśli chodzi o młodsze dzieci, dawka i postać podawania leku jest ściśle uzależniona od masy ciała ^[39].

4.4. Eleksakaftor/tezakaftor/iwakaftor

Ostatnim z nowoczesnych leków na mukowiscydozę jest Kaftrio (Vertex). W USA nosi on nazwę Trikafta. Jest połączeniem trzech substancji czynnych – eleksakaftoru, tezakaftoru i iwakaftoru (ETI). Lek ten jest stosunkowo nowy, ponieważ otrzymał pozwolenie na dopuszczenie do obrotu w Unii w roku 2020. Nowa substancja – eleksakaftor – zwiększa ilość białka CFTR dostarczanego na powierzchnię komórki ^[40]. Grupą docelową dla leku są pacjenci w wieku powyżej 6 lat, posiadający minimum jedną mutację F508del (heterozygoty), lub inną mutację określoną na podstawie badań klinicznych, która reaguje na ETI. Lek jest odpowiedni także dla pacjentów homozygotycznych względem mutacji F508del. Osoby z tymi określonymi mutacjami stanowią 92% wszystkich chorych na mukowiscydozę powyżej 6 roku życia w Stanach Zjednoczonych ^[33]. Szczegółowe mutacje kwalifikujące się do leczenia tym lekiem przedstawiono w tabeli 1.

Przeprowadzono kilka badań klinicznych oceniających skuteczność ETI. W pierwszym badaniu porównano połączenie iwakaftoru z tezakaftorem i ETI u pacjentów z różnymi genotypami mutacji F508del (homozygoty, heterozygoty). Wykazano, iż terapia z eleksakaftorem w większym stopniu poprawiła funkcjonowanie białka CFTR oraz transport chlorków niż terapia podwójna. W zależności od genotypu pacjenci wykazywali nieznacznie różniący się wzrost FEV1 oraz stężenie chlorków po zakończeniu

badania ^[41]. W innym badaniu grupę badawczą stanowiło 403 pacjentów powyżej 12 roku życia z jednym allelem F508del i innym rodzajem mutacji. Terapia potrójna z eleksakaftorem spowodowała wzrost przewidywanej FEV1 o 14,3 punktu procentowego i spadek zaostrzeń płucnych o 63% w ciągu 24 tygodni w porównaniu z grupą przyjmującą placebo. Stężenie chlorków w pocie grupy badawczej zmalało o 41,8 mmol/l, a objawy ze strony układu oddechowego stały się dla pacjentów znacznie mniej uciążliwe, co zostało zmierzone przy pomocy kwestionariusza ^[42]. Pacjenci homozygotyczni względem mutacji odpowiadającej za mukowiscydozę powyżej 12 roku życia zostali przebadani w badaniu obejmującym 107 osób, z czego 55 z nich otrzymywało terapię potrójną z eleksakaftorem, a 52 terapię podwójną (iwakaftor + tezakaftor). Po 4 tygodniach średnia wartość FEV1 początkowo wynosząca 61% wzrosła o 10,4 punktów procentowych w pierwszej grupie w porównaniu do wzrostu o 0,4 punktów procentowych w drugiej grupie. Stężenie chlorków w pocie również wypadło na korzyść terapii z eleksakaftorem ^[43]. We wszystkich badaniach klinicznych terapia potrójna była dobrze tolerowana, a większość działań niepożądanych miała charakter łagodny lub umiarkowany.

Lek Kaftrio jest dostępny w dwóch tabletkach o różnych dawkach. Pacjenci w wieku co najmniej 12 lat oraz ważący minimum 30 kilogramów otrzymują tabletkę zawierającą 75 mg iwakaftoru, 50 mg tezakaftoru i 100 mg eleksakaftoru. Osoby młodsze oraz ważące mniej niż 30 kilogramów przyjmują mniejszą dawkę: 37,5 mg iwakaftoru, 25 mg tezakaftoru i 50 mg eleksakaftoru. Zaleca się przyjmowanie 2 tabletek Kaftrio z rana oraz 1 tabletkę z iwakaftorem w odpowiedniej dawce wieczorem. Podobnie jak poprzednio, leki te należy przyjmować z posiłkiem bogatym w tłuszcze ^[33].

5. SYTUACJA CHORYCH W POLSCE

Jak wcześniej wspomiano, w Polsce rodzi się około 1 chore dziecko na 5000 urodzeń. Od roku 2009 wszystkie nowo narodzone dzieci są poddawane badaniom przesiewowym o czułości ~ 98%. Według niektórych danych w kraju obecnie żyje 1800-2000 osób z mukowiscydozą, przy czym >33% z nich to osoby dorosłe. Dla porównania, w Wielkiej Brytanii osoby dorosłe stanowią > 48% populacji chorych na mukowiscydozę. Średni wiek polskich chorych wynosi 24 lata, co stanowi wartość o 10-15 lat niższą niż w krajach z szerokim dostępem do modulatorów CFTR – w Polsce jeszcze do niedawna leki te były nierfundowane, a ze względu na bardzo wysoką cenę preparatów, niedostępne dla większości pacjentów ^[2, 44]. Pacjenci z mukowiscydozą jeszcze

do niedawna zajmowali wysokie miejsce wśród biorców przeszczepów płuc, gdyż była to jedyna skuteczna metoda leczenia choroby płucnej ^[46]. Sytuacja ta uległa zmianie po wprowadzeniu refundacji na modulatory.

W dniu 1 marca 2022 roku wpisano na listę leków refundowanych wszystkie dostępne na rynku modulatory CFTR. Do leczenia kwalifikuje się blisko 1000 pacjentów, a roczny szacowany koszt refundacji wynosi około 500 mln zł. Lek Kalydeco (iwakaftor) był dostępny w Polsce od roku 2020, jednak, jak wyżej wspomiano, większość pacjentów nie może korzystać z tej monoterapii ze względu na szczególny typ mutacji kwalifikujący się do leczenia. Za główne kryterium kwalifikacji uważa się wiek i genotyp chorego, jednak nie zawsze są one zgodne ze wskazaniami ogólnymi do stosowania leku. Przykładowo lek Kaftrio według zaleceń może być stosowany u dzieci od 6 roku życia, natomiast w Polsce jest on refundowany jedynie dla osób w wieku >12 lat. Szczegółowe wskazania do refundacji leków dla pacjentów przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Przedstawia wskazania do objęcia konkretnym programem lekowym osób chorych na mukowiscydozę w Polsce w zależności od wieku i mutacji ^[47]

| Lek | Wiek chorych | Wskazania/mutacje |
|---|-------------------------|--|
| KALYDECO iwakaftor | 12 miesięcy i starsi | Potwierdzone wystąpienie jednej z mutacji, w przynajmniej 1 allelu genu CFTR: mutacja bramkująca genu CFTR (klasy III): G551D, G1244E, G1349D, G178R, G551S, S1251N, S1255P, S549N lub S549R |
| ORKAMBI lumakaftor z iwakaftorem | co najmniej 2 lata | Potwierdzone wystąpienie mutacji F508del genu CFTR na obu allelach (czyli posiadający 2 mutacje F508del) |
| SYMKEVI ezakaftor/iwakaftor w skojarzeniu z iwakaftorem | co najmniej 6 lat | Pacjenci homozygotyczni pod względem mutacji F508del (czyli posiadający 2 mutacje F508del) lub Pacjenci heterozygotyczni pod względem mutacji F508del i mający jedną z następujących mutacji genu CFTR: P67L, R117C, L206W, R352Q, A455E, D579G, 711+3A→G, S945L, S977F, R1070W, D1152H, 2789+5G→A, 3272-26A→G i 3849+10kbC→T |
| KAFTRIO eleksakaftor/ tezakaftor/ iwakaftor z iwakaftorem | co najmniej 12 lat | Pacjenci homozygotyczni pod względem mutacji F508del genu CFTR (czyli posiadający 2 mutacje F508del) lub Pacjenci heterozygotyczni pod względem mutacji F508del z mutacją o minimalnej wartości funkcji (MF) genu CFTR |

Proces kwalifikacji do programu lekowego jest długotrwały i złożony. W czasie do 3 miesięcy przed rozpoczęciem leczenia konieczne jest wykonanie szeregu badań, w tym test potowy, badanie spirometryczne, parametry wątrobowe, a wcześniej należy wykonać badanie obrazowe klatki piersiowej. Monitorowanie leczenia obejmuje częste wizyty kontrolne chorego, początkowo co 3 miesiące, a po 12 miesiącach leczenia raz do roku. Pacjent powinien także zostać zarejestrowany w Europejskim Rejestrze Mukowiscydozy w celu monitorowania klinicznych efektów leczenia. Istnieją również określone sytuacje, w których lekarz może wykluczyć pacjenta z programu lekowego. Należą do nich m. in. poważne działania niepożądane, ciąża i okres karmienia piersią, stan po przeszczepieniu płuc czy zaniedbywanie zaleceń ^[47].

6. PODSUMOWANIE

Nowoczesne leki na mukowiscydozę są bardzo obiecującą metodą leczenia, która po raz pierwszy oddziałuje bezpośrednio na przyczynę choroby – zmutowane białko CFTR. Stanowią one niewątpliwy przełom dla pacjentów na całym świecie. Wyniki badań klinicznych jednoznacznie wskazują na ich ogromną rolę w poprawie funkcjonowania płuc, redukcji stężenia chlorków w pocie oraz ogólnej poprawy jakości życia zgłaszanej przez samych pacjentów. Mimo że leki te odznaczają się dobrym profilem działań niepożądanych i były dobrze tolerowane przez chorych w badaniach, potrzebna jest długoterminowa weryfikacja wpływu terapii stosowanej przewlekle, gdyż, jak już wcześniej wspomniano – leki te muszą być przyjmowane do końca życia. W celu uzyskania kompleksowych efektów należy objąć refundacją jak największą liczbę pacjentów oraz zwiększyć ilość ośrodków prowadzących leczenie. Potrzebne są także badania oceniające faktyczny wpływ na długość życia pacjentów z mukowiscydozą.

REFERENCJE

- [1] Dickinson KM, Collaco JM. Cystic Fibrosis. *Pediatr Rev.* 2021;42(2):55-67. doi:10.1542/pir.2019-0212
- [2] Szczeklik A. *Interna Szczeklika*. Kraków: Medycyna Praktyczna; 2020: 738-746.
- [3] Turcios NL. Cystic Fibrosis Lung Disease: An Overview. *Respir Care.* 2020;65(2):233-251. doi:10.4187/respcare.06697

- [4] López-Valdez JA, Aguilar-Alonso LA, Gándara-Quezada V, et al. Cystic fibrosis: current concepts. *Fibrosis cuántica: conceptos actuales. Bol Med Hosp Infant Mex.* 2021;78(6):584-596. doi:10.24875/BMHIM.20000372
- [5] Mall MA, Hartl D. CFTR: cystic fibrosis and beyond. *Eur Respir J.* 2014;44(4):1042-1054. doi:10.1183/09031936.00228013
- [6] Stężowska-Kubiak S. Charakterystyka epidemiologiczno-kliniczna polskiej populacji chorych na mukowiscydozę - Wielkopolska Biblioteka Cyfrowa. *Wielkopolska Biblioteka Cyfrowa.* 2011. Dostęp 1.01.2023. <https://www.wbc.poznan.pl/dlibra/publication/256742/edition/212709/content>
- [7] Orenti A, Zolin A, Jung A, van Rens J et al. ECFSPR Annual Report 2020. https://www.ecfs.eu/sites/default/files/ECFSPR_Report_2020_v1.0%20%2807Jun2022%29_website.pdf Dostęp 06.2022
- [8] Mukowiscydozy, Stanowisko Polskiej Grupy Roboczej. "Zasady rozpoznawania i leczenia mukowiscydozy." *Standardy Medyczne*10 (2002): 600-612.
- [9] Bierlaagh MC, Muilwijk D, Beekman JM, van der Ent CK. A new era for people with cystic fibrosis. *Eur J Pediatr.* 2021;180(9):2731-2739. doi:10.1007/s00431-021-04168-y
- [10] Chen Q, Shen Y, Zheng J. A review of cystic fibrosis: Basic and clinical aspects. *Animal Model Exp Med.* 2021;4(3):220-232. Published 2021 Sep 16. doi:10.1002/ame2.12180
- [11] J Stuart Elborn, Cystic fibrosis, *The Lancet*, Volume 388, Issue 10059, 2016. 2519-2531. ISSN 0140-6736. doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00576-6.
- [12] Patel D, Shan A, Mathews S, Sathe M. Understanding Cystic Fibrosis Comorbidities and Their Impact on Nutritional Management. *Nutrients.* 2022;14(5):1028. Published 2022 Feb 28. doi:10.3390/nu14051028
- [13] Jain R, Kazmerski TM, Zuckerwise LC, et al. Pregnancy in cystic fibrosis: Review of the literature and expert recommendations. *J Cyst Fibros.* 2022;21(3):387-395. doi:10.1016/j.jcf.2021.07.019
- [14] Lee JA, Cho A, Huang EN, et al. Gene therapy for cystic fibrosis: new tools for precision medicine. *J Transl Med.* 2021;19(1):452. Published 2021 Oct 30. doi:10.1186/s12967-021-03099-4

- [15] Rafeeq, M.M., Murad, H.A.S. Cystic fibrosis: current therapeutic targets and future approaches. *J Transl Med* 15, 84 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1193-9>
- [16] Smyth AR, Bell SC, Bojcin S, et al. European Cystic Fibrosis Society Standards of Care: Best Practice guidelines. *J Cyst Fibros.* 2014;13 Suppl 1:S23-S42. doi:10.1016/j.jcf.2014.03.010
- [17] Sullivan JS, Mascarenhas MR. Nutrition: Prevention and management of nutritional failure in Cystic Fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2017;16 Suppl 2:S87-S93. doi:10.1016/j.jcf.2017.07.010
- [18] Lommatzsch ST, Taylor-Cousar JL. The combination of tezacaftor and ivacaftor in the treatment of patients with cystic fibrosis: clinical evidence and future prospects in cystic fibrosis therapy. *Ther Adv Respir Dis.* 2019;13:1753466619844424. doi:10.1177/1753466619844424
- [19] Ivacaftor for cystic fibrosis. *Aust Prescr* 2014;37:64-71. 21.02.2014. Doi:10.18773/austprescr.2014.028
- [20] Davies JC, Cunningham S, Harris WT, et al. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of ivacaftor in patients aged 2-5 years with cystic fibrosis and a CFTR gating mutation (KIWI): an open-label, single-arm study [published correction appears in *Lancet Respir Med.* 2016 Dec;4(12):e57]. *Lancet Respir Med.* 2016;4(2):107-115. doi:10.1016/S2213-2600(15)00545-7
- [21] Accurso FJ, Rowe SM, Clancy JP, et al. Effect of VX-770 in persons with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation. *N Engl J Med.* 2010;363(21):1991-2003. doi:10.1056/NEJMoa0909825
- [22] Whiting P, Al M, Burgers L, et al. Ivacaftor for the treatment of patients with cystic fibrosis and the G551D mutation: a systematic review and cost-effectiveness analysis. *Health Technol Assess.* 2014;18(18):1-106. doi:10.3310/hta18180
- [23] Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, et al. A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N Engl J Med.* 2011;365(18):1663-1672. doi:10.1056/NEJMoa1105185

- [24] Mainz JG, Arnold C, Wittstock K, et al. Ivacaftor Reduces Inflammatory Mediators in Upper Airway Lining Fluid From Cystic Fibrosis Patients With a G551D Mutation: Serial Non-Invasive Home-Based Collection of Upper Airway Lining Fluid. *Front Immunol.* 2021;12:642180. Published 2021 May 5. doi:10.3389/fimmu.2021.642180
- [25] Lopes-Pacheco M. CFTR Modulators: The Changing Face of Cystic Fibrosis in the Era of Precision Medicine. *Front Pharmacol.* 2020;10:1662. Published 2020 Feb 21. doi:10.3389/fphar.2019.01662
- [26] Gramegna A, Contarini M, Aliberti S, Casciaro R, Blasi F, Castellani C. From Ivacaftor to Triple Combination: A Systematic Review of Efficacy and Safety of CFTR Modulators in People with Cystic Fibrosis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(16):5882. Published 2020 Aug 16. doi:10.3390/ijms21165882
- [27] Pettit RS, Fellner C. CFTR Modulators for the Treatment of Cystic Fibrosis. *P T.* 2014;39(7):500-511.
- [28] Tezacaftor/ivacaftor for cystic fibrosis. *Aust Prescr.* 2019;42(5):174-175. doi:10.18773/austprescr.2019.060
- [29] Taylor-Cousar JL, Munck A, McKone EF, et al. Tezacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del. *N Engl J Med.* 2017;377(21):2013-2023. doi:10.1056/NEJMoa1709846
- [30] Rowe SM, Daines C, Ringshausen FC, et al. Tezacaftor-Ivacaftor in Residual-Function Heterozygotes with Cystic Fibrosis. *N Engl J Med.* 2017;377(21):2024-2035. doi:10.1056/NEJMoa1709847
- [31] Davies JC, Sermet-Gaudelus I, Naehrlich L, et al. A phase 3, double-blind, parallel-group study to evaluate the efficacy and safety of tezacaftor in combination with ivacaftor in participants 6 through 11 years of age with cystic fibrosis homozygous for F508del or heterozygous for the F508del-CFTR mutation and a residual function mutation. *J Cyst Fibros.* 2021;20(1):68-77. doi:10.1016/j.jcf.2020.07.023
- [32] Flume PA, Biner RF, Downey DG, et al. Long-term safety and efficacy of tezacaftor-ivacaftor in individuals with cystic fibrosis aged 12 years or older who are homozygous or heterozygous for Phe508del CFTR (EXTEND): an open-label extension study [published correction appears in *Lancet Respir Med.* 2021 Apr;9(4):e38]. *Lancet Respir Med.* 2021;9(7):733-746. doi:10.1016/S2213-2600(20)30510-5

- [33] Simon HR. Cystic fibrosis: Treatment with CFTR modulators. Evidence-Based Clinical Decision Support System| UpToDate | Wolters Kluwer. 29.11.2022. Dostęp 26.01.2023. https://www.uptodate.com/contents/cystic-fibrosis-treatment-with-cftr-modulators?search=tezakaftor-iwakaftor&source=search_result&selectedTitle=2~15&usage_type=default&display_rank=1
- [34] Lumacaftor/ivacaftor for cystic fibrosis. *Aust Prescr.* 2019;42(5):170-171. doi:10.18773/austprescr.2019.058
- [35] Wainwright CE, Elborn JS, Ramsey BW, et al. Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *N Engl J Med.* 2015;373(3):220-231. doi:10.1056/NEJMoa1409547
- [36] Ratjen F, Hug C, Marigowda G, et al. Efficacy and safety of lumacaftor and ivacaftor in patients aged 6-11 years with cystic fibrosis homozygous for F508del-CFTR: a randomised, placebo-controlled phase 3 trial [published correction appears in *Lancet Respir Med.* 2017 Aug;5(8):e28]. *Lancet Respir Med.* 2017;5(7):557-567. doi:10.1016/S2213-2600(17)30215-1
- [37] McNamara JJ, McColley SA, Marigowda G, et al. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of lumacaftor and ivacaftor combination therapy in children aged 2-5 years with cystic fibrosis homozygous for F508del-CFTR: an open-label phase 3 study. *Lancet Respir Med.* 2019;7(4):325-335. doi:10.1016/S2213-2600(18)30460-0
- [38] Rowe SM, McColley SA, Rietschel E, et al. Lumacaftor/Ivacaftor Treatment of Patients with Cystic Fibrosis Heterozygous for F508del-CFTR. *Ann Am Thorac Soc.* 2017;14(2):213-219. doi:10.1513/AnnalsATS.2016.09-689OC
- [39] Deeks ED. Lumacaftor/Ivacaftor: A Review in Cystic Fibrosis. *Drugs.* 2016;76(12):1191-1201. doi:10.1007/s40265-016-0611-2
- [40] Elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor for cystic fibrosis. *Aust Prescr.* 2021; 44(4):137-138. doi:10.18773/austprescr.2021.031
- [41] Keating D, Marigowda G, Burr L, et al. VX-445-Tezacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis and One or Two Phe508del Alleles. *N Engl J Med.* 2018;379(17):1612-1620. doi:10.1056/NEJMoa1807120
- [42] Middleton PG, Mall MA, Dřevínek P, et al. Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor for Cystic Fibrosis with a Single Phe508del Allele. *N Engl J Med.* 2019;381(19):1809-1819. doi:10.1056/NEJMoa1908639

- [43] Heijerman HGM, McKone EF, Downey DG, et al. Efficacy and safety of the elxacaftor plus tezacaftor plus ivacaftor combination regimen in people with cystic fibrosis homozygous for the F508del mutation: a double-blind, randomised, phase 3 trial [published correction appears in *Lancet*. 2020 May 30;395(10238):1694]. *Lancet*. 2019;394(10212):1940-1948. doi:10.1016/S0140-6736(19)32597-8
- [44] Interpelacja nr 5104 do ministra zdrowia w sprawie objęcia refundacją produktu leczniczego Kaydeco (iwakaftor) w ramach programu lekowego "Leczenie mukowiscydozy (ICD-10 E84)". 24.04.2020. <https://www.sejm.gov.pl/Sejm9.nsf/InterpelacjaTresc.xsp?key=BPAHMM>
- [45] Refundacja modulatorów CFTR w Polsce. Dostęp 25.03.2022. <https://infomuko.ptwm.org.pl/medycyna/refundacja-modulatorow-cftr-w-polsce/>
- [46] Urlik M, Stącel T, Latos M, et al. Results of Lung Transplantations Among Cystic Fibrosis Patients: A Single-Center Study. *Transplant Proc*. 2022;54(4):1082-1085. doi:10.1016/j.transproceed.2022.02.056
- [47] Leki przyczynowe w mukowiscydozie – zasady realizacji programu lekowego. Dostęp 16.02.2022. <https://ptwm.org.pl/pl/aktualnosci/321>

ZASTOSOWANIE METOD UCZENIA MASZYNOWEGO W ANALIZIE WYNIKÓW WYBRANYCH OBIEKTYWNYCH BADAŃ SŁUCHU

Nikodem Pietrzak, Jakub Roman, Wiktoria Haberko,
Przemysław Bugajski, Daniel Gondko

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

Abstrakt: Złożoność procedur, nieustanny rozwój wiedzy w obrębie nauk medycznych oraz ilość pacjentów wymagających opieki stanowi ogromne wyzwanie w codziennej praktyce lekarskiej. Jednocześnie równoległy rozwój nauk informatycznych stwarza pole dla implementacji technik bazujących na sztucznej inteligencji w celu usprawnienia oraz ułatwienia pracy personelu medycznego. Diagnostyka otologiczna stanowi jedną z dziedzin, gdzie zastosowanie takich metod jest opisywane przez autorów publikacji. Obiektywne badania słuchu (OBS) stanowią jedno z jej podstawowych narzędzi. Do metod tych należą m.in.: badania słuchowych potencjałów wywołanych z pnia mózgu, tympanometria oraz badanie otoemisji akustycznych. Pomimo istotnej wartości klinicznej tych metod, analiza ich wyników często wymaga wieloletniego doświadczenia klinicznego oraz również jest czasochłonna. Wykorzystanie metod uczenia maszynowego (ang. machine learning, ML), jest nieustannie testowane na polu wielu nauk. W przyszłości mogą one wspomóc specjalistów w diagnostyce otologicznej. Celem niniejszego opracowania jest przedstawienie możliwości usprawnienia praktyki lekarskiej przy użyciu najnowszych rozwiązań sztucznej inteligencji oraz przegląd aktualnych badań i ich wyników nad zastosowaniem ML w analizie wyników obiektywnych badań słuchu. Autorzy przeprowadzili przegląd literatury za pośrednictwem bazy publikacji naukowych PUBMED stosując słowa kluczowe: (i) *auditory brainstem response machine learning*, (ii) *tympanometry machine learning*, (iii) *otoacoustic emission machine learning*. Zastosowano wytyczne PRISMA dla przeglądów systematycznych. Do przeglądu włączono 10 publikacji. Badacze wykazują wysoką trafność diagnoz oraz interpretacji wyników stawianych przez algorytmy ML. Jednakże metody te wymagają dalszego opracowania oraz rozwoju w celu zapewnienia wysokiej jakości i bezpieczeństwa procesu terapeutycznego w przyszłości.

Słowa kluczowe: uczenie maszynowe, obiektywne badania słuchu, otologia, niedosłuch

Abstract: The complexity of procedures, the continuous development of knowledge within the medical sciences and the number of patients requiring care pose a huge challenge in the daily practice of medicine. At the same time, the parallel development of information sciences creates a field for the implementation of techniques based on artificial intelligence to improve and facilitate the work of medical personnel. Otological diagnostics is one of the fields where the application of such methods is described by the authors of the publications. Objective hearing tests are one of its basic tools. These methods include brainstem auditory evoked potentials, tympanometry and acoustic otoemission testing. Despite the significant clinical value of these methods, analysis of their results often requires years of clinical experience and can also be time-consuming. The use of machine learning (ML) methods is constantly being tested in the field of many sciences. In the future, they may assist specialists in otologic diagnosis. The purpose of this paper is to present the possibility of improving medical practice using the latest artificial intelligence solutions and to review current research and its results on the application of ML in the analysis of objective hearing test results. The authors conducted a literature review through the PUBMED scientific publications database using the keywords (i) "auditory brainstem response machine learning", (ii) "tympanometry machine learning", (iii) "otoacoustic emission machine learning". PRISMA guidelines for systematic reviews were applied. Ten publications were included in the review. Researchers show high accuracy of diagnoses and interpretation of results made by ML algorithms. However, these methods need further elaboration and development to ensure high quality and safety of the therapeutic process in the future.

Keywords: machine learning, objective hearing testing, otology, hearing loss

1. WSTĘP

Na przestrzeni ostatnich lat pojawia się trudna do zliczenia ilość nowych doniesień o zastosowaniu uczenia maszynowego (ang. machine learning ML) w wielu gałęziach medycyny. Powierzchnowe przeszukanie bazy danych PUBMED z użyciem słów kluczowych „*machine learning*”, zawartych w tytule lub abstrakcie, ukazuje ponad 80 tys. publikacji naukowych poświęconych tej tematyce, wprowadzanych do bazy przez ostatnie 20 lat. Tym samym na okres lat 2018-2023 przypada ich prawie 70 tys. Można zatem wysunąć, iż zainteresowanie tematyką zastosowania technik uczenia maszynowego w naukach okołomedycznych rośnie wręcz logarytmicznie.

Poprzez uczenie maszynowe rozumiemy złożone algorytmy, posiadające zdolność samodoskonalenia się, tzn. proces rozwoju oraz poprawy ich działania przebiega automatycznie w trakcie analizy eksponowanych danych – dokładne mechanizmy funkcjonowania algorytmów są bardzo różnorodne i stanowią istotny element nauk informatycznych poświęconych sztucznej inteligencji. W założeniu ingerencja czynnika ludzkiego w procesie samouczenia jest minimalizowana do niezbędnego poziomu. Jednakże w procesie „trenowania algorytmu” stopień takich działań zależy od rodzaju zastosowanej metody ML oraz od ogólnej ich tendencji do „przeuczenia”

(ang. overfitting), skutkującej najczęściej wynikami fałszywie dodatnimi (ang. false positive FP). Proces analizy jest nadzorowany przez ekspertów dziedziny, w której zaimplementowano daną technikę uczenia maszynowego. Algorytmy ML budują model matematyczny w procesie automatycznego samo-uczenia, na podstawie którego podejmują one samodzielne decyzje – w postaci min. matematycznych wniosków, prognoz, jak i również diagnoz ^[1]. To właśnie ten kluczowy element stanowi szansę i możliwość rozwoju oraz usprawnienia procesów diagnostycznych, jak i terapeutycznych na polu medycyny, poprzez zwiększenie efektywności, wydajności, obniżenie kosztów oraz zmniejszenie ilości błędów w pracy lekarza.

W opublikowanym przez Singh H *et al.* raporcie z 2014 odnajdziemy informacje, iż rocznie, 5% stawionych diagnoz przez amerykańskich lekarzy jest błędna. Mowa tutaj o liczbie około 12 mln poszkodowanych osób ^[2]. „Towarzystwo na Rzecz Poprawy Diagnostyki w Medycynie” (ang. Society to Improve Diagnosis in Medicine SIDM) szacuje roczną liczbę zgonów pacjentów spowodowanych tym faktem w przedziale 40-80 tys. osób ^[3]. Autorzy zwracają uwagę, że istotnymi czynnikami odpowiadającymi za obecny stan rzeczy są: dostępność optymalnych metod diagnostycznych oraz terapeutycznych, czas oczekiwania na procedury medyczne, koszty diagnostyki oraz leczenia, jak i alarmujący niedobór personelu medycznego. Zastosowanie metod usprawniających oraz ułatwiających procesy diagnostyczno-terapeutyczne może stanowić szansę na poprawę wyników pracy opieki zdrowotnej na świecie, na każdym wymienionym powyżej polu.

Jedną z gałęzi medycyny, gdzie od niedawna, pojawiają się doniesienia na temat implementacji technik ML jest diagnostyka otologiczna. Dane WHO szacują, że obecnie około 1,5 mld osób na świecie boryka się z problemem niedosłuchu, gdzie 430 mln to osoby z niepełnosprawnością indukowaną tym zaburzeniem ^[4]. Stanowi to ogromne wyzwanie diagnostyczne oraz terapeutyczne dla specjalistów dziedziny otolaryngologii. Celem niniejszego rozdziału jest przybliżenie tematu diagnostyki obiektywnej zaburzeń słyszenia oraz dokonanie przeglądu najnowszych doniesień oraz publikacji o zastosowaniu metod ML w analizie wyników obiektywnych badań słuchu.

2. WPROWADZENIE DO WYBRANYCH ZAGADNIENÍ AUDIOLOGII

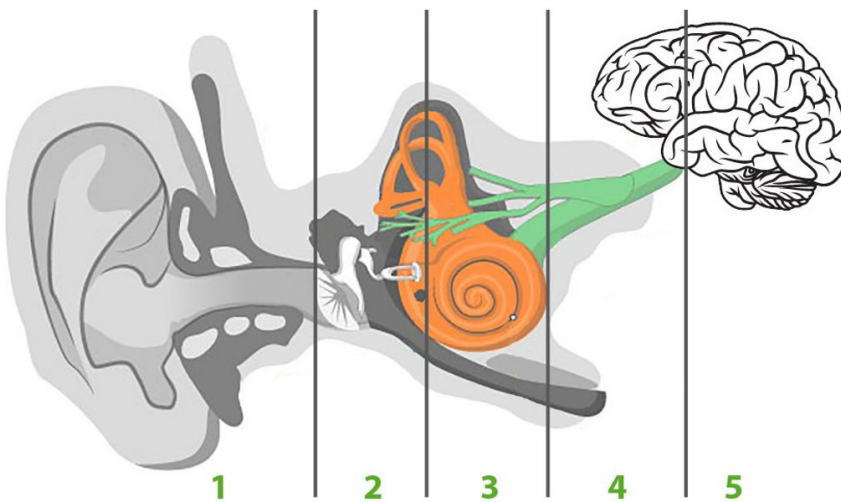
Audiologia stanowi dziedzinę medycyny zajmująca się obszarem diagnostyki i leczenia zaburzeń zmysłu słuchu. Podrozdział ten stanowi merytoryczne

wprowadzenie do wybranych zagadnień z tej dziedziny, które jest niezbędne dla poprawnej interpretacji, dokonanego przez autorów rozdziału, przeglądu.

2.1. Niedosłuch

Ubytek słuchu jest stanem chorobowym, którego częstość występowania i stopień nasilenia wzrasta wraz z wiekiem. Jest to częściowe lub całkowite, przejściowe lub stałe, jak również nabyte lub wrodzone zaburzenie zmysłu słuchu^[5]. Populacja dotknięta niedosłuchem jest rozległa, ponieważ problem ten dotyczy noworodków, jak i pacjentów w podeszłym wieku, a w grupie osób 70+ jest niemal wszechobecna^[6].

Fizjologiczny proces słyszenia (Rycina 1.) polega na skupieniu oraz przewodzeniu fali akustycznej poprzez ucho zewnętrzne do ucha środkowego (1), gdzie energia fali dźwiękowej zostaje wzmocniona mechanicznie i przekazana w postaci drgań kosteczek słuchowych do ucha wewnętrznego (2). Jest to miejsce reinterpretacji energii fali akustycznej na impuls nerwowy (3) – przekazywany następnie nerwem ślimakowym (składową NCVIII) (4) drogą słuchową do ośrodków korowych odpowiedzialnych za analizę słyszalnego dźwięku (5)^[7].



Rycina 1. Schemat drogi fizjologicznego procesu słyszenia – podział numeryczny odpowiada odniesieniom tekstowym^[8]

Niedosłuch, ze względu na patomechanizm, możemy podzielić na: *przewodzeniowy*, *odbiorczy* lub *mieszany*^[6].

Niedosłuch *przewodzeniowy* wynika z zakłóceń w przekazywaniu fal dźwiękowych poprzez ucho zewnętrzne do ślimaka. Do najczęstszych jego przyczyn należą m.in. anatomiczne wady ukształtowania małżowiny usznej, ciała obce w przewodzie słuchowym, dysfunkcja pracy łańcucha kosteczek słuchowych oraz wysiękowe zapalenia ucha środkowego.

Ubytek słuchu typu *odbiorczego* zwykle wynika z problemów z przekazywaniem bodźców w ślimaku lub za nim ^[9]. Ubytek ten może być związany z dysfunkcją komórek rzęsatych narządu Cortiego lub zaburzeniu samego NC VIII. Główną różnicą pomiędzy tymi dwoma rodzajami ubytków słuchu, poza cechami patofizjologicznymi, jest to, że pacjenci z *przewodzeniowym* ubytkiem słuchu odbierają dźwięki w sposób zmniejszony, podczas gdy pacjenci z zaburzeniem typu *odbiorczego* odbierają dźwięki zmniejszone, jak i również zniekształcone.

Mieszany ubytkiem słuchu nazywamy stan wywołany nałożeniem różnych czynników patologicznych pochodzących z obu powyższych zaburzeń ^[6].

2.2. Wybrane obiektywne badania słuchu

Badania diagnostyczne w zakresie audiologii, w literaturze naukowej nazywane również audiometrią, pozwalają wcześniej i z wysoką precyzją wykryć wadę słuchu bez względu na wiek badanej osoby. Poza dziedziną otolaryngologii stosowane są one również w diagnostyce anestezjologicznej, paliatywnej oraz neurologicznej. Badania słuchu możemy podzielić na subiektywne i obiektywne. Subiektywne badania słuchu stanowią podstawę powszechnej diagnostyki chorób słuchu, ale z racji na ich metodykę wymagają one współpracy z kontaktowym oraz przytomnym pacjentem. Badania obiektywne (OBS) w przeciwieństwie do subiektywnych przeprowadzane samodzielnie przez specjalistów z zastosowaniem odpowiedniej aparatury. Metody audiometrii obiektywnej są szczególnie wartościowe w badaniu słuchu niemowląt, protetyce małych dzieci oraz osób dorosłych osób nieprzytomnych lub niewspółpracujących. Istotnym zastosowaniem tych metod jest diagnostyka głuchot czynnościowych i stanów chorobowych słuchu, m.in. dla rozróżnienia patologii w lokalizacji ślimakowej od pozaślimakowej ^[10]. Specyfika tego rodzaju badań, w przeciwieństwie do metod subiektywnych, stwarza pole dla implementacji technik uczenia maszynowego – w tym przypadku wynikiem badania jest najczęściej informacja zawarta w zapisie liczbowym, przez to, w przeciwieństwie do wyniku badań subiektywnych, jego analiza

może nie wymagać interpretacji dokonywanej przez specjalistę, oczywiście przy założeniu wysokiego bezpieczeństwa oraz trafności diagnostycznej metod automatycznych.

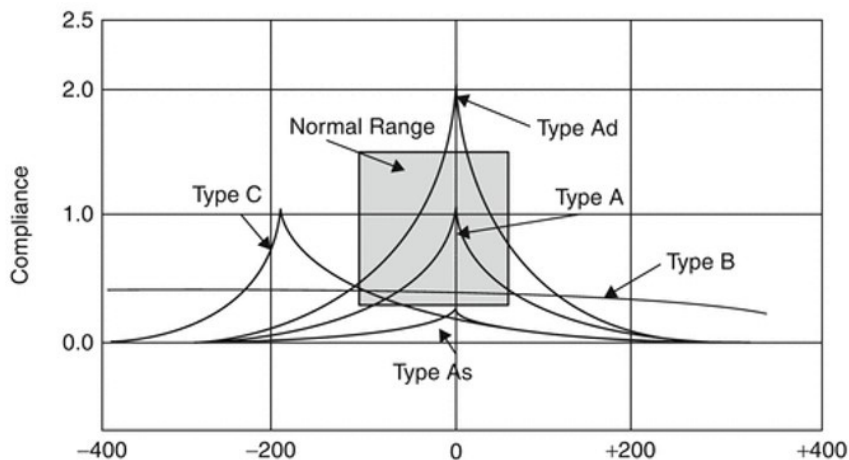
Obiektywne metody badania słuchu dzieli się na 3 grupy:

- Audiometria odruchowa (ang. reflex audiometry RA), w której wykorzystuje się rejestrację odruchów powstałych pod wpływem bodźców akustycznych. Zawiera ona m.in. podgrupę badań audiometrii impedancyjnej do której należą: tympanometria, pomiar podatności błony bębenkowej, pomiar impedancji akustycznej układu przewodzącego ucha i rejestracje odruchów z mięśni śródusznych;
- Audiometria odpowiedzi elektrycznych (ang. electric response audiometry ERA), w tym przypadku diagnostyka odbywa się poprzez rejestracje i analizę zjawisk elektrycznych, w każdym odcinku drogi słuchowej, które to powstają na skutek stymulacji bodźcem akustycznym ucha. Grupa ta jest podzielona w zależności od lokalizacji rejestrowanych zjawisk elektrycznych, m.in. badanie słuchowych potencjałów wywołanych z pnia mózgu (ang. auditory brainstem response ABR)
- Pomiar emisji otoakustycznej (ang. otoacoustic emission OAE) oparte na fizjologicznym zjawisku emisji dźwięków przez ucho wewnętrzne w odpowiedzi na bodziec akustyczny – (ang. evoked otoacoustic emission EOAE) lub spontanicznie – otoemisja akustyczna spontaniczna (ang. spontanically otoacoustic emission SOAE) ^[10,11].

Poniżej opisane zostały metody obiektywne zawarte w przeglądzie.

2.2.1. Tympanometria

Badanie tympanometryczne (ang. tympanometry TM) polega na badaniu podatności błony bębenkowej w zależności od zmian ciśnienia w przewodzie słuchowym zewnętrznym. Metoda ta pozwala m.in. wyznaczyć ciśnienie w uchu środkowym, dzięki temu jesteśmy w stanie ocenić stan ucha środkowego: sztywność układu kosteczek (przy występowaniu otosklerozy lub tympanosklerozy), istnienie bezpowietrzności lub płynu w jamie bębenkowej (w przewlekłej niedrożności trąbki słuchowej lub w stanach pozapalnych). Na tympanogramach oceniane są trzy parametry: wysokość krzywej, wierzchołek oraz kształt. Analiza tych parametrów umożliwia przyporządkowanie wyniku badania do jednego z typów (Rycina 2.):

Rycina 2. Typy tympanogramów ^[12]

- Typ A, to rodzaj tympanogramu stanowiący fizjologię. Na podstawie tego typu krzywej możemy określić ciśnienie, podatność oraz gradient jako unormowany. Pojemność ucha nie przekracza 2,5 cm³, a odruchy z mięśnia strzemiączkowego są obecne. Jednakże tego rodzaju tympanogram może występować u osób z głuchotą typu odbiorczego.
- Typ B, to krzywa płaska. W tym przypadku ciśnienie, podatność oraz gradient są obniżone, a niekiedy trudne do oceny przez specjalistę. Jeśli mamy do czynienia z perforacją to pojemność ucha może przekraczać 2,5 cm³. Brak jest odruchów z mięśnia strzemiączkowego. Typ ten jest charakterystyczny dla zapaleń wydzielniczych i zrostowych w uchu środkowym, całkowitej niedrożności ucha środkowego lub trąbki słuchowej, wynikającej np. z przerośnięcia migdała gardłowego u dzieci. Również wczesne stadium nowotworu jamy nosowo-gardłowej wychodzącego z zachyłka gardłowego może doprowadzić do jednostronnego tympanogramu typu B.
- Typ C, to sytuacja, w której krzywa jest przesunięta w lewo na tympanogramie. Oznacza to obecność podciśnienia w uchu środkowym. Podatność może być obniżona lub w normie, a gradient krzywej jest zazwyczaj unormowany. Pojemność nie przekracza 2,5 cm³. Obecne są odruchy z mięśnia strzemiączkowego. Typ C tympanogramu odpowiada następującym stanom klinicznym takim jak, przewlekła niedrożność trąbki słuchowej, zrostowe zapalenie błony bębenkowej, infekcje górnych dróg oddechowych oraz przerost III migdałka.

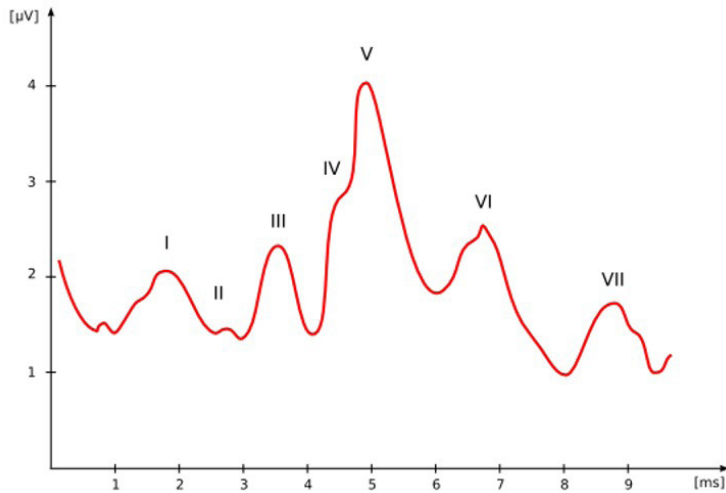
- Typ As odróżnia od Typu A lekkie spłaszczenie krzywej (z obecnością wierzchołka), co wskazuje na obniżenie podatności i gradientu. Możliwy brak odruchów z mięśnia strzemiączkowego dotyczy dorosłych pacjentów z otosklerozą. U niektórych dzieci stanowi on fizjologię.
- Typ Ad to sytuacja, w przypadku której mamy do czynienia z krzywą podobną do Typu A, ale wyższą od niej, przez co często trudno jest wyznaczyć jej wierzchołek. Wskazuje to na podwyższenie podatności oraz gradientu. W przypadku perforacji błony pojemność ucha może przekraczać 2,5cm³. Brak jest odruchów z mięśnia strzemiączkowego. Typ Ad koreluje z wystąpieniem u osoby badanej barotraumaty lub w przypadku przerwania ciągłości kosteczek słuchowych.

Badanie tympanometryczne, mimo względnie prostej metody oraz często charakterystycznych przebiegu krzywych, posiada swoje ograniczenia interpretacyjne. Jedną z takich sytuacji jest *otitis media secretoria*, gdzie możemy wyróżnić typ przejściowy tympanogramu typu B i C sprawiający często problemy interpretacyjne. W przypadku otosklerozy, powszechnego schorzenia ucha środkowego, interpretacja tympanogramu jest skomplikowana i czasochłonna, przez co wymaga dużego doświadczenia od specjalisty ^[11,13,14].

2.2.2. Słuchowe potencjały wywołane z pnia mózgu

W codziennej diagnostyce klinicznej czułość słuchu oceniana jest za pomocą wywiadu lekarskiego oraz z zastosowaniem metod audiometrii subiektywnej. Jednakże w przypadku noworodków, bardzo małych dzieci lub osób w stanie nieświadomości specjaliści stosują badania elektrofizjologiczne. Jest to jedno z badań należących do grupy ERA. Podczas tego badania oceniana jest oddzielnie czynność poszczególnych odcinków drogi słuchowej oraz pnia mózgu. Stanowi ono również istotną pomoc przy diagnostyce zaburzeń rozwojowych. Badanie słuchowych potencjałów wywołanych działa na zasadzie analizy wywołanych potencjałów, charakterystycznych dla różnych pięter drogi słuchowej, które to powstają jako odpowiedź na podawane do ucha bodźce akustyczne. Obecnie, najczęściej, wykorzystywanym badaniem jest badanie słuchowych potencjałów wywołanych z pnia mózgu. Zapis badania ABR polega na obecności 7-8 fali, wraz z wierzchołkami, dla których ustalany jest próg wyzwolenia poprzez bodziec akustyczny. Wyznaczenie najniższej

intensywności bodźca, przy którym możliwa jest rejestracja fali V, stanowi podstawę oceny czułości słuchu badanego ^[15].



Rycina 3. Uproszczony zapis ABR ^[16].

- Fala I ~ 1,9 ms, pochodzi z dystalnej części nerwu słuchowego,
- Fala II ~ 3 ms, pochodzi proksymalnej części nerwu słuchowego,
- Fala III ~ 4 ms, pochodzi z jąder ślimakowych,
- Fale IV ~ 5,2-6 ms, powstaje w zespole oliwki górnej, trudno jest ją rozdzielić z falą V, ponieważ dość często występują w tym samym czasie nakładając się. Fala V pochodzi ze wstęgi bocznej oraz wzgórek dolnego pokrywy śródmózgowia. Obecność fali V jest najistotniejsza, ponieważ powstaje ona nawet dla bardzo małych bodźców, u wszystkich ludzi,
- Fala VI ~ 7,6 ms, pochodzi z ciała kolankowatego przyśrodkowego wzgórza,
- Fala VII ~ 9 ms, pochodzi z promienistości słuchowej w kresomózgowiu.

Amplituda i miejsce występowania poszczególnych fal nie zależy od siły bodźca, ani od stanu czuwania i snu ^[14,15].

Na podstawie badania ABR możemy szacować niedosłuch do wartości 95-110 dB HL, w zależności od rodzaju wykorzystywanego przez nasz urządzenia diagnostycznego.

Metoda ta posiada ograniczone zastosowanie w ocenie zaburzeń ucha środkowego oraz wewnętrznego w przypadku nałożenia się ich na uszkodzenie drogi słuchowej lub ośrodków w OUN ^[14].

Prawidłowa analiza badania ABR jest możliwa, tylko jeśli technik oraz specjalista diagnostyk posiadają duże doświadczenie. Badanie to jest podatne na zakłócenia powodowane przez szumy elektryczne powstałe na skutek rejestracji potencjałów miogennych oraz artefaktów ruchowych, co może wpływać na czas, ale również na trafność interpretacji klinicznej.

Naves et. al. zbadali zgodność oceny badania ABR przez czterech niezależnych badaczy o różnym stopniu doświadczenia klinicznego. Opierając się na analizie wykresów Blanda-Altmana stwierdzili wysoką zgodność interpretacji wyniku ABR między badaczami. Wysłanęli wniosek, iż liczba lat doświadczenia w opisywaniu ABR nie była najistotniejszym czynnikiem różniącym badaczy, mimo że jeden z badaczy z najmniejszym doświadczeniem popełnił kilka istotnych klinicznie błędów. Badacze zidentyfikowali kilka potencjalnych czynników wpływających na różnice w interpretacji wyników między badaczami: (i) błędne wykrycie szczytu fali ABR podczas ręcznego procesu analizy danych; (ii) brak standaryzacji podczas procesu identyfikacji pików fali; oraz (iii) błędy spowodowane przenoszeniem danych z oprogramowania badania do arkusza kalkulacyjnego ^[17]. Na podstawie powyższej analizy możemy przypuszczać, że wprowadzenie zaawansowanych algorytmów opartych na metodzie uczenia maszynowego oraz zastosowaniu automatyzacji procesu diagnostycznego jako narzędzia pomocniczego w praktyce diagnostycznej lekarzy, może zminimalizować ryzyko błędów spowodowanych czynnikiem ludzkim oraz ułatwić proces diagnostyczny.

2.2.3. Badanie otoemisji akustycznych

Otoemisja akustyczna, nazywana również emisją otoakustyczną jest kolejną obiektywną metodą diagnostyczną stosowanych w audiologii. Metoda ta pozwala na wykrycie niedosłuchu odbiorczego pochodzenia ślimakowego. Otoemisja akustyczna od 2002 roku jest w Polsce przesiewowym badaniem słuchu. Działanie OAE opiera się na zjawisku fizjologicznym na emisji przez ucho wewnętrzne dźwięków w odpowiedzi na bodziec akustyczny lub spontanicznie. Słaby sygnał emitowany jest poprzez ucho wewnętrzne do środowiska zewnętrznego skąd rejestrowany jest za pomocą aparatu do pomiaru OAE.

Za emisję dźwięków w uchu wewnętrznym odpowiedzialne są komórki rzęstate. Przez to OAE jest miarą czynności ślimaka. W sposób nieinwazyjny umożliwia ona ocenę jego działania. Metoda OAE jest wykorzystywana w diagnostyce: nagłej głuchoty, uszkodzenia słuchu spowodowane hałasem, głuchot uwarunkowanych oraz innych niedosłuchów wrodzonych.

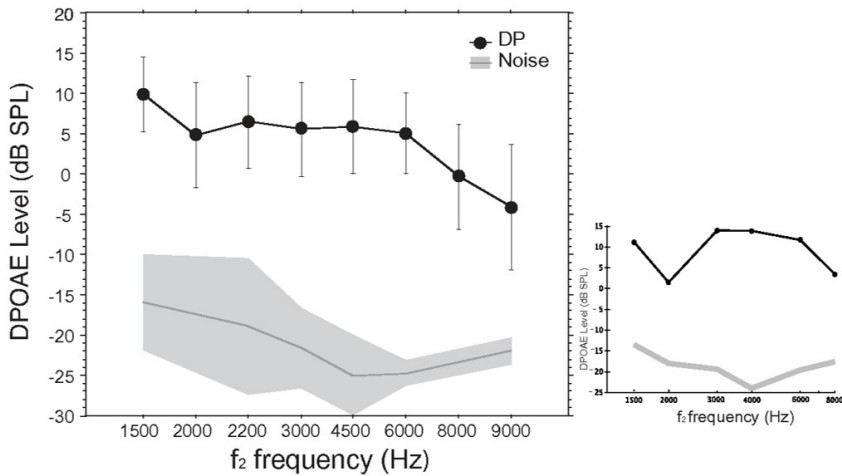
Jest stosowana również w diagnostyce zaburzeń słuchu wynikających z neuropatii i mikroangiopatii cukrzycowej, kolagenoz, czy też głuchoty starczej.

Metody otoemisji możemy podzielić na dwie podstawowe grupy:

- Otoemisja akustyczna spontaniczna (ang. spontaneous otoacoustic emission SOAE), która to występuje bez żadnej stymulacji ślimaka. Ten rodzaj otoemisji ma ograniczone zastosowanie, gdyż nie występuje u wszystkich zdrowych osób. Najczęściej rejestruje się ją pomiędzy 10. a 30. rokiem życia, także później. Wraz z wiekiem liczba osób, u których można zarejestrować SOAE znacznie spada. SOAE występują głównie w paśmie 1–3 kHz, ale spotyka się je także w szerszym zakresie: 0,5–9 kHz.
- Otoemisje akustyczne wywołane (ang. evoked otoacoustic emissions EOAE) – są one rejestrowane u 95–100% zdrowej populacji. Wyróżnia się kilka typów EOAEs, w zależności od rodzaju bodźca wywołującego:
 - a) przejściowe (ang. transiently-evoked o.e. TEOAE), wywoływane najczęściej przez bodziec akustyczny w postaci trzasku, dużo rzadziej ton krótki. rejestruje się ją rzadziej, co jest związane z powolnymi zmianami starczymi w ślimaku. Rejestracja TEOAE związana jest z częstotliwością zastosowanego trzasku: im jest ona wyższa tym odpowiedź pojawia się szybciej. Powtarzalność stanowi istotną cechę przejściowych OAE, jeśli wynosi ona >75% uznaje się to badanie za wiarygodne.
 - b) emisje produktów zniekształceń nieliniowych (ang. distortion product o.a.e DPOAE) do pobudzenia których stosuje się 2 tony czyste o różnych częstotliwościach.

DPOAE oraz TEOAE są jednymi z najczęściej stosowanych otoemisji w celu diagnostyki niedosłuchu. Wynik badania DPOAE przedstawiany jest w postaci wykresu nazywanego DP-gramem (Rycina 4.). Interpretacja badań z zakresu OAE jest jednak czasochłonna.

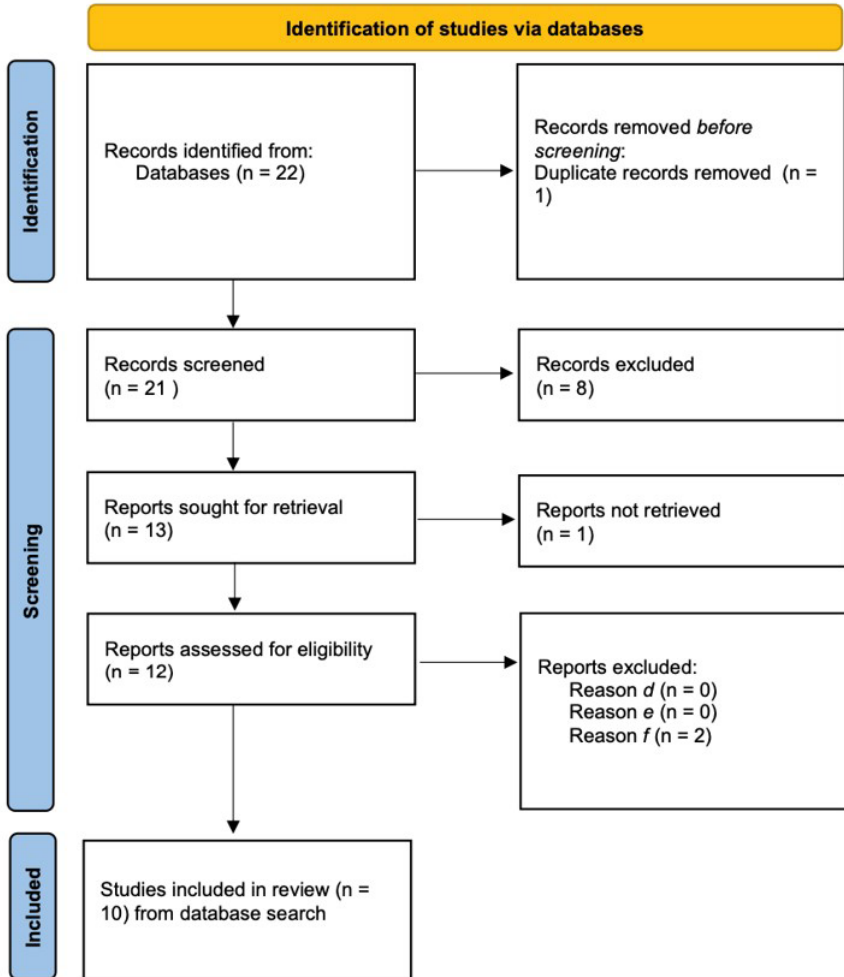
 - c) emisje wywołane sygnałem sinusoidalnym (ang. stimulus-frequency o.a.e. SFOAE), wywoływane poprzez użycie czystego tonu o określonej częstotliwości.
 - d) emisje wywołane bodźcem elektrycznym (ang. electrically-evoked o.a.e. EEOAE), wywoływane za pośrednictwem stymulacji elektrycznej ^[14,19].

Rycina 4. Przykładowy DP-gram zdrowego pacjenta ^[18]

3. MATERIAŁ I METODY

Dnia 6/3/2023 autorzy dokonali przeglądu literatury naukowej za pośrednictwem bazy PUBMED stosując słowa kluczowe (i) auditory brainstem response machine learning”, (ii) "tympanometry machine learning", (iii) "otoacoustic emission machine learning". Zastosowano uproszczone wytyczne PRISMA dla przeglądów systematycznych (Rycina 5.). Znalaziono 13 publikacji powiązanych z i, 5 z ii oraz 4 z iii. Z przeglądu usunięto duplikaty (1 sztuka).

Zastosowano następujące kryteria włączające: *a.* Prace oryginalne, prace przeglądowe oraz opisy przypadków, *b.* Tematyka prac dotycząca zastosowaniu technik uczenia maszynowego w wybranych obiektywnych badaniach słuchu, tj. badanie potencjałów wywołanych z pnia mózgu, tympanometria, badanie otoemisji akustycznych, *c.* Publikacje w języku polskim lub angielskim oraz kryteria wyłączające: *d.* Doniesienia konferencyjne, listy do redakcji czasopism, *e.* Prace starsze niż 20 lat, *f.* Badania opracowane na modelach zwierzęcych. Dwóch autorów dokonało niezależnego przeglądu wyłonionych w pierwszym etapie tytułów i abstraktów publikacji (n=21). Do dalszego przeglądu włączono 10 prac w języku polskim lub angielskim spełniających kryteria.



Rycina 5. PRISMA 2020 *flow diagram*

Poza przeglądem, w rozdziale uwzględniono pozostałe referencje (n=19) w celu zapewnienia niezbędnych podstaw merytorycznych.

4. WYNIKI PRZEGLĄDU

Poniżej przedstawione zostały wyniki przeglądu dla użytych przez autorów słów kluczowych (Tabela 1.). Podkreślić jednak należy, że poza badaniem ABR dostępne piśmiennictwo w zakresie stosowania metod sztucznej inteligencji w innych badaniach obiektywnych jest skąpe.

Tabela 1. Wyniki przeglądu

| Przegląd zastosowanych technik ML w wybranych OBS | | | | | | | | | |
|---|------|--------------------------|----------------|--------------------------|--|---------------|---------------|---|---|
| Autorzy | Rok | Próba | Rodzaj badania | Rodzaj metody ML | Cel badania | Wyniki | | | Uwagi/Ograniczenia |
| | | | | | | Członość | Swobitość | Trafniość/inne parametry | |
| Sundgaard JV et al. | 2022 | 1014 pomiarów | TM | CNN | Wykrywanie zapaleń ucha środkowego metodami ML; | 92,20% | 92,90% | ACC: 92,60% AUC: 0,97 F1-score: 92,60% | Algorytm nie posiada możliwości rozróżnienia typu zapalenia ucha środkowego; |
| Nie L et al. | 2022 | 135 pomiarów; 135 os. | TM | CNN | Automatyzacja diagnostyki otosklerozy; | b.d. | b.d. | AUC: 0,97 ±0,01 F1-score: 94% ±1,60% | Wyniki poprawiono poprzez systemy powiększania danych i strategie uczenia się poprzez prezentowanie; |
| McKearney RM et al. | 2022 | 27 os. | ABR/EEG | RF, SE, LSTM, MP | Szkolenie i testowanie algorytmów uczenia maszynowego w wykrywaniu potencjalów ABR w badaniu EEG; | b.d. | b.d. | Algorytm SE wykazał się największą trafnością diag. | Badania wymagają ewaluacji poprzez zwiększenie grupy badanej; |
| Wimalaratna H et al. | 2021 | 136 os. | ABR | SVM, RF, DT, GB, Xgboost | Porównanie najlepszej metody ML do metod statystycznych; Określenie odpowiedniej techniki ML w celu automatyzowania analizy ABR; | b.d. | b.d. | ACC: 92% dla Xgboost | Największą trafność diag. uzyskała technika ML Xgboost; |
| McKearney RM et al. | 2019 | 232 pomiarów | ABR | DCNN (LSTM) | Wykorzystanie technik ML w celu obiektywnej klasyfikacji sprawnego i fałd odpowiadającego "niejednolitej" lub "brak odpowiedzi"; | 92,90% | 96,40% | ACC: 92,90% | Badania wymagają ewaluacji poprzez zwiększenie grupy badanej; |
| Chen C et al. | 2020 | 614 pomiarów | ABR | BiLSTM | Skrócenie czasu oraz wsparcie procesu diagnostycznego przy zastosowaniu metody ML; | b.d. | b.d. | ACC: 92,91% dt: 0,05 s | Badania wymagają ewaluacji poprzez zwiększenie grupy badanej; |
| McCullagh P et al. | 2007 | 550 pomiarów; 85 os. | ABR | NR, SVM-LP, KStar | Zastosowanie technik ML w klasyfikacji wzorów fał ABR; | 93,10% dla NB | 86,30% dla NB | ACC: 83,40% dla NB | Największą trafność diag. uzyskała technika ML NB; |
| Liu Y et al. | 2021 | 957 pomiarów | SFOAE | SVM, k-Im, BPNN, DT, RF | Przewidywanie stanu sluchu w oparciu o modele ML; | b.d. | b.d. | AUC: 0,93-0,99 dla 0,50-8 kHz | Przyszłe badania powinny skupić się na dalszej poprawie dokładności i skróceniu czasu badania w celu zwiększenia użyteczności klinicznej; |
| Liu YW et al. | 2020 | 30 os. | TEOAE | SVM | Użycie technik ML w celu znalezienia parametrów predykcyjnych dla ubytku sluchu w przebiegu choroby Ménière'a. | b.d. | b.d. | ACC: >80% | Badania wymagają ewaluacji poprzez zwiększenie grupy badanej. |

Słownik

Próba: os. – osoby; Rodzaj badania - patrz podrozdz. 2.4; Rodzaj metody ML - patrz podrozdz. 4; Wyniki: b.d. – brak danych; ACC (ang. accuracy) – trafność; AUC (ang. area under curve) – parametr pola powierzchni pod krzywą; F1-score – parametr wydajności F1-score; dt. (ang. detection time) – czas detekcji.

Sundgaard JV *et al.* zaproponowali automatyczny algorytm diagnostyczny do wykrywania zapalenia ucha środkowego na podstawie pomiarów tympanometrii szerokopasmowej. Opracowana przez nich konwencjonalna sieć neuronową (ang. convolutional neural network CNN) do klasyfikacji zapalenia ucha środkowego na podstawie analizy szerokopasmowego tympanogramu wykazała wysoką wydajność w zakresie ogólnego wykrywania zapalenia ucha środkowego z dokładnością 92,6%, po walidowaniu. Nie jest ona jednak w stanie odróżnić poszczególnych typów zapalenia ucha środkowego. Badanie autorów ukazuje fakt, że algorytmy ML umożliwiają automatyczną diagnostykę zapalenia ucha z wysoką trafnością, co może stać się cennym narzędziem diagnostycznym w przyszłości [20].

Otoskleroza jest częstą chorobą ucha środkowego prowadzącą do unieruchomienia łańcucha kosteczek słuchowych. Diagnostowana jest ona z użyciem metod tympanometrycznych, jednakże interpretacja surowych danych powstałych na skutek przeprowadzenia badania jest skomplikowana i czasochłonna. Autorzy Nie L *et al.* w 2022 roku zaproponowali zastosowanie algorytmu CNN w kategoryzacji wyników badania TM. Zaimplementowany przez nich algorytm osiągnął wysoką wydajność, ocenianą parametrem F1-score, równą 94%, po walidacji. Uzyskane przez nich wyniki mają istotne znaczenie dla rozwoju diagnostyki audiologicznej. Rozwój proponowanych przez nich metod ma szansę skrócić oraz uprościć diagnostykę otosklerozy w przyszłości [21].

W 2020 roku Wimalarathna H *et al.* opublikowali przegląd dotyczący zastosowania różnych technik sztucznej inteligencji, w tym metod ML, w badaniach słuchowych potencjałów wywołanych z pnia mózgu. Przedstawione przez nich doniesienia o zastosowaniu technik ML z przeglądu autorów wykazywały co najmniej 90% trafność diagnostyczną w klasyfikacji badania ABR. Warto zaznaczyć, że w pierwszych badaniach z 1991 opartych na pionierskiej, ale prostej sieci neuronalnej (ang. neural network NN), będącej jedną z technik uczenia maszynowego, trafność diagnostyczna została ustalona po walidacji na 74,9% [22]. Przegląd autorów, z racji na rodzaj publikacji jaką stanowi, nie został uwzględniony w tabeli.

Głównym celem badań McKearney RM *et al.* w 2022 roku było wyszkolenie i przetestowanie algorytmów uczenia maszynowego, aby były one w stanie dokonać automatycznej detekcji, czy dane EEG zawierają odpowiedź słuchowego pnia mózgu (ABR), czy nie. Wyszkolili oni w tym celu cztery rodzaje algorytmów ML: *random forest* (RF), *stacked esamble* (SE), sieć konwolucjonalna z pamięcią długotrwałą (ang. long short-term memory network

LSTM) oraz perceptron wielowarstwowy (ang. multilayer perceptron MP). Po przeprowadzonych przez nich treningu algorytmów ML oraz walidacji, najlepszym okazał się SE – osiągnął on wysoką swoistość, specyficzność oraz trafność. Implementacja tego rodzaju algorytmu umożliwia kilkudziesięciokrotne przyspieszenie diagnostyki w badaniu ABR. Jednakże zalecają oni dalszą ocenę możliwości modelu przy użyciu dużej kohorty [23].

Wimalarathna H *et al.* w 2021 roku postawili hipotezę, iż techniki uczenia maszynowego (ML) mogą być odpowiednim podejściem do zautomatyzowania interpretacji ABR i zmniejszenia czynnika błędu ludzkiego. Postawili sobie za cel dobranie najodpowiedniejszego algorytmu do kwalifikacji wyników badania ABR. Spośród metod *support vector machines* (SVM), RF, *decision trees* (DT), *gradient boosting* (GB), *extreme gradient boosting* (Xgboost) oraz NN – technika ML oparta na algorytmie Xgboost wykazała największą trafność, rzędu 92%, po walidacji. Obecnie nie istnieje żadna aplikacja oparta na ML, służąca do oceny badań przesiewowych dzieci z zaburzeniami słuchu, na skutek czego autorzy oczekują, że ich publikacja przyspieszy proces wdrażania użycia technik ML w codziennej pracy audiologów. Badacze postulują również, iż wykorzystanie metod ML w przyszłości może stanowić istotne wsparcie przy identyfikacji nieprawidłowości neurologicznych w badaniu ABR [24].

Rozwój badań nad sztuczną inteligencją zwiększa zdolności klasyfikacyjne algorytmów ML. W 2019 roku McKearney *et al.* zaproponowali algorytm klasyfikacyjny DCNN (ang. deep convolutional neural network) cechujący się 92,9% trafnością, 92,9% czułością oraz 94,6% swoistością, po przeprowadzonym procesie walidacji. Jest on oparty na metodzie LSTM, która to działa na zasadzie wielowarstwowej weryfikacji przetwarzanej informacji, operacja (zawarta w algorytmie) ma za zadanie decydować, które informacje dalej przetwarzać, a które powinny zostać odrzucone, dzięki czemu system taki, w procesie uczenia maszynowego, ma zdolność osiągnięcia wysokiej trafności diagnostycznej i minimalizuje ryzyko nałożenia się błędu wynikającego z artefaktów [25].

Chen C *et al.* w 2021 roku zaproponowali użycie dwukierunkowej sieci bineuralnej (ang. bidirectional-long short-time memory Bi-LSTM) dla analizy badań ABR. Ten typ sieci neuronalnej opiera się na wielowarstwowym mechanizmie samo uczenia sieci neuronalnej, w celu analizy i usprawnienia interpretacji wyników badania ABR. Dwukierunkowa sieć neuronalna (Bi-LSTM) różni się od LSTM, tym, że dane analizowane są przez algorytm „w obie strony”, oznacza to, że w tym samym czasie reinterpretowane są dane

wejściowe (z „przeszłości”) zależnie od zmian spowodowanych przez wprowadzanie kolejnych danych (z „przyszłości”), a nie działa tylko wstecznie, jak to w przypadku algorytmów typu LSTM. Taki system jest bardziej zaawansowany od jednokierunkowego, a proces nauki maszynowej bardziej dokładny. Tak skonstruowany algorytm wykazał dużą oporność na zakłócenia, wykazywał również szybki czas detekcji dla poszczególnych danych, średnio 0,05 s, a trafność diagnostyczna osiągnęła 92,91% dla walidowanych danych [26].

McCullagh *P et al.* również zbadali rolę uczenia maszynowego dla klasyfikacji wzorców w badaniu ABR. Autorzy porównali cztery metody klasyfikacji nadzorowanej: naïve bayes (NB), SVM-MP i *KStar*. Największą walidowaną dokładność klasyfikacji na poziomie 83,4% uzyskano przy użyciu metody NB [27].

Badania przeprowadzone przez zespół Liu Y *et al.* w 2021 roku miały na celu maksymalne zwiększenie zdolności emisji otoakustycznych o częstotliwości bodźca (ang. stimulus-frequency otoacoustic emissions SFOAE) do przewidywania stanu słuchu i progów w oparciu o modele uczenia maszynowego. Badacze zastosowali 5 różnych technik uczenia maszynowego: SVM, *k-nearest neighbour* (k-nn), *back propagation neural network* (BPNN), DT, RF do budowy modeli klasyfikacyjnych identyfikujących stan słuchu badanych pacjentów oraz modeli regresyjnych dla predykcji progów słyszenia. Zaproponowana przez nich metoda diagnostyczna, z dołączeniem technik uczenia maszynowego, wykazała się dużą dokładnością predykcji niedosłuchu. SFOAE wykorzystujące metody ML, według autorów publikacji, oferują obiecujące narzędzia do predykcji zdolności słyszenia, przynajmniej w zakresie 0,5-4 kHz. Przyszłe badania powinny skupić się na dalszej poprawie dokładności, by zwiększyć użyteczność i możliwość zaproponowanej metody w powszechnej praktyce klinicznej [28].

Fluktuacyjny ubytek słuchu jest charakterystyczny dla choroby Ménière'a (MD) podczas ostrych epizodów. Brak jest jednak wiarygodnych audiometrycznych cech charakterystycznych, które pozwoliłyby przewidzieć możliwość wycofania niedosłuchu. Autorzy Liu YW *et al.* postawili sobie za cel stworzenie narzędzia diagnostycznego umożliwiającego znalezienie parametrów predykcyjnych dla wystąpienia niedosłuchu w przebiegu choroby MD. Zastosowali oni implementacje metody SVM w badaniu TEOAE. Powyższa technika osiągnęła walidowaną krzyżowo trafność ponad 80% w przewidywaniu wyników słuchowych. Przeprowadzone przez autorów badanie wykazało, że bazowe parametry TEOAE uzyskane podczas ostrych epizodów MD, przetworzone za pomocą technologii uczenia maszynowego, mogą dostarczyć

informacji na temat funkcji komórek rzęsatych, co może stanowić przydatne narzędzie do przewidywania odzyskania słuchu ^[29].

5. PODSUMOWANIE

Metody sztucznej inteligencji i uczenia maszynowego mogą mieć duży wpływ na przyszłość diagnostyki audiologicznej. Przy użyciu tych technologii, możliwe jest szybkie przetwarzanie dużych zbiorów danych, dzięki czemu diagnozowanie może stać się bardziej precyzyjne i skuteczne. Algorytmy uczenia maszynowego są w stanie analizować złożone zjawiska i wykrywać subtelne różnice w danych, co może pomóc w wykryciu trudnych do zidentyfikowania problemów słuchowych.

Zastosowanie sztucznej inteligencji i uczenia maszynowego może również przyspieszyć proces diagnozowania, co z kolei prowadzi do szybszego dostępu pacjentów do odpowiedniego leczenia. Automatyzacja procesu diagnozowania może również zmniejszyć obciążenie pracy personelu medycznego i zapewnić skuteczniejsze wykorzystanie czasu i zasobów.

Jednakże, przy rozwoju tych technologii, konieczne jest zachowanie ostrożności i przestrzeganie odpowiednich przepisów dotyczących prywatności danych oraz etyki. Kluczowe jest również to, aby systemy oparte na sztucznej inteligencji i uczeniu maszynowym były kalibrowane i weryfikowane poprzez badania na coraz większych grupach pacjentów.

Mnogość prac poświęconych tematyce metod uczenia maszynowego w klasyfikacji badań ABR, innowacyjne badania nad zastosowaniem technik ML w diagnostyce TM i OAE oraz widoczny wzrost trafności diagnostycznej w czasie wraz ze stosowaniem coraz to bardziej skomplikowanych algorytmów dowodzi, że doświadczenia pozyskane z badań na tym polu mogą zostać przeniesione, w przyszłości, na inne badania obiektywne, stosowane nie tylko w dziedzinie otoneurologii.

REFERENCJE

- [1] Rajkomar A, Dean J, Kohane I. Machine Learning in Medicine. *New England Journal of Medicine*. 2019;380(14):1347-1358. doi:10.1056/NEJMra1814259

- [2] Singh H, Meyer AND, Thomas EJ. The frequency of diagnostic errors in outpatient care: estimations from three large observational studies involving US adult populations. *BMJ Quality & Safety*. 2014;23(9):727. doi:10.1136/bmjqs-2013-002627
- [3] Society to Improve Diagnosis in Medicine. <https://www.improvediagnosis.org/what-is-diagnostic-error> Accessed: 6/3/2023
- [4] Geneva: World Health Organization. World report on hearing; Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Published online 2021.
- [5] Cruickshanks KJ, Tweed TS, Wiley TL, et al. The 5-Year Incidence and Progression of Hearing Loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003;129(10):1041. doi:10.1001/archotol.129.10.1041
- [6] Zahnert T. The Differential Diagnosis of Hearing Loss. *Dtsch Arztebl Int*. Published online June 24, 2011. doi:10.3238/arztebl.2011.0433
- [7] National Research Council (US) Committee on Disability Determination for Individuals with Hearing Impairments, Dobie R, Van Hemel S. Hearing Loss: Determining Eligibility for Social Security Benefits. In: *Basics of Sound, the Ear, and Hearing*. National Academies Press (US); 2004:2.
- [8] Adapted from BRANDvital. Przyczyny niedosłuchu – utrata słuchu odbiorcza i przewodzeniowa. <https://www.brandvital.eu/niedosluch-i-aparaty-sluchowe/przyczyny-niedosluchu/> Accessed: 6/3/2023
- [9] Isaacson JE, Vora NM. Differential diagnosis and treatment of hearing loss. *Am Fam Physician*. 2003;68(6):1125-1132.
- [10] Hoth S, Baljić I. Current audiological diagnostics. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg*. 2017;16:Doc09. doi:10.3205/cto000148
- [11] Onusko E. Tympanometry. *Am Fam Physician*. 2004;70(9):1713-1720.
- [12] Adapted from Nakayama JR, Ramsey MJ. Tympanometry. In: Kountakis SE, ed. *Encyclopedia of Otolaryngology, Head and Neck Surgery*. Springer Berlin Heidelberg; 2013:2905-2909. doi:10.1007/978-3-642-23499-6_742
- [13] Bredfeldt RC. An introduction to tympanometry. *Am Fam Physician*. 1991;44(6):2113-2118.
- [14] Pruszewicz A. *Audiologia Kliniczna - Zarys*. 4th ed. UM Poznań; 2010.
- [15] Young A, Cornejo J, Spinner A. *Auditory Brainstem Response*. StatPearls Publishing LLC; 2022.

- [16] Adapted from Raczynski S. Zapis ABR based on drawings from book “Fizjologia człowieka z elementami fizjologii stosowanej i klinicznej” by many authors. https://pl.wikipedia.org/wiki/Słuchowe_potencjały_wywolane_pnia_mózgu#/media/Plik:ABR.png Accessed: 6/3/2023
- [17] Naves KF, Pereira AA, Nasuto SJ, Russo IP, Andrade AO. Assessment of inter-examiner agreement and variability in the manual classification of auditory brainstem response. *Biomed Eng Online*. 2012;11(1):86. doi:10.1186/1475-925X-11-86
- [18] Adapted from Shera CA, Abdala C. Otoacoustic emissions — Mechanisms and Applications. <https://www.semanticscholar.org/paper/otoacoustic-emissions—Mechanisms-and-Applications-Shera-Abdala/8f947cbcd9245976ea7e9e2f1529eccf0a3b6648> Accessed: 6/3/2023
- [19] Young A, Ng M. *Otoacoustic Emissions*. StatPearls Publishing LLC; 2022.
- [20] Sundgaard JV, Bray P, Laugesen S, et al. A Deep Learning Approach for Detecting Otitis Media From Wideband Tympanometry Measurements. *IEEE J Biomed Health Inform*. 2022;26(7):2974-2982. doi:10.1109/JBHI.2022.3159263
- [21] Nie L, Li C, Marzani F, Wang H, Thibouw F, Grayeli AB. Classification of Wideband Tympanometry by Deep Transfer Learning With Data Augmentation for Automatic Diagnosis of Otosclerosis. *IEEE J Biomed Health Inform*. 2022;26(2):888-897. doi:10.1109/JBHI.2021.3093007
- [22] Wimalarathna H, Ankmnal-Veeranna S, Allan C, et al. Machine learning approaches used to analyze auditory evoked responses from the human auditory brainstem: A systematic review. *Comput Methods Programs Biomed*. 2022;226:107118. doi:10.1016/j.cmpb.2022.107118
- [23] McKearney RM, MacKinnon RC. Objective auditory brainstem response classification using machine learning. *Int J Audiol*. 2019;58(4):224-230. doi:10.1080/14992027.2018.1551633
- [24] Wimalarathna H, Ankmnal-Veeranna S, Allan C, et al. Comparison of machine learning models to classify Auditory Brainstem Responses recorded from children with Auditory Processing Disorder. *Comput Methods Programs Biomed*. 2021;200:105942. doi:10.1016/j.cmpb.2021.105942

- [25] McKearney RM, Bell SL, Chesnaye MA, Simpson DM. Auditory Brainstem Response Detection Using Machine Learning: A Comparison With Statistical Detection Methods. *Ear Hear.* 2022;43(3):949-960. doi:10.1097/AUD.0000000000001151
- [26] Chen C, Zhan L, Pan X, et al. Automatic Recognition of Auditory Brainstem Response Characteristic Waveform Based on Bidirectional Long Short-Term Memory. *Front Med (Lausanne).* 2021;7. doi:10.3389/fmed.2020.613708
- [27] McCullagh P, Wang H, Zheng H, Lightbody G, McAllister G. A comparison of supervised classification methods for auditory brainstem response determination. *Stud Health Technol Inform.* 2007;129(Pt 2):1289-1293.
- [28] Liu Y, Xu R, Gong Q. Maximising the ability of stimulus-frequency otoacoustic emissions to predict hearing status and thresholds using machine-learning models. *Int J Audiol.* 2021;60(4):263-273. doi:10.1080/14992027.2020.1821252
- [29] Liu YW, Kao SL, Wu HT, Liu TC, Fang TY, Wang PC. Transient-evoked otoacoustic emission signals predicting outcomes of acute sensorineural hearing loss in patients with Ménière's disease. *Acta Otolaryngol.* 2020;140(3):230-235. doi:10.1080/00016489.2019.1704865

PROBLEM ZWŁÓKNIENIA WĄTROBY U PACJENTÓW PEDIATRYCZNYCH PO TRANSPLANTACJI – PERSPEKTYWA PRZESZCZEPU MIKROBIOMU KAŁOWEGO

Natalia Zawronek, Barbara Sławińska, Wiktoria Sokołowska,
Maja Kruplewicz, Karolina Kruk, Wojciech Jaworski

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

Abstrakt: Istotny postęp ostatnich lat w zakresie transplantacji wątroby u pacjentów pediatrycznych umożliwił zauważalne zwiększenie przeżywalności i powodzenia przeszczepów. Pomimo to, większość dziecięcych biorców jest w perspektywie długoterminowej narażona na postępujące włóknienie transplantatu. Celem niniejszego rozdziału jest przybliżenie tego problemu - etiopatogenezy, czynników ryzyka i aktualnego postępowania. W dalszej części, po przeanalizowaniu literatury dotyczącej przeszczepu mikrobiomu kałowego dostępnej w bazach medycznych PubMed oraz Google Scholar, przedstawiono nadzieje wiązane z tą metodą w aspekcie zapobiegania potransplantacyjnej fibrogenzie wątroby. Na tej podstawie został sformułowany wniosek mówiący o niewykorzystanym potencjale terapeutycznym FMT w procesie włóknienia wątroby po przeszczepie u dzieci i ogromnym zapotrzebowaniu na dalsze badania w zakresie jej bezpieczeństwa i skuteczności dla pacjentów pediatrycznych.

Słowa kluczowe: zwłóknienie, wątroba, mikrobiom, transplantologia, pediatria

Abstract: Significant progress in recent years in the field of pediatric liver transplantation has enabled a noticeable increase in patient survival and transplant success. Nevertheless, most pediatric organ recipients are at the risk of progressive transplant fibrosis in the long term. The purpose of this chapter is to present this problem, including its etiopathogenesis, risk factors, and current management. Based on an analysis of the literature on fecal microbiome transplantation available in the PubMed and Google Scholar medical databases, this chapter presents the potential of this method in preventing post-transplant liver fibrosis. The conclusions focus on the untapped therapeutic potential of FMT in the process of liver fibrosis after transplantation in children, and the need for continuing research on its safety and efficacy for pediatric patients.

Keywords: fibrosis, liver, microbiome, transplantology, pediatrics

1. WSTĘP

Wątroba jest narządem o wielu niezwykle ważnych funkcjach. Bierze udział w syntezie cholesterolu, trójglicerydów, czynników krzepnięcia krwi czy angiotensynogenu. Metabolizuje węglowodany, aminokwasy i puryny. Stanowi magazyn dla witamin, żelaza i innych składników odżywczych [1]. Jej potencjał obejmuje także możliwość ponownego wzrostu po uszkodzeniu lub częściowym usunięciu [2].

Przeszczep wątroby jest standardową procedurą ratującą życie pacjentów pediatrycznych ze schyłkową niewydolnością wątroby, a ciągłe udoskonalanie technik chirurgicznych, leczenia immunosupresyjnego i opieki pooperacyjnej wpływa na systematyczny wzrost liczby wykonywanych transplantacji oraz ich długoterminowych wyników [3].

2. HISTORIA PRZESZCZEPÓW WĄTROBY

Historia przeszczepów wątroby u człowieka sięga roku 1963. W Denver, Thomas Starzl podjął się jako pierwszy transplantacji wątroby u trzyletniego pacjenta cierpiącego na atreżję dróg żółciowych. O niepowodzeniu tego zabiegu zdecydowały zaburzenia krzepnięcia i masywny krwotok, na skutek których w trakcie przeszczepienia dziecko zmarło [4]. Próby podejmowane przez kolejne 4 lata w Stanach Zjednoczonych kończyły się zgonem biorców w okresie pooperacyjnym. W 1967 roku Starzl i wsp. dokonali pierwszego zakończonego sukcesem przeszczepienia wątroby. Pacjentem był wówczas chory z zaawansowanym rakiem wątrobowokomórkowym, który zmarł dopiero po roku, na skutek nawrotu choroby [5].

Nieustanny postęp w zakresie wielu istotnych elementów tego zabiegu, m.in. leczenia immunosupresyjnego czy technik chirurgicznych, pozwolił po 16 latach od pierwszego zakończonego powodzeniem przeszczepienia uznać transplantację wątroby za formę leczenia [6]. Znaczny wzrost przeżycia pacjentów można było zaobserwować w roku 1989. Ponad połowa biorców dożywała od roku do nawet 5 lat po przeszczepie [7]. Niewątpliwym wpływem na dalsze zmniejszenie częstości odrzuceń przeszczepu miało zastosowanie cyklosporyny w leczeniu immunosupresyjnym przez Sir Roy Calne'a, a następnie zastąpienie jej przez tacrolimus [8-9]. Według Starzl i in. cyklosporyna podwyższyła 5-letnie przeżycia pacjentów do 70%, natomiast takrolimus nawet do 80% [10].

Historia udanych przeszczepów wątroby w Polsce ma swój początek w 1990 roku. Piotr Kaliciński wraz z Rudolfem Pichlmayer'em dokonali

transplantacji wątroby pacjentowi pediatrycznemu w Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie ^[11].

Aktualnie mija ponad 40 lat od pierwszego przeszczepu wątroby, a liczbę transplantacji wykonanych na świecie przez ten czas szacuje się na około 10 tysięcy. Nieustannie ulepszane techniki chirurgiczne, jak i leczenie immunosupresyjne oraz systematyczny wzrost liczby zabiegów i ośrodków, pozwalają obecnie na przeżycie przeszczepu i biorcy w pierwszym roku w 80-90% przypadków, a 5-letnim przeżyciem kończy się około 70-75% transplantacji ^[9].

3. WSKAZANIA DO PRZESZCZEPU WĄTROBY U DZIECI

Istnieje wiele wskazań do wykonania transplantacji wątroby u dzieci. Najczęstszym z nich jest atrezja dróg żółciowych, będąca przyczyną około połowy wszystkich wykonywanych przeszczepów. Upośledzone wydalanie żółci objawia się żółtaczką występującą już w okresie niemowlęcym ^[12]. Innymi schorzeniami należącymi do grupy cholestazy schorzeń wątroby, mogącymi prowadzić do jej niewydolności i będącymi poprzez to wskazaniami do przeszczepu są pierwotna rodzinna cholestaza wewnątrzwątrobowa (PFIC-progressive familial intrahepatic cholestasis), pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych czy zespół Alagille'a ^[13].

Kolejną grupę wskazań stanowią choroby metaboliczne, które w dużym stopniu wpływają na czynność wątroby. Należą tu między innymi takie schorzenia jak zespół Criglera-Najjara, zaburzenia cyklu mocznikowego, choroby spichrzeniowe glikogenu (typu III i IV), pierwotna hiperoksaluria czy choroba Wilsona ^[14].

Pacjenci pediatryczni z ostrą niewydolnością wątroby wymagają pilnej transplantacji, gdyż stale narażeni są na niezwykle szybkie pogorszenie stanu zdrowia ^[15]. Przyczyny mogą mieć różną etiologię - m.in. immunologiczną, polekową czy zakaźną, jednak w połowie przypadków jest ona nieustalona ^[16]. O złym rokowaniu świadczą takie parametry jak stężenie bilirubiny w surowicy >13,8 mg/dl, INR >4, wiek poniżej 2 lat oraz poziom leukocytów >9000/m³ ^[17].

Poza powyższymi wskazaniami, istotne okazują się także nowotwory wątroby, z powodu których według Sindhi, R. i in. wykonuje się od 5 do 10% ogółu przeszczepów wątroby u dzieci ^[18]. Zdecydowanie najczęściej występującym jest wątrobiak komórkowy, zwany inaczej hepatoblastomą, który wymaga całkowitej resekcji w celu długoterminowego przeżycia ^[19].

Rozmiar, lokalizacja lub inne cechy guza uniemożliwiający wykonanie tego radykalnego zabiegu wymuszają konieczność transplantacji wątroby po przedoperacyjnej chemioterapii [20].

Pediatriczny rak wątrobowokomórkowy (HCC) - znacznie częściej rozpoznawany w nastoletnim wieku, stanowi kolejne wskazanie do przeszczepienia [21]. Różni się on molekularnie od HHC dorosłych tym, że w większości przypadków rozwija się na prawidłowym tle wątrobowym i ma korzystniejsze rokowanie we wszystkich stadiach [22] - 5-letnie przeżycie po transplantacji osiąga 70-80% pacjentów [23]. Innym nowotworem wątroby dzieci, wymagającym interwencji transplantologicznej w przypadku nieresekcyjności, jest niezróżnicowany mięsak zarodkowy [24].

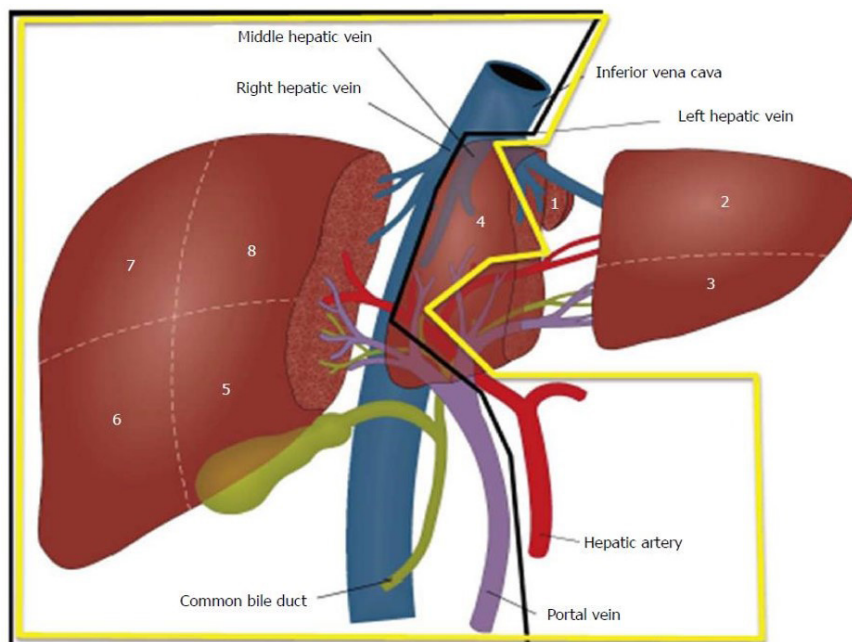
4. TECHNIKI PRZESZCZEPÓW WĄTROBY U DZIECI

Gwarancją udanego przeszczepu wątroby, zarówno u dzieci jak i u dorosłych, jest wybór narządu o odpowiedniej wielkości. Dla jak najdokładniejszej predykcji objętości przeszczepu stosuje się oszacowanie stosunku masy ciała dawcy do masy ciała biorcy (GRWR) [25]. Przeżycie biorcy oraz przeszczepu jest zmniejszone w sytuacji nie tylko zbyt niskiego (<0,7%), ale także zbyt wysokiego (>5%) GRWR. W pierwszym przypadku dochodzi do nadmiernego przepływu wrotnego, a co za tym idzie martwicy krwotocznej graftu, zaś w drugim głównymi problemami są zmniejszona perfuzja wrotna i utrudnione zamknięcie jamy brzusznej [26]. Ze względu na zbyt małą dostępność narządów dla biorców pediatricznych, konieczna była optymalizacja dostępnych przeszczepów – m.in. poprzez przeszczepianie fragmentu wątroby. Powszechnie znane są 3 techniki operacyjne [27].

4.1. Split liver transplantation

(SLT, przeszczep wątroby rozszczepionej/podzielonej)

Jedną z modyfikacji technik operacyjnych wykorzystywanych w transplantacji wątroby u dzieci jest SLT, której pionierem w 1988 roku był Rudolf Pilchmay'er. Polega ona na podziale przeszczepu umożliwiającym jego rozdział pomiędzy biorcą pediatricznego i dorosłego [28]. Biorca pediatriczny otrzymuje przeszczep lewego płata bocznego (LLL), natomiast prawy płat rozszerzony (eRL) dedykowany jest dla osoby dorosłej (rycina 1.) [29]. Zabieg ten jest niezwykle trudny i długotrwały, jednak ostatnie lata pokazały, że jego skuteczność nieustannie wzrasta, a wyniki SLT w porównaniu do przeszczepu całej wątroby są korzystne [30].



Rycina 1. Na rycinie linią żółtą przedstawiono sposób podziału wątroby do przeszczepu w technice SLT [<https://www.wjgnet.com/10079327/full/v24/i47/5312.htm?fbclid=IwAR3W0CLLqPKG02wwplE2RElWHB0KOnsxGni2LvM7GTsxzNL1wS7ZhrTwnNgM#F2>].

4.2. Reduced size liver transplantation

(RSLT, przeszczep wątroby o zredukowanym rozmiarze)

Przeszczep wątroby o zredukowanym rozmiarze polega na zmniejszeniu narządu pobranego od zmarłego dawcy. Istotną wadą tego typu transplantacji, mimo korzyści dla dziecięcych biorców, jest niepełne wykorzystanie wątroby dorosłego dawcy, a co za tym idzie zmniejszenie dostępności tego narządu dla oczekujących biorców dorosłych ^[31].

4.3. Living donor liver transplantation

(LDLT, przeszczep wątroby od żywego dawcy)

Zmniejszenie śmiertelności wśród pacjentów pediatrycznych oczekujących na transplantację nastąpiło dzięki przeszczepom wątroby od żywego dawcy. W latach 80. wynosiła ona około 40%, obecnie została zredukowana do 10% u niemowląt oraz 5% u dzieci starszych. W chwili obecnej około 30% dziecięcych biorców otrzymuje wątrobę od żywych dawców, co pozwoliło

na znaczne zmniejszenie niedoboru narządów. Dodatkowo LDLT umożliwiły transplantację wątroby u noworodków i niemowląt. Liczba wykonywanych zabiegów LDLT stale wzrasta ^[32].

5. POWIKŁANIA PRZESZCZEPU WĄTROBY U DZIECI

Obecnie obserwowany znaczny wzrost przeżywalności pacjentów pediatrycznych po przeszczepach wątroby zawdzięczany jest nieustannym ulepszeniom technik chirurgicznych, opieki pooperacyjnej czy immunosupresji ^[33]. Ten niewątpliwy sukces transplantologii pediatrycznej jest jednak przyćmiewany przez fakt, że większość dziecięcych biorców, pomimo zadowalających wskaźników krótko- i średnioterminowego przeżycia, w perspektywie długoterminowej wykazuje wiele powikłań, nie osiągając celu jakim jest "jeden przeszczep na całe życie" ^[34-35].

Do występujących najczęściej należą powikłania naczyniowe. Zakrzepica tętnicy wątrobowej (HAT-Hepatic artery thrombosis) wczesnego okresu pooperacyjnego, cechująca się dużą śmiertelnością, występuje znacznie częściej u pacjentów pediatrycznych niż u dorosłych ze względu na niewielką średnicę zespalanych naczyń ^[36]. Objawia się znacznym wzrostem bilirubiny, fosfatazy zasadowej i aktywności enzymów wątrobowych w surowicy ^[37]. HAT wiąże się z dużym ryzykiem wystąpienia niedokrwienia, z następczą martwicą dróg żółciowych, a także niepowodzenia przeszczepu na skutek niewydolności wątroby ^[38]. Zakrzepica żyły wrotnej (PVT-Portal vein thrombosis) u dzieci po przeszczepie wątroby spowodowana jest niewielką średnicą tego naczynia dawcy bądź biorcy, a także obecnością dużych naczyń krążenia obocznego ^[39]. Dzieci ze wczesną PVT potwierdzoną w badaniu ultrasonograficznym metodą Dopplera wymagają pilnej interwencji chirurgicznej, początkowo polegającej na usunięciu zakrzepu i rekonstrukcji naczynia, a w razie braku skuteczności tej metody, konieczna jest retransplantacja ^[40]. Późne PVT, rozwijające się ponad 30 dni od przeszczepu, charakteryzuje się mniej nasilonymi objawami na skutek obecności krążenia obocznego umożliwiającego kompensację ^[41].

Powikłanie w postaci utrudnionego odpływu krwi żyłnej z wątroby występuje u pacjentów pediatrycznych stosunkowo rzadko ^[42]. Rozwijający się zespół Budd-Chiarego cechuje się obrazem klinicznym hepatomegalii, masywnego wodobrzusza, obrzęków obwodowych i biegunki ^[43-44]. Leczenie tego powikłania obejmuje stentowanie żył wątrobowych, w ciężkich przypadkach konieczna może być retransplantacja ^[45].

Powikłania żółciowe według Nada A. Yazigi dotyczą około 10% dziecięcych biorców^[37]. Obejmują one wycieki żółci np. z miejsca zepolenia czy wprowadzenia drenu, które pojawiają się zdecydowanie częściej we wczesnym okresie po przeszczepie oraz zwężenia dróg żółciowych, będące zagrożeniem dla biorcy i rozwijające się nieco później^[46-47]. Leczenie z wyboru stanowi cholangiografia endoskopowa bądź przeszskórna^[48].

Grupa powikłań niechirurgicznych przeszczepu wątroby u dzieci jest niezwykle różnorodna. Obejmuje m.in. cukrzycę rozwijającą się dość szybko po transplantacji. Zmiany w schemacie leczenia immunosupresyjnego wpływają na jej odwracalność, dzięki czemu w perspektywie długoterminowej tylko niewielki odsetek dziecięcych biorców wymaga insulinoterapii^[49]. Wśród powikłań zakaźnych zdecydowanie najczęściej występującym patogenem jest cytomegalowirus (CMV-Cytomegalovirus), który objawia się ogólnym osłabieniem, bólami mięśni i stawów, gorączką, a także żółtaczką na skutek zapalenia wątroby^[50]. Ze względu na duże ryzyko odrzutu przeszczepu na skutek zakażenia CMV, konieczna jest pilna ocena wirerii przy każdym klinicznym podejrzeniu choroby. Zastosowanie profilaktyki w postaci walgancyklowiru u pediatrycznych biorców wątroby umożliwiła znaczną redukcję liczby zakażeń^[51]. Infekcje wczesnego okresu potransplantacyjnego mają z reguły charakter bakteryjny i są leczone szerokospektralną antybiotykoterapią^[52]. Przyczyną zgonu biorcy może być również nadciśnienie tętnicze z następczą dysfunkcją nerek, charakteryzujące się nierzadko ciężkim przebiegiem^[53]. Najlepsze korzyści przynosi zmniejszenie dawki bądź całkowite odstawienie inhibitorów kalcyneuryny oraz wdrożenie leczenia hipotensyjnego^[54].

Niezwykle ważne z punktu widzenia pediatrycznego biorcy wątroby jest zjawisko zahamowania wzrostu po transplantacji. Szczególnie istotny deficyt obserwowany jest u dzieci poniżej 5 roku życia w momencie przeszczepu. Choć po upływie roku, dzięki terapii ludzkim hormonem wzrostu jego niedobór nieco się zmniejsza, jest on mimo wszystko zauważalny w porównaniu do średniej populacyjnej^[55]. Zjawisko to ma związek z upośledzonym wchłanianiem pokarmów i niedożywieniem na skutek niewystarczającej syntezy białek wątrobowych przed przeszczepem oraz z dużą dawką immunosupresji konieczną w okresie potransplantacyjnym^[56]. Dzieciom po przeszczepie wątroby zalecana jest również suplementacja witaminy D, w celu zapobiegania złamań, będących skutkiem zaburzeń funkcjonowania osteoklastów i osteoblastów^[57].

Niezbyt częstym, jednak zdecydowanie ciężkim powikłaniem jest niepodjęcie czynności przez przeszczepioną wątrobę. Wieloczynnikowa etiologia wpływa na to, że postępowaniem z wyboru jest ponowna transplantacja [58].

6. ODRZUCANIE PRZESZCZEPU

Wiele powikłań po transplantacji wątroby u dzieci może prowadzić do odrzucenia narządu przeszczepionego. Odrzucaniem przeszczepu nazywamy odpowiedź immunologiczną organizmu biorcy na antygeny narządu dawcy. Ze względu na mechanizm odrzucania dzieli się ono na odrzucanie humoralne, w którym biorą udział przeciwciała (AMR- Antibody-mediated rejection), odrzucanie komórkowe, odbywające się za pomocą limfocytów T (TCMR-T cell mediated rejection) oraz na odrzucanie bogate w komórki plazmatyczne - z zapaleniem wątroby bogatym w plazmocyty lub autoimmunologicznym zapaleniem wątroby de novo. Ponadto, ze względu na czas po którym do niego dochodzi, odrzucanie można podzielić na ostre (z dalszym podziałem na AMR i TCMR) oraz na przewlekłe [59].

Przeprowadzone badania udowadniają powszechność odrzucania przeszczepu wątroby w pierwszym roku po transplantacji - dotyczy ono aż 26% pacjentów pediatrycznych [60]. Leczenie ostrego odrzucania jest znacznie bardziej skuteczne, większość pacjentów korzystnie odpowiada na sterydoterapię. Prawdziwe wyzwanie stanowi odrzucanie przewlekłe, znacznie trudniejsze i mniej skuteczne leczenie często kończy się koniecznością ponownej transplantacji [61].

7. ZWŁÓKNIENIE WĄTROBY PO PRZESZCZEPIE U PACJENTÓW PEDIATRYCZNYCH

Nieustanne innowacje i ulepszenia w opiece potransplantacyjnej i leczeniu immunosupresyjnym u dzieci po przeszczepie wątroby umożliwiły znaczne wydłużenie czasu przeżycia. Mimo to, znaczny odsetek pacjentów pediatrycznych jest narażony na niepowodzenie przeszczepu na drodze postępującego włóknienia wątroby. Według Ekong UD i wsp. problem dotyka aż 69-97% biorców [34]. Częstość występowania zwłóknienia przeszczepu wątroby u dzieci na podstawie różnych badań została przedstawiona w poniższej tabeli (tabela 1).

Tabela 1. Przedstawia częstość występowania zwłóknienia przeszczepu wątroby u dzieci w zależności od czasu po transplantacji na podstawie różnych badań [George, M., Paci, P., & Taner, T. (2020). Significance of progressive liver fibrosis in pediatric liver transplants: a review of current evidence. *World journal of gastroenterology*, 26(17), 1987]

| ref. | 1-2lata (%) | 3-5 lat (%) | 10 lat (%) |
|--|-------------|-------------|------------|
| Fouquet i wsp. ^[62] , 2005 | | | 73,0 |
| Evans i wsp. ^[35] , 2006 | 32,0 | 55,0 | 69,0 |
| Ekong i wsp. ^[34] , 2008 | | 97,0 | |
| Scheenstra i wsp. ^[63] , 2009 | 34,0 | 65,0 | 69,0 |
| Miyagawa-Hayashino i wsp. ^[64] , 2012 | | 84,0 | |
| Sanada i wsp. ^[65] , 2014 | 24,7 | 34,5 | |
| Sheikh i wsp. ^[66] , 2018 | | 2,0 | |

7.1. Etiopatogeneza

Etiopatogeneza zwłóknienia wątroby po przeszczepie u dzieci jest wieloczynnikowa. Włóknienie wątroby jest złożonym procesem cechującym się zaburzeniami w budowie i składzie macierzy zewnątrzkomórkowej ^[67]. Dochodzi do aktywacji komórek gwiazdzistych wątroby (HSC-Hepatic stellate cells), znajdujących się w przestrzeni okołozatokowej (sinusoidalnej) i ich przemianie z formy spoczynkowej do formy fenotypowej zbliżonej do miofibroblastów. Dzieje się tak w odpowiedzi na uszkodzenia hepatocytów lub stan zapalny ^[68]. Uszkodzenia komórek wątroby w następstwie mechanizmów immunologicznych bądź na podłożu infekcyjnym, powodują stymulację HSC poprzez uwalnianie substancji fibrogennych, reaktywnych form tlenu (ROS-reactive oxygen species) i rekrutację komórek odpornościowych ^[69]. HSC po aktywacji proliferują i rozpoczynają syntezę kolagenu, głównie typu 1 i 3, powodując remodeling macierzy zewnątrzkomórkowej. Dochodzi również do ich oddziaływania z sąsiadującymi komórkami, co przemawia za istotnym udziałem w potransplantacyjnym włóknieniu wątroby odporności nieswoistej dziecięcego biorcy. Według Connolly'ego i in. komórki dendrytyczne wątroby mają niewątpliwą związek z fibrogenzą wątroby, o czym świadczy ich znaczne namnożenie w czasie trwania procesu oraz zdolność bezpośredniej aktywacji HSC ^[70]. Komórki Kupffera sprzyjają proliferacji HSC oraz syntezie macierzy zewnątrzkomórkowej poprzez agregację komórek odpornościowych i interakcję z prozapalnymi cytokinami i ROS ^[71]. Na nasilenie

ich chemotaksji wpływają receptory Toll-podobne (TLR-Toll-like receptors), szczególnie TLR4 i TLR9. Markery aktywacji HSC obserwuje się również równocześnie z napływem leukocytów oraz na skutek syntezy fibronektyny lub aktywacji TGF- β (transforming growth factor beta, transformujący czynnik wzrostu beta) przez komórki sinusoidalne [72]. Zwłóknieniu wątroby po przeszczepie u dzieci sprzyja także IFN- λ , wpływając na fenotyp makrofagów i promując ich działanie prozapalne [73].

O udział w zwłóknieniu przeszczepionej wątroby podejrzewane jest również od niedawna przewlekłe odrzucanie za pomocą przeciwciał (cAMR-chronic antibody-mediated rejection), choć rzeczywista częstość występowania tej jednostki pozostaje nieznana, ze względu na niewykonywanie w wielu przypadkach badań immunohistochemicznych i pomiaru DSA (donor specific antibodies – przeciwciała swoiste dla dawcy), koniecznych dla potwierdzenia rozpoznania [64, 74]. Demetris i in. szacują występowanie cAMR u dzieci po transplantacji wątroby na 8-15% [59]. Przewlekłe odrzucanie z udziałem przeciwciał prowadzi do zwłóknienia wątroby najprawdopodobniej na drodze stanu zapalnego [75].

O predyspozycji pediatrycznego biorcy wątroby do wysokiego stopnia zwłóknienia świadczy również obecność allelu HLA-DRB1*03/04. Jest to rodzaj mimikry antygenowej, w której wspomniany allel promuje wadliwe przetwarzanie antygeny, na skutek czego dochodzi do niszczenia hepatocytów na drodze procesów immunologicznych [76].

7.2. Czynniki ryzyka

Istnieje wiele teorii dotyczących wpływu konkretnych czynników na postęp zwłóknienia wątroby u dzieci po przeszczepie, jednak nie są one unormowane. Scheenstra R i in. za predyktory zwłóknienia uważają młody wiek w czasie transplantacji, dużą różnicę wieku pomiędzy dawcą a biorcą oraz wydłużony czas zimnego niedokrwienia (CIT, cold ischaemic time) [63]. Peters PMJG i in. wskazują z kolei na powikłania żółciowe oraz nosicielstwo CMV przez biorcę [77]. Dodatkowo istnieją podejrzenia, że ryzyko zwłóknienia wątroby u dzieci rośnie wraz z czasem po transplantacji, a także że jest ono znacznie większe w obecności przeciwciał przeciwdądrowych oraz po częściowych przeszczepach wątroby [35]. Niezbędne są dalsze badania w kierunku czynników prognostycznych.

7.3. Stopnie zwłóknienia wątroby

Ocena histologiczna oraz klasyfikacja stopnia zwłóknienia wątroby u pacjentów pediatrycznych po transplantacji opiera się na systemie punktacji Metavir. Stopień postępu choroby, czyli jej aktywność (A) wyraża się w czteropunktowej skali - A0, A1, A2, A3, od braku po bardzo ciężką aktywność. Podobnie ocenia się stopień zwłóknienia narządu przeszczepionego (F) - skala jest pięciopunktowa, od braku zwłóknienia po marskość wątroby (F0-F4) [78].

Zasadniczy jest fakt, iż charakter procesu zwłóknienia wątroby jest dynamiczny, co pozwala na jego zahamowanie, a nawet odwrócenie, jednak bez możliwości uzyskania obrazu histologicznego sprzed zaistniałych zmian [79]. Zbyt długa ekspozycja na szkodliwe czynniki uniemożliwia regresję, ze względu na powstałe połączenia międzykolagenowe, cechujące się dużą trwałością [80].

7.4. Diagnostyka

Za złoty standard diagnostyki zwłóknienia wątroby u dzieci po transplantacji uznaje się ocenę histopatologiczną w protokołowej biopsji wątroby wykonywanej w określonych punktach czasowych okresu poprzszczepiennego. Pomimo faktu, że badanie to jest inwazyjne, wartość diagnostyczna w ocenie stanu przeszczepionego narządu oraz stosunkowo niskie ryzyko powikłań przemawiają na jego korzyść [81]. O niezbędności biopsji w wykrywaniu i ocenie zwłóknienia przeszczepu u długoterminowych pacjentów świadczy również fakt, że nierzadko postępujące zwłóknienie nie jest odzwierciedlone przez żadne z obecnych w surowicy markerów, a do dysfunkcji przeszczepu dochodzi dopiero w momencie znacznego zaawansowania zwłóknienia. Ponadto badanie to umożliwi kontrolę skuteczności wdrożonego leczenia immunosupresyjnego [82].

Przydatną metodą do przewidzenia zwłóknienia wątroby po transplantacji u pacjentów pediatrycznych jest oznaczanie α -SMA (α -smooth muscle actin, α -aktyna mięśni gładkich), której zwiększoną ekspresję obserwuje się na aktywowanych HSC, przed rozpoczęciem wydzielania włókien kolagenowych. Varma S. i in. w ostatnich badaniach wykazali bardzo wysoką skuteczność oraz specyficzność tej metody [83].

Odrębną grupę metod diagnostycznych zwłóknienia wątroby po przeszczepie u dzieci stanowią testy serologiczne. Fibrotest (FT) wykorzystuje

6 markerów biochemicznych oraz wiek i płeć pacjenta, aby na podstawie algorytmu obliczyć wynik mieszczący się w przedziale od 0 do 1, skorelowany ze stopniem włóknienia wątroby [84]. Test ELF (enhanced liver fibrosis - wzmocniony test zwłóknienia wątroby) opiera się na algorytmie łączącym PIIINP (procollagen III N-terminal propeptide, N-końcowy propeptyd kolagenu typu III), TIMP-1 (tkankowy inhibitor metaloproteiny 1) oraz kwas hialuronowy. Na jego podstawie możliwe jest określenie stopnia zwłóknienia wątroby z podziałem na łagodne, umiarkowane i ciężkie [85].

Do badań obrazowych wykorzystywanych w toku diagnostyki zwłóknienia wątroby po transplantacji pediatrycznej należą:

- elastografia przejściowa (TE- transient elastography) - umożliwia nieinwazyjną ocenę zwłóknienia wątroby przez pomiar jej sztywności przy użyciu FibroScanu® i odpowiedniej sondy pediatrycznej; metoda ta opiera się na mierzonej za pomocą ultrasonografii prędkości fali ścinającej wywołanej impulsami oraz na założeniu, że zwłóknienie powoduje zmniejszenie elastyczności badanego narządu i szybsze rozchodzenie się fali poprzecznej; TE jest badaniem bezpiecznym i dobrze tolerowanym przez pacjentów pediatrycznych, z jedynym ograniczeniem w postaci zniekształconych sygnałów w momencie, gdy przeszczep mieści się w linii środkowej ciała [85]; Vinciguerra i wsp. skłaniają się ku zmniejszeniu ilości protokołowych biopsji wątroby u dzieci na rzecz diagnostyki za pomocą elastografii przejściowej [86],
- impuls siły promieniowania akustycznego - według Tomita i wsp. ta oparta na ultradźwiękach nowoczesna metoda elastografii posiada wysoką skuteczność w rozpoznawaniu zwłóknienia przeszczepu wątroby u dzieci po LDLT [87]; polega ona na generowaniu fal ścinających przez tkankę po jej uprzednim pobudzeniu impulsem akustycznym i pomiarze ich prędkości, co ilościowo odzwierciedla sztywność tkanki (w m/s) [88].

Rezonans magnetyczny ze względu na swój potencjał w różnicowaniu zwłóknienia niższego i wyższego stopnia towarzyszącego chorobom wątroby, może w perspektywie lat również zostać wykorzystany do oceny przeszczepów u dzieci [89].

7.5. Postępowanie

Niezwykle ważne, a zarazem wyjątkowo problematyczne jest ustalenie skutecznego postępowania z pacjentami pediatrycznymi po przeszczepie wątroby, aby zapobiec progresji włóknienia. Najbardziej powszechną metodą jest zintensyfikowanie leczenia immunosupresyjnego z powodu korzystnego wpływu zwiększonego stężenia cyklosporyny A oraz takrolimusu na obecny w wątrobie stan zapalny, a w związku z tym także na włóknienie ^[90]. Sheikh i in. w swoim badaniu również potwierdzają dużą skuteczność tej metody - pediatryczni biorcy wątroby poddani analizie, dzięki nasileniu immunosupresji i utrzymywaniu w ciągu pierwszych pięciu lat okresu poprzyszczepiennego stężenia takrolimusu w granicach 5,8µg/l, uzyskali ponadprzeciętne wyniki - zwłóknienie przeszczepu po 5 latach wystąpiło jedynie u 2% badanych. Istotne wątpliwości takiego leczenia budzi jednak znacząca liczba powikłań stosowania leków immunosupresyjnych w dużych dawkach ^[66].

Zbadano również wpływ stosowania sterydoterapii w połączeniu z leczeniem immunosupresyjnym na włóknienie wątroby u dzieci po przeszczepie. Pomimo optymistycznych wyników dotyczących pierwszego roku po transplantacji, steroidowy schemat immunosupresji nie wpłynął na długotrwałe zahamowanie progresji włóknienia. Zatem początkowo dobrze zapowiadające się dla pacjentów pediatrycznych rozwiązanie, okazuje się nie przynosić korzystnych skutków w dłuższej perspektywie ^[91].

8. Przeszczep mikrobiomu kałowego a zwłóknienie po transplantacji wątroby u dzieci

Zwłóknienie wątroby po transplantacji u pediatrycznych biorców nie posiada w pełni wyjaśnionej przyczyny, co sprowadza się do pytania, w jaki zatem sposób postępować, aby uniknąć niepowodzenia przeszczepu na drodze progresywnego włóknienia. Istnieją poglądy dotyczące znaczącej roli mikrobioty jelitowej i wszelkich zmian w jej składzie oraz funkcji, w procesie fibrogenyzy po przeszczepie wątroby u dzieci. Metoda ta może z dużym prawdopodobieństwem posiadać potencjał terapeutyczny, dotychczas niewykorzystany w pediatrycznej transplantologii wątroby ^[92].

Mikrobiota jelitowa to ogromna liczba drobnoustrojów, która w przypadku jelita grubego oszacowana jest na 10^{14} , obejmująca głównie bakterie, ale również wirusy i grzyby. Symbiotyczne działanie mikroflory jelitowej z organizmem gospodarza przynosi wiele korzyści - między innymi w postaci

pobudzania układu odpornościowego w kontakcie z czynnikami chorobotwórczymi, produkcji witamin i hormonów, a także rozkładu wybranych składników pokarmowych i pozyskiwaniu składników odżywczych. Również utrzymywanie ciągłości błony śluzowej jelit oraz prawidłowe funkcjonowanie mózgu pozostaje pod jej wpływem ^[93]. Bakterie mikrobioty zasiedlające jelito grube stanowią aż 80% suchej masy kału i mają one znaczącą przewagę liczebną nad wirusami i grzybami. Skład poszczególnych drobnoustrojów jest dynamiczny, możliwy do modyfikacji przez czynniki takie jak sposób odżywiania, mechanizmy odpornościowe, warunki środowiskowe, antybiotykoterapię lub ewentualne powikłania po przeszczepie ^[94].

Pojęcie dysbiozy jelitowej, będące przeciwieństwem stanu eubiozy, odnosi się do zaburzeń w składzie oraz liczebności drobnoustrojów mikrobioty, obserwowanych w wielu powszechnie znanych chorobach, np. we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego, chorobie Leśniowskiego-Crohna czy też w cukrzycy. Dysbiozę cechuje spadek symbiotycznych a wzrost chorobotwórczych taksonów, bądź też zmniejszenie ich różnorodności ^[95]. Stan ten ma udowodniony wpływ na wybrane choroby wątroby, jak np. NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease, niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby) czy ALD (alcoholic liver disease – alkoholowa choroba wątroby) i jest podejrzany o udział w progresji fibrogenezy wątroby ^[96].

Wzajemną zależność pomiędzy mikroflorą jelita a wątrobą opisuje oś wątrobowo-jelitowa, w myśl której krew żyły wrotnej dostarcza produkty pochodzenia jelitowego do wątroby, natomiast żółć i przeciwciała transportowane są z wątroby do jelit. Niezwykle istotna jest bariera jelitowa, na którą składają się warstwa naczyń krwionośnych, komórki nabłonkowe, błona śluzowa i mikroflora jelit. Jej integralność stanowi podstawę do zachowania homeostazy, a zwiększenie jej przepuszczalności przy jednoczesnej obecności dysbiozy umożliwia translokację patogenów chorobotwórczych i ich metabolitów – PAMP (pathogen-associated molecular patterns, wzór molekularny związany z patogenem) przez krew żyły wrotnej do wątroby ^[97]. W następstwie dochodzi do aktywacji TLR obecnych na komórkach Kupffera, aktywacji jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF kappa B i poprzez produkcję cytokin, chemokin oraz mechanizm zapalny do stymulowania proliferacji HSC i fibrogenezy (rycina 2.). Jest to jeden z potencjalnych mechanizmów odpowiadających za włóknienie przeszczepu wątroby u dzieci ^[95].

Inną teorią, podejrzaną o wpływ na włóknienie wątroby biorców pediatrycznych jest niezrównoważony metabolizm kwasów żółciowych. Kwasy żółciowe krążenia jelitowo-wątrobowego są ważnym modulatorem mikrobioty

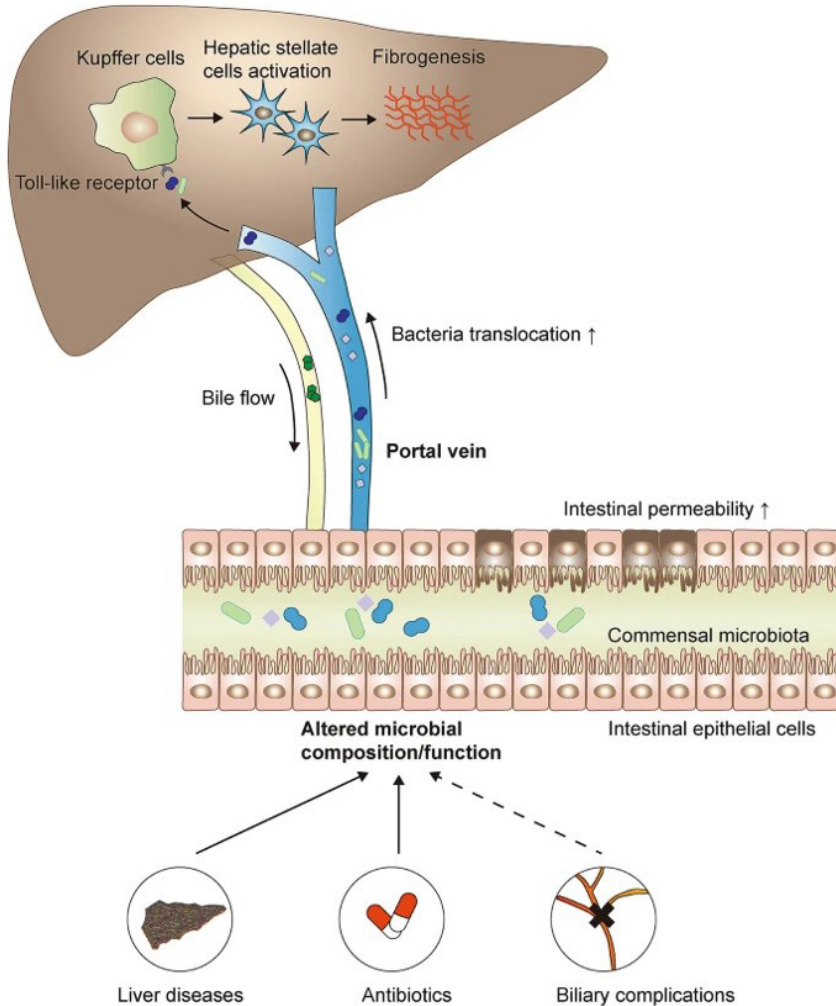
jelitowej, mikroflora jelit bierze natomiast udział w wytwarzaniu wtórnych kwasów żółciowych^[98]. Związki te mają wiele istotnych dla organizmu funkcji – przede wszystkim ułatwiają proces trawienia i wchłaniania tłuszczu. Są one również ligandem dla jądrowego receptora farnesoidu X (FRX-Farnesoid X Receptor), którego aktywowanie reguluje ich homeostazę i wpływa ochronnie na właściwości bariery jelitowej^[99]. Wszelkie zmiany w składzie mikrobioty jelitowej nie pozostają bez wpływu na równowagę w syntezie pierwotnych i wtórnych kwasów żółciowych, a co za tym idzie powodują one tłumienie odpowiedzi z FRX i utratę ciągłości nabłonka jelitowego. Prawdopodobnym skutkiem tego procesu jest translokacja patogenów do wątroby i progresja jej włóknienia u dzieci po przeszczepie^[100].

Potencjalnym mechanizmem leżącym u podstawy wzrostu ryzyka zwłóknienia wątroby po przeszczepie u biorców pediatrycznych jest zmniejszona produkcja SCFA (short-chain fatty acids, krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych) przez mikrobiotę jelitową^[101]. Powstają one z błonnika pokarmowego i wpływają w korzystny sposób na integralność bariery jelitowej, metabolizm oraz odpowiedź immunologiczną, dlatego zarówno suplementowanie SCFA, jak i pobudzanie przez probiotyki bakterii je produkujących wydaje się mieć terapeutyczną wartość. Znaczna redukcja liczby drobnoustrojów produkujących SCFA na drodze dysbiozy może zakłócić ważne funkcje tych związków i doprowadzić do progresywnego włóknienia wątroby u pacjentów pediatrycznych^[102].

Przeszczep wątroby u pacjentów pediatrycznych często, o ile nie zawsze, skutkuje zmianami w mikrobiocie jelitowej. Zrozumienie wpływu drobnoustrojów zasiedlających jelita i przypuszczalnych mechanizmów procesu zwłóknienia wątroby na drodze dysbiozy umożliwiło rozważenie nowego podejścia do leczenia, jakim jest przeszczep mikrobiomu kałowego (FMT – fecal microbiota transplantation). Jego celem jest przywrócenie prawidłowej mikroflory jelitowej, normalizacja jej składu oraz funkcji. Według Zhou i in. FTM przynosi efekt w postaci wzmocnienia integralności bariery jelitowej i zahamowania translokacji patogenów. U podstaw skuteczności FTM leży prawdopodobnie również zwiększenie produkcji SCFA i hamowanie syntezy cytokin prozapalnych^[103]. Skuteczność przeszczepu mikrobiomu kałowego została już potwierdzona w leczeniu NAFLD, cukrzycy typu 2 oraz marskości wątroby. Świadczy to o dużym potencjale tej metody^[104].

Do oceny różnorodności drobnoustrojów w kale używanym do FTM używa się sekwencjonowania 16s rRNA oraz metagenomicznego. Metody te różnią się poziomem do którego można zidentyfikować mikrobiotę.

Pierwsza z nich różnicuje do poziomu rodzaju, natomiast druga umożliwia różnicowanie nawet do poziomu gatunku [105].



Rycina 2. Na rycinie przedstawiono translokację PAMP na skutek braku integralności bariery jelitowej oraz mechanizm aktywacji HSC i inicjacji fibrogeneracji wątroby [https://link.springer.com/article/10.1007/s00439-020-02221-8?fbclid=IwAR3173uXdADfwow-0cohWXG1tmlr sxmqUHZMIdJQE4bDtd-qmL3PtfCYwSo].

FTM wykorzystuje zarówno świeży, jak i mrożony kał. W przypadku świeżego kału, przygotowujący jest przesącz z NaCl, który podaje się bezpośrednio do przewodu pokarmowego. W sytuacji konieczności użycia kału mrożonego, wykorzystywana jest łaźnia wodna oraz sól fizjologiczna. Ważne jest, aby przeszczipiany mikrobiom nie miał kontaktu z powietrzem, ponieważ

powoduje ono utlenianie bakterii ^[106]. Najskuteczniejszym i najbezpieczniejszym sposobem podawania FTM wydaje się być zgłębnik nosowo-żołądkowy/nosowo-jelitowy. Jest to metoda znacznie mniej inwazyjna niż kolonoskopia, przy której istnieje ryzyko, że proces normalizacji mikroflory będzie ograniczony tylko do okrężnicy. Istnieje również kontrowersyjna, doustna droga podania, jednak w przypadku dzieci ograniczona przez duże ryzyko aspiracji, bądź utknięcia tabletki w przełyku. Aby określić objętość przesączu dla dziecięcego biorcy wątroby, konieczne są dalsze badania ^[107-108].

Analiza powyższych danych pozwala stwierdzić, że jednoczasowy, bądź następczy przeszczep wątroby oraz mikrobiomu jelitowego pacjentowi pediatrycznemu może zahamować lub zapobiec procesowi włóknienia wątroby, znacznie redukując liczbę dotychczasowych niepowodzeń transplantacji. Wykorzystanie potencjału FTM wymaga jednak dalszych badań, które pomogą doprecyzować wytyczne i szczegółowo ocenić bezpieczeństwo tej metody dla dziecięcych biorców wątroby ^[109].

9. PODSUMOWANIE

Wraz z rozwojem technik chirurgicznych oraz ogromnym postępem w zakresie opieki pooperacyjnej i leczenia immunosupresyjnego, zauważalny jest znaczny wzrost przeżywalności pacjentów pediatrycznych po przeszczepie wątroby. Pomimo tego, istotnym problemem w perspektywie długoterminowej pozostaje włóknienie przeszczepionego narządu. Podejmowane dotychczas wysiłki, aby zidentyfikować czynniki etiologiczne i zapobiec progresywnemu włóknieniu, skutkowały niepowodzeniem. Wszelkie zmiany w składzie i funkcji drobnoustrojów mikroflory przewodu pokarmowego, bardzo często występujące u dzieci po przeszczepie wątroby, mają wpływ na integralność bariery jelitowej, a co za tym idzie, potencjalnie są odpowiedzialne za wywoływanie włóknienia. Istnieją teorie, że przeszczep mikrobiomu kałowego mógłby okazać się skutecznym w przeciwdziałaniu temu procesowi. Konieczne są jednak dalsze badania, aby wykorzystać potencjał terapeutyczny tej metody, sprawdzić jej bezpieczeństwo i długoterminową efektywność. W FMT pokładane są duże nadzieje na zmniejszenie ryzyka fibrogenyzy wątroby po transplantacji pediatrycznej.

REFERENCJE

- [1] Cieslak, K. P., Runge, J. H., Heger, M., Stoker, J., Bennink, R. J., & Van Gulik, T. M. (2014). New perspectives in the assessment of future remnant liver. *Digestive Surgery*, 31(4-5), 255-268.
- [2] Rahbari, N. N., Garden, O. J., Padbury, R., Brooke-Smith, M., Crawford, M., Adam, R., ... & Weitz, J. (2011). Posthepatectomy liver failure: a definition and grading by the International Study Group of Liver Surgery (ISGLS). *Surgery*, 149(5), 713-724.
- [3] Venick, R. S., Farmer, D. G., Soto, J. R., Vargas, J., Yersiz, H., Kaldas, F. M., ... & Busuttil, R. W. (2018). One thousand pediatric liver transplants during thirty years: lessons learned. *Journal of the American College of Surgeons*, 226(4), 355-366.
- [4] Starzl, T., Marchioro, T., von Kaulla, K., Hermann, G., Brittain, R., & Waddell, W. (1963). homotransplantation of the liver in humans. *surg. gynecol. obstet.* 117: 659. *PubMed| CAS| Web of Science® Times Cited*, 522.
- [5] Starzl, T. E., Groth, C. G., Brettschneider, L., Penn, I., Fulginiti, V. A., Moon, J. B., ... & Porter, K. A. (1968). Orthotopic homotransplantation of the human liver. *Annals of surgery*, 168(3), 392.
- [6] Scharschmidt, B. F. (1984). Human liver transplantation: analysis of data on 540 patients from four centers. *Hepatology*, 4(S1), 95S-101S.
- [7] Starzl, T. E., Todo, S., Tzakis, A. G., Gordon, R. D., Makowka, L., Stieber, A., ... & Iwatsuki, S. (1989, February). Liver transplantation: an unfinished product. In *Transplantation proceedings* (Vol. 21, No. 1 Pt 2, p. 2197). NIH Public Access.
- [8] Calne, R. Y., Rolles, K., White, D. J. G., Thim, S., Evans, D. B., & McMaster, P. Dunn, DC, Craddock. GN, Henderson. RG, Aziz, S. and Lewis, P.(1979). Cyclosporinc A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadavric organs: 32 kidneys, 2 pancreases and 2 livers. *Lancet*, 2, 1033-6.
- [9] Fung, J. J., Todo, S., Jain, A., McCauley, J., Alessiani, M., Scotti, C., & Starzl, T. E. (1990, February). Conversion from cyclosporine to FK 506 in liver allograft recipients with cyclosporine-related complications. In *Transplantation proceedings* (Vol. 22, No. 1, p. 6). NIH Public Access.

- [10] Starzl, T. E. (2012). The long reach of liver transplantation. *Nature medicine*, 18(10), 1489-1492.
- [11] Krawczyk M., Transplantacja jako metoda leczenia niewydolności wątroby – historia i współczesność, [w:] U. Ołdakowska-Jedynak, M. Krawczyk
- [12] Barshes, N. R., Lee, T. C., Balkrishnan, R., Karpen, S. J., Carter, B. A., & Goss, J. A. (2005). Orthotopic liver transplantation for biliary atresia: the US experience. *Liver transplantation*, 11(10), 1193-1200.
- [13] Kasai, M., Mochizuki, I., Ohkohchi, N., Chiba, T., & Ohi, R. (1989). Surgical limitation for biliary atresia: indication for liver transplantation. *Journal of pediatric surgery*, 24(9), 851-854.
- [14] Austin, M. T., Leys, C. M., Feurer, I. D., Lovvorn III, H. N., O'Neill Jr, J. A., Pinson, C. W., & Pietsch, J. B. (2006). Liver transplantation for childhood hepatic malignancy: a review of the United Network for Organ Sharing (UNOS) database. *Journal of pediatric surgery*, 41(1), 182-186.
- [15] Dhawan, A., Cheeseman, P., & Mieli-Vergani, G. (2004). Approaches to acute liver failure in children. *Pediatric transplantation*, 8(6), 584-588.
- [16] Squires, J. E., McKiernan, P., & Squires, R. H. (2018). Acute liver failure: an update. *Clinics in liver disease*, 22(4), 773-805.
- [17] Ng, V. L., Li, R., Loomes, K. M., Leonis, M. A., Rudnick, D. A., Belle, S. H., & Squires, R. H. (2016). Outcomes of children with and without hepatic encephalopathy from the Pediatric Acute Liver Failure (PALF) Study Group. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 63(3), 357.
- [18] Sindhi, R., Rohan, V., Bukowinski, A., Tadros, S., de Ville de Goyet, J., Rapkin, L., & Ranganathan, S. (2020). Liver transplantation for pediatric liver cancer. *Cancers*, 12(3), 720.
- [19] Lake, C. M., Tiao, G. M., & Bondoc, A. J. (2019, December). Surgical management of locally-advanced and metastatic hepatoblastoma. In *Seminars in Pediatric Surgery* (Vol. 28, No. 6, p. 150856). WB Saunders.
- [20] de Goyet, J. D. V., Meyers, R. L., Tiao, G. M., & Morland, B. (2017). Beyond the Milan criteria for liver transplantation in children with hepatic tumours. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 2(6), 456-462.
- [21] Khanna, R., & Verma, S. K. (2018). Pediatric hepatocellular carcinoma. *World journal of gastroenterology*, 24(35), 3980.

- [22] Renne, S. L., Sarcognato, S., Sacchi, D., Guido, M., Roncalli, M., Terracciano, L., & Di Tommaso, L. (2021). Hepatocellular carcinoma: a clinical and pathological overview. *Pathologica*, 113(3), 203.
- [23] Romano, F., Stroppa, P., Bravi, M., Casotti, V., Lucianetti, A., Guizzetti, M., ... & D'Antiga, L. (2011). Favorable outcome of primary liver transplantation in children with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Pediatric transplantation*, 15(6), 573-579.
- [24] Freeman, A. J., Sellers, Z. M., Mazariegos, G., Kelly, A., Saiman, L., Mallory, G., ... & Leung, D. H. (2019). A multidisciplinary approach to pre-transplant and posttransplant management of cystic fibrosis-associated liver disease. *Liver Transplantation*, 25(4), 640-657.
- [25] Yersiz, H., Renz, J. F., Farmer, D. G., Hisatake, G. M., McDiarmid, S. V., & Busuttil, R. W. (2003). One hundred in situ split-liver transplantations: a single-center experience. *Annals of surgery*, 238(4), 496.
- [26] Morimoto, T., Ichimiya, M., Tanaka, A., Ikai, I., Yanamoto, Y., Nakamura, Y., ... & Yamaoka, Y. (1996). Guidelines for donor selection and an overview of the donor operation in living related liver transplantation. *Transplant international*, 9, 208-213.
- [27] Cherukuru, R., Reddy, M. S., Shanmugam, N. P., Rajalingam, R., Kota, V., Gunasekaran, V., ... & Rela, M. (2019). Feasibility and safety of split-liver transplantation in a nascent framework of deceased donation. *Liver Transplantation*, 25(3), 450-458.
- [28] Pichlmayr, R., Ringe, B., Gubernatis, G., Hauss, J., & Bunzendahl, H. (1988). Transplantation of one donor liver to two recipients (splitting transplantation)—a new method for further development of segmental liver transplantation. *Langenbecks archiv für chirurgie*, 373, 127-130.
- [29] Busuttil, R. W., & Goss, J. A. (1999). Split liver transplantation. *Annals of surgery*, 229(3), 313.
- [30] Moussaoui, D., Toso, C., Nowacka, A., McLin, V. A., Bednarkiewicz, M., Andres, A., ... & Wildhaber, B. E. (2017). Early complications after liver transplantation in children and adults: Are split grafts equal to each other and equal to whole livers?. *Pediatric transplantation*, 21(4), e12908.
- [31] Slooff, M. J. H. (1995). Reduced size liver transplantation, split liver transplantation, and living related liver transplantation in relation to the

- donor organ shortage. *Transplant International*, 8, 65-68.
- [32] Perito, E. R., Roll, G., Dodge, J. L., Rhee, S., & Roberts, J. P. (2019). Split liver transplantation and pediatric waitlist mortality in the United States: potential for improvement. *Transplantation*, 103(3), 552.
- [33] Martinelli, J., Habes, D., Majed, L., Guettier, C., Gonzalès, E., Linglart, A., ... & Bernard, O. (2018). Long-term outcome of liver transplantation in childhood: a study of 20-year survivors. *American Journal of Transplantation*, 18(7), 1680-1689.
- [34] Ekong, U. D., Melin-Aldana, H., Seshadri, R., Lokar, J., Harris, D., Whittington, P. F., & Alonso, E. M. (2008). Graft histology characteristics in long-term survivors of pediatric liver transplantation. *Liver Transplantation*, 14(11), 1582-1587.
- [35] Evans, H. M., Kelly, D. A., McKiernan, P. J., & Hübscher, S. (2006). Progressive histological damage in liver allografts following pediatric liver transplantation. *Hepatology*, 43(5), 1109-1117.
- [36] Jain, A., Costa, G., Marsh, W., Fontes, P., Devera, M., Mazariegos, G., ... & Marcos, A. (2006). Thrombotic and nonthrombotic hepatic artery complications in adults and children following primary liver transplantation with long-term follow-up in 1000 consecutive patients. *Transplant international*, 19(1), 27-37.
- [37] Yazigi, N. A. (2013). Long term outcomes after pediatric liver transplantation. *Pediatric gastroenterology, hepatology & nutrition*, 16(4), 207-218.
- [38] Ebel, N. H., Hsu, E. K., Dick, A. A., Shaffer, M. L., Carlin, K., & Horslen, S. P. (2020). Decreased incidence of hepatic artery thrombosis in pediatric liver transplantation using technical variant grafts: report of the Society of Pediatric Liver Transplantation Experience. *The Journal of pediatrics*, 226, 195-201.
- [39] Woo, D. H., LaBerge, J. M., Gordon, R. L., Wilson, M. W., & Kerlan Jr, R. K. (2007). Management of portal venous complications after liver transplantation. *Techniques in vascular and interventional radiology*, 10(3), 233-239.
- [40] Settmacher, U., Nüssler, N. C., Glanemann, M., Haase, R., Heise, M., Bechstein, W. O., & Neuhaus, P. (2000). Venous complications after orthotopic liver transplantation. *Clinical transplantation*, 14(3), 235-241.

- [41] Naik, K. B., Hawkins, C. M., Gill, A. E., & Gupta, N. A. (2018). Clinical efficacy of percutaneous transhepatic portal vein angioplasty for late-onset portal vein stenosis in pediatric liver transplant patients. *Transplantation*, 102(6), e282-e287.
- [42] Grimaldi, C., Spada, M., & Maggiore, G. (2021). Liver transplantation in children: an overview of organ allocation and surgical management. *Current Pediatric Reviews*, 17(4), 245-252.
- [43] Zhang, Z. Y., Jin, L., Chen, G., Su, T. H., Zhu, Z. J., Sun, L. Y., ... & Xiao, G. W. (2017). Balloon dilatation for treatment of hepatic venous outflow obstruction following pediatric liver transplantation. *World Journal of Gastroenterology*, 23(46), 8227.
- [44] Cescon, M., Grazi, G. L., Varotti, G., Ravaioli, M., Ercolani, G., Gardini, A., & Cavallari, A. (2005). Venous outflow reconstructions with the piggyback technique in liver transplantation: a single-center experience of 431 cases. *Transplant international*, 18(3), 318-325.
- [45] Uller, W., Knoppke, B., Schreyer, A. G., Heiss, P., Schlitt, H. J., Melder, M., ... & Wohlgenuth, W. A. (2013). Interventional radiological treatment of perihepatic vascular stenosis or occlusion in pediatric patients after liver transplantation. *Cardiovascular and interventional radiology*, 36, 1562-1571.
- [46] Sanada, Y., Katano, T., Hirata, Y., Yamada, N., Okada, N., Ihara, Y., ... & Mizuta, K. (2018). Interventional radiology treatment for vascular and biliary complications following pediatric living donor liver transplantation—a retrospective study. *Transplant International*, 31(11), 1216-1222.
- [47] Laurence, J. M., Sapisochin, G., DeAngelis, M., Seal, J. B., Miserachs, M. M., Marquez, M., ... & Ghanekar, A. (2015). Biliary complications in pediatric liver transplantation: incidence and management over a decade. *Liver Transplantation*, 21(8), 1082-1090.
- [48] Dechêne, A., Kodde, C., Kathemann, S., Treckmann, J., Lainka, E., Paul, A., ... & Canbay, A. (2015). Endoscopic treatment of pediatric post-transplant biliary complications is safe and effective. *Digestive Endoscopy*, 27(4), 505-511.
- [49] Regelman, M. O., Goldis, M., & Arnon, R. (2015). New-onset diabetes mellitus after pediatric liver transplantation. *Pediatric Transplantation*, 19(5), 452-459.

- [50] Razonable, R. R., & Emery, V. C. (2004). Management of CMV infection and disease in transplant patients. 27-29 February 2004. Herpes: the journal of the IHMF, 11(3), 77-86.
- [51] Paya, C., Humar, A., Dominguez, E. D., Washburn, K., Blumberg, E., Alexander, B., ... & Pescovitz, M. D. (2004). Efficacy and safety of valganciclovir vs. oral ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. American Journal of Transplantation, 4(4), 611-620.
- [52] Nafady-Hego, H., Elgendy, H., Moghazy, W. E., Fukuda, K., & Uemoto, S. (2011). Pattern of bacterial and fungal infections in the first 3 months after pediatric living donor liver transplantation: an 11-year single-center experience. Liver Transplantation, 17(8), 976-984.
- [53] D'alessandro, A. M., Knechtle, S. J., Chin, L. T., Fernandez, L. A., Yagci, G., Levenson, G., & Kalayoglu, M. (2007). Liver transplantation in pediatric patients: twenty years of experience at the University of Wisconsin. Pediatric transplantation, 11(6), 661-670.
- [54] Lawless, S., Ellis, D., Thompson, A., Cook, D. R., Esquivel, C., & Starzl, T. (1989). Mechanisms of hypertension during and after orthotopic liver transplantation in children. The Journal of pediatrics, 115(3), 372-379.
- [55] Fine, R. N., Alonso, E. M., Fischel, J. E., Bucuvalas, J. C., Enos, R. A., & Gore-Langton, R. E. (2004). Pediatric transplantation of the kidney, liver and heart: summary report. Pediatric transplantation, 8(1), 75-86.
- [56] Ng, V. L., Alonso, E. M., Bucuvalas, J. C., Cohen, G., Limbers, C. A., Varni, J. W., ... & Studies of Pediatric Liver Transplantation (SPLIT) Research Group. (2012). Health status of children alive 10 years after pediatric liver transplantation performed in the US and Canada: report of the studies of pediatric liver transplantation experience. The Journal of pediatrics, 160(5), 820-826.
- [57] Högler, W., Baumann, U., & Kelly, D. (2012). Endocrine and bone metabolic complications in chronic liver disease and after liver transplantation in children. Journal of pediatric gastroenterology and nutrition, 54(3), 313-321.
- [58] Kelly, D. A., Bucuvalas, J. C., Alonso, E. M., Karpen, S. J., Allen, U., Green, M., ... & McDonald, R. A. (2013). Long-term medical management of the pediatric patient after liver transplantation: 2013 practice guideline by the

American Association for the Study of Liver Diseases and the American Society of Transplantation. *Liver Transplantation*, 19(8), 798-825.

- [59] Demetris, A. J., Bellamy, C., Hübscher, S. G., O'leary, J., Randhawa, P. S., Feng, S., ... & Zen, Y. (2016). 2016 comprehensive update of the Banff Working Group on Liver Allograft Pathology: introduction of antibody-mediated rejection. *American Journal of Transplantation*, 16(10), 2816-2835.
- [60] Procurement, O., & Network, T. (2011). and Scientific Registry of Transplant Recipients (SRTR). OPTN/SRTR 2010 Annual Data Report. Rockville, MD: Department of Health and Human Services, Health Resources and Services Administration, Healthcare Systems Bureau, Division of Transplantation, 12(Suppl 1), 1-156.
- [61] Alonso, E. M., & Superina, R. A. (2011). Liver transplantation in children: Post-transplant care. In *Liver Disease in Children, Fourth Edition* (pp. 773-787). Cambridge University Press.
- [62] Fouquet, V., Alves, A., Branchereau, S., Grabar, S., Debray, D., Jacquemin, E., ... & Soubrane, O. (2005). Long-term outcome of pediatric liver transplantation for biliary atresia: a 10-year follow-up in a single center. *Liver transplantation*, 11(2), 152-160.
- [63] Scheenstra, R., Peeters, P. M., Verkade, H. J., & Gouw, A. S. (2009). Graft fibrosis after pediatric liver transplantation: ten years of follow-up. *Hepatology*, 49(3), 880-886.
- [64] Miyagawa-Hayashino, A., Yoshizawa, A., Uchida, Y., Egawa, H., Yurugi, K., Masuda, S., ... & Haga, H. (2012). Progressive graft fibrosis and donor-specific human leukocyte antigen antibodies in pediatric late liver allografts. *Liver Transplantation*, 18(11), 1333-1342.
- [65] Sanada, Y., Matsumoto, K., Urahashi, T., Ihara, Y., Wakiya, T., Okada, N., ... & Mizuta, K. (2014). Protocol liver biopsy is the only examination that can detect mid-term graft fibrosis after pediatric liver transplantation. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(21), 6638.
- [66] Sheikh, A., Chau, K. Y., & Evans, H. M. (2018). Histological findings in protocol biopsies following pediatric liver transplant: Low incidence of abnormalities at 5 years. *Pediatric Transplantation*, 22(5), e13212.

- [67] Wynn, T. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 214(2), 199-210.
- [68] Reynaert H., Thompson MG, Thomas T. i Geerts A. (2002). Komórki gwiazdziste wątroby: rola w mikrokrążeniu i patofizjologii nadciśnienia wrotnego. *Jelita* , 50 (4), 571-581.
- [69] Hanvesakul, R., Spencer, N., Cook, M., Gunson, B., Hathaway, M., Brown, R., ... & Briggs, D. (2008). Donor HLA-C genotype has a profound impact on the clinical outcome following liver transplantation. *American Journal of Transplantation*, 8(9), 1931-1941.
- [70] Connolly, M. K., Bedrosian, A. S., Clair, J. M. S., Mitchell, A. P., Ibrahim, J., Stroud, A., ... & Miller, G. (2009). In liver fibrosis, dendritic cells govern hepatic inflammation in mice via TNF- α . *The Journal of clinical investigation*, 119(11), 3213-3225.
- [71] Duffield, J. S., Forbes, S. J., Constandinou, C. M., Clay, S., Partolina, M., Vuthoori, S., ... & Iredale, J. P. (2005). Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *The Journal of clinical investigation*, 115(1), 56-65.
- [72] Li, J. T., Liao, Z. X., Ping, J., Xu, D., & Wang, H. (2008). Molecular mechanism of hepatic stellate cell activation and antifibrotic therapeutic strategies. *Journal of gastroenterology*, 43, 419-428.
- [73] Read, S. A., Wijaya, R., Ramezani-Moghadam, M., Tay, E., Schibeci, S., Liddle, C., ... & Ahlenstiel, G. (2019). Macrophage coordination of the interferon lambda immune response. *Frontiers in Immunology*, 10, 2674.
- [74] Del Bello, A., Congy-Jolivet, N., Muscari, F., Lavyssière, L., Esposito, L., Cardeau-Desangles, I., ... & Kamar, N. (2014). Prevalence, incidence and risk factors for donor-specific anti-HLA antibodies in maintenance liver transplant patients. *American Journal of Transplantation*, 14(4), 867-875.
- [75] Valenzuela, N. M., & Reed, E. F. (2017). Antibody-mediated rejection across solid organ transplants: manifestations, mechanisms, and therapies. *The Journal of clinical investigation*, 127(7), 2492-2504.
- [76] Montano-Loza, A. J., Carpenter, H. A., & Czaja, A. J. (2006). Clinical significance of HLA DRB1* 03-DRB1* 04 in type 1 autoimmune hepatitis. *Liver International*, 26(10), 1201-1208.

- [77] Peeters, P. M., Sieders, E., vd Heuvel, M., Bijleveld, C. M., de Jong, K. P., TenVergert, E. M., ... & Gouw, A. S. (2000). Predictive factors for portal fibrosis in pediatric liver transplant recipients. *Transplantation*, 70(11), 1581-1587.
- [78] Bedossa, P., & Poynard, T. (1996). An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. *Hepatology*, 24(2), 289-293.
- [79] Lebensztejn, D. M. (2005). Odwracalność zaawansowanego włóknienia wątroby—możliwości terapeutyczne i biochemiczne monitorowanie procesu chorobowego. *Przegl. Epidemiol*, 59(2), 535-540.
- [80] Issa, R., Zhou, X., Constandinou, C. M., Fallowfield, J., Millward-Sadler, H., Gaca, M. D., ... & Iredale, J. P. (2004). Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking. *Gastroenterology*, 126(7), 1795-1808.
- [81] Venturi, C., Sempoux, C., Quinones, J. A., Bourdeaux, C., Hoyos, S. P., Sokal, E., & Reding, R. (2014). Dynamics of allograft fibrosis in pediatric liver transplantation. *American Journal of Transplantation*, 14(7), 1648-1656.
- [82] Ueno, T., Tanaka, N., Ihara, Y., Takama, Y., Yamada, H., Mushiake, S., & Fukuzawa, M. (2011). Graft fibrosis in patients with biliary atresia after pediatric living-related liver transplantation. *Pediatric transplantation*, 15(5), 470-475.
- [83] Varma, S., Stéphenne, X., Komuta, M., Bouzin, C., Ambroise, J., Smets, F., ... & Sokal, E. M. (2017). The histological quantification of alpha-smooth muscle actin predicts future graft fibrosis in pediatric liver transplant recipients. *Pediatric transplantation*, 21(1), e12834.
- [84] Poynard, T., Ngo, Y., Marcellin, P., Hadziyannis, S., Ratziu, V., Benhamou, Y., & Adefovir Dipivoxil 437 and 438 Study Groups. (2009). Impact of adefovir dipivoxil on liver fibrosis and activity assessed with biochemical markers (FibroTest–ActiTest) in patients infected by hepatitis B virus. *Journal of Viral Hepatitis*, 16(3), 203-213.
- [85] Goldschmidt, I., Stieghorst, H., Munteanu, M., Poynard, T., Schlue, J., Streckenbach, C., & Baumann, U. (2013). The use of transient elastography and non-invasive serum markers of fibrosis in pediatric liver transplant recipients. *Pediatric transplantation*, 17(6), 525-534.

- [86] Vinciguerra, T., Brunati, A., David, E., Longo, F., Pinon, M., Ricceri, F., ... & Calvo, P. L. (2018). Transient elastography for non-invasive evaluation of post-transplant liver graft fibrosis in children. *Pediatric Transplantation*, 22(2), e13125.
- [87] Tomita, H., Hoshino, K., Fuchimoto, Y., Ebinuma, H., Ohkuma, K., Tanami, Y., ... & Kuroda, T. (2013). Acoustic radiation force impulse imaging for assessing graft fibrosis after pediatric living donor liver transplantation: a pilot study. *Liver Transplantation*, 19(11), 1202-1213.
- [88] Friedrich-Rust, M., Wunder, K., Kriener, S., Sotoudeh, F., Richter, S., Bojunga, J., ... & Sarrazin, C. (2009). Liver fibrosis in viral hepatitis: non-invasive assessment with acoustic radiation force impulse imaging versus transient elastography. *Radiology*, 252(2), 595-604.
- [89] Serai, S. D., Trout, A. T., & Sirlin, C. B. (2017). Elastography to assess the stage of liver fibrosis in children: Concepts, opportunities, and challenges. *Clinical liver disease*, 9(1), 5.
- [90] Briem-Richter, A., Ganschow, R., Sornsakrin, M., Brinkert, F., Schirmer, J., Schaefer, H., & Grabhorn, E. (2013). Liver allograft pathology in healthy pediatric liver transplant recipients. *Pediatric Transplantation*, 17(6), 543-549.
- [91] Reding, R., Gras, J., Sokal, E., Otte, J. B., & Davies, H. F. (2003). Steroid-free liver transplantation in children. *The Lancet*, 362(9401), 2068-2070.
- [92] Ardalan, M. i Vahed, SZ (2017). Mikrobiota jelitowa i wynik przeszczepu nerki. *Biomedycyna i farmakoterapia* , 90 , 229-236.
- [93] Moradi, F., Berglund, P., Linnskog, R., Leandersson, K., Andersson, T., & Prasad, C. P. (2016). Dual mechanisms of action of the RNA-binding protein human antigen R explains its regulatory effect on melanoma cell migration. *Translational Research*, 172, 45-60.
- [94] Shreiner, AB, Kao, JY i Young, VB (2015). Mikrobiom jelitowy w zdrowiu i chorobie. *Aktualna opinia w gastroenterologii* , 31 (1), 69.
- [95] Albillos, A., De Gottardi, A., & Rescigno, M. (2020). Oś jelitowo-wątrobową w chorobach wątroby: patofizjologiczne podstawy terapii. *Journal of hepatology* , 72 (3), 558-577.
- [96] Bajaj, JS (2019). Alkohol, choroby wątroby i mikroflora jelitowa. *Nature Recenzje Gastroenterologia i hepatologia* , 16 (4), 235-246.

- [97] Bajaj, J. S., Heuman, D. M., Hylemon, P. B., Sanyal, A. J., White, M. B., Monteith, P., ... & Gillevet, P. M. (2014). Altered profile of human gut microbiome is associated with cirrhosis and its complications. *Journal of hepatology*, 60(5), 940-947.
- [98] Henao-Mejia, J., Elinav, E., Thaiss, C. A., Licona-Limon, P., & Flavell, R. A. (2013). Role of the intestinal microbiome in liver disease. *Journal of autoimmunity*, 46, 66-73.
- [99] Mouries, J., Brescia, P., Silvestri, A., Spadoni, I., Sorribas, M., Wiest, R., ... & Rescigno, M. (2019). Microbiota-driven gut vascular barrier disruption is a prerequisite for non-alcoholic steatohepatitis development. *Journal of hepatology*, 71(6), 1216-1228.
- [100] Sinal, C. J., Tohkin, M., Miyata, M., Ward, J. M., Lambert, G., & Gonzalez, F. J. (2000). Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell*, 102(6), 731-744.
- [101] Schulthess, J., Pandey, S., Capitani, M., Rue-Albrecht, KC, Arnold, I., Franchini, F., ... & Powrie, F. (2019). Maślan krótkołańcuchowego kwasu tłuszczowego odciska program przeciwdrobnoustrojowy w makrofagach. *Immunitet*, 50 (2), 432-445.
- [102] Lu, HF, Ren, ZG, Li, A., Zhang, H., Xu, SY, Jiang, JW, ... & Li, LJ (2019). Dane dotyczące mikrobiomu kałowego odróżniają biorców wątroby z normalną i nieprawidłową czynnością wątroby od zdrowych osób z grupy kontrolnej. *Granice w mikrobiologii*, 10, 1518.
- [103] Zhou, D., Pan, Q., Shen, F., Cao, HX, Ding, WJ, Chen, YW i Fan, JG (2017). Całkowity przeszczep mikroflory kałowej łagodzi stłuszczeniowe zapalenie wątroby wywołane dietą wysokotłuszczową u myszy poprzez korzystną regulację mikroflory jelitowej. *Sprawozdania naukowe*, 7 (1), 1529.
- [104] Bajaj, JS, Kakiyama, G., Savidge, T., Takei, H., Kassam, ZA, Fagan, A., ... & Gillevet, PM (2018). Związane z antybiotykami zakłócenie składu i funkcji mikrobiomu w marskości wątroby jest przywracane przez przeszczep kału. *Hepatology*, 68 (4), 1549-1558.
- [105] Malla, MA, Dubey, A., Kumar, A., Yadav, S., Hashem, A., & Abd_Allah, EF (2019). Badanie ludzkiego mikrobiomu: potencjalna przyszła rola sekwencjonowania nowej generacji w diagnostyce i leczeniu chorób. *Granice w immunologii*, 9, 2868.

- [106] Wang, JW, Kuo, CH, Kuo, FC, Wang, YK, Hsu, WH, Yu, FJ, ... & Wu, DC (2019). Przeszczep mikroflory kałowej: przegląd i aktualizacja. *Journal of Formosan Medical Association*, 118 , S23-S31.
- [107] Gough, E., Shaikh, H. i Manges, AR (2011). Przegląd systematyczny transplantacji mikroflory jelitowej (bakterioterapia kałowa) w przypadku nawracającego zakażenia *Clostridium difficile*. *Kliniczne choroby zakaźne* , 53 (10), 994-1002.
- [108] Cammarota, G., Ianiro, G., Kelly, CR, Mullish, BH, Allegretti, JR, Kasam, Z., ... & Gasbarrini, A. (2019). Międzynarodowa konferencja konsensusu na temat przechowywania kału w transplantacji mikroflory kałowej w praktyce klinicznej. *Gut* , 68 (12), 2111-2121.
- [109] Fouts, DE, Torralba, M., Nelson, KE, Brenner, DA i Schnabl, B. (2012). Translokacja bakteryjna i zmiany mikrobiomu jelitowego w mysich modelach chorób wątroby. *Journal of hepatology* , 56 (6), 1283-1292.

ZASTOSOWANIE SZTUCZNEJ INTELIGENCJI W RADIOLOGICZNEJ OCENIE OBRAZÓW ULTRASONOGRAFICZNYCH

Marcin Rojek, Michał Azierski

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

Abstrakt: Celem pracy był przegląd i analiza wybranych zastosowań sztucznej inteligencji w wspomaganiu i analizie badania ultrasonograficznego. Badanie ultrasonograficzne cechuje się wyjątkowo niską inwazyjnością i ceną na tle innych badań. Z tego powodu znajduje szerokie zastosowanie w wczesnej diagnostyce szerokiego spektrum zaburzeń. Mimo automatyzacji i wzrostu precyzji urządzeń, jakość i użyteczność badania ciągle pozostaje w wysokim stopniu uzależniona od umiejętności operatora urządzenia i radiologa oceniającego obraz. Sztuczna inteligencja jest zbiorem dziedzin zajmujących się matematyczną analizą dużych zbiorów danych. Wraz ze wzrostem mocy obliczeniowej komputerów, zyskuje coraz szersze zastosowanie, także w dziedzinach medycznych. Analizowane prace dotyczyły algorytmów szkolonych w celu analizy obrazów ultrasonograficznych. Autorzy prac wskazywali, na potencjał sztucznej inteligencji jako narzędzia wspomagającego pracę radiologa, a skuteczność algorytmów była porównywana z praktykami o różnym stopniu doświadczenia. W większości przytoczonych prac algorytmy cechowały się potencjalnie użyteczną klinicznie dokładnością, przytoczono także algorytmy mające już zastosowanie komercyjne. Istotnym czynnikiem ograniczającym rozwój dziedziny jest ograniczone istnienie i dostęp do zbiorów danych mogących stanowić materiał szkoleniowy, a szerzej zakrojone prace w przyszłości będą musiały rozwiązać tą kwestię.

Słowa kluczowe: sztuczna inteligencja, ultrasonografia, radiologia, sieci neuronowe

Abstract: The aim of the study was to review and analyze selected applications of artificial intelligence in supporting and analyzing ultrasound examinations. Ultrasound examination is characterized by exceptionally low invasiveness and price compared to other examinations. For this reason, it is widely used in the early diagnosis of a wide range of disorders. Despite the automation and increased precision of devices, the quality and usability of the examination still remains highly dependent on the skills of the device operator and the radiologist assessing the image. Artificial intelligence is a collection of fields dealing with the mathematical analysis of large data sets. Along with the increase in the computing power of computers, it is gaining more and more widespread use, also in medical fields. The analyzed works concerned algorithms trained to analyze ultrasound images. The authors of the papers pointed to the potential of artificial intelligence as a tool supporting the work of a radiologist, and the effectiveness of the algorithms was compared with practitioners with varying degrees of experience. In most

of the cited papers, the algorithms were characterized by potentially clinically useful accuracy, and algorithms already in commercial use were cited. An important factor limiting the development of the field is the limited existence and access to datasets that can be used as training material, and more extensive work in the future will have to address this issue.

Keywords: sztuczna inteligencja, ultrasonografia, radiologia, sieci neuronowe

1. WSTĘP

1.1. Sztuczna Inteligencja (SI)

Sztuczna inteligencja (SI) to ogólne pojęcie opisujące program lub algorytm, wykonywany przez komputer, który naśladuje ludzką logikę oraz inteligencje. Po raz pierwszy pojęcie to zostało przedstawione w 1956 roku, na konferencji prowadzonej przez Johna McCarthy'ego poświęcone tej tematyce ^[1]. Rozwój technologii komputerowych, który dokonał się w latach osiemdziesiątych, umożliwił powstanie sieci neuronowej, dzięki której rozwój technologii sztucznej inteligencji znacznie przyspieszył. Sieć neuronowa to program komputerowy, którego zadaniem jest symulować pracę ludzkiego mózgu poprzez zauważanie zależności między wieloma danymi ^[2]. Ponieważ SI to szeroka dziedzina nauki, posiada ona wiele poddziedzin. Jednymi z nich jest uczenie maszynowe oraz deep learning, które stanowią ważny filar działania sztucznej inteligencji ^[3] (rysunek 1).



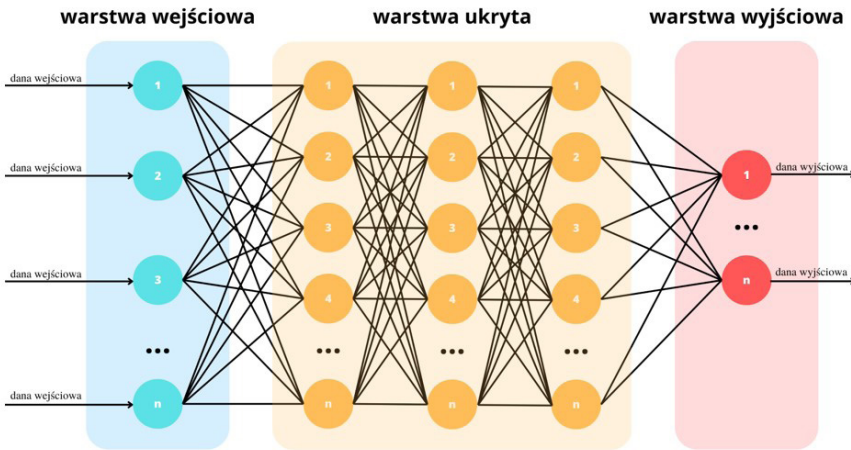
Rysunek 1. Schemat przedstawiający hierarchię między poddziedzinami sztucznej inteligencji [wykonanie własne]

1.2. Uczenie maszynowe

Uczenie maszynowe to nie zaprogramowany proces wykorzystania danych wejściowych, które dzięki użyciu technik statystycznych i analizy umożliwiają komputerowi naukę schematów, dzięki czemu jest on w stanie przewidywać nowe dane. Pobieranie, magazynowanie, a następnie analizy kolejnych danych pozwalają na zwiększanie wiedzy programu na temat możliwości przewidywania kolejnych danych. Kolejne cykle nauki powiększają zakres możliwych zachowań o kolejne przypadki, a gdy program napotka podobne do szkoleniowych dane wejściowe, wraz z kolejnymi cyklami ta umiejętność jest pogłębianą ^[4]. Uczenie maszynowe można prowadzić na dwa sposoby. W sposób nadzorowany oraz nienadzorowany. Uczenie nadzorowane polega na wprowadzeniu oznakowanych danych wejściowych oraz pożądanego wyniku. Model ten opiera się na uczeniu przez program schematów i jest to najczęściej stosowany model uczenia maszynowego. Dzięki takiemu szkoleniu, program jest w stanie na nowych, oznaczonych danych wejściowych przewidzieć wynik końcowy ^[5]. W modelu nadzorowanym, program po analizie wielu tysięcy oznakowanych danych wejściowych i oczekiwanym wyniku końcowym jest w stanie precyzyjnie oraz dokładnie określić dane końcowe posiadając jedynie dane wejściowe ^[6]. Uczenie maszynowe nienadzorowane polega na uczeniu poprzez analizę różnic między wcześniej wyuczonymi zależnościami, a nowymi nieoznaczonymi danymi wejściowymi ^[7].

1.3. Deep learning

Deep learning to poddziedzina uczenia maszynowego, wykorzystywana do analizy i przetworzenia duże ilości danych wejściowych. Metoda ta oparta jest na wykorzystaniu sztucznych sieci neuronowych składających się z warstw wejściowych, wyjściowych oraz ukrytych (rysunek 2). Każda warstwa przekształca daną wejściową w informację, która następnie jest wykorzystywana w zadaniu predykcyjnym ^[8]. Metoda ta daje możliwość nauki programu na własnych doświadczeniach, jednakże doświadczenie to musi być zebrane na analizie specjalnie dobranych danych „treningowych”, które nie zawierają błędów ^[9].



Rysunek 2. Uproszczony schemat przedstawiający działanie sztucznej sieci neuronowej w deep learning'u. Na schemacie zostały przedstawione trzy warstwy ukryte, natomiast aktualne wykorzystanie tej metody może opierać się na setkach lub tysiącach warstw ukrytych [opracowanie własne]

1.4. Konwolucyjne sieci neuronowe

Konwolucyjne sieci neuronowe są szczególnie efektywnym rodzajem sztucznych sieci neuronowych z unikalną architekturą. Warstwy są zorganizowane w trzech wymiarach: szerokość, wysokość i głębokość. Neurony w jednej warstwie nie są połączone ze wszystkimi neuronami w następnej warstwie, ale tylko z niewielkim obszarem neuronów w tej warstwie. Ostateczny wynik jest redukowany do pojedynczego wektora wyników prawdopodobieństwa posortowanych wzdłuż wymiaru głębokości ^[10].

Konwolucyjne sieci neuronowe zostały zastosowane w programach do rozpoznawania obrazów, w tym do analizy obrazów USG ^[11].

1.5. Badanie ultrasonograficzne

Badanie ultrasonograficzne (USG) jest niskoinwazyjną techniką obrazowania tkanek wykorzystującą fale akustyczne z zakresu ultradźwięków, w zakresie od kilku do kilkudziesięciu megaherców. Fale generowane są w obrębie przykładanej do powierzchni ciała głowicy, na zasadzie zjawiska piezoelektrycznego i odbierane z wykorzystaniem jego odwrotności. Polegają one bądź na mechanicznym odkształcaniu kryształu pod wpływem przyłożonego napięcia lub generacji tegoż podczas działania siłą mechaniczną

na kryształ. Dualizm tego zjawiska umożliwia wykorzystanie każdego z kryształów zarówno w roli nadajnika, jak i rejestratora ultradźwięków ^[12]. Fale wyemitowane przez głowicę, przemieszczając się w głąb tkanek mogą ulec zjawiskom pochłonięcia, rozproszenia lub odbicia. To, że ultradźwięki na różnych tkankach ulegają wymienionym zjawiskom w różnej proporcji jest czynnikiem umożliwiającym obrazowanie w oparciu o różnice w powracającym do głowicy sygnale. W oparciu o rozwinięcie technik ultrasonograficznych powstały pokrewne metody typu obrazowania dopplerowskiego, które dokonując analizy fal odbitych od ruchomej, płynnej tkanki umożliwiają uwidocznienie i analizę przepływu krwi przez naczynia w czasie rzeczywistym. Dane uzyskane na drodze obrazowania mogą być przedstawione w różnej postaci, na użytek tej pracy należy wyróżnić prezentację typu A i B. Prezentacja typu A jest jednowymiarową prezentacją chwilowej mocy sygnału prezentowaną w funkcji czasu. Ma zastosowanie głównie w okulistyce. Prezentacja typu B jest prezentacją dwuwymiarową ^[13]. Umożliwia ocenę echogeniczności (zdolności badanej struktury do odbijania fal) poszczególnych obszarów w danym przekroju. Prezentacja badania jako dwuwymiarowy obraz podlegający interpretacji przez specjalistę jest głównym obszarem zainteresowania grup zajmujących się implementacją algorytmów uczenia maszynowego i większość z przytoczonych prac skupia się właśnie na niej. Inną, istotną w kontekście analizowanego tematu techniką wykorzystującą ultradźwięki jest elastografia. Wykorzystuje fale do rejestracji podatności tkanki na odkształcenia, by następnie w oparciu o modelowanie matematyczne określić twardość tkanki. Informacja o twardości względnej i bezwzględnej obserwowanych zmian, stanowić istotny czynnik różnicujący ^[14, 15].

2. OBRAZOWANIE WĄTROBY

Ultrasonograficzne badanie wątroby należy do jednych z najszerzej rozpowszechnionych procedur tego typu. Mimo dostępności alternatywnych, dokładniejszych procedur obrazowania takich jak tomografia komputerowa (TK), ultrasonografia ciągle pozostaje jednym z początkowych badań w ścieżce diagnostycznej ^[16]. U podstaw biofizycznych obrazowania wątroby ultradźwiękami leżą różnice w echogeniczności między narządem a składowymi anatomicznymi takimi jak żyła wrotna, drogi żółciowe lub otoczeniem ^[17]. Obszary o różnych właściwościach akustycznych będą różnić się jasnością i będą kolejno, jaśniejsze dla obszarów hiperechogenicznych i ciemniejsze dla obszarów hipoechogenicznych. Podstawowa tematyka dotycząca zastosowania

AI w analizie USG wątroby obejmuje wykrywanie zmian o charakterze zwłóknieniowym i stłuszczeniowym. Złotym standardem w ocenie włóknienia wątroby jest ocena histopatologiczna w oparciu o wycinek, jednakże ze względu na inwazyjność tej metody, poprzedza się ją mniej obciążającymi badaniami pomocniczymi. Jednym z nich jest ultrasonograficzna ocena przerostu płatów lewego ogoniastego, zmniejszenia płata prawego wraz z oceną elastograficzną^[18]. Niealkoholowe stłuszczenie wątroby (NAFLD) jest jedną z najczęstszych przewlekłych chorób wątroby w krajach uprzemysłowionych. Główne zagrożenia wynikające z NAFLD wiążą się z postępującym uszkodzeniem wątroby i powikłaniami sercowo-naczyniowymi^[23]. NAFLD definiuje się je jako nadmierne gromadzenie się tłuszczu w wątrobie, powyżej 5% hepatocytów wykazujących cechy stłuszczenia w badaniu histologicznym. Patogeneza pierwotnej postaci choroby jest związana z nadmiarowym spożyciem tłuszczu i fruktozy. Istotnym czynnikiem ryzyka jest również występowanie zespołu metabolicznego i zaleca się uwzględnienie go w prowadzeniu rozpoznania. Podstawowym badaniem umożliwiającym ocenę stanu wątroby w kontekście NAFLD pozostaje ocena ultrasonograficzna, rezonansem magnetycznym i histopatologiczna, przy czym użyteczność USG jest ograniczona u pacjentów otyłych oraz takich u których zmiany nie mają jeszcze dostatecznie zaawansowanego charakteru^[25]. Ponadto, rozróżnienie między NAFLD a stłuszczeniem prostym jest niemożliwe bez przeprowadzenia badania inwazyjnego w postaci biopsji^[26]. Cechą w obrazie USG mogącą świadczyć o zmianach stłuszczeniowych jest przede wszystkim hiperechogeniczność narządu w porównaniu do kory nerki^[27]. Ryzyko niesione przez metody inwazyjne zarówno w przypadku diagnostyki zwłóknień jak i stłuszczeń jest czynnikiem skłaniającym do prac nad poprawą wartości diagnostycznej metod alternatywnych, w tym ultrasonografii wspomaganej przez AI. Przytoczone prace przeglądowe^[19, 29] analizujące dotychczasowe testy diagnostyki wspomaganej AI wskazują na potencjał i ograniczenia tej technologii. W analizowanej pracy przeglądowej przytoczono dwa niezależne badania w których porównywano skuteczność AI z radiologami. W obu wskazano na wyższą skuteczność modeli, należy natomiast mieć na uwadze ograniczoną liczbę prac dokonującą tego typu analizy^[19]. Praca przeglądowa z 2022 analizująca 15 badań wskazuje na dużą zależność skuteczności modelu od stopnia zaawansowania stłuszczenia. Algorytmy najlepiej sobie radzą z wykrywaniem zaawansowanych zmian osiągając przy tym rezultaty lepsze od alternatywnych metod nieinwazyjnych. Warto jednak podkreślić, że w wszystkich analizowanych badaniach czułość przekraczała 90% przy minimalnej dokładności 80%^[29].

2.1. S-Detect 2 (Samsung Medison)

Opracowany w 2020 roku S-Detect 2 (Samsung Medison) to oparty na głębokim uczeniu system zintegrowany z USG producenta analizującym obraz w czasie rzeczywistym. Po zidentyfikowaniu guzka podczas skanowania obraz zostaje zamrożony, a wokół guzka zarysowywany jest kwadratowy ROI. Późniejsza automatyczna segmentacja krawędzi guzków, po której następuje automatyczne przypisanie sześciu cech, z których wiele odzwierciedla te wspólne dla TIRADS: Kompozycja, Orientacja, Echo, Kształt, Granica i Zwapnienie. Następnie program klasyfikuje zmianę do jednej z pięciu kategorii ryzyka TIRADS oraz ocenia prawdopodobieństwo złośliwości zmiany. Wśród dostępnych narzędzi zatwierdzonych przez FDA, S-detect jest najlepiej zbadanym ^[33]. Do innych komercyjnie dostępnych produktów należy m.in. AmCAD-UT od firmy AmCAD Biomed oraz Koios DS™ Thyroid od firmy Koios™ ^[34, 35]. W literaturze opisano również inne zastosowania AI poza klasyfikacją i oceną guzków tarczycy, co daje nadzieję na przyszły rozwój i nowe zastosowania komercyjne w diagnostyce USG tarczycy.

3. OBRAZOWANIE UKŁADU SERCOWO-NACZYNIOWEGO

Wykorzystanie technologii sztucznej inteligencji w obrazowaniu układu sercowo-naczyniowego stało się w ostatnich latach gorącym punktem badań, ponieważ daje nadzieję na obniżenie kosztów leczenia oraz uniknięciu niepotrzebnych badań ^[36]. Technologia echokardiografii ma pewne ograniczenia jako nieinwazyjne narzędzie obrazowe anatomii serca i jego oceny czynnościowej. Należą do nich długie procedury, wiele wartości pomiarowych, subiektywność użytkownika, dogłębne analizy ewaluacyjne, wysokie standardy zindywidualizowanych ocen, wysoki subiektywizm operatora oraz szerokie zakresy obserwacji i różnice między obserwatorami. Ograniczenia te powodują duże zapotrzebowanie na specjalistyczne szkolenia medyczne w zakresie echokardiografii, dlatego wykorzystanie sztucznej inteligencji budzi tak duże zainteresowanie ^[37, 38].

3.1. Automatyczne wyznaczenie frakcji wyrzutowej (Ef)

Jedną z najważniejszych i najczęściej stosowanych technik diagnostycznych w diagnostyce echokardiograficznej jest pomiar stanu czynnościowego lewej komory. Frakcja wyrzutowa (Ef) lewej komory, objętość lewej komory,

funkcja ruchu ściany lewej komory, kurczliwość mięśnia sercowego i odkształcenie podłużne są markerami oceny czynnościowej skurczu lewej komory. Najczęściej stosowaną miarą do oceny funkcji skurczowej lewej komory jest frakcja wyrzutowa. Ef można obliczyć za pomocą M-mode (trybu M), mierząc stosunek średnicy wewnętrznej lewej komory w końcowym rozkurczu do jej średnicy w czasie skurczu ^[39]. Dwupłaszczyznowa technika Simpsona jest dokładniejszym sposobem oszacowania frakcji wyrzutowej, szczególnie w przypadku obecności nieprawidłowości ruchomości segmentowej ściany komory, takich jak zawał mięśnia sercowego ^[40]. Niezależnie od zastosowanej metody, ocena opiera się na ręcznym wyznaczeniu granic, a powtarzalność i dokładność zależą od doświadczenia lekarza ^[41]. Różne badania kliniczne wykazały, że zautomatyzowane oprogramowanie do oceny objętości komór i frakcji wyrzutowej może zapewnić zbliżoną dokładność do metod manualnych ^[42]. Aktualnie na rynku dostępnych jest kilka rozwiązań komercyjnych, które w sposób zautomatyzowany przeprowadzają analizę obrazu USG, pod względem oceny funkcji lewej komory ^[43].

3.2. Automatyczna segmentacja jam serca

Dzięki określeniu płaszczyzny segmentacji możemy zobrazować kształt i funkcję dwóch komór oraz dwóch przedsionków. W wymienionych przestrzeniach może dochodzić do patologicznych zmian ciśnienia oraz objętości, co powoduje powiększenie komór, kompensacyjne pogrubienie ścian i przebudowę serca. Dlatego też uzyskanie dokładnej segmentacji obrazów ultrasonograficznych serca i zrozumienie zmian morfologicznych w diagnostyce klinicznej ma ogromne znaczenie ^[44]. Ręczna segmentacja jest żmudna, czasochłonna i subiektywna. Dlatego automatyczna i dokładna segmentacja może ograniczyć występowanie wyżej wymienionych problemów i ma korzystną wartość kliniczną. Obecnie komory serca są automatycznie segmentowane poprzez identyfikację ściany wsierdza na obrazach dwuwymiarowych lub trójwymiarowych (3D), co jest powszechne w przypadku segmentacji lewej i prawej komory. Podczas procesu segmentacji parametry takie jak wielkość komory serca mogą być również automatycznie oceniane i dokładnie mierzone ^[45].

3.3. Diagnostyka wad zastawkowych

Dzięki echokardiografii można wizualnie zbadać kształt i funkcję zastawek serca. Powtarzalność takiego badania jest niewiarygodna ze względu na subtelne różnice w architekturze zastawki i zakresie ruchu, a także różnice między lekarzami w postrzeganiu zwężenia, wypadania, zwapnień i niewydolności zastawek. Sztuczna inteligencja dzięki swojej strukturze jest w stanie dokładnie i precyzyjnie ocenić wady zastawkowe ^[46]. Dane takie jak długość i wysokość pierścienia w obrazie 3D, powierzchnia w obrazie 2D, szerokość spoidła, szerokość zakładki, powierzchnia płątka 3D, kąt przedniego i tylnego płątka, kąt niepłaski, wypadanie, wysokość zastawki i objętość. Dzięki wykorzystaniu AI można automatycznie wykonać pomiar powierzchni zastawki mitralnej i objętości fali zwrotnej w celu oceny ciężkości niedomykalności zastawki ^[47].

4. OBRAZOWANIE PIERSI

Zastosowanie technik USG przypadku piersi odnosi się przede wszystkim do wykrywania zmian nowotworowych. Najważniejszymi czynnikami ryzyka dla raka piersi są starszy wiek i nosicielstwo mutacji niektórych genów wśród wskazuje się zwłaszcza na BRCA1 i BRCA2 ^[48]. Pozostaje istotnym problemem zdrowotnym stanowiąc 23% zachorowań z powodu nowotworów złośliwych i generując około 14% zgonów z tej kategorii. Najskuteczniejszą metodą wczesnego wykrywania raka piersi pozostają badania przesiewowe badania mammograficzne (MMG) oparte o promieniowanie rentgenowskie ^[50]. Mimo to badania USG wskazuje się jako metodę diagnostyki pomocniczej, a skale wypracowane do oceny obrazów MMG takie jak BIRADS (patrz tabela nr. 2) opracowane przez Amerykańskie Towarzystwo Radiologiczne mają również do niego zastosowanie. Problematyka detekcji wiąże się z faktem, że aby dany obraz mógł zostać przeanalizowany przez radiologa, musi być wcześniej uznany przez operatora urządzenia wykonującego badanie za odbiegający od normy i istotny diagnostycznie ^[51]. Na ten aspekt zwrócili uwagę autorzy oryginalnego badania, w którym wyszkolili model zdolny do wykrywania w czasie rzeczywistym zmian podczas USG piersi (24 klatki/s). Badacze dokonali jednocześnie analizy zdolności obliczeniowych kart graficznych aparatu USG w kontekście implementacji takiej funkcji zwracając tym samym uwagę na problematykę wymagań sprzętowych w przypadku możliwej szerszej implementacji takich funkcjonalności w urządzeniach. W przytoczonej pracy skutecznie zaimplementowano funkcję predykcyjną czasu rzeczywistego

którą określono jako “niewymagającą” wykorzystując moc obliczeniową którą oszacowano jako “przeciętne” [52]. W innym badaniu z 2021 roku wykazano, że obrazowanie wspomagane AI podniosło skuteczność zarówno początkujących jak i zaawansowanych radiologów. Analizowano wspomniany już wyżej system S-Detect którego rolą było wyznaczenie granic oznaczonej przez operatora zmiany, a następnie segmentację i analizę jej w oparciu o cechy morfologiczne zgodnie z odpowiednią skalą (np. BI-RADS). Ostateczny wynik analizy obok ustrukturyzowanego raportu jest przedstawiany dychotomicznie jako “przypuszczalnie złośliwy” lub “przypuszczalnie łagodny” i ma charakter odniesienia mającego wspomóc radiologa w ostatecznej diagnozie [53, 54]. Badacze na stosunkowo niewielkiej grupie 40 pacjentów przeprowadzili badanie, w ramach którego testowali między innymi skuteczność tandemu AI+Radiolog względem specjalisty bez wspomagania. Poprawa efektywności dla początkującego radiologa wyniosła 0.948 z AI vs 0.719 bez wspomagania, a dla zaawansowanego 0.969 vs 0.802 (wielkość pola pod krzywą- ROC) [55].

5. PODSUMOWYWANIE

Sztuczna inteligencja w ostatnich latach znajduje szerokie zastosowanie w analizie obrazów ultrasonograficznych, a tendencja ta nasila się wraz z coraz większą dostępnością sprzętu o dostatecznej mocy obliczeniowej. W cytowanych pracach autorzy odnosząc się zarówno do powszechnie stosowanych jak i eksperymentalnych technik skupiają się na ocenie skuteczności algorytmu porównując go z radiologami o różnym stopniu doświadczenia, oraz oceniają potencjał w asyście lekarzowi. Na uwagę zasługuje fakt, że nawet w pracach, których wyniki są niejednoznaczne w ocenie skuteczności algorytmów, autorzy raczej na konieczność rozbudowy szkoleniowych baz danych niż na wykluczenie zastosowania AI w poszczególnych procedurach. Budowanie odpowiednio dużych baz danych, na których możliwe byłoby szkolenie i testowanie modeli jest istotnym elementem problematyki związanej z AI w medycynie i wielu badaczy wskazywało na ograniczenie szkolonych modeli wynikające z niego.

6. DYSKUSJA

Sztuczna inteligencja znajduje szerokie zastosowanie w analizie obrazu ultrasonograficznego zarówno w modelach eksperymentalnych jak i dopuszczonych do stosowania. Do najważniejszych wyzwań, na które wskazują badacze w omawianych pracach należy dostęp do odpowiednio rozbudowanych baz danych. Zbieranie i udostępnianie wyników archiwalnych między ośrodkami medycznymi może być kluczowe dla dalszego rozwoju tej technologii, ale potencjalnie niesie ze sobą problemy związane z zachowaniem poufności pacjentów i organizacją takiego przedsięwzięcia. Przytoczone prace ukierunkowane są bardziej na optymalizację pracy radiologa i operatora ultrasonografu niż na eliminację czynnika ludzkiego z procedury. Badacze motywują swoje działania zwiększeniem dostępu do radiologa oraz ograniczenie błędów wynikających z przemęczenia. Wszystkie dostępne komercyjnie narzędzia tego typu posiadają klauzulę wymuszającą weryfikację przez ludzkiego eksperta otrzymanych przy ich użyciu wyników. Rozwój przytoczonych technik wygląda obiecująco, ale wymagane są dalsze badania dla zwiększenia skuteczności i określenia ram, w ramach których mogą być stosowane.

REFERENCJE

- [1] Mintz Y, Brodie R. Introduction to artificial intelligence in medicine. *Minimal Invasive Ther Allied Technol.* 2019;28(2):73-81. doi:10.1080/13645706.2019.1575882
- [2] Ghosh-Dastidar S, Adeli H. Spiking neural networks. *Int J Neural Syst.* 2009;19(4):295-308. doi:10.1142/S0129065709002002
- [3] He J, Baxter SL, Xu J, Xu J, Zhou X, Zhang K. The practical implementation of artificial intelligence technologies in medicine. *Nat Med.* 2019;25(1):30-36. doi:10.1038/s41591-018-0307-0
- [4] Murdoch WJ, Singh C, Kumbier K, Abbasi-Asl R, Yu B. Definitions, methods, and applications in interpretable machine learning. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(44):22071-22080. doi:10.1073/pnas.1900654116
- [5] Davis A, Billick K, Horton K, et al. Artificial Intelligence and Echocardiography: A Primer for Cardiac Sonographers. *J Am Soc Echocardiogr.* 2020;33(9):1061-1066. doi:10.1016/j.echo.2020.04.025

- [6] Asch FM, Poilvert N, Abraham T, et al. Automated Echocardiographic Quantification of Left Ventricular Ejection Fraction Without Volume Measurements Using a Machine Learning Algorithm Mimicking a Human Expert. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2019;12(9):e009303. doi:10.1161/CIRCIMAGING.119.009303
- [7] COŚ NIE IDZIE ZROBIĆ AMA
- [8] Wang J, Chen Y, Yu SX, Cheung B, LeCun Y. Compact and optimal deep learning with recurrent parameter generators. In: *2023 IEEE/CVF Winter Conference on Applications of Computer Vision (WACV)*. IEEE; 2023. doi:10.1109/wacv56688.2023.00389
- [9] Shrestha A, Mahmood A. Review of deep learning algorithms and architectures. *IEEE Access*. 2019;7:53040-53065. doi:10.1109/access.2019.2912200
- [10] O'Shea K, Nash R. An Introduction to Convolutional Neural Networks. *arXiv [csNE]*. Published online 26 November 2015. <http://arxiv.org/abs/1511.08458>
- [11] Srivastava R, Kumar P. GSO-CNN-based model for the identification and classification of thyroid nodule in medical USG images. *Netw Model Anal Health Inform Bioinform*. 2022;11(1). doi:10.1007/s13721-022-00388-w
- [12] Pruszyński Bogdan. Diagnostyka Obrazowa. Podstawy Teoretyczne i metodyka badań. PZWL Wydawnictwo Lekarskie, 2013
- [13] Baron Jan, Pilch-Kowalczyk Joanna. Podstawy badania ultrasonograficznego. Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Katowice, 2021.
- [14] Skuza M, Stachowicz-Stencel T. Ocena przydatności diagnostyki ultrasonograficznej w różnicowaniu zmian ogniskowych wątroby. *Forum Medycyny Rodzinnej*. 2015;9:318-325.
- [15] Real-time ultrasound elastography-a new tool for diagnosing thyroid nodules. *Endokrynologia Polska*. 2010;61:652-657.
- [16] Skuza M, Stachowicz-Stencel T. Ocena przydatności diagnostyki ultrasonograficznej w różnicowaniu zmian ogniskowych wątroby. *Forum Medycyny Rodzinnej*. 2015;9:318-325.
- [17] Baron Jan, Pilch-Kowalczyk Joanna. Podstawy badania ultrasonograficznego. Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Katowice, 2021.

- [18] Wawrzynowicz-Syczewska Marta. „Marskość wątroby”, *mp.pl*, Medycyna Praktyczna, Kraków, 10.08.2022
- [19] Anteby R, Klang E, Horesh N, et al. Deep learning for noninvasive liver fibrosis classification: A systematic review. *Liver Int.* 2021;41(10):2269-2278. doi:10.1111/liv.14966
- [20] Wang K, Lu X, Zhou H, et al. Deep learning Radiomics of shear wave elastography significantly improved diagnostic performance for assessing liver fibrosis in chronic hepatitis B: a prospective multicentre study. *Gut.* 2019;68(4):729-741. doi:10.1136/gutjnl-2018-316204
- [21] Anteby R, Klang E, Horesh N, et al. Deep learning for noninvasive liver fibrosis classification: A systematic review. *Liver Int.* 2021;41(10):2269-2278. doi:10.1111/liv.14966
- [22] BRAK LINKU
- [23] Gąsiorowska AD. Niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby. *Lekarz POZ.* 2019;5(3/4).
- [24] Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, et al. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol.* 2006;6:33. Published 2006 Nov 2. doi:10.1186/1471-230X-6-33
- [25] Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, et al. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol.* 2006;6:33. Published 2006 Nov 2. doi:10.1186/1471-230X-6-33
- [26] Gąsiorowska AD. Niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby. *Lekarz POZ.* 2019;5(3/4).
- [27] Gąsiorowska AD. Niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby. *Lekarz POZ.* 2019;5(3/4).
- [28] Cao LL, Peng M, Xie X, et al. Artificial intelligence in liver ultrasound. *World J Gastroenterol.* 2022;28(27):3398-3409. doi:10.3748/wjg.v28.i27.3398
- [29] Cao LL, Peng M, Xie X, et al. Artificial intelligence in liver ultrasound. *World J Gastroenterol.* 2022;28(27):3398-3409. doi:10.3748/wjg.v28.i27.3398

- [30] Durante C, Grani G, Lamartina L, Filetti S, Mandel SJ, Cooper DS. The Diagnosis and Management of Thyroid Nodules: A Review [published correction appears in JAMA. 2018 Apr 17;319(15):1622]. *JAMA*. 2018;319(9):914-924. doi:10.1001/jama.2018.0898
- [31] Choi YJ, Baek JH, Park HS, et al. A Computer-Aided Diagnosis System Using Artificial Intelligence for the Diagnosis and Characterization of Thyroid Nodules on Ultrasound: Initial Clinical Assessment. *Thyroid*. 2017;27(4):546-552. doi:10.1089/thy.2016.0372
- [32] Choi YJ, Baek JH, Park HS, et al. A Computer-Aided Diagnosis System Using Artificial Intelligence for the Diagnosis and Characterization of Thyroid Nodules on Ultrasound: Initial Clinical Assessment. *Thyroid*. 2017;27(4):546-552. doi:10.1089/thy.2016.0372
- [33] Wildman-Tobriner B, Taghi-Zadeh E, Mazurowski MA. Artificial intelligence (AI) tools for thyroid nodules on ultrasound, from the AJR special series on AI applications. *AJR Am J Roentgenol*. 2022;219(4):1-8. doi:10.2214/AJR.22.27430
- [34] Reverter JL, Vázquez F, Puig-Domingo M. Diagnostic performance evaluation of a computer-assisted imaging analysis system for ultrasound risk stratification of thyroid nodules. *AJR Am J Roentgenol*. 2019;213(1):169-174. doi:10.2214/AJR.18.20740
- [35] Koios Medical, Inc. Koios DS, https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf21/K212616.pdf
- [36] Kuehn BM. Cardiac imaging on the cusp of an artificial intelligence revolution. *Circulation*. 2020;141(15):1266-1267. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.120.046760
- [37] Kumar S, Nilsen WJ, Abernethy A, et al. Mobile health technology evaluation: the mHealth evidence workshop. *Am J Prev Med*. 2013;45(2):228-236. doi:10.1016/j.amepre.2013.03.017
- [38] Cihon P, Schuett J, Baum SD. Corporate governance of artificial intelligence in the public interest. *Information (Basel)*. 2021;12(7):275. doi:10.3390/info12070275
- [39] Vanhove C, Franken PR, Defrise M, Momen A, Everaert H, Bossuyt A. Automatic determination of left ventricular ejection fraction from gated blood-pool tomography. *J Nucl Med*. 2001;42(3):401-407. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11337514>

- [40] Bellenger NG, Burgess MI, Ray SG, et al. Comparison of left ventricular ejection fraction and volumes in heart failure by echocardiography, radionuclide ventriculography and cardiovascular magnetic resonance. Are they interchangeable? *European heart journal*. 2000;21(16):1387-1396.
- [41] Vanhove C, Franken PR, Defrise M, Momen A, Everaert H, Bossuyt A. Automatic determination of left ventricular ejection fraction from gated blood-pool tomography. *J Nucl Med*. 2001;42(3):401-407.
- [42] Knackstedt C, Bekkers SCAM, Schummers G, et al. Fully automated versus standard tracking of left ventricular ejection fraction and longitudinal strain: The FAST-EFs multicenter study. *J Am Coll Cardiol*. 2015;66(13):1456-1466. doi:10.1016/j.jacc.2015.07.052
- [43] Tsang W, Salgo IS, Medvedofsky D, et al. Transthoracic 3D echocardiographic left heart chamber quantification using an automated adaptive analytics algorithm. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2016;9(7):769-782. doi:10.1016/j.jcmg.2015.12.020
- [44] Li Y, Garson CD, Xu Y, Helm PA, Hossack JA, French BA. Serial ultrasound evaluation of intramyocardial strain after reperfused myocardial infarction reveals that remote zone dyssynchrony develops in concert with left ventricular remodeling. *Ultrasound Med Biol*. 2011;37(7):1073-1086. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2011.04.002
- [45] Saris AECM, Nillesen MM, Lopata RGP, de Korte CL. Correlation-based discrimination between cardiac tissue and blood for segmentation of the left ventricle in 3-D echocardiographic images. *Ultrasound Med Biol*. 2014;40(3):596-610. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2013.09.025
- [46] Gandhi S, Mosleh W, Shen J, Chow CM. Automation, machine learning, and artificial intelligence in echocardiography: A brave new world. *Echocardiography*. 2018;35(9):1402-1418. doi:10.1111/echo.14086
- [47] de Agustín JA, Marcos-Alberca P, Fernandez-Golfin C, et al. Direct measurement of proximal isovelocity surface area by single-beat three-dimensional color Doppler echocardiography in mitral regurgitation: a validation study. *J Am Soc Echocardiogr*. 2012;25(8):815-823. doi:10.1016/j.echo.2012.05.021

- [48] Karczmarek-Borowska B, Walowska A. Analiza czynników ryzyka zachorowania na raka piersi u kobiet po mastektomii : badania wstępne. *Problemy Nauk Stosowanych*. 2017;T. 6. Accessed February 14, 2023. <https://yadda.icm.edu.pl/baztech/element/bwmeta1.element/baztech-a6ba5f5f-a62b-4f55-9188-56aecff602e0>
- [49] Krajowy Rejestr Nowotworów. Nowotwór piersi u kobiet. Uzyskano dostęp Grudzień 28, 2022. <https://onkologia.org/pl/pl/nnowotwor-piersi-u-kobiet-czym-jest>
- [50] Perry N, Broeders M, de Wolf C, Törnberg S, Holland R, von Karsa L. European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis. Fourth edition--summary document. *Ann Oncol*. 2008;19(4):614-622. doi:10.1093/annonc/mdm481
- [51] Kim J, Kim HJ, Kim C, Kim WH. Artificial intelligence in breast ultrasonography. *Ultrasonography*. 2021;40(2):183-190. doi:10.14366/usg.201117
- [52] Zhang X, Lin X, Zhang Z, et al. Artificial intelligence medical ultrasound equipment: Application of breast lesions detection. *Ultrason Imaging*. 2020;42(4-5):191-202. doi:10.1177/0161734620928453
- [53] Xia Q, Cheng Y, Hu J, et al. Differential diagnosis of breast cancer assisted by S-Detect artificial intelligence system. *Math Biosci Eng*. 2021;18(4):3680-3689. doi:10.3934/mbe.2021184
- [54] Zhang D, Jiang F, Yin R, et al. A Review of the Role of the S-Detect Computer-Aided Diagnostic Ultrasound System in the Evaluation of Benign and Malignant Breast and Thyroid Masses. *Med Sci Monit*. 2021;27:e931957. Published 2021 Sep 23. doi:10.12659/MSM.931957
- [55] Xia Q, Cheng Y, Hu J, et al. Differential diagnosis of breast cancer assisted by S-Detect artificial intelligence system. *Math Biosci Eng*. 2021;18(4):3680-3689. doi:10.3934/mbe.2021184

POTRÓJNIE UJEMNE RAKI PIERSI — LECZENIE I NOWE STRATEGIE TERAPEUTYCZNE

Martyna Żurek, Zofia Graca, Łukasz Czogalik, Jakub Kołodziej, Oliwia Pluta

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

Abstrakt: Potrójnie ujemne raki piersi (TNBC) to nowotwory, które nie wykazują ekspresji receptora estrogenowego, progesteronowego, ani receptora ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu typu 2 (HER-2). Stanowią około 12-17% wszystkich przypadków raka piersi i występują głównie u osób poniżej 50 roku życia. Cechują się bardzo agresywnym przebiegiem, szybką progresją i tworzeniem przerzutów, a także gorszym rokowaniem. Ze względu na brak ekspresji docelowych receptorów, hormonoterapia i terapia przeciwko HER-2 nie znajdują zastosowania w tym podtypie raka. Standardem postępowania jest leczenie chirurgiczne i chemioterapia, co wiąże się z ograniczoną skutecznością. Badania nowych terapii celowanych dla TNBC znajdują się na różnych etapach, ale ich wyniki są zdecydowanie zachęcające. W pracy przedstawiono aktualnym schemat postępowania i omówiono przykłady wybranych, potencjalnych strategii terapeutycznych w tym: inhibitory polimerazy poli(ADP-rybozy), terapię anti-TROP-2, inhibitory VEGF, inhibitory EGFR, terapię antyandrogenową i inhibitory wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych.

Słowa kluczowe: potrójnie ujemny rak piersi, TNBC, terapia celowana

Abstract: Triple-negative breast cancers (TNBCs) are cancers that do not express estrogen receptors, progesterone receptors, or human epidermal growth factor receptors 2 (HER-2). They account for approximately 12-17% of all breast cancer cases and occur mainly under the age of 50. TNBC has a particularly aggressive course, rapid progression and metastasis, as well as a worse prognosis. Due to the lack of target receptors, hormonal and anti-HER-2 therapies are unsuccessful in these cases. Current standard of care includes surgery and chemotherapy, which is associated with limited treatment effectiveness. Research on new targeted therapies for TNBC is in various stages, but results are definitely encouraging. In this review, we discuss current procedure and examples of selected, potential therapeutic strategies, including: poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors, anti-TROP-2 therapy, VEGF inhibitors, EGFR inhibitors, anti-androgen therapy and inhibitors of intracellular signaling pathways.

Keywords: triple-negative breast cancer, TNBC, targeted therapy

1. WPROWADZENIE

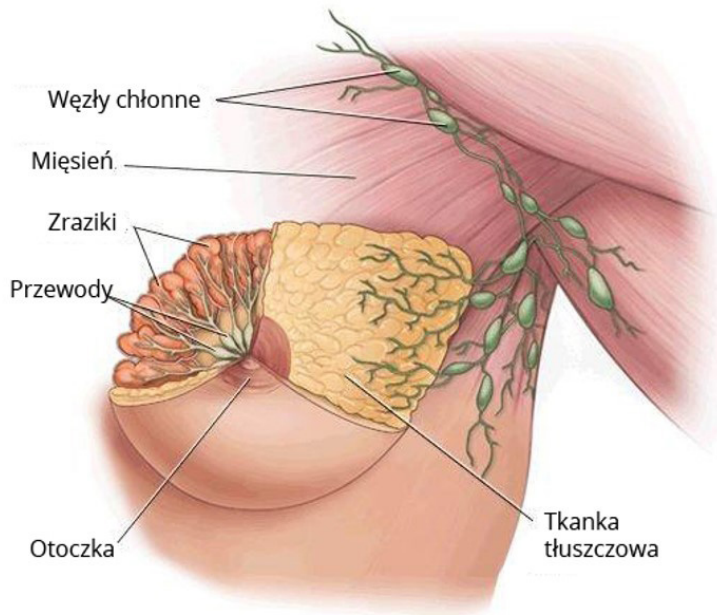
Rak piersi zwany też inaczej rakiem sutka to najczęściej występujący nowotwór złośliwy wśród kobiet zamieszkujących kraje wysoko rozwinięte, w tym również Polskę, gdzie stanowi przyczynę ok. 23% zachorowań na nowotwory i jest odpowiedzialny za ok. 15% zgonów (dane na podstawie KRN z 2019r.). Rozwija się miejscowo z komórek gruczołu piersiowego, który zbudowany jest z przewodów mlecznych oraz 15-20 zrazików (płatów); (rycina 1.). Elementy te są wysielone komórkami, z których może rozwinąć się nowotwór. Zwykle wywodzi się on z przewodów (rak przewodowy), rzadziej ze zrazików (rak zrazikowy), a wyjątkowo komórki nowotworowe mogą rozwijać się również w innych elementach budowy piersi np. mięsaki. Najczęściej daje przerzuty do okolicznych węzłów chłonnych — pachowych po stronie nowotworu, zamostkowych i nadobojczykowych. Może też zająć płuca, wątrobę, kości i mózgu^[1].

Wśród wielu modeli klasyfikacji raka piersi jednym z najważniejszych jest podział na podtypy molekularne, ustalane w trakcie badań immunohistochemicznych, w zależności od ekspresji receptora estrogenowego — ER, progesteronowego — PgR, receptora ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu typu 2 — HER-2 oraz indeksu proliferacji Ki-67^[2, 3]. Podział ten stanowi istotną składową wyboru odpowiedniej terapii (tabela 1.). Podstawą leczenia raka piersi jest chirurgia, chemioterapia, radioterapia, hormonoterapia i terapia celowana. Natomiast model leczenia różni się w zależności od podtypu. Guzy, których wzrost stymulowany jest przez hormony, a więc takie, które wykazują wysoki stopień ekspresji receptorów PgR lub ER, można próbować leczyć za pomocą hormonoterapii. W terapii nowotworów z wysokim poziomem HER-2 wykorzystuje się antagonistów tego receptora^[4].

Istnieje też grupa raków piersi, które nie wykazują ekspresji receptorów hormonalnych oraz brak lub bardzo niską ekspresję HER-2. Nowotwory te nazwano potrójnie ujemnymi (TNBC triple-negative breast cancer). Często utożsamiane są z nowotworami bazalnymi, natomiast nie wszystkie nowotwory bazalne są potrójnie ujemnymi rakami i odwrotnie, te typy pokrywają się w około 80%^[5]. Wśród chorych nosicielek mutacji genu BRCA1 około 57% choruje na TNBC^[6]. W wielu badaniach wykazano również związek częstości występowania tego podtypu raka piersi z mutacją BRCA2^[7,8,9]. W klasyfikacji ogólnej stanowi około 12-17% wszystkich przypadków zachorowań na raka piersi. Chorują szczególnie kobiety poniżej 50 roku życia. Choroba cechuje się agresywnym przebiegiem, szybką progresją oraz szybkim tworzeniem

się przerzutów — najczęściej do mózgu, płuc i wątroby. Potrójnie ujemny rak piersi w porównaniu z innymi podtypami charakteryzuje się szczególnie złym rokowaniem, krótkim okresem przeżycia oraz wczesnymi nawrotami choroby ^[10,11].

Widok piersi z przodu



Rycina 1. Anatomiczny schemat budowy piersi z przodu
<https://onkologia.org.pl/pl/nowotwor-piersi-u-kobiet-czym-jest> Accessed February 7, 2023]

Progres w leczeniu raka sutka wynika głównie z rozpowszechnienia programów profilaktycznych, szczególnie w grupie wiekowej kobiet 50-69 lat, która jest najbardziej narażona na rozwój nowotworu piersi. Profilaktyczne badanie mammograficzne pozwala wykryć zmiany w gruczole piersiowym we wczesnym stadium zaawansowania, co znacznie poprawia rokowanie, gdyż aktualnie najczęstszą przyczyną zgonów jest progresja choroby z występującymi przerzutami do innych narządów. Niestety, jako że TNBC pojawia się szczególnie u kobiet poniżej 50 roku życia, nie jest on zwykle wykrywany w badaniach przesiewowych i szanse na jego wczesne rozpoznanie oraz szybkie leczenie są zmniejszone. Terapia hormonalna oraz terapia przeciwko HER-2 nie znajdują zastosowania w leczeniu tego podtypu ze względu na brak ekspresji docelowych receptorów. Kobiety chorujące na potrójnie ujemnego raka piersi mają takie same wskazania do zabiegów chirurgicznych oraz chemioterapii

jak kobiety chorujące na inne podtypy. Natomiast do niedawna nie istniała żadna terapia celowana dla tej grupy pacjentów. Dodatkowo Lehmann i wsp. wyróżnili co najmniej 6 kolejnych, odrębnych podtypów molekularnych występujących wśród TNBC, które różniły się ekspresją poszczególnych genów i skutecznością zastosowanych terapii celowanych ^[12]. Dlatego w ostatnich latach niezwykle intensywnie poszukuje się terapii o większej skuteczności, które poprawiłyby rokowania chorych. Celem pracy jest przybliżenie aktualnego schematu leczenia osób z potrójnie ujemnym rakiem piersi oraz przykładowych, potencjalnych terapii przyszłości.

Tabela 1. Molekularne podtypy raka piersi, ich charakterystyka oraz zalecane metody leczenia systemowego [opracowanie własne na podstawie wytycznych z konferencji w St. Gallen 2011 ^[14]

| Podtyp raka piersi | Charakterystyka molekularna | Sposoby leczenia pozachirurgicznego |
|----------------------------|---|---|
| Luminalny A | ER (+) PgR > 20% HER-2 (-) Ki-67 < 14% | Hormonoterapia |
| Luminalny B (HER-2 (-)) | ER (+) PgR (+) HER-2 (-) Ki-67 > 14% | Hormonoterapia + chemioterapie |
| Luminalny B (HER-2 (+)) | ER (+) PgR (każdy) HER-2 (+) Ki-67 (każdy) | Chemioterapie + hormonoterapie + leki przeciwko HER-2 |
| HER-2 nieluminalny | ER (-) PgR (-) HER-2 (+) | Chemioterapie + leki przeciwko HER-2 |
| Potrójnie ujemny (bazalny) | ER (-) PgR (-) HER-2 (-) | Chemioterapie |

2. OBECNY MODEL LECZENIA

Pacjenci chorujący na TNBC mają takie same wskazania do leczenia chirurgicznego i chemioterapie, jak chorzy cierpiący na inne podtypy raka sutka. Ze względu na brak terapii celowanych w przypadku potrójnie ujemnego raka piersi jest to standard w dotychczasowym modelu leczenia mimo ograniczonej skuteczności wspomnianych metod. Według badań również radioterapie może przynosić korzyści w leczeniu chorych na TNBC ^[14, 15, 16].

2.1. Chirurgia

Chirurgia raka piersi obejmuje dwie podstawowe procedury – mastektomię (całkowite usunięcie piersi, amputacja piersi) oraz zabieg oszczędzający, podczas którego usuwany jest jedynie fragment piersi z guzem z zachowaniem możliwie jak największego obszaru piersi [17]. Wśród procedur oszczędzających możemy wyróżnić różne typy zabiegów: kwadrantenktomię, lumpektomię oraz tumorektomię, które różnią się wielkością usuwanego obszaru piersi [18]. Podczas postępowania chirurgicznego mogą zostać usunięte również okoliczne węzły chłonne, jeśli podejrzewa się, że są w nich obecne komórki nowotworowe. Przeprowadzono wiele badań w celu ustalenia, która z procedur — mastektomia czy zabieg oszczędzający, są częściej wybierane i jaka jest ich skuteczność w leczeniu potrójnie ujemnych raków piersi. TNBC jest zwykle jednoogniskową zmianą z gładkim brzegiem, co daje dobre warunki do wykonania zabiegu oszczędzającego [14]. W jednym z badań wykazano, że do mastektomii częściej kwalifikowane są pacjentki z większymi guzami, w bardziej zaawansowanym stadium choroby oraz z zajęтыми węzłami chłonnymi. W okresie obserwacji, którego mediana wynosiła 62 miesiące, nawrót guza piersi po zastosowaniu procedur oszczędzających nastąpił u 26% badanych, natomiast po mastektomii u 30% [19]. Wynika stąd, że rozpoznanie potrójnie ujemnego raka piersi nie jest przeciwwskazaniem do wykonania zabiegów oszczędzających, co potwierdzają inne badania w tym metaanaliza uwzględniająca wyniki otrzymane z 14 badań na 19 819 pacjentach [20]. Podczas kolejnych obserwacji wykazano brak różnic w zakresie 5-letniego przeżycia bez wznowy miejscowej po leczeniu oszczędzającym u pacjentów z TNBC i nie-TNBC. Zwrócono natomiast uwagę na konieczność stosowania w pierwszej grupie pacjentów bardziej agresywnej i dostosowanej terapii uzupełniającej [21].

2.2. Radioterapia

W TNBC radioterapia stosowana jest zwykle jako leczenie uzupełniające po zabiegach oszczędzających i czasem również po mastektomii. Zaobserwowano, że kobiety po mastektomii mają większe prawdopodobieństwo nawrotu guza piersi w ciągu 5 lat po zabiegu w porównaniu z pacjentkami po zabiegu oszczędzającym połączonym z radioterapią. Pięcioletnie przeżycie wolne od wznowy wynosiło odpowiednio 85% i 94% ($P < 0,001$) [22, 23]. W innych badaniach wykazano, że korzyści w zakresie przeżycia wynikające

z zastosowania radioterapii odnosiły się tylko do grupy pacjentek leczonych w sposób oszczędzający. Nie odnotowano korzyści u pacjentek po mastektomii [24]. Inny artykuł zwraca uwagę na mogącą się pojawić u pacjentek z potrójnie ujemnymi rakami piersi oporność na radioterapię i wskazuje na rolę miRNA jako regulatora i biomarkera selekcji pacjentek do omawianego leczenia [25]. Te ustalenia sugerują, że podjęcie decyzji o zastosowaniu radioterapii powinno zostać rozważone indywidualnie w odniesieniu do danego przypadku TNBC.

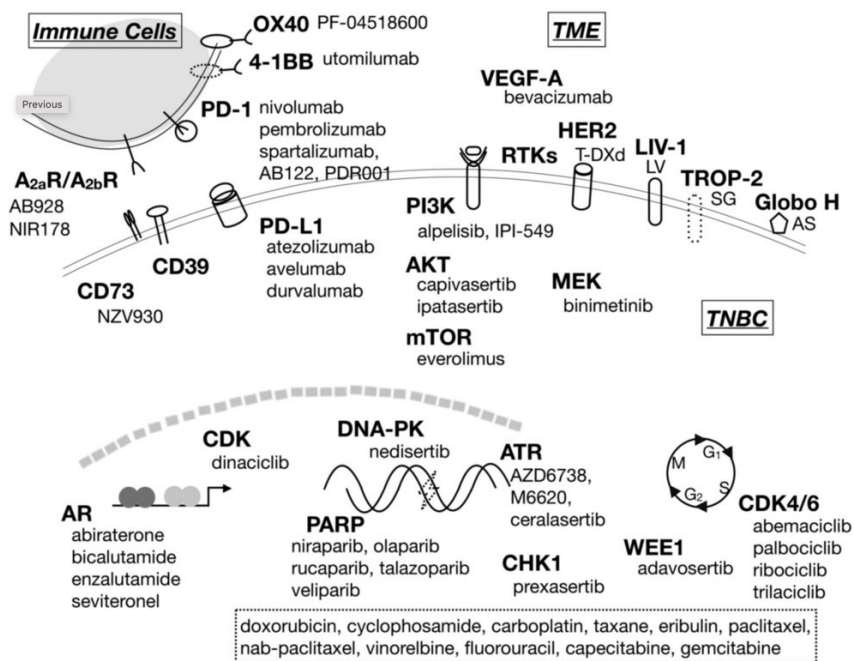
2.3. Chemioterapia

Mimo wysiłków w poznaniu genomiki oraz punktów uchwytu dla terapii celowanej chemioterapia wciąż stanowi standard postępowania w TNBC. Jednak w porównaniu z innymi rakami piersi, rak potrójnie ujemny charakteryzuje się taką samą, a nawet większą chemiowrażliwością [26, 27, 28]. W nowotworach piersi chemioterapia jest wykorzystywana jednakowo jako leczenie adjuwantowe, neoadjuwantowe oraz przerzutowe. Brakuje jednoznacznych schematów chemioterapii dla osób z tym podtypem raka. Zgodnie z opinią konferencji w St. Gallen w 2011 r. zalecanymi substancjami w chemioterapii TNBC są antracykliny, taksany i leki alkilujące (cyklofosfamid) [13, 29]. Związki platyny wzbudziły zainteresowanie w kontekście leczenia TNBC ze względu na zachęcające dane przedkliniczne i kliniczne [30, 31], jednak wyniki badań tych związków nie są jednoznaczne [32, 33]. Pojawia się coraz więcej artykułów wskazujących na bardzo korzystny wpływ dodatkowego włączenia kapecytabiny do podstawowej chemioterapii potrójnie ujemnych raków piersi [32, 34, 35, 36]. Mimo ograniczonej skuteczności chemioterapii należy dalej prowadzić badania i obserwacje nad jej zastosowaniem w TNBC, w celu wyodrębnienia grup pacjentów z mutacjami, którzy najlepiej odpowiadają na ten typ leczenia systemowego. Co więcej, takie dane będą stanowiły w przyszłości podstawę do stworzenia skutecznych kombinacji chemioterapii z lekami celowanymi.

3. TERAPIE POTENCJALNE

Wielogenowa analiza ekspresji ujawniła, że potrójnie ujemne raki piersi to heterogenna grupa nowotworów, które różnią się profilem molekularnym, a w związku z tym odpowiedzią na potencjalne terapie celowane [37, 38]. Udowodnili to już wcześniej Lehmann i wsp. [12]. Dobór odpowiedniego leczenia,

zależny od zaburzeń ekspresji i określonych szlaków sygnalizacyjnych w komórkach nowotworowych pacjenta, stanowi klucz do poprawy jakości życia oraz rokowań u osób z TNBC. Wyniki badań wskazują, że punktów uchwytu w tych rakach może być wiele (rycina 2.). W poniższych podrozdziałach omówiono kilka wybranych, potencjalnych strategii terapeutycznych.



Rycina 2. Na rycinie przedstawiono przykładowe cele i nazwy środków z potencjalnym zastosowaniem w terapii potrójnie ujemnych raków piersi. Wymienione substancje wpływają na immunologiczny punkt kontrolny, receptory błonowe i wewnątrzkomórkowe, szlaki sygnałowe, element odpowiedzi na uszkodzenia DNA oraz punkty kontrolne cyklu komórkowego. W ramce w prawym dolnym rogu ryciny zostały wymienione dodatkowo przykładowe środki stosowane w chemioterapii (omówionej wcześniej w artykule) TNBC ^[39]

3.1. Inhibitory polimerazy poli(ADP-rybozy) — PARPi

Polimeraza poli(ADP-rybozy), inaczej (PARP), odgrywa rolę w wielu procesach komórkowych, w tym również w utrzymaniu stabilności genomu. Odpowiada za regenerację uszkodzonego materiału genetycznego w wyniku pęknięć jednoniciowych DNA (ssDNA). Gdy PARP jest hamowana przez inhibitory, dochodzi do kumulacji pęknięć jednoniciowych, a w konsekwencji do powstania pęknięć dwuniciowych. W prawidłowych warunkach takie uszkodzenia zostałyby naprawione przez rekombinację homologiczną z

udziałem białek BRCA1 i BRCA2 [40]. Około 31% kobiet chorujących na TNBC posiada zmutowane geny jednego lub dwóch powyższych białek [41]. Ich mutacja prowadzi do kumulacji uszkodzeń materiału genetycznego, niestabilności i apoptozy komórek nowotworowych. Od kilku lat inhibitory PARP (PARPi) wykazują obiecujące działanie w leczeniu potrójnie ujemnych raków piersi u kobiet z mutacjami BRCA1/2 [42, 43, 44]. Wyniki metaanalizy, w której uwzględniono dane 2091 pacjentów, wskazują na lepszą skuteczność chemioterapii w połączeniu z PARPi niż jej samodzielnego użycia. Terapia skojarzona charakteryzowała się lepszym czasem przeżycia bez progresji choroby (współczynnik ryzyka (HR)=0,83; P=0,001), przeżyciem całkowitym (HR=0,89; P=0,11) i ogólnym wskaźnikiem odpowiedzi (RR=1,19; P=0,10). Przy zastosowaniu chemioterapii uzupełnionej PARPi pojawiły się jednak ciężkie działania niepożądane najczęściej neutropenia (62,8%), anemia (28,5%) i trombocytopenia (24,4%) [43]. Mimo pozytywnych wyników przy długotrwałym stosowaniu tych inhibitorów zaobserwowano rozwój oporności i nawroty choroby [45, 46]. Trwające obecnie badania skupiają się na przełamaniu oporności i przywróceniu wrażliwości na PARPi w długotrwałej terapii [47].

3.2. Terapia anty-TROP-2

TROP-2 to ludzki antygen powierzchniowy komórek trofoblastu 2. Ulega ekspresji na niskim poziomie na wielu komórkach nabłonkowych. Natomiast na powierzchni niektórych komórek nowotworowych (okrężnicy, trzustki, płuc itp.) występuje w znacznie większej ilości [48]. Jest idealnym celem terapeutycznym w TNBC, gdzie dochodzi do silnej nadekspresji tej cząsteczki. Z badań wynika, że 50-88% guzów potrójnie ujemnych w badaniu histochemicznym wykazuje średnią lub wysoką ekspresję TROP-2 [49, 50]. Sacituzumab govitecan (nazwa handlowa: Trodelvy); (koniugat przeciwciało-lek SN-38, który jest inhibitorem topoizomerazy I) to pierwszy zatwierdzony przez Agencję Żywności i Leków inhibitor TROP-2. W badaniu klinicznym III fazy ASCENT porównano skuteczność Trodelvy i 4 substancji stosowanych dotychczas w chemioterapii. Pacjenci przyjęli wcześniej co najmniej dwie dawki chemioterapii i zostali zrandomizowani do grup przyjmujących dalej chemioterapię lub sacituzumab govitecan. W grupie przyjmującej nowy lek mediana czasu wolnego od progresji wynosiła 5,6 miesiąca, a w grupie kontrolnej jedynie 1,7 miesiąca. Natomiast mediana czasu przeżycia całkowitego wyniosła odpowiednio 12,1 miesiąca przy zastosowaniu Trodelvy i 6,7 miesiąca dla grupy kontrolnej. Dodatkowo zaobserwowano zmniejszenie się

wymiarów guza w grupie badawczej ^[51]. Trwają też badania nad leczeniem skojarzonym i neoadjuwantowym z wykorzystaniem inhibitora TROP-2 ^[52].

3.3. Inhibitory angiogenezy

VEGF (czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego) to główny mediator angiogenezy także w nowotworach. Jako ligand łączy się z receptorem czynnika wzrostu i za pośrednictwem kinazy tyrozynowej przyczynia się do angiogenezy w okolicy guza, wzrostu przepuszczalności naczyń i inwazji komórek nowotworowych. Zaobserwowano podwyższone poziomy VEGF w osoczu kobiet z potrójnie ujemnymi rakami, z większymi guzami i przerzutami w przebiegu raka piersi ^[53, 54]. Jednak zgodnie z opinią ekspertów obecnych na konferencji w St. Gallen nie zaleca się stosowania inhibitorów VEGF w TNBC ^[4]. Dodatkowo brakuje do dzisiaj przekonujących, istotnych statystycznie wyników badań, które wskazywałyby jednoznacznie na korzyści wynikające ze stosowania inhibitorów VEGF ^[55, 56].

3.4. Inhibitory receptora naskórkowego czynnika wzrostu EGFR

Receptor naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) występuje na powierzchni niektórych komórek, w tym również komórek nabłonka i tkanki łącznej gruczołu piersiowego, a po połączeniu z ligandem, za pośrednictwem kinazy tyrozynowej, stymuluje wzrost i podział komórek. Szacuje się, że ulega nadekspresji w około 64% przypadków TNBC ^[57]. W zmienionych nowotworowo komórkach raka piersi pobudza ich namnażanie, hamuje programowaną śmierć komórki i sprzyja angiogenezie oraz tworzeniu przerzutów. Zahamowanie aktywności receptora czynnika wzrostu próbuje się uzyskać przez zastosowanie przeciwciał monoklonalnych ^[58], inhibitorów kinazy tyrozynowej ^[59] lub przez połączenie dwóch powyższych metod ^[60]. Potwierdzenie skuteczności tych związków wymaga dalszych badań.

3.5. Leki antyandrogenowe

LAR (luminal androgen receptor) to potrójnie ujemny rak piersi, który wykazuje ekspresję luminalnego receptora androgenowego AR (androgen receptor). Raki posiadające ten rodzaj receptora, około 10-15%, charakteryzują się lepszym rokowaniem, słabszą odpowiedzią na chemioterapię i znacznie gorszą odpowiedzią patomorfologiczną na chemioterapię neoadjuwantową

niż pozostałe TNBC [61, 62, 63]. Jako że AR może stanowić istotny cel terapeutyczny w leczeniu osób wykazujących ekspresję tej cząsteczki, pojawiły się głosy, by dokonać dalszego podziału podtypu potrójnie ujemnego na AR+TNBC i poczwórnie ujemnego raka piersi [64]. Leki antyandrogenowe zostały już zatwierdzone przez Agencję Żywności i Leków w terapii raka prostaty i są uznawane za standard leczenia [65]. Wśród inhibitorów AR należy wymienić bikalutamid, enzalutamid i abirateron. Niedawno przeprowadzone badania potwierdzają bezpieczeństwo wykorzystania tych substancji w leczeniu TNBC [66, 67]. Strategia wykorzystania receptorów androgenowych jest stosunkowo nowym zagadnieniem i wymaga dalszych obserwacji klinicznych, w celu potwierdzenia pozytywnego wpływu na poprawę jakości życia oraz rokowań u pacjentów z potrójnie ujemnymi rakami. Z badań przeprowadzonych nad bikalutamidem wynika, że znacząco hamuje on proliferację komórek TNBC w porównaniu z grupą kontrolną ($P < 0,05$), a efekt zależny jest od dawki. Mechanizm ten może być związany ze spadkiem poziomu cykliny D1 i zatrzymaniem cyklu komórkowego w fazie G0/G1. Poza tym zaobserwowano spadek migracji i inwazji linii komórkowych należących do raka piersi z jednoczesnym spadkiem stężenia MMP2 i MMP9 (metaloproteiny macierzy); ($P < 0,05$). Także ekspresja białka AR była zmniejszona [68].

3.6. Inhibitory wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych

W badaniach przedklinicznych nad TNBC przetestowano wiele drobnocząsteczkowych inhibitorów wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych, w tym m.in. szlaku PI3K/AKT, CDK4/6/Rb/E2F, MYC i CDK [69]. U niewyselekcjonowanej grupy pacjentów z TNBC substancje te nie przyniosą pożądaných efektów. Natomiast po uwzględnieniu profilu molekularnego guza mogłyby dać znaczące korzyści terapeutyczne [70].

Ze względu na ilość potencjalnych punktów uchwytu ciężko wymienić wszystkie badania. Warto jednak szczególnie wspomnieć o inhibitorach kinaz tyrozynowych. Komórki macierzyste raka piersi to niewielka populacja wśród komórek guza, które odgrywają ważną rolę w nawrocie choroby, tworzeniu przerzutów i chemiooporności. Drobnocząsteczkowy DCC-2036 w badaniach przeprowadzonych *in vitro* nie tylko powodował supresję komórek macierzystych raka piersi, ale także zwiększał ich wrażliwość na chemioterapię [71]. Podczas badań przeprowadzonych na modelach zwierzęcych, nanocząsteczki ludzkiej albuminy obciążone lapatynibem wywołały efekt supresyjny nie tylko guza piersi, ale także komórek nowotworowych zlokalizowanych

w ogniskach przerzutowych płuc^[72]. Inhibitor kinazy tyrozynowej Pan-TAM (BMS-777607) w leczeniu skojarzonym z przeciwciałem monoklonalnym anty-PD-1 zmniejszył wzrost guza i częstość występowania przerzutów w modelu mysim. Ponadto leczenie zwiększyło infiltrację efektorowych limfocytów T przeciwnowotworowych i wzrost stężenia cytokin prozapalnych^[73]. Jak do tej pory brakuje jednak znaczących wyników badań klinicznych, które potwierdzałyby skuteczność powyższych substancji u ludzi.

4. PODSUMOWANIE

Opracowanie nowoczesnych metod leczenia potrójnie ujemnych raków piersi pozostaje ważnym problemem medycyny. Nie ma wątpliwości, że przyszłość terapii TNBC będzie skupiona na molekularnym profilowaniu chorych, co wielokrotnie zostało potwierdzone w powyższym artykule. Tak dokładna, molekularna diagnoza pozwoli na wyselekcjonowanie grup pacjentów odnoszących największe korzyści z konkretnych terapii celowanych. Potencjalnych kierunków badań klinicznych jest wiele, a powyższa praca przybliżyła tylko przykładowe strategie. Niewątpliwie po dalszych analizach immunohistochemicznych odkryte zostaną kolejne cząsteczki, na podstawie których powstaną nowe koncepcje leczenia, a te już istniejące ulegną udoskonaleniu ze względu na mnogość prowadzonych w tym kierunku badań. Wprowadzenie nowych rozwiązań do powszechnej praktyki klinicznej znacznie przybliżyło się w czasie i jest możliwe w ciągu najbliższych lat.

REFERENCJE

- [1] Ditkowska J, Wojciechowska U, Olasek P. Onkologia.org.pl. https://onkologia.org.pl/sites/default/files/publications/2022-05/Nowotwory_2019.pdf. Accessed February 7, 2023.
- [2] Tsang JYS, Tse GM. Molecular Classification of Breast Cancer. *Advances in Anatomic Pathology*. 2019;27(1):27-35. doi:10.1097/pap.000000000000232
- [3] Zubair M, Wang S, Ali N. Advanced Approaches to Breast Cancer Classification and Diagnosis. *Front Pharmacol*. 2021;11. doi:10.3389/fphar.2020.632079

- [4] Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Annals of Oncology*. 2011;22(8):1736-1747. doi:10.1093/annonc/mdr304
- [5] Prat A, Adamo B, Cheang MCU, Anders CK, Carey LA, Perou CM. Molecular Characterization of Basal-Like and Non-Basal-Like Triple-Negative Breast Cancer. *The Oncologist*. 2013;18(2):123-133. doi:10.1634/theoncologist.2012-0397
- [6] Atchley DP, Albarracin CT, Lopez A, et al. Clinical and Pathologic Characteristics of Patients With BRCA-Positive and BRCA-Negative Breast Cancer. *JCO*. 2008;26(26):4282-4288. doi:10.1200/jco.2008.16.6231
- [7] Meyer P, Landgraf K, Högel B, Eiermann W, Ataseven B. BRCA2 Mutations and Triple-Negative Breast Cancer. Toland AE, ed. *PLoS ONE*. 2012;7(5):e38361. doi:10.1371/journal.pone.0038361
- [8] Chen H, Wu J, Zhang Z, et al. Association Between BRCA Status and Triple-Negative Breast Cancer: A Meta-Analysis. *Front Pharmacol*. 2018;9. doi:10.3389/fphar.2018.00909
- [9] Comen E, Davids M, Kirchoff T, Hudis C, Offit K, Robson M. Relative contributions of BRCA1 and BRCA2 mutations to “triple-negative” breast cancer in Ashkenazi Women. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;129(1):185-190. doi:10.1007/s10549-011-1433-2
- [10] Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype. *Cancer*. 2007;109(9):1721-1728. doi:10.1002/cncr.22618
- [11] Qiu J, Xue X, Hu C, et al. Comparison of Clinicopathological Features and Prognosis in Triple-Negative and Non-Triple Negative Breast Cancer. *J Cancer*. 2016;7(2):167-173. doi:10.7150/jca.10944
- [12] Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*. 2011;121(7):2750-2767. doi:10.1172/jci45014

- [13] Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Annals of Oncology*. 2011;22(8):1736-1747. doi:10.1093/annonc/mdr304
- [14] Yagata H, Kajiura Y, Yamauchi H. Current strategy for triple-negative breast cancer: appropriate combination of surgery, radiation, and chemotherapy. *Breast Cancer*. 2011;18(3):165-173. doi:10.1007/s12282-011-0254-9
- [15] Wahba HA, El-Hadaad HA. Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer. *Cancer Biol Med*. 2015;12(2):106-116. doi:10.7497/j.issn.2095-3941.2015.0030
- [16] Berrada N, Delaloge S, André F. Treatment of triple-negative metastatic breast cancer: toward individualized targeted treatments or chemosensitization? *Annals of Oncology*. 2010;21:vii30-vii35. doi:10.1093/annonc/mdq279
- [17] Gośliński J. Operacja Oszczędzająca Piersi I Mastektomia W Chirurgicznym leczeniu Raka Sutka. *Zwrotnikraka.pl*. <https://www.zwrotnikraka.pl/operacja-oszczedzajaca-piers-mastektomia-rak-sutka/>. Published April 29, 2021. Accessed February 9, 2023.
- [18] Skotnicki P. Kwadrantektomia – Operacja oszczędzająca W leczeniu Raka Piersi. *Szpital na Klinach*. <https://www.szpitalnaklinach.pl/blog/kwadrantektomia-operacja-oszczedzajaca-w-leczeniu-raka-piersi/>. Accessed February 9, 2023.
- [19] Adkins FC, Gonzalez-Angulo AM, Lei X, et al. Triple-Negative Breast Cancer Is Not a Contraindication for Breast Conservation. *Ann Surg Oncol*. 2011;18(11):3164-3173. doi:10.1245/s10434-011-1920-z
- [20] Fancellu A, Houssami N, Sanna V, Porcu A, Ninniri C, Marinovich ML. Outcomes after breast-conserving surgery or mastectomy in patients with triple-negative breast cancer: meta-analysis. *British Journal of Surgery*. 2021;108(7):760-768. doi:10.1093/bjs/znab145
- [21] Barbieri V, Sanpaolo P, Genovesi D. Prognostic Impact of Triple Negative Phenotype in Conservatively Treated Breast Cancer. *The Breast Journal*. 2011;17(4):377-382. doi:10.1111/j.1524-4741.2011.01100.x

- [22] Abdulkarim BS, Cuartero J, Hanson J, Deschênes J, Lesniak D, Sabri S. Increased Risk of Locoregional Recurrence for Women With T1-2N0 Triple-Negative Breast Cancer Treated With Modified Radical Mastectomy Without Adjuvant Radiation Therapy Compared With Breast-Conserving Therapy. *JCO*. 2011;29(21):2852-2858. doi:10.1200/jco.2010.33.4714
- [23] Wang S, Sun Y, Zhao S, Wei F, Yang G. Breast conserving surgery (BCS) with adjuvant radiation therapy showed improved prognosis compared with mastectomy for early staged triple negative breast cancer patients. *Mathematical Biosciences and Engineering*. 2020;17(1):92-104. doi:10.3934/mbe.2020005
- [24] Steward LT, Gao F, Taylor MA, Margenthaler JA. Impact of radiation therapy on survival in patients with triple-negative breast cancer. *Oncology Letters*. 2013;7(2):548-552. doi:10.3892/ol.2013.1700
- [25] To NH, Nguyen HQ, Thiolat A, et al. Radiation therapy for triple-negative breast cancer: emerging role of microRNAs as biomarkers and radiosensitivity modifiers. A systematic review. *Breast Cancer Res Treat*. 2022;193(2):265-279. doi:10.1007/s10549-022-06533-3
- [26] Isakoff SJ. Triple-Negative Breast Cancer. *The Cancer Journal*. 2010;16(1):53-61. doi:10.1097/ppo.0b013e3181d24ff7
- [27] Xu Y, Diao L, Chen Y, et al. Promoter methylation of BRCA1 in triple-negative breast cancer predicts sensitivity to adjuvant chemotherapy. *Annals of Oncology*. 2013;24(6):1498-1505. doi:10.1093/annonc/mdt011
- [28] Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26(8):1275-1281. doi:10.1200/jco.2007.14.4147
- [29] Wu J, Li S, Jia W, Su F. Response and prognosis of taxanes and anthracyclines neoadjuvant chemotherapy in patients with triple-negative breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011;137(10):1505-1510. doi:10.1007/s00432-011-1029-6
- [30] Pandey JGP, Balolong-Garcia JC, Cruz-Ordinario MVB, Que FVF. Triple negative breast cancer and platinum-based systemic treatment: a meta-analysis and systematic review. *BMC Cancer*. 2019;19(1). doi:10.1186/s12885-019-6253-5

- [31] Telli ML, Timms KM, Reid J, et al. Homologous Recombination Deficiency (HRD) Score Predicts Response to Platinum-Containing Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2016;22(15):3764-3773. doi:10.1158/1078-0432.ccr-15-2477
- [32] Mayer IA, Zhao F, Arteaga CL, et al. Randomized Phase III Postoperative Trial of Platinum-Based Chemotherapy Versus Capecitabine in Patients With Residual Triple-Negative Breast Cancer Following Neoadjuvant Chemotherapy: ECOG-ACRIN EA1131. *JCO*. 2021;39(23):2539-2551. doi:10.1200/jco.21.00976
- [33] Saleh RR, Nadler MB, Desnoyers A, Meti N, Fazelzad R, Amir E. Platinum-based chemotherapy in early-stage triple negative breast cancer: A meta-analysis. *Cancer Treatment Reviews*. 2021;100:102283. doi:10.1016/j.ctrv.2021.102283
- [34] Li Y, Zhou Y, Mao F, et al. Adjuvant addition of capecitabine to early-stage triple-negative breast cancer patients receiving standard chemotherapy: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2019;179(3):533-542. doi:10.1007/s10549-019-05513-4
- [35] Huo X, Li J, Zhao F, et al. The role of capecitabine-based neoadjuvant and adjuvant chemotherapy in early-stage triple-negative breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*. 2021;21(1). doi:10.1186/s12885-021-07791-y
- [36] Zhang Z, Ma K, Li J, et al. The Clinical Value of Chemotherapy Combined With Capecitabine in Triple-Negative Breast Cancer—A Meta-Analysis. *Front Pharmacol*. 2021;12. doi:10.3389/fphar.2021.771839
- [37] Komatsu M, Yoshimaru T, Matsuo T, et al. Molecular features of triple negative breast cancer cells by genome-wide gene expression profiling analysis. *International Journal of Oncology*. 2012;42(2):478-506. doi:10.3892/ijo.2012.1744
- [38] Wang Q, Xu M, Sun Y, et al. Gene Expression Profiling for Diagnosis of Triple-Negative Breast Cancer: A Multicenter, Retrospective Cohort Study. *Front Oncol*. 2019;9. doi:10.3389/fonc.2019.00354
- [39] Won K, Spruck C. Triple-negative breast cancer therapy: Current and future perspectives (Review). *Int J Oncol*. 2020;57(6):1245-1261. doi:10.3892/ijo.2020.5135

- [40] Singh DD, Parveen A, Yadav DK. Role of PARP in TNBC: Mechanism of Inhibition, Clinical Applications, and Resistance. *Biomedicines*. 2021;9(11):1512. doi:10.3390/biomedicines9111512
- [41] Greenup R, Buchanan A, Lorizio W, et al. Prevalence of BRCA Mutations Among Women with Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) in a Genetic Counseling Cohort. *Ann Surg Oncol*. 2013;20(10):3254-3258. doi:10.1245/s10434-013-3205-1
- [42] Zhu X, Chen L, Huang B, et al. Efficacy and mechanism of the combination of PARP and CDK4/6 inhibitors in the treatment of triple-negative breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2021;40(1). doi:10.1186/s13046-021-01930-w
- [43] Li C, Hao M, Fang Z, et al. PARP inhibitor plus chemotherapy versus chemotherapy alone in patients with triple-negative breast cancer: a systematic review and meta-analysis based on randomized controlled trials. *Cancer Chemother Pharmacol*. Published online February 2, 2023. doi:10.1007/s00280-023-04506-x
- [44] Chen Z, Wang X, Li X, Zhou Y, Chen K. Deep exploration of PARP inhibitors in breast cancer: Monotherapy and combination therapy. *Journal of International Medical Research*. 2021;49(2):030006052199101. doi:10.1177/0300060521991019
- [45] Simmons AD, Nguyen M, Pintus E. Polyclonal BRCA2 mutations following carboplatin treatment confer resistance to the PARP inhibitor rucaparib in a patient with mCRPC: a case report. *BMC Cancer*. 2020;20(1). doi:10.1186/s12885-020-6657-2
- [46] Collot T, Niogret J, Carnet M, et al. PARP inhibitor resistance and TP53 mutations in patients treated with olaparib for BRCA-mutated cancer: Four case reports. *Mol Med Rep*. 2020;23(1). doi:10.3892/mmr.2020.11713
- [47] Bitler BG, Watson ZL, Wheeler LJ, Behbakht K. PARP inhibitors: Clinical utility and possibilities of overcoming resistance. *Gynecologic Oncology*. 2017;147(3):695-704. doi:10.1016/j.ygyno.2017.10.003
- [48] Sakach E, Sacks R, Kalinsky K. Trop-2 as a Therapeutic Target in Breast Cancer. *Cancers*. 2022;14(23):5936. doi:10.3390/cancers14235936

- [49] Izci H, Punie K, Waumans L, et al. Correlation of Trop-2 expression with clinicopathological characteristics, sTILs, AR expression and outcome in primary TNBC. *JCO*. 2021;39(15_suppl):e12558-e12558. doi:10.1200/jco.2021.39.15_suppl.e12558
- [50] Bardia A, Mayer IA, Diamond JR, et al. Efficacy and Safety of Anti-Trop-2 Antibody Drug Conjugate Sacituzumab Govitecan (IMMU-132) in Heavily Pretreated Patients With Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *JCO*. 2017;35(19):2141-2148. doi:10.1200/jco.2016.70.8297
- [51] Bardia A, Hurvitz SA, Tolaney SM, et al. Sacituzumab Govitecan in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2021;384(16):1529-1541. doi:10.1056/nejmoa2028485
- [52] Bardia A, Spring LM, Juric D, et al. 358TiP Phase Ib/II study of antibody-drug conjugate, sacituzumab govitecan, in combination with the PARP inhibitor, talazoparib, in metastatic triple-negative breast cancer. *Annals of Oncology*. 2020;31:S394. doi:10.1016/j.annonc.2020.08.460
- [53] Linderholm BK, Hellborg H, Johansson U, et al. Significantly higher levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and shorter survival times for patients with primary operable triple-negative breast cancer. *Annals of Oncology*. 2009;20(10):1639-1646. doi:10.1093/annonc/mdp062
- [54] Ribatti D, Nico B, Ruggieri S, Tamma R, Simone G, Mangia A. Angiogenesis and Antiangiogenesis in Triple-Negative Breast cancer. *Translational Oncology*. 2016;9(5):453-457. doi:10.1016/j.tranon.2016.07.002
- [55] Liu JF, Tolaney SM, Birrer M, et al. A Phase 1 trial of the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib (AZD2281) in combination with the anti-angiogenic cediranib (AZD2171) in recurrent epithelial ovarian or triple-negative breast cancer. *European Journal of Cancer*. 2013;49(14):2972-2978. doi:10.1016/j.ejca.2013.05.020
- [56] Mery B, Rowinski E, Vallard A, et al. Advocacy for a New Oncology Research Paradigm: The Model of Bevacizumab in Triple-Negative Breast Cancer in a French Cohort Study. *Oncology*. 2019;97(1):1-6. doi:10.1159/000499583
- [57] Park HS, Jang MH, Kim EJ, et al. High EGFR gene copy number predicts poor outcome in triple-negative breast cancer. *Modern Pathology*. 2014;27(9):1212-1222. doi:10.1038/modpathol.2013.251

- [58] Si Y, Xu Y, Guan J, et al. Anti-EGFR antibody-drug conjugate for triple-negative breast cancer therapy. *Eng Life Sci.* 2020;21(1-2):37-44. doi:10.1002/elsc.202000027
- [59] Abdelmalek CM, Hu Z, Kronenberger T, et al. Gefitinib-Tamoxifen Hybrid Ligands as Potent Agents against Triple-Negative Breast Cancer. *J Med Chem.* 2022;65(6):4616-4632. doi:10.1021/acs.jmedchem.1c01646
- [60] Guerrab AE, Bamdad M, Kwiatkowski F, Bignon YJ, Penault-Llorca F, Aubel C. Anti-EGFR monoclonal antibodies and EGFR tyrosine kinase inhibitors as combination therapy for triple-negative breast cancer. *Oncotarget.* 2016;7(45):73618-73637. doi:10.18632/oncotarget.12037
- [61] Echavarria I, López-Tarruella S, Picornell A, et al. Pathological Response in a Triple-Negative Breast Cancer Cohort Treated with Neoadjuvant Carboplatin and Docetaxel According to Lehmann's Refined Classification. *Clinical Cancer Research.* 2018;24(8):1845-1852. doi:10.1158/1078-0432.ccr-17-1912
- [62] Gerratana L, Basile D, Buono G, et al. Androgen receptor in triple negative breast cancer: A potential target for the targetless subtype. *Cancer Treatment Reviews.* 2018;68:102-110. doi:10.1016/j.ctrv.2018.06.005
- [63] Gucalp A, Traina TA. Triple-Negative Breast Cancer. *The Cancer Journal.* 2010;16(1):62-65. doi:10.1097/ppo.0b013e3181ce4ae1
- [64] Barton VN, D'Amato NC, Gordon MA, Christenson JL, Elias A, Richer JK. Androgen Receptor Biology in Triple Negative Breast Cancer: a Case for Classification as AR+ or Quadruple Negative Disease. *HORM CANC.* 2015;6(5-6):206-213. doi:10.1007/s12672-015-0232-3
- [65] Rice MA, Malhotra SV, Stoyanova T. Second-Generation Antiandrogens: From Discovery to Standard of Care in Castration Resistant Prostate Cancer. *Front Oncol.* 2019;9. doi:10.3389/fonc.2019.00801
- [66] Rhanine Y, Bonnefoi HR, Goncalves A, et al. Real-life data of antiandrogens (AA) use in metastatic androgen receptor positive triple negative breast cancer (AR+ TNBC): The ATOVAT retrospective French cohort. *JCO.* 2022;40(16_suppl):e13074-e13074. doi:10.1200/jco.2022.40.16_suppl.e13074

- [67] Sharifi M, Wisinski K, Burkard M, et al. Abstract OT1-02-01: Phase I trial of bicalutamide and ribociclib in androgen receptor-positive triple negative breast cancer. *Cancer Research*. 2019;79(4_Supplement):OT1-02-01-OT1-02-01. doi:10.1158/1538-7445.sabcs18-ot1-02-01
- [68] Kong Y, Qu F, Yuan X, Yan X, Yu W. Effect of Bicalutamide on the proliferation and invasion of human triple negative breast cancer MDA-MB-231 cells. *Medicine*. 2020;99(17):e19822. doi:10.1097/md.00000000000019822
- [69] Khan MA, Jain VK, Rizwanullah Md, Ahmad J, Jain K. PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors in triple-negative breast cancer: a review on drug discovery and future challenges. *Drug Discovery Today*. 2019;24(11):2181-2191. doi:10.1016/j.drudis.2019.09.001
- [70] Fink LS, Beatty A, Devarajan K, Peri S, Peterson JR. Pharmacological Profiling of Kinase Dependency in Cell Lines across Triple-Negative Breast Cancer Subtypes. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2015;14(1):298-306. doi:10.1158/1535-7163.mct-14-0529
- [71] Shen Y, Zhu Q, Xiao M, et al. Inhibitory effect of the novel tyrosine kinase inhibitor DCC-2036 on triple-negative breast cancer stem cells through AXL-KLF5 positive feedback loop. *Cell Death Dis*. 2022;13(8). doi:10.1038/s41419-022-05185-x
- [72] Wan X, Zheng X, Pang X, et al. The potential use of lapatinib-loaded human serum albumin nanoparticles in the treatment of triple-negative breast cancer. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015;484(1-2):16-28. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.02.037
- [73] Kasikara C, Davra V, Calianese D, et al. Pan-TAM Tyrosine Kinase Inhibitor BMS-777607 Enhances Anti-PD-1 mAb Efficacy in a Murine Model of Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Research*. 2019;79(10):2669-2683. doi:10.1158/0008-5472.can-18-2614

TERAPIA CELOWANA NA PSMA W RAKU PROSTATY

Agnieszka Nowotarska, Michalina Masternak, Łukasz Grajcarek,
Julia Gawron, Martyna Nowak, Tola Kotkiewicz

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

Abstrakt: Przerzutowy oporny na kastrację rak prostaty jest śmiertelny. Wysoką ekspresję w przypadku tego schorzenia wykazuje antygen błonowy specyficzny dla gruczołu krokowego (PSMA). Wiele terapii ukierunkowało się na ten antygen poprzez różne ścieżki terapeutyczne. Terapia radioligandowa indukuje apoptozę przez biologiczny efekt jonizujący radionuklidów. Koniugaty przeciwciało-lek opierają swoje działanie na cytotoksyczności leków. W immunoterapii komórkowej efekt przeciwnowotworowy jest związany z aktywacją układu immunologicznego. Terapia fotodynamiczna opiera się na efekcie fotouczulającym fotouczulaczy. Możliwe jest również niszczenie nanopęcherzyków za pomocą ultradźwięków. Chirurgia sterowana obrazem gwarantuje chirurgom dokładniejszą resekcję zmiany.

Dzisiejsze priorytety terapeutyczne polegają na minimalizacji nadmiernego leczenia choroby łagodnej i poprawy wyników leczenia pacjentów z chorobą agresywną. Przedstawione w tym rozdziale techniki umożliwiają nowoczesne podejście do leczenia raka gruczołu krokowego oraz poprawiają rokowanie pacjentów.

Słowa kluczowe: rak prostaty, PSMA, terapia radioligandowa, immunoterapia komórkowa

Abstract: Metastatic castration-resistant prostate cancer is lethal. Prostate-specific membrane antigen (PSMA) is highly expressed in metastatic, castration-resistant prostate cancer. Many therapies have targeted this antigen through various therapeutic pathways. Radioligand therapy induces apoptosis by the biological ionizing effect of radionuclides. Antibody-drug conjugates base their effects on drug cytotoxicity. In cellular immunotherapy, the anti-tumor effect is related to activation of the immune system. Photodynamic therapy relies on the photosensitizing effect of photosensitizers. It is also possible to destroy nanobubbles using ultrasound. Image-guided surgery guarantees surgeons a more precise resection of the lesion. Today's therapeutic priorities are to minimize the overtreatment of benign diseases and improve outcomes for patients with an aggressive disease. The techniques presented in this chapter enable a modern approach to prostate cancer treatment and improve patient prognosis.

Keywords: prostate cancer, PSMA, radioligand therapy, cellular immunotherapy

1. WSTĘP

Rak gruczołu krokowego jest najczęstszym litym nowotworem złośliwym u mężczyzn i drugą po raku płuca najczęstszą przyczyną zgonów osobników płci męskiej z powodu nowotworu w krajach rozwiniętych [1].

Na ryzyko wystąpienia raka gruczołu krokowego u mężczyzny wpływa jego wiek, występowanie choroby w rodzinie, pochodzenie etniczne, otyłość oraz inne czynniki środowiskowe [2]. Wielu mężczyzn z rakiem gruczołu krokowego nie ma żadnych objawów aż do momentu progresji nowotworu. Objawy ze strony dolnych dróg moczowych (LUTS) m.in. nokturia, słaby strumień moczu, widoczna hematuria i zaburzenia erekcji korelują z rakiem prostaty, jednak nie są one swoiste i mogą świadczyć o łagodnych schorzeniach gruczołu krokowego, takich jak łagodny przerost gruczołu krokowego (BPH) lub zapalenie gruczołu krokowego [3].

Powszechniejsze badania stężenia antygenu swoistego dla gruczołu krokowego (PSA) umożliwiły wykrywanie nowotworów prostaty we wczesnych uleczalnych stadiach, jednakże zaawansowany rak prostaty pozostaje w dużej mierze nieuleczalny. Agresywność raka gruczołu krokowego ograniczonego do narządu jest bardzo zróżnicowana poczynając od choroby łagodnej do bardzo agresywnego raka [4].

Najczęściej stosowany schemat stratyfikacji ryzyka łączy stopień zaawansowania klinicznego, PSA i punktację Gleasona [5].

Tabela 1. Schemat stratyfikacji ryzyka [5].

| OCENA RYZYKA | STADIUM KLINICZNE | PSA | PUNKTACJA GLEASONA | 10 LETNI DFS* |
|--------------|-------------------|-----------------|--------------------|---------------|
| NISKIE | T1-2a | ≤ 10 ng/mL | ≤ 6 | 83% |
| ŚREDNIE | T2b | 10 - ≤ 20 ng/mL | 7 | 46% |
| WYSOKIE | ≥ T2c | >20 ng/mL | ≥ 8 | 29% |

*DFS (disease-free survival) - przeżycie bezobjawowe

Pacjenci są dzieleni na chorych niskiego ryzyka (stadium kliniczne T1-2a, PSA ≤10 ng/ml i wynik w skali Gleasona ≤6), średniego ryzyka (stadium T2b lub 10 o PSA ≤20 ng/ml lub wynik w skali Gleasona 7) lub wysokiego ryzyka (stadium ≥T2c lub PSA >20 ng/ml lub wynik w skali Gleasona ≥8) [5].

Stratyfikacja ryzyka ułatwia wybór odpowiedniej metody leczenia dla pacjenta.

Ze względu na znaczną śmiertelność i zachorowalność związaną z progresją tej choroby rozwinęła się nowa generacja strategii opartych na terapii celowanej na PSMA w leczeniu raka gruczołu krokowego, które zostały omówione w tym rozdziale.

2. DIAGNOSTYKA

Obecnie nie istnieje specyficzny test wykrywający raka prostaty. Diagnostyka opiera się na badaniu per rectum, w którym oceniana jest wielkość oraz ewentualne nieprawidłowości gruczołu. Wykrywanie nieprawidłowości jest ułatwione, dzięki PSA czyli glikoproteinie wydzielanej przez komórki nabłonkowe gruczołu krokowego. Badanie antygenu swoistego dla prostaty PSA jest rutynowo wykonywane w zakładach medycznych. Niemniej jednak, podwyższone wartości PSA mogą świadczyć o łagodnym rozroście gruczołu krokowego, czy zapaleniu gruczołu krokowego. Nie świadczą one o raku, ponieważ PSA jest specyficzne dla gruczołu krokowego, a nie dla raka prostaty [2].

W celu potwierdzenia obecności raka wykonywana jest biopsja gruczołu krokowego, która niestety jest podatna na błędy pobierania próbek. Skutkować to może wynikami fałszywie ujemnymi oraz niedokładną oceną guza [2, 6]. Według najnowszych wytycznych, każdy mężczyzna narażony na raka prostaty, powinien mieć wykonany rezonans magnetyczny (MRI) gruczołu przed wykonaniem biopsji [2].

MRI umożliwia wykonanie biopsji celowanej zmian podejrzanych radiologicznie. Dostarcza również ważnych informacji na temat miejscowego zaawansowania, pozwalając skuteczniej zaplanować leczenie [6].

3. AKTUALNE METODY LECZENIA RAKA PROSTATY

Wyróżniamy chirurgiczne oraz niechirurgiczne metody leczenia raka gruczołu krokowego. Radykalna prostatektomia w połączeniu z radioterapią stanowią podstawową terapię stosowaną w leczeniu raka niskiego ryzyka. W przypadku jej nieskuteczności terapeutycznej lub braku możliwości jej zastosowania w sytuacji, kiedy nowotwór rozprzestrzenił się poza prostatę możliwa jest hormonoterapia. U chorych hormonoopornych stosowana jest chemioterapia [2, 7].

Wybór najlepszej metody terapeutycznej dla pacjenta zależy od:

- charakteru guza,
- poziomu PSA,
- stopnia zaawansowania,
- możliwego nawrotu.

Należy również pamiętać, że każde leczenie wiąże się z wystąpieniem skutków ubocznych. Toksyczność leczenia oraz zmniejszona liczba białych i czerwonych krwinek są związane ze zmęczeniem, wypadaniem włosów, neuropatią obwodową, nietrzymaniem moczu, czy zaburzeniami erekcji [2].

3.1. Metody niechirurgiczne

Niechirurgiczne metody leczenia raka gruczołu krokowego obejmują terapię pozbawioną androgenów (ADT), radioterapię (RT), terapie ablacyjne, chemioterapię i immunoterapię. Te metody mogą być stosowane samodzielnie lub w połączeniu, w zależności od sytuacji klinicznej [8].

3.1.1. Radioterapia (RT)

Stosowana u pacjentów po prostatektomii jako leczenie adjuwantowe.

Może stanowić również leczenie pierwotne zamiast zabiegu chirurgicznego w celu wyleczenia choroby o niskim lub średnim ryzyku. Wykonywana jest również w przypadku miejscowo zaawansowanej choroby i braku możliwości wykonania prostatektomii [8]. Zastosowanie znajduje u połowy chorych i pozwala wyleczyć do 40% pacjentów [9].

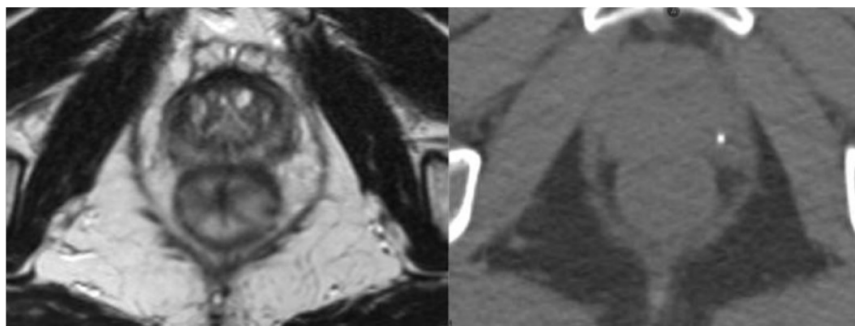
3.1.1.1. Radioterapia pod kontrolą MRI (MRIgRT)

Cechuje się lepszym kontrastem tkanek miękkich niż obrazowanie oparte na promieniowaniu rentgenowskim, co umożliwia zmniejszenie toksyczności leczenia.

Polega na obrazowaniu w czasie rzeczywistym i monitorowaniu wewnątrzfrakcyjnego ruchu docelowego. Przy wypełnianiu pęcherza, czy przechodzeniu gazu przez odbytnicę możliwe jest przemieszczanie się gruczołu krokowego. Metoda ta pozwala na bramkowanie leczenia, co umożliwia ochronę otaczających zagrożonych narządów. Dostarczana jest również zamierzona dawka promieniowania rentgenowskiego.

Do tej metody potrzebne są znaczne zasoby, nie jest ona powszechnie dostępna oraz wymaga przeprowadzenia większej ilości prospektywnych

badania klinicznych [9].



Rycina 1. MRI prostaty (po lewej) oraz tomografia komputerowa (CT) prostaty (po prawej). Architektura i granice gruczołu krokowego są lepiej uwidocznione w MRI [9].

3.1.2. Terapia pozbawiona androgenów (ADT)

Stosowana miejscowo lub systemowo zwykle w zaawansowanej chorobie z obecnością przerzutów. Łagodzi objawy oraz spowalnia progresję choroby poprzez maksymalną blokadę androgenową, utrzymując kastracyjne stężenie testosteronu do czasu progresji choroby. Środkami stosowanymi są leki blokujące syntezę testosteronu takie jak agoniści hormonu uwalniającego hormon luteinizujący (LHRH), antagoniści LHRH oraz inhibitory cytochromu p450 [10].

Terapia może się wiązać z długotrwałymi skutkami ubocznymi m.in osteoporozą, chorobami sercowo-naczyniowymi, hiperlipidemią, insulinoopornością, anemią i zmęczeniem, uderzeniami gorąca, czy nawet prowadzić do dysfunkcji seksualnych [2].

Większość pacjentów z przerzutowym rakiem gruczołu krokowego początkowo reaguje na ADT, jednak u prawie wszystkich dochodzi po około 18-24 miesiącach do rozwoju opornego na kastrację raka gruczołu krokowego (CRPC) [11]. Występuje grupa chorych z rakiem prostaty niewrażliwym na androgeny, która nie odniesie korzyści terapeutycznej z tej metody leczenia [2].

3.1.3. Terapia ablacyjna

Stosowana jako terapia pierwotna w przypadku choroby o niskim ryzyku polegająca na wprowadzeniu energii do gruczołu krokowego w celu zniszczenia ognisk nowotworowych przy jednoczesnej minimalizacji uszkodzenia sąsiadujących struktur. Dodatkowo może być stosowana jako leczenie ratunkowe u chorych z niepowodzeniem pierwotnej RT [8].

3.1.4. Chemioterapia i terapie immunozależne

Polega na zabijaniu lub hamowaniu wzrostu komórek nowotworowych. Głównym lekiem stosowanym w chemioterapii zaawansowanego raka prostaty jest docetaksel. Stanowi on terapię I rzutu w przerzutowym opornym na kastrację raka gruczołu krokowego. Poprawia on przeżycie całkowite pacjentom, u których hormonoterapia nie przyniosła efektów [2,12].

3.2. Metody chirurgiczne

Chirurgicznymi metodami są radykalna prostatektomia oraz laparoskopowe usunięcie prostaty metodą da Vinci [4].

3.2.1. Radykalna prostatektomia (RP) metodą tradycyjną

RP polega na wycięciu całej prostaty i pęcherzyków nasiennych oraz limfadenektomii miednicznej. Radykalna resekcja raka przy zachowaniu prawidłowych tkanek otaczających umożliwia zachowanie trzymaniu moczu oraz zapobiega zaburzeniom erekcji. Wiąże się z poprawą śmiertelności specyficznej dla raka oraz przeżycia wolnego od przerzutów [4].

3.2.2. Laparoskopowa prostatektomia metodą da Vinci

System robotyczny da Vinci wykorzystuje cztery ramiona robotyczne, które są kontrolowane przez chirurga z konsoli. Umożliwia on trójwymiarową wizualizację, 10-krotne powiększenie oraz większy zakres ruchu i zręczność w porównaniu ze standardową chirurgią laparoskopową [4].

Tabela 2. Podsumowanie aktualnych, wybranych metod leczenia [opracowanie własne, 2].

| OPCJA LECZENIA | POSTĘP CHOROBY | POTENCJALNE SKUTKI UBOCZNE |
|---------------------------------|---|--|
| RADIOTERAPIA | <ul style="list-style-type: none"> • MIEJSCOWO ZAAWANSOWANY • NISKIE LUB ŚREDNIE RYZYKO | <p>WCZESNE:</p> <ul style="list-style-type: none"> • UCZUCIE PARCIA NA ODBYTNICĘ • BIEGUNKI • CZĘSTE ODDAWANIE MOCZU <p>PÓŹNE:</p> <ul style="list-style-type: none"> • NIETRZYMANIE MOCZU • IMPOTENCJA |
| ADT | <ul style="list-style-type: none"> • ZAAWANSOWANY | <ul style="list-style-type: none"> • OSTEOPOROZA • CHOROBY SERCOWO- NACZYNIOWE • HIPERLIPIDEMIA • INSULINOOPORNOŚĆ • ANEMIA • ZMĘCZENIE • DYSFUNKCJE SEKSUALNE |
| CHEMIOTERAPIA | <ul style="list-style-type: none"> • ZAAWANSOWANY | <ul style="list-style-type: none"> • ZAHAMOWANIE CZYNNOŚCI SZPIKU KOSTNEGO • REAKCJA NADWRAŻLIWOŚCI • NEUROPATIA OBWODOWA • PROBLEMY ŻOŁĄDKOWO-JELITOWE |
| RADYKALNA PROSTATEKTOMIA | <ul style="list-style-type: none"> • ZLOKALIZOWANY | <ul style="list-style-type: none"> • ZABURZENIA EREKCJI • NIETRZYMANIE MOCZU |

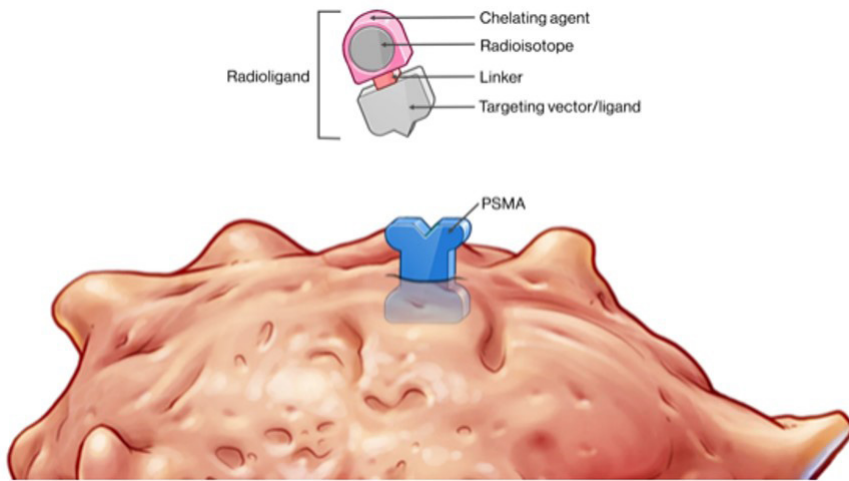
4. PSMA I LIGAND UKIERUNKOWANY NA PSMA

PSMA to antygen błonowy specyficzny dla prostaty, znany również jako N-acetylo-alfa-liniowa kwasowa dipeptydaza I (NAALA-Dase), karboksypeptydaza glutaminianowa II lub hydrolaza folianowa.

Stanowi on najważniejszy antygen wykorzystywany w terapii celowanej.

Złożony jest z krótkiej domeny wewnątrzkomórkowej o masie 19 aminokwasów, domeny transmembranowej o masie 24 aminokwasów i rozległej glikozylowanej domeny zewnątrzkomórkowej o masie 707 aminokwasów. Wśród nich znajduje się wiele epitopów antygenowych, które mogą wiązać się z ligandami w domenie wewnątrzkomórkowej i zewnątrzkomórkowej [13]. Uważa się, że pełni on wiele funkcji komórkowych:

- działa jako enzym biorący udział w pobieraniu składników odżywczych (kwas foliowy),
- odgrywa rolę w:
- migracji,
- przeżywalności,
- proliferacji komórek.



Rycina 2. Białko transmembranowe PSMA zakotwiczone w błonie komórkowej [14].

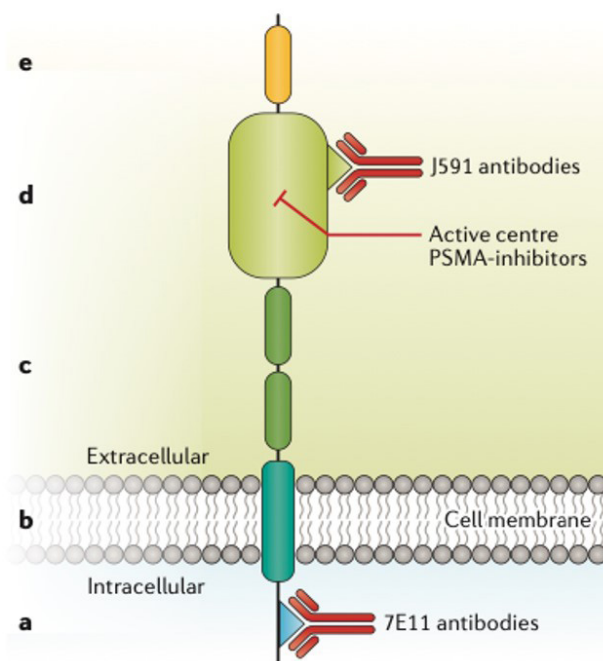
PSMA jest specyficznie wysoko wyrażona w komórkach prostaty, a ponadto stwierdza się jego nadekspresję w niektórych przerzutowych guzach prostaty [15]. W pewnych zdrowych tkankach m.in w astrocytach, neuronach, nabłonku nerki i gruczole ślinowym ekspresja jest na bardzo niskim poziomie [16]. W dalszym ciągu nie jest jednak wiadomo, czy zdrowe tkanki zostają niezamierzenie uszkodzone, jeśli pacjenci będą leczeni lekami ukierunkowanymi na PSMA w dużych dawkach [7].

Poziom ekspresji jest podwyższony w chorobie nowotworowej, a także związany z inwazyjnością guza. Najwyższy poziom wykrywany jest w przerzutowym androgenozależnym raku prostaty ze względu na to, że jest on związany z aktywnością enzymatyczną [17].

PSMA jest prezentowany na powierzchni komórek, ale nie uwalniany do krążenia, ulega on internalizacji do endosomów po związaniu z ligandem.

Wyróżniane są trzy główne rodzaje ligandów, które namierzają PSMA i są nimi: przeciwciała monoklonalne, aptamery oraz inhibitory małych cząsteczek [18].

1. Przeciwciała monoklonalne są przeciwciałami sztucznie wytworzonymi przez człowieka. Zawierają komórki hybrydowe, które celują wyłącznie w określone epitopy antygenowe. Radioznakowany J591 dokładnie celuje w miejsca przerzutów raka prostaty do kości i tkanek miękkich, co wiąże się z jego przydatnością w obrazowaniu. Obecnie J591 skierowany na domenę zewnątrzkomórkową PSMA ma dobre perspektywy zastosowania w diagnostyce i leczeniu raka prostaty [19].



Rycina 3. Struktura PSMA oraz najczęściej stosowane przeciwciało J591^[13].

2. Aptamery są jednoniciowymi oligonukleotydami, które selektywnie rozpoznają PSMA. Charakteryzuje je niska masa cząsteczkowa, łatwość syntezy i modyfikacji, wysoka stabilność oraz niska immunogenność. Mogą one łączyć się z lekami chematycznymi i siRNA w celu uzyskania celowanej terapii raka prostaty ^[20, 21].
3. Inhibitory małych cząsteczek wiążą się z miejscami aktywnymi enzymu PSMA i w ten sposób konkurencyjnie hamują jego aktywność. Wyróżniane są trzy kategorie inhibitorów: związki serii siarkowej (takie jak pochodne sulfhydrylowe i merkaptan), związki serii fosforowej (takie jak fosforan, fosforamid) oraz najczęściej stosowane związki serii mocznikowej (takie jak pochodne mocznika) ^[22].

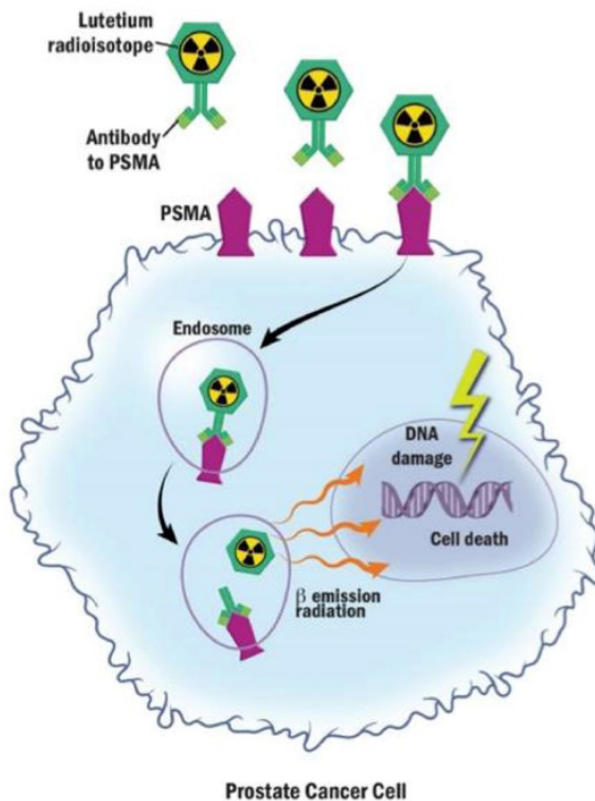
5. TERAPIA UKIERUNKOWANA NA PSMA

5.1. Terapia radioligandowa

Stanowi leczenie polegające na wstrzyknięciu do organizmu dawki terapeutycznej ligandu znakowanego radionuklidem. Ligand zostaje specyficznie związany w komórkach docelowych, co sprawia, że radionuklid uwalnia cząstki alfa, beta oraz elektrony. Cząstki te oddziałują na makrocząsteczki biologiczne wytwarzając wolne rodniki. Indukowane zostaje w ten sposób przerwanie nici DNA, co prowadzi do apoptozy lub martwicy komórek docelowych [18].

5.1.1. Radioligand ^{177}Lu PSMA

Emituje promieniowanie beta i jest preferowany, dzięki długiemu okresowi półtrwania i szybkiej penetracji [18].



Rycina 4. Mechanizm działania radioliganda ^{177}Lu PSMA [10].

Ten rodzaj terapii jest najczęściej stosowany jako opcja terapeutyczna u chorych na metastatycznego opornego na kastrację raka prostaty, u których po niepowodzeniu leczenia farmakologicznego uzyskano dodatni wynik w pozytonowej emisyjnej tomografii komputerowej [7].

Badanie Barber T i in. wykazało minimalną toksyczność leczenia tą metodą obserwowaną zarówno w kohorcie pacjentów T-naiwnych, jak i mocno leczonych [23]. Potwierdzone badaniami zostało również krótkoterminowe bezpieczeństwo i skuteczność w postaci wysokiego odsetka odpowiedzi oraz poprawa jakości życia u pacjentów leczonych terapią tym radioligandem [24, 25].

5.1.2. Radioligand 225Ac PSMA

Emituje promieniowanie alfa i może przynieść korzyści pacjentom niereagującym na leczenie 177 Lu-PSMA [6].

Wykorzystanie emisji alfa charakteryzuje się wysokim liniowym transferem energii, co selektywnie zabija komórki nowotworowe poprzez pęknięcie podwójnej nici DNA i klastrów DNA, jednocześnie oszczędzając zdrową tkankę. Powoduje to przewagę emisji alfa nad emisją beta, niemniej jednak Ac-225 jest rzadziej wykorzystywany ze względu na bardziej ograniczoną produkcję niż w przypadku Lu-177 [26].

5.2. Koniugaty przeciwciało-lek

Stanowią one połączenie przeciwciał z lekami cytotoksycznymi za pomocą różnych wiązań chemicznych. Połączenie umożliwia uniknięcie podawania leków ogólnoustrojowo, a tym samym zmniejsza toksyczność dla narządów niebędących celem terapii. Przeciwciało po specyficznym połączeniu z PSMA wnika do komórek nowotworowych, uwalniając lek zabijający komórki. Przykładami koniugatów przeciwciało-lek są MLN2704, PSMA-MMAE, MEDI3726 [18].

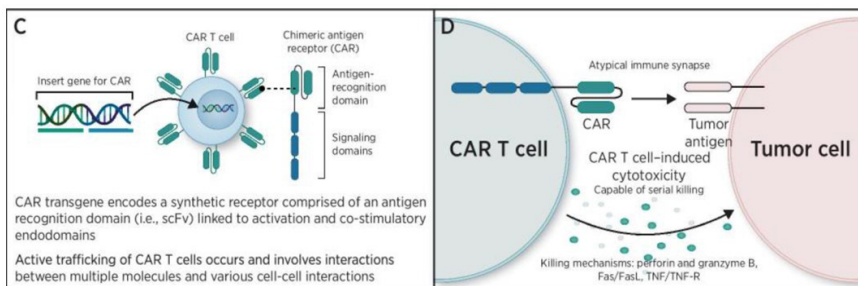
5.3. Immunoterapia komórkowa (CAR-T)

Komórki CAR-T są najczęściej stosowane w leczeniu nowotworów złośliwych układu krwiotwórczego, ale ostatnie badania wykazały, że mogą być uznawane za terapię adjuwantową leczenia standardowego raka prostaty.

Terapia komórkami chimerycznego, białkowego receptora antygeny (CAR) polega na gromadzeniu ludzkich komórek autoimmunologicznych

i wzmacnianiu ich liczby oraz funkcji celowanego zabijania komórek nowotworowych poprzez modyfikację genetyczną. Komórki T są aktywowane, gdy antygen jest rozpoznawany przez CAR, co może indukować uwalnianie cytotosyn i powodować apoptozę [18].

Badanie Slovin.S i in, w którym wykorzystano P-PSMA-101 jako autologiczną terapię CAR-T skierowaną na PSMA wykazało znaczącą skuteczność w przerzutowym raku prostaty opornym na kastrację. Terapia była bezpieczna zgodnie z oczekiwaniami dla produktu CAR-T oraz naprowadzona na kości, co jest szczególnie istotne, ponieważ rak prostaty często przerzuca do kości. Badanie dowiodło, że korzyści terapeutyczne z komórek CAR-T w guzie liwym są możliwe [27].



Rycina 5. Mechanizm działania terapii CAR-T [28].

5.4. Terapia fotodynamiczna

Terapia opiera swoją skuteczność na synergistycznym działaniu światła, fotouczulacza oraz tlenu, co jest toksyczne dla nowotworu. W połączeniu z fotouczulaczem padeliporfiną została zatwierdzona przez Europejską Agencję Medyczną do leczenia jednostronnego, zlokalizowanego raka prostaty niskiego ryzyka [18]. Ukierunkowana naczyniowo terapia fotodynamiczna stanowi alternatywną metodę leczenia dla radykalnej prostatektomii. Terapia umożliwia zachowanie zdrowych sąsiadujących tkanek, a tym samym wstępnie wspomaga funkcje seksualne i prawidłowe funkcjonowanie pęcherza moczowego. W badaniu Flegar L i in. wykazano, że terapia charakteryzuje się niższym profilem powikłań, ale częstszymi nawrotami i progresją w porównaniu do radykalnej prostatektomii [29].

5.5. Chirurgia sterowana obrazem

Chirurgia kierowana obrazem pozwoliła na znaczną poprawę wskaźnika wykrywalności zmian i zmniejszenie dodatniego wskaźnika marginesu chirurgicznego. Obejmuje ona:

- chirurgię sterowaną radionuklidami, która umożliwia śródoperacyjną lokalizację guza, ^[30].
- chirurgię sterowaną fluorescencją, która pozwala na wizualizację i obrysowanie guza ^[31].
- multimodalną chirurgię sterowaną obrazami, która łączy zalety chirurgii sterowanej radionuklidami oraz fluorescencją. Może być stosowana do przed- i śródoperacyjnego wykrywania guzów PSMA+. Według Lütje S i in. multimodalna chirurgia może wydłużyć przeżycie i wykazuje duży potencjał w leczeniu przerzutowego raka prostaty ^[32].

5.6. Niszczenie nanopęcherzyków za pomocą ultradźwięków

Nanopęcherzyki stanowią nośniki do przenoszenia leków. Niszczone są w komórce docelowej pod wpływem promieniowania ultradźwiękowego, w wyniku czego leki są uwalniane w celu zabicia komórek nowotworowych. Obecnie dostępnych jest niewiele doniesień na temat ich ukierunkowanego na PSMA zastosowania w leczeniu raka gruczołu krokowego ^[33, 34].

6. PODSUMOWANIE

Rak gruczołu krokowego jest najczęstszym litym nowotworem złośliwym i drugą najczęstszą przyczyną zgonów u mężczyzn.

Stanowi problem diagnostyczny, ponieważ zazwyczaj nie daje objawów aż do momentu progresji, a także nie istnieje specyficzny test umożliwiający jego wczesne wykrycie ^[2, 3]. Obecnie możliwości terapeutyczne są wciąż niewystarczające, szczególnie w przerzutowym raku prostaty opornym na kastrację. Aktywność przeciwnowotworową w tym rodzaju raka wykazują terapie ukierunkowane na PSMA, dlatego stanowią obiecującą metodą leczenia. Jest to możliwe, ponieważ PSMA ulega wysokiej ekspresji w złośliwej tkance prostaty i bezpośrednio koreluje z zaawansowaniem raka prostaty ^[15]. Każda z przedstawionych form terapii wykazuje skuteczne działanie terapeutyczne w odmiennych mechanizmach. W związku z tym można rozważyć połączenie

terapii ukierunkowanych na PSMA z zatwierdzonymi terapiami standardowymi w celu poprawy skuteczności leczenia raków gruczołu krokowego. Należy jednak pamiętać, że nie wszystkie guzy wykazują ekspresję PSMA oraz część pacjentów nie odpowiada na terapię ukierunkowaną na PSMA jako monoterapię [10,18]. Ze względu na dużą częstotliwość występowania tego schorzenia, skąpą diagnostykę przesiewową oraz ograniczone możliwości leczenia bardziej zaawansowanych stadiów choroby, niezwykle istotnym jest prowadzenie dalszych badań nad nowoczesnymi metodami leczenia. Umożliwi to wyleczenie choroby lub wydłużenie czasu przeżycia od momentu otrzymania diagnozy.

REFERENCJE

- [1] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA A Cancer J Clinicians*. 2022;72(1):7-33. doi:10.3322/caac.21708
- [2] Sekhoacha M, Riet K, Motloun P, Gumenku L, Adegoke A, Mashele S. Prostate Cancer Review: Genetics, Diagnosis, Treatment Options, and Alternative Approaches. *Molecules*. 2022;27(17):5730. doi:10.3390/molecules27175730
- [3] Merriel SWD, Funston G, Hamilton W. Prostate Cancer in Primary Care. *Adv Ther*. 2018;35(9):1285-1294. doi:10.1007/s12325-018-0766-
- [4] Sebesta EM, Anderson CB. The Surgical Management of Prostate Cancer. *Seminars in Oncology*. 2017;44(5):347-357. doi:10.1053/j.seminoncol.2018.01.003
- [5] D'Amico AV. Biochemical Outcome After Radical Prostatectomy, External Beam Radiation Therapy, or Interstitial Radiation Therapy for Clinically Localized Prostate Cancer. *JAMA*. 1998;280(11):969. doi:10.1001/jama.280.11.969
- [6] Luining WI, Cysouw MCF, Meijer D, et al. Targeting PSMA Revolutionizes the Role of Nuclear Medicine in Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer. *Cancers*. 2022;14(5):1169. doi:10.3390/cancers14051169
- [7] Emmett L, Willowson K, Violet J, Shin J, Blanksby A, Lee J. Lutetium-177 PSMA radionuclide therapy for men with prostate cancer: a review of the current literature and discussion of practical aspects of therapy. *J Med Radiat Sci*. 2017;64(1):52-60. doi:10.1002/jmrs.227

- [8] Evans AJ. Treatment effects in prostate cancer. *Modern Pathology*. 2018;31:110-121. doi:10.1038/modpathol.2017.158
- [9] Sritharan K, Tree A. MR-guided radiotherapy for prostate cancer: state of the art and future perspectives. *BJR*. 2022;95(1131). doi:10.1259/bjr.20210800
- [10] Deluce JE, Cardenas L, Lalani AK, Maleki Vareki S, Fernandes R. Emerging Biomarker-Guided Therapies in Prostate Cancer. *Current Oncology*. 2022;29(7):5054-5076. doi:10.3390/curroncol29070400
- [11] Kim SJ, Kim SI. Current Treatment Strategies for Castration-Resistant Prostate Cancer. *Korean J Urol*. 2011;52(3):157. doi:10.4111/kju.2011.52.3.157
- [12] Aragon-Ching J, Nader R, El Amm J. Role of chemotherapy in prostate cancer. *Asian J Androl*. 2018;20(3):221. doi:10.4103/aja.aja_40_17
- [13] Maurer T, Eiber M, Schwaiger M, Gschwend JE. Current use of PSMA-PET in prostate cancer management. *Nat Rev Urol*. 2016;13(4):226-235. doi:10.1038/nrurol.2016.26
- [14] <https://www.hcp.novartis.com/medical/areas-of-research/prostate/psma/expression-of-psma-potential-utility/>
- [15] Wright GL Jr, Haley C, Beckett ML, Schellhammer PF. Expression of prostate-specific membrane antigen in normal, benign, and malignant prostate tissues. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 1995;1(1):18-28. doi:10.1016/1078-1439(95)00002-y
- [16] Kloss CC, Lee J, Zhang A, et al. Dominant-Negative TGF- β Receptor Enhances PSMA-Targeted Human CAR T Cell Proliferation And Augments Prostate Cancer Eradication. *Molecular Therapy*. 2018;26(7):1855-1866. doi:10.1016/j.ymthe.2018.05.003
- [17] Czerwińska M, Bilewicz A, Kruszewski M, Wegierek-Ciuk A, Lankoff A. Targeted Radionuclide Therapy of Prostate Cancer—From Basic Research to Clinical Perspectives. *Molecules*. 2020;25(7):1743. doi:10.3390/molecules25071743
- [18] Wang F, Li Z, Feng X, Yang D, Lin M. Advances in PSMA-targeted therapy for prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2021;25(1):11-26. doi:10.1038/s41391-021-00394-5

- [19] BANDER NH, TRABULSI EJ, KOSTAKOGLU L, et al. Targeting Metastatic Prostate Cancer With Radiolabeled Monoclonal Antibody J591 to the Extracellular Domain of Prostate Specific Membrane Antigen. *Journal of Urology*. 2003;170(5):1717-1721. doi:10.1097/01.ju.0000091655.77601.0c
- [20] Wang AZ, Farokhzad OC. Current Progress of Aptamer-Based Molecular Imaging. *J Nucl Med*. 2014;55(3):353-356. doi:10.2967/jnumed.113.126144
- [21] Hussain AF, Tur MK, Barth S. An Aptamer-siRNA Chimera Silences the Eukaryotic Elongation Factor 2 Gene and Induces Apoptosis in Cancers Expressing $\alpha v \beta 3$ Integrin. *Nucleic Acid Therapeutics*. 2013;23(3):203-212. doi:10.1089/nat.2012.0408
- [22] Pastorino S, Riondato M, Uccelli L, et al. Toward the Discovery and Development of PSMA Targeted Inhibitors for Nuclear Medicine Applications. *CRP*. 2020;13(1):63-79. doi:10.2174/1874471012666190729151540
- [23] Barber TW, Singh A, Kulkarni HR, Niepsch K, Billah B, Baum RP. Clinical Outcomes of ^{177}Lu -PSMA Radioligand Therapy in Earlier and Later Phases of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Grouped by Previous Taxane Chemotherapy. *J Nucl Med*. 2019;60(7):955-962. doi:10.2967/jnumed.118.216820
- [24] Yadav MP, Ballal S, Sahoo RK, et al. Long-term outcome of ^{177}Lu -PSMA-617 radioligand therapy in heavily pre-treated metastatic castration-resistant prostate cancer patients. Wallis CJD, ed. *PLoS ONE*. 2021;16(5):e0251375. doi:10.1371/journal.pone.0251375
- [25] Khreish F, Ghazal Z, Marlowe RJ, et al. ^{177}Lu -PSMA-617 radioligand therapy of metastatic castration-resistant prostate cancer: Initial 254-patient results from a prospective registry (REALITY Study). *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2021;49(3):1075-1085. doi:10.1007/s00259-021-05525-7
- [26] Ling SW, de Blois E, Hooijman E, van der Veldt A, Brabander T. Advances in ^{177}Lu -PSMA and ^{225}Ac -PSMA Radionuclide Therapy for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Pharmaceutics*. 2022;14(10):2166. doi:10.3390/pharmaceutics14102166

- [27] Slovin SF, Dorff TB, Falchook GS, et al. Phase 1 study of P-PSMA-101 CAR-T cells in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC). *JCO*. 2022;40(6_suppl):98-98. doi:10.1200/jco.2022.40.6_suppl.098
- [28] Dorff TB, Narayan V, Forman SJ, et al. Novel Redirected T-Cell Immunotherapies for Advanced Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2021;28(4):576-584. doi:10.1158/1078-0432.ccr-21-1483
- [29] Flegar L, Buerk B, Proschmann R, et al. Vascular-targeted Photodynamic Therapy in Unilateral Low-risk Prostate Cancer in Germany: 2-yr Single-centre Experience in a Real-world Setting Compared with Radical Prostatectomy. *European Urology Focus*. 2022;8(1):121-127. doi:10.1016/j.euf.2021.01.018
- [30] Horn T, Rauscher I, Eiber M, Gschwend JE, Maurer T. „PSMA-radio-guided surgery“ beim lokalisierten Prostatakarzinomrezidiv. *Urologe*. 2017;56(11):1417-1423. doi:10.1007/s00120-017-0516-z
- [31] Mangano MS, De Gobbi A, Beniamin F, Lamon C, Ciaccia M, Macca-trozzo L. Robot-assisted nerve-sparing radical prostatectomy using near-infrared fluorescence technology and indocyanine green: initial experience. *Urologia*. 2018;85(1):29-31. doi:10.5301/uj.5000244
- [32] Lütje S, Heskamp S, Franssen GM, et al. Development and characterization of a theranostic multimodal anti-PSMA targeting agent for imaging, surgical guidance, and targeted photodynamic therapy of PSMA-expressing tumors. *Theranostics*. 2019;9(10):2924-2938. doi:10.7150/thno.35274
- [33] Wu M, Wang Y, Wang Y, et al. Paclitaxel-loaded and A10-3.2 aptamer-targeted poly(lactide-&em>&em>-glycolic acid) nanobubbles for ultrasound imaging and therapy of prostate cancer. *IJN*. 2017;Volume 12:5313-5330. doi:10.2147/ijn.s136032
- [34] Wu M, Zhao H, Guo L, et al. Ultrasound-mediated nanobubble destruction (UMND) facilitates the delivery of A10-3.2 aptamer targeted and siRNA-loaded cationic nanobubbles for therapy of prostate cancer. *Drug Delivery*. 2018;25(1):226-240. doi:10.1080/10717544.2017.1422300

GŁĘBOKA STYMULACJA MÓZGU W CHOROBIE PARKINSONA

**Dominika Majer, Szymon Warwas, Emilia Słabońska, Krzysztof
Krukowski, Oliwia Jewuła, Gabriela Mysiek**

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

Abstrakt: Wraz ze starzeniem się społeczeństwa, zwiększa się występowanie chorób układu nerwowego. Jedną z częściej występujących chorób neurodegeneracyjnych jest choroba Parkinsona. Wpływa ona na codzienne funkcjonowanie pacjenta. Charakteryzuje się zespołem objawów motorycznych i niemotorycznych. Farmakologiczne leczenie przyczynowe choroby Parkinsona nie jest obecnie możliwe, ale stosuje się leczenie objawowe, które ma na celu poprawić jakość życia chorego. U pacjentów z zaawansowaną chorobą Parkinsona można zastosować głęboką stymulację mózgu *ang. deep brain stimulation* (DBS), która polega na umieszczeniu elektrod w wybranych strukturach mózgu. Celem pracy jest omówienie terapii DBS, jej działania oraz kwalifikacji pacjentów do zabiegu.

Słowa kluczowe: choroba Parkinsona, neurodegeneracja, leczenie, głęboka stymulacja mózgu

Abstract: As the population ages, the incidence of nervous system diseases increases. One of the more common neurodegenerative diseases is Parkinson's disease. It affects the patient's daily functioning. It is characterized by a complex of motor and non-motor symptoms. Pharmacological causal treatment of Parkinson's disease is not currently possible, but symptomatic treatment is used to improve the patient's quality of life. Patients with advanced Parkinson's disease can be treated with deep brain stimulation (DBS), which involves placing electrodes into selected brain structures. The aim of this study is to discuss DBS therapy, its effects and how patients qualify for the procedure.

Keywords: Parkinson's disease, neurodegeneration, treatment, deep brain stimulation

1. WSTĘP

Choroba Parkinsona *ang. Parkinson Disease* (PD) należy do grupy chorób neurodegeneracyjnych, które charakteryzują się destrukcją neuronów układu nerwowego i jest drugą, po chorobie Alzheimera, najczęściej występującą

chorobą z tej grupy. Z powodu starzejącej się populacji na świecie występuje coraz częściej. Do czynników ryzyka możemy zaliczyć: wiek, który stanowi najważniejszy czynnik ryzyka, płeć męską, wywiad rodzinny oraz czynniki środowiskowe^[1,2,3,4]. Przypuszcza się, że wpływ na rozwój choroby Parkinsona może mieć ekspozycja na pestycydy, herbicydy, rozpuszczalniki oraz metale ciężkie^[2], które przyczyniają się do powstawania stresu oksydacyjnego, wpływającego na rozwój zmian neurodegeneracyjnych.

Choroba Parkinsona charakteryzuje się utratą neuronów dopaminergicznych w istocie czarnej oraz odkładaniem się nieprawidłowo sfałdowanego białka α -synukleiny^[5]. Objawy charakteryzujące PD możemy podzielić na objawy motoryczne, do których możemy zaliczyć okresowe drżenie rąk, problem z utrzymaniem stabilnej postawy^[1], spowolnienie ruchowe^[1], mikrografię, bóle barku⁶ oraz objawy niemotoryczne takie jak: lęk, depresja, zaburzenia snu, utrata węchu czy hipotensja ortostatyczna^[6].

Nie ma obecnie leku, który ograniczyłby rozwój choroby Parkinsona, dlatego stosowane jest leczenie objawowe, za pomocą którego możemy poprawić jakość życia pacjenta. Dodatkowo stosowanie rehabilitacji przez cały okres choroby umożliwia poprawę sprawności ruchowej pacjenta^[6]. U osób z zaawansowaną chorobą Parkinsona możliwe jest zastosowanie leczenia chirurgicznego z wykorzystaniem elektrod umożliwiających głęboką stymulację mózgu *ang. deep brain stimulation* (DBS)^[6]. Badania wskazują, że DBS jest bezpiecznym i skutecznym rozwiązaniem^[7].

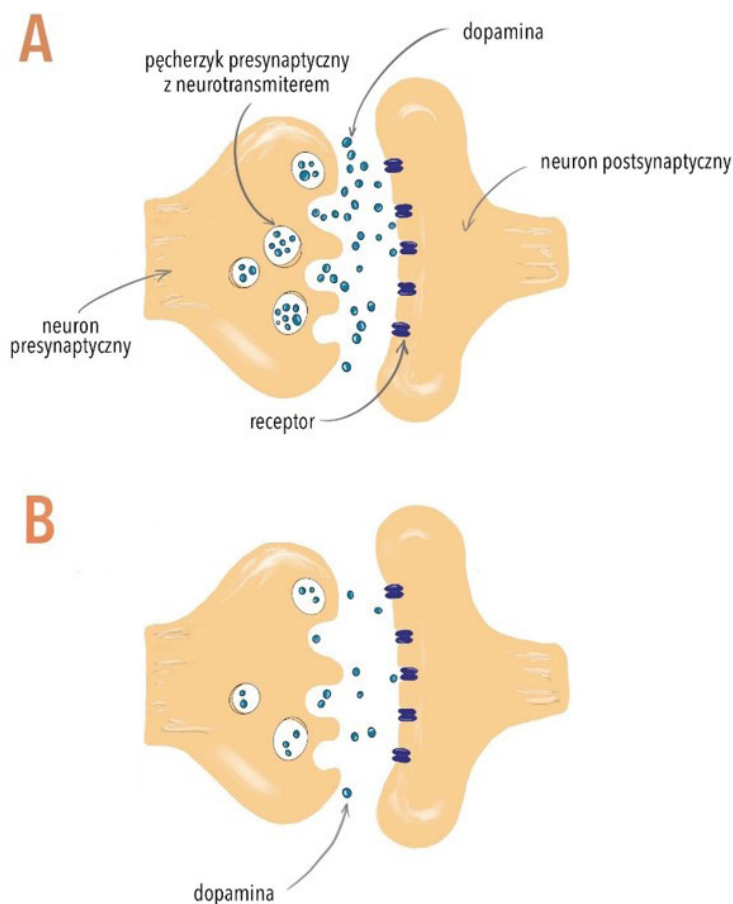
2. NEURODEGENERACYJNE PROCESY W CHOROBI PARKINSONA

Uznaje się, że głównym mechanizmem patofizjologicznym choroby Parkinsona są długotrwanie utrzymujące się procesy zapalne układu nerwowego, przyczyniające się do degeneracji komórek nerwowych^[8]. Choroba Parkinsona cechuje się uszkodzeniem i zanikiem neuronów dopaminergicznych znajdujących się w istocie czarnej zbitej, co prowadzi do niedoboru dopaminy^[9] (Ryc. 1). Poza aspektem neuronalnym, istotne jest również gromadzenie się nieprawidłowo sfałdowanego białka α -synukleiny^[5,10,11], które także wpływa na dysfunkcję neuronów oraz na ich degenerację.

Procesy zapalne przebiegające w odpowiedzi na uszkodzenia tkanek mają na celu chronić struktury ośrodkowego układu nerwowego (OUN) i promować procesy naprawy tkanek^[10]. Aktywowane komórki układu odpornościowego przyczyniając się do fagocytozy toksyn i/lub patogenów

wykazują działanie neuroprotecyjne ^[10]. Prawdopodobnie, długie utrzymywanie się aktywnych procesów immunologicznych może zaburzać równowagę procesów przebiegających w OUN, co skutkuje zwiększeniem degeneracji neuronów oraz zaburzeniami bariery krew-mózg, skutkując rozwinięciem się przewlekłego stanu zapalnego ^[10].

Badania wykazują, że udział białka α -synukleiny w patogenezie PD jest znaczący ^[12]. Białko to, prawdopodobnie, uczestniczy w procesie regulacji ruchu pęcherzyków synaptycznych i uwalnianiu neuroprzekaźników, jednakże w formie nieprawidłowo sfałdowanej agreguje w patologiczne formy, odkłada się wewnątrz neuronów tworząc ciała Lewy'ego i przyczynia się do degradacji neuronów dopaminergicznych ^[12,13,14].



Rycina 1. Przebieg synaptyczny w neuronie osoby zdrowej (A) oraz z chorobą Parkinsona (B) [opracowanie własne]

3. LECZENIE

Ciągle postępujący zanik neuronów dopaminergicznych może zostać nieznacznie skompensowany dzięki farmakologicznej terapii dopaminergicznej [9]. Zastosowanie takiej terapii umożliwia kontrolę objawów, gdyż występują one z mniejszym nasileniem, a pacjent może normalnie funkcjonować. Wybór metody leczenia powinien być zindywidualizowany i zależeć od wieku pacjenta, czasu trwania choroby, chorób współistniejących oraz stosowania leków w przebiegu innych chorób [1].

Leczenie choroby Parkinsona powinno rozpocząć się już od samego początku, gdy choroba została zdiagnozowana, jeszcze zanim pojawią się ciężkie objawy. W leczeniu farmakologicznym wykorzystuje się następujące preparaty:

- Lewodopę,
- Agonistów dopaminy,
- Inhibitory monoaminoooksydazy-B (inhibitory MAO-B),
- Inhibitory katecholo-O-metylotransferazy (inhibitory COMT),
- Amantadynę,
- Leki antycholinergiczne,

Lewodopa, agoniści dopaminy oraz inhibitory MAO-B są odpowiednimi lekami, które możemy podać na samym początku terapii choroby Parkinsona [2].

Lewodopa uznawana jest za najskuteczniejszy lek w leczeniu objawów motorycznych [1,6]. Po przeniknięciu bariery krew-mózg przekształcana jest w dopaminę, co umożliwia uzupełnienie jej deficytu związanego z degeneracją neuronów dopaminergicznych. Lek stosowany jest doustnie [1,6]. Badania naukowe wykazują, że w trakcie terapii lewodopą, u osób w zaawansowanym stadium choroby, może rozwinąć się dyskineza indukowana lewodopą [17]. Opracowano lek o przedłużonym uwalnianiu składający się z połączenia lewodopy z inhibitorem dekarboksylazy aminokwasów aromatycznych – karbidopą. Takie połączenie ma zmniejszać fluktuacje ruchowe [1]. Do działań niepożądanych możemy zaliczyć: dyskinezy, senność, depresję, lęki, omamy i wymioty.

Działanie agonistów dopaminy wiąże się z mniejszym łagodzeniem objawów, a jej mechanizm polega na stymulacji postsynaptycznych receptorów dopaminergicznych D1, D2 i D3 [1]. Można je stosować w połączeniu z lewodopą lub w monoterapii [1]. Działania niepożądane są podobne do wyżej wymienionych w trakcie terapii lewodopą [1]. Dodatkowo możemy wyróżnić

obrzęk nóg ^[1], nadmierną senność, hipotonię oraz halucynacje ^[6]. Agonistów dopaminy można stosować doustnie, w postaci o przedłużonym uwalnianiu, transdermalnie oraz podskórnie ^[1].

Inhibitory MAO-B zmniejszają rozkład dopaminy przez enzym monoaminooksydazy B, dzięki czemu wydłużają okres połowicznego rozkładu dopaminy, a tym samym czas jej działania ^[1]. Stosowane są we wczesnym stadium PD w monoterapii lub, gdy choroba osiąga stadium zaawansowane, razem z lewodopą, w celu zmniejszenia fluktuacji ruchowych. Inhibitory MAO-B wykazują mniej działań niepożądanych niż lewodopa ^[1]. Możemy wyróżnić działania niepożądane takie jak: występowanie zawrotów głowy, omamy, dezorientację ^[18]. Zarówno inhibitory MAO-B jak i agoniści dopaminy wiążą się z mniejszym złagodzeniem objawów, ale za to mniejszym ryzykiem dyskinez.

Inhibitory COMT stosowane są w leczeniu choroby Parkinsona razem z lewodopą w celu zwiększenia skuteczności jej działania. Hamują enzym, katecholo-O-metylotransferazę, biorący udział w przekształcaniu lewodopy do nieaktywnych metabolitów. Zastosowanie inhibitorów COMT wydłuża czas półtrwania lewodopy zwiększając jej skuteczność działania. Łagodzą również występujące w trakcie terapii lewodopą fluktuacje ruchowe szczytu dawki ^[19].

Amantadyna pełni funkcję antagonisty receptora N-metylo-D-asparaginowego o działaniu antycholinergicznym ^[1]. Wykorzystywana jest do leczenia grypy jako lek przeciwwirusowy ^[1,6]. Po odkryciu jej skutecznego działania w chorobie Parkinsona zaczęto ją stosować w celu zmniejszenia powikłań po terapii lewodopą takich jak dyskinezy płasawicze szczytu dawki ^[1,6]. Wczesne leczenie amantadyną może opóźnić wystąpienie dyskinezy indukowanej lewodopą w większym stopniu niż leczenie innymi lekami objawowymi ^[20]. Wśród działań niepożądanych amantadyny możemy wyróżnić: zatrzymanie moczu u pacjentów z przerostem gruczołu krokowego, senność, halucynacje wzrokowe, suchość w ustach, zawroty głowy oraz sinicę marmurkową ^[6].

Leki antycholinergiczne używane są w celu poprawy objawów motorycznych np. zmniejszenia objawu drżenia parkinsonowskiego ^[1,6]. Ze względu na wywoływanie deficytów związanych z funkcjami poznawczymi oraz działania niepożądane takie jak: halucynacje, suchość w ustach, zwiększenie ciśnienia śródgałkowego stosuje się je coraz rzadziej.

W sytuacji, gdy choroba postępuje, a leczenie farmakologiczne nie przynosi oczekiwanych efektów, do terapii pacjenta można wdrożyć leczenie neurochirurgiczne. U pacjentów, którzy się kwalifikują można zastosować DBS ^[7].

DBS to bezpieczna terapia dla pacjentów z zaawansowaną chorobą Parkinsona. Podczas zabiegu chirurgicznego wszczepiane są elektrody do określonych części mózgu i łączone z małym urządzeniem elektrycznym umieszczonym w klatce piersiowej. Urządzenie i elektrody bezboleśnie stymulują określone obszary w mózgu, które kontrolują ruch. Dzięki temu DBS może pomóc zatrzymać wiele objawów choroby Parkinsona związanych z ruchem, takich jak drżenie, spowolnienie ruchu i sztywność.

Dodatkowo można zastosować terapie nefarmakologiczne, które pomogą pacjentowi w zachowaniu dobrej sprawności fizycznej i w opanowaniu objawów. Są to:

- Rehabilitacja,
- Masaż leczniczy,
- Zdrowa dieta,
- Ćwiczenia wzmacniające mięśnie.

4. GŁĘBOKA STYMULACJA MÓZGU (DBS)

DBS znalazła zastosowanie w leczeniu pacjentów z chorobą Parkinsona, u których występują dyskinezy i/lub fluktuacje ruchowe, które przeszkadzają pacjentowi w codziennym funkcjonowaniu, a leczenie farmakologiczne traci skuteczność [7]. Należy pamiętać, że aktualnie nie ma leku, który prowadziłby do całkowitego wyleczenia PD. Podobnie jest z DBS, która, chociaż nie zatrzyma postępu neurodegeneracyjnego będącego przyczyną rozwoju choroby Parkinsona, to działając objawowo, zwiększa komfort życia pacjenta [21].

4.1. Budowa stymulatora

Obecnie wykorzystuje się cztero- lub ośmiokontaktowe elektrody o średnicy 1,3 mm, stymulujące określone miejsce w mózgu, najczęściej jądro niskowzgórzowe (STN), jednak można je również wszczepić do części wewnętrznej gałki bladej (GPI) lub jądra brzuszno-środkowego wzgórza (VIM) [9,21,22,23]. Miejsce, do którego wszczepiamy elektrody wybiera specjalista w zależności od: obrazu klinicznego choroby, stanu zaawansowania choroby Parkinsona, stopnia nasilenia zaburzeń ruchowych oraz obecności dodatkowych ruchów mimowolnych [22]. Lokalizacja umieszczanych elektrod jest również weryfikowana poprzez śródoperacyjne lub pooperacyjne obrazowanie z wykorzystaniem tomografii komputerowej (TK) lub rezonansu magnetycznego (MRI) [7]. Elektrody w strukturach mózgu umieszczane są zazwyczaj obustronnie,

jednak zdarzają się pacjenci, u których należy zastosować jednostronną stymulację^[23].

Elektroda połączona jest podskórnym przewodem z generatorem impulsów *ang. implantable pulse generator* (IPG), położonym podskórnym pod obojczykiem na ścianie klatki piersiowej^[23, 24].

Generator impulsów stosowany do DBS w chorobie Parkinsona waży w przedziale od 40-67g^[21]. IPG zawiera baterię, która może się wyczerpać, dlatego należy ją wymienić zwykle po 3-5 latach ciągłej stymulacji lub jeśli zastosowano IPG z możliwością ładowania, to może służyć nawet 15-25 lat^[7,25].

4.2. Mechanizm działania

Za uruchomienie elektrostymulacji odpowiedzialny jest neurolog, neurochirurg lub odpowiednio wykwalifikowana pielęgniarka w dziedzinie głębokiej stymulacji mózgu. Po kilku dniach od zabiegu, za pomocą komputera zewnętrznego połączonego zdalnie z generatorem impulsów, zespół medyczny programuje stymulację oraz sprawdza jej działanie i ewentualne efekty uboczne^[7].

Do zaprogramowania odpowiedniej stymulacji najczęściej wykorzystywany jest prąd o częstotliwości 130 Hz, o zmiennej amplitudzie w zakresie od 1-4 miliamperów w zależności od reakcji pacjenta oraz impuls o szerokości 60 ms^[7].

W DBS wykorzystuje się stymulację mono- lub bipolarną, a poszczególne kontakty elektrod mogą być aktywowane oddzielnie lub razem, zgodnie ze wskazaniami klinicznymi. Najnowsze urządzenia do DBS wykorzystują elektrody z przewodami kierunkowymi, które mogą przewodzić prąd prostopadle do osi elektrody, aby bardziej precyzyjnie skupić stymulację na odpowiednim obszarze mózgu, zamiast tworzyć wielokierunkowe pole elektryczne^[7].

Trwałość IPG zależy od zastosowanych parametrów stymulacji. Na przykład podwójna stymulacja monopolarna pochłania znacznie więcej energii niż pojedyncza stymulacja monopolarna, co prowadzi do skrócenia żywotności baterii. Wyższa częstotliwość, wyższa amplituda i większa szerokość impulsu również korelują ze skróconą żywotnością baterii^[21].

Mechanizm działania, który odpowiada za kliniczny wpływ głębokiej stymulacji mózgu na objawy motoryczne choroby Parkinsona jest nadal nieznanym. Istnieje kilka hipotez, które wskazują na prawdopodobny mechanizm działania DBS, jednak żadna z nich nie została potwierdzona^[9]. Mówi się, że jego działanie jest zarówno hamujące jak i stymulujące^[1].

Jedna z hipotez zakłada, że DBS wywiera swoje działanie terapeutyczne poprzez stymulację STN, GPI lub VIM poprzez prąd wytwarzany w generatorze impulsów, z którym jest połączony.

Zaproponowano jednak hipotezę związaną z hamowaniem sieci neuronowych, która zakłada oddzielanie sygnałów wejściowych i wyjściowych z jąder podstawy, co skutkuje przerwaniem nieprawidłowego przepływu impulsów przez stymulowany obszar ^[24,26].

Wiele czynników decyduje o tym, które struktury neuronu są pobudzane ^[23]. Stymulacja działa głównie na aksony oraz dendryty w pobliżu umieszczonej elektrody, ale nie wpływa na ciało komórki nerwowej (perykarion), gdyż ma wyższy próg stymulacji. Oznacza to, że łatwiejszej stymulacji podlega neuron, którego perykarion leży w większej odległości od elektrody, a wypustki dendrytyczne lub aksonalne neuronu leżą w jej pobliżu ^[23].

Głęboka stymulacja mózgu ma na celu zmniejszać objawy ruchowe u pacjentów w zaawansowanym stadium choroby Parkinsona. Według badań poprawia niepełnosprawność ruchową o 33-67%, fluktuacje ruchowe o 73-83% oraz dyskinezy, które pojawiły się po leczeniu farmakologicznym lewodopą ^[27,28,29].

Głęboka stymulacja STN uznawana jest za złoty standard ^[22]. Skutecznie kontroluje objawy i powikłania motoryczne, poprawia jakość życia chorego, a także umożliwia zmniejszenie dawek leków w trakcie leczenia farmakologicznego, a w niektórych przypadkach również całkowite ich odstawienie ^[1,7].

W przypadku pacjentów, którzy zmagają się głównie z silnym drżeniem a inne objawy są kontrolowane lekami lub nawet nie występują, zastosowanie VIM DBS umożliwia skuteczną i długotrwałą kontrolę drżenia ^[7].

DBS w GPI przeprowadzany jest u osób, które mają wszystkie charakterystyczne objawy ruchowe choroby Parkinsona. Ma pozytywny wpływ na dyskinezy, sztywność, akinezę, drżenie, a także, choć w mniejszym stopniu, na zaburzenia chodu tzw. zamrożenie chodu ^[7]. Pozytywny wpływ na dyskinezy umożliwia kontynuację leczenia lewodopą bez ryzyka wystąpienia dyskinez indukowanych lewodopą ^[7].

4.3. Kwalifikacja pacjentów

Do zabiegu głębokiej stymulacji mózgu mogą przystąpić pacjenci, którzy spełniają określone wymagania. Aktualnie brak ujednoliconej skali, za pomocą której można ocenić stan zdrowia pacjenta i stopień zaawansowania

choroby Parkinsona. W zależności od badań klinicznych, do oceny wybierane są różne skale oceniające stopień zaawansowania choroby Parkinsona ^[30,31,32,33].

Do oceny nasilenia lub zmniejszenia objawów motorycznych najczęściej wykorzystuje się Zunifikowaną Skalę Oceny Choroby Parkinsona Towarzystwa Zaburzeń Ruchowych *ang. Movement Disorder Society – Unified Parkinson's Disease Rating Scale* (MDS-UPDRS), która składa się z czterech części ^[30].

- Część I (Pozaruchowe aspekty umiejętności w zakresie czynności codziennych),
- Część II (Ruchowe aspekty codziennego funkcjonowania),
- Część III (Objawy ruchowe),
- Część IV (Powikłania ruchowe).

Ponadto różni badacze wyróżniali następujące kryteria włączające ^[31,32]:

- Wiek od 18 do 60 roku życia,
- Choroba trwająca ≥ 4 lata,
- Objawy motoryczne zmniejszone o 50% po zastosowaniu leczenia farmakologicznego (oceniana zgodnie ze skalą MDS-UPDRS, część III oceniająca objawy ruchowe),
- Ocena ciężkości choroby przy stosowanym leczeniu farmakologicznym (zgodnie ze skalą Hoehna i Yahra),
- Fluktuacje ruchowe lub dyskinezy przez okres 3 lat lub krótszy,

Do najważniejszych kryteriów wykluczających można zaliczyć ^[31,32]:

- Demencja,
- Ciężka depresja z myślami samobójczymi ^[34],
- Zaburzenia psychiatryczne,
- Czas trwania choroby krótszy niż 4 lata,
- Atypowy parkinsonizm ^[35],
- Brak odpowiedzi na leczenie lewodopą.

4.4. Zagrożenia i skutki uboczne

Do najczęstszych powikłań po zabiegu chirurgicznym należą infekcje ^[7]. Działania niepożądane DBS wywołane stymulacją obejmują zaburzenia wzroku i mowy, zaburzenia równowagi, dyzatrię, pogorszenie funkcji poznawczych i stanu psychicznego ^[1, 36, 37]. Do rzadkich powikłań śródoperacyjnych należą krwotoki śródczaszkowy ^[38, 39]. Zdarzają się również przypadki

manii pooperacyjnej, jednak jest to stan przejściowy, który ulega poprawie w ciągu miesiąca od wykonanego zabiegu^[40].

5. ZASTOSOWANIE REZONANSU MAGNETYCZNEGO (MRI) U PACJENTÓW Z DBS

Badanie MRI wśród pacjentów z PD, u których zastosowano DBS jest istotne i może dotyczyć nawet 70% pacjentów w przeciągu 10 lat^[40]. Możliwość przeprowadzenia badań obrazowych metodą MRI u pacjentów ze wszczepionymi, metalowymi urządzeniami DBS może stanowić problem kliniczny w związku z możliwością nagrzewania się końcówek elektrod, dysfunkcji IPG czy powstawaniu indukowanych prądów^[41]. W urządzeniach starszej generacji mogło dochodzić do spontanicznego uruchamiania lub dezaktywacji IPG, co w rzadkich przypadkach wymagało nawet wymiany całego urządzenia^[42]. W obecnie stosowanych IPG nowej generacji, występowanie wyżej wymienionych powikłań jest rzadkie, niemniej jednak należy kontrolnie sprawdzić działanie IPG po badaniu MR^[43]. Pomimo potencjalnych zagrożeń, wydaje się, że aktualnie stosowanie MRI u pacjentów poddającym się leczeniu z zastosowaniem terapii DBS, jest kluczowe.

W celu zapobiegania występującym powikłaniom zostały opracowane wytyczne odnośnie przeprowadzania badań MRI u pacjentów z DBS. Wytyczne te określają rodzaj cewek, jaki należy użyć, ustawienia gradientów oraz ustawienia mocy pola magnetycznego^[41]. Ma to zapobiegać nagrzewaniu się urządzenia i poważnym konsekwencjom z tym związanym np. uszkodzeniom mózgu.

Funkcjonalne MRI (fMRI) jest obecnie wykorzystywane w celu badania wpływu stosowania DBS na struktury mózgowia^[44]. Badania fMRI pozwoliły ustalić powtarzalny wzór aktywności mózgu poprzez porównanie optymalnych i nieoptymalnych kontaktów i wysokości napięć, służąc jako biomarker skuteczności DBS. Wzorce odpowiedzi mózgu są wykorzystywane w modelach uczenia maszynowego w celu przewidywania optymalnego dla pacjenta ustawienia kontaktu^[44].

Głosem przyszłości pozostaje udoskonalanie algorytmów uczenia maszynowego w celu zwiększenia precyzji w dopasowaniu ustawień parametrów DBS specyficznych i unikatowych dla każdego pacjenta.

6. WNIOSKI

Przyczynowe leczenie PD nadal nie jest możliwe, ale istnieje skuteczny sposób, żeby zmniejszyć nasilenie towarzyszących chorobie objawów motorycznych. Poza zastosowaniem lewodopy, będącej złotym standardem w leczeniu farmakologicznym PD, w niektórych przypadkach można zastosować leczenie chirurgiczne. W celu zwiększenia komfortu życia pacjenta chorego na PD opracowano DBS-STN, DBS-VIM oraz DBS-GPI. Są to skuteczne metody, dzięki którym w bezpieczny sposób można zmniejszyć występowanie objawów motorycznych takich jak: drżenie, dyskinezy czy fluktuacje ruchowe oraz zmniejszyć występowanie działań niepożądanych spowodowanych lekami np. dyskinez indukowanych lewodopą. Niestety w przeciwieństwie do leczenia farmakologicznego, które stosuje się u wszystkich pacjentów z PD, do leczenia DBS należy spełniać określone kryteria, aby uniknąć silnych działań niepożądanych. DBS jest uznaną metodą leczenia, która z pewnością będzie się w dalszym ciągu rozwijać. Wykorzystując algorytmy uczenia maszynowego pacjenci mogą otrzymać zindywidualizowane leczenie dopasowane do potrzeb każdego pacjenta z osobna.

REFERENCJE

- [1] Balestrino R, Schapira AHV. Parkinson disease. *Eur J Neurol.* 2020;27(1):27-42. doi:10.1111/ene.14108
- [2] Armstrong MJ, Okun MS. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. *JAMA.* 2020;323(6):548-560. doi:10.1001/jama.2019.22360
- [3] Murata H, Barnhill LM, Bronstein JM. Air Pollution and the Risk of Parkinson's Disease: A Review. *Mov Disord.* 2022;37(5):894-904. doi:10.1002/mds.28922
- [4] Thaler A, Alcalay RN. Diagnosis and Medical Management of Parkinson Disease. *Continuum (Minneap Minn).* 2022;28(5):1281-1300. doi:10.1212/CON.0000000000001152
- [5] Lee SYH, Yates NJ, Tye SJ. Inflammatory Mechanisms in Parkinson's Disease: From Pathogenesis to Targeted Therapies. *Neuroscientist.* 2022;28(5):485-506. doi:10.1177/1073858421992265
- [6] <https://www.mp.pl/pacjent/neurologia/choroby/151060,choroba-parkinsona>

- [7] Hariz M, Blomstedt P. Deep brain stimulation for Parkinson's disease. *J Intern Med.* 2022;292(5):764-778. doi:10.1111/joim.13541
- [8] Arena G, Sharma K, Agyeah G, Krüger R, Grünewald A, Fitzgerald JC. Neurodegeneration and Neuroinflammation in Parkinson's Disease: a Self-Sustained Loop. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2022;22(8):427-440. doi:10.1007/s11910-022-01207-5
- [9] Shah H, Usman O, Ur Rehman H, et al. Deep Brain Stimulation in the Treatment of Parkinson's Disease. *Cureus.* 2022;14(9):e28760. Published 2022 Sep 3. doi:10.7759/cureus.28760
- [10] Araújo B, Caridade-Silva R, Soares-Guedes C, et al. Neuroinflammation and Parkinson's Disease-From Neurodegeneration to Therapeutic Opportunities. *Cells.* 2022;11(18):2908. Published 2022 Sep 17. doi:10.3390/cells11182908
- [11] Kam TI, Park H, Chou SC, et al. Amelioration of pathologic α -synuclein-induced Parkinson's disease by irisin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2022; 119(36):e2204835119. doi:10.1073/pnas.2204835119
- [12] Chen R, Gu X, Wang X. α -Synuclein in Parkinson's disease and advances in detection. *Clin Chim Acta.* 2022;529:76-86. doi:10.1016/j.cca.2022.02.006
- [13] Tofaris GK. Initiation and progression of α -synuclein pathology in Parkinson's disease. *Cell Mol Life Sci.* 2022;79(4):210. Published 2022 Mar 26. doi:10.1007/s00018-022-04240-2
- [14] Yang Y, Song JJ, Choi YR, et al. Therapeutic functions of astrocytes to treat α -synuclein pathology in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2022;119(29):e2110746119. doi:10.1073/pnas.2110746119
- [15] https://www.researchgate.net/publication/324529141_Model_kompleksowej_i_koordynowanej_opieki_nad_pacjentem_z_choroba_Parkinsona_A_model_of_comprehensive_and_coordinated_care_over_patient_with_Parkinson's_disease_in_Poland
- [16] McKinley JE, Perkins A. Neurologic Conditions: Parkinson Disease. *FP Essent.* 2019;477:16-21.

- [17] Kwon DK, Kwatra M, Wang J, Ko HS. Levodopa-Induced Dyskinesia in Parkinson's Disease: Pathogenesis and Emerging Treatment Strategies. *Cells*. 2022;11(23):3736. Published 2022 Nov 23. doi:10.3390/cells11233736
- [18] <https://www.mp.pl/pacjent/leki/subst.html?id=716>
- [19] Fabbri M, Ferreira JJ, Rascol O. COMT Inhibitors in the Management of Parkinson's Disease. *CNS Drugs*. 2022;36(3):261-282. doi:10.1007/s40263-021-00888-9
- [20] Wang CC, Wu TL, Lin FJ, Tai CH, Lin CH, Wu RM. Amantadine treatment and delayed onset of levodopa-induced dyskinesia in patients with early Parkinson's disease. *Eur J Neurol*. 2022;29(4):1044-1055. doi:10.1111/ene.15234
- [21] Frey J, Cagle J, Johnson KA, et al. Past, Present, and Future of Deep Brain Stimulation: Hardware, Software, Imaging, Physiology and Novel Approaches. *Front Neurol*. 2022;13:825178. Published 2022 Mar 9. doi:10.3389/fneur.2022.825178
- [22] <https://www.mp.pl/pacjent/neurologia/choroby/159336,gleboka-stymulacja-mozgu-w-chorobie-parkinsona>
- [23] Herrington TM, Cheng JJ, Eskandar EN. Mechanisms of deep brain stimulation [published correction appears in *J Neurophysiol*. 2020 Mar 1;123(3):1277]. *J Neurophysiol*. 2016;115(1):19-38. doi:10.1152/jn.00281.2015
- [24] Malek N. Deep Brain Stimulation in Parkinson's Disease. *Neurol India*. 2019;67(4):968-978. doi:10.4103/0028-3886.266268
- [25] Flora ED, Perera CL, Cameron AL, Maddern GJ. Deep brain stimulation for essential tremor: a systematic review. *Mov Disord*. 2010;25(11):1550-1559. doi:10.1002/mds.23195
- [26] Chiken S, Nambu A. Mechanism of Deep Brain Stimulation: Inhibition, Excitation, or Disruption?. *Neuroscientist*. 2016;22(3):313-322. doi:10.1177/1073858415581986
- [27] Lo Buono V, Lucà Trombetta M, Palmeri R, et al. Subthalamic nucleus deep brain stimulation and impulsivity in Parkinson's disease: a descriptive review. *Acta Neurol Belg*. 2021;121(4):837-847. doi:10.1007/s13760-021-01684-4

- [28] Berg D, Postuma RB, Adler CH, et al. MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2015;30(12):1600-1611. doi:10.1002/mds.26431
- [29] Limousin P, Krack P, Pollak P, et al. Electrical stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *N Engl J Med.* 1998;339(16):1105-1111. doi:10.1056/NEJM199810153391603
- [30] https://www.movementdisorders.org/MDS-Files1/PDFs/Rating-Scales/MDS-UPDRS_Polish_Official_Translation_FINAL.pdf
- [31] Schüpbach WM, Rau J, Knudsen K, et al. Neurostimulation for Parkinson's disease with early motor complications. *N Engl J Med.* 2013;368(7):610-622. doi:10.1056/NEJMoa1205158
- [32] Deuschl G, Schade-Brittinger C, Krack P, et al. A randomized trial of deep-brain stimulation for Parkinson's disease [published correction appears in *N Engl J Med.* 2006 Sep 21;355(12):1289]. *N Engl J Med.* 2006;355(9):896-908. doi:10.1056/NEJMoa060281
- [33] Williams A, Gill S, Varma T, et al. Deep brain stimulation plus best medical therapy versus best medical therapy alone for advanced Parkinson's disease (PD SURG trial): a randomised, open-label trial. *Lancet Neurol.* 2010;9(6):581-591. doi:10.1016/S1474-4422(10)70093-4
- [34] Doshi PK, Chhaya N, Bhatt MH. Depression leading to attempted suicide after bilateral subthalamic nucleus stimulation for Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2002;17(5):1084-1085. doi:10.1002/mds.10198
- [35] Artusi CA, Lopiano L, Morgante F. Deep Brain Stimulation Selection Criteria for Parkinson's Disease: Time to Go beyond CAPSIT-PD. *J Clin Med.* 2020;9(12):3931. Published 2020 Dec 4. doi:10.3390/jcm9123931
- [36] Habets JGV, Heijmans M, Kuijf ML, Janssen MLF, Temel Y, Kubben PL. An update on adaptive deep brain stimulation in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2018;33(12):1834-1843. doi:10.1002/mds.115
- [37] Schüpbach WM, Maltête D, Houeto JL, et al. Neurosurgery at an earlier stage of Parkinson disease: a randomized, controlled trial. *Neurology.* 2007;68(4):267-271. doi:10.1212/01.wnl.0000250253.03919.fb

- [38] Lachenmayer, M.L., Mürset, M., Antih, N. *et al.* Subthalamic and pallidal deep brain stimulation for Parkinson's disease—meta-analysis of outcomes. *npj Parkinsons Dis.* 7, 77 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41531-021-00223-5>
- [39] Rothlind JC, York MK, Luo P, et al. Predictors of multi-domain cognitive decline following DBS for treatment of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2022;95:23-27. doi:10.1016/j.parkreldis.2021.12.011
- [40] Falowski S, Safriel Y, Ryan MP, Hargens L. The Rate of Magnetic Resonance Imaging in Patients with Deep Brain Stimulation. *Stereotact Funct Neurosurg.* 2016;94(3):147-153. doi:10.1159/000444760
- [41] Boutet A, Chow CT, Narang K, et al. Improving Safety of MRI in Patients with Deep Brain Stimulation Devices. *Radiology.* 2020;296(2):250-262. doi:10.1148/radiol.2020192291
- [42] Tagliati M, Jankovic J, Pagan F, et al. Safety of MRI in patients with implanted deep brain stimulation devices. *Neuroimage.* 2009;47 Suppl 2:T53-T57. doi:10.1016/j.neuroimage.2009.04.044
- [43] Boutet A, Hancu I, Saha U, et al. 3-Tesla MRI of deep brain stimulation patients: safety assessment of coils and pulse sequences. *J Neurosurg.* 2019;132(2):586-594. doi:10.3171/2018.11.JNS181338
- [44] Boutet A, Madhavan R, Elias GJB, Joel SE, Gramer R, Ranjan M, Paramanandam V, Xu D, Germann J, Loh A, Kalia SK, Hodaie M, Li B, Prasad S, Coblenz A, Munhoz RP, Ashe J, Kucharczyk W, Fasano A, Lozano AM. Predicting optimal deep brain stimulation parameters for Parkinson's disease using functional MRI and machine learning. *Nat Commun.* 2021 May 24;12(1):3043. doi: 10.1038/s41467-021-23311-9. PMID: 34031407; PMCID: PMC8144408.

DYSTROFIA MIĘŚNIOWA DUCHENNE'A - NOWE METODY LECZENIA

**Paulina Jaruga, Michał Tutaj, Marcin Jezierzański,
Karolina Grodkowska, Oskar Fogiel, Marlena Grzybek**

Studenckie Kolo Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Biofizyki im. prof. Zbigniewa Religi,
Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Abstrakt: Dystrofia mięśniowa Duchenne'a jest ciężką chorobą mięśni. We włóknach mięśniowych chorych z DMD dochodzi do wytwarzania nieprawidłowego białka dystrofiny, co spowodowane jest mutacją w genie DMD. Cecha DMD jest sprzężona z chromosomem X i jest dziedziczona recesywnie. Choroba występuje głównie u mężczyzn. Objawia się już w dzieciństwie, a charakterystycznym objawem jest utrata zdolności chodzenia. Ostatecznie niewydolność oddechowa i kardiomiopatia prowadzą do przedwczesnej śmierci chorych. Leczenie DMD stanowi duże wyzwanie. Obecnie stosowane są głównie glikokortykosteroidy, które opóźniają osłabienie mięśni i utratę funkcji chodu, jednak występowanie wielu działań niepożądanych GKS podczas ich przewlekłego stosowania jest istotnym problemem klinicznym. Poszukuje się innowacyjnych sposobów leczenia DMD, wśród których możemy wyróżnić leki steroidopodobne pozbawione większości działań niepożądanych GKS takie jak vamorolon oraz leki, które skupiają się na przywracaniu produkcji prawidłowej dystrofiny takie jak ataluren i technika CRISPR-Cas9. Celem niniejszej pracy jest opis mechanizmu działania vamorolonu, atalurenu i systemu CRISPR-Cas9 oraz przedstawienie wyników badań, które zostały przeprowadzone w celu oceny bezpieczeństwa i skuteczności tych leków.

Słowa kluczowe: dystrofia mięśniowa Duchenne'a, genetyka, vamorolon, ataluren, CRISPR/Cas9

Abstract: Duchenne muscular dystrophy is a severe muscle disease. The DMD patients' muscle fibers produce an abnormal dystrophin protein, which is caused by a mutation in the DMD gene. The DMD gene is X-linked and recessive. The disease occurs mainly in men. It manifests already in childhood and the characteristic symptom is the loss of the ability to walk. Ultimately, respiratory failure and cardiomyopathy lead to premature patients' death. Treating DMD is a major challenge. Currently, mainly glucocorticosteroids are used, which delay muscle weakness and loss of gait function, however, the occurrence of many side effects of GCS during their chronic use is a significant clinical problem. Innovative ways of treating DMD are sought, among which we can distinguish steroid-like drugs devoid of most of the side effects of GCS,

such as vamorolon, and drugs that focus on restoring the production of normal dystrophin, such as ataluren and the CRISPR-Cas9 technique. The aim of this paper is to describe the mechanism of action of vamorolon, ataluren and the CRISPR-Cas9 system and to present the results of studies that were conducted to assess the safety and effectiveness of these drugs.

Keywords: Duchenne Muscular Dystrophy, genetics, vamorolone, ataluren, CRISPR/Cas9

1. DYSTROFIA MIĘŚNIOWA DUCHENNE'A - OPIS CHOROBY I MECHANIZM DZIEDZICZENIA

Dystrofia mięśniowa Duchenne'a (Duchenne muscular dystrophy, DMD) jest najcięższą i zarazem najczęstszą postacią dystrofii mięśniowej wieku dziecięcego, której występowanie w populacji jest związane z dziedziczeniem tej recesywnej cechy sprzężonej z chromosomem X po rodzicach ^[1]. DMD występuje z większą częstością u mężczyzn (1:3000-3500 urodzeń chłopców).

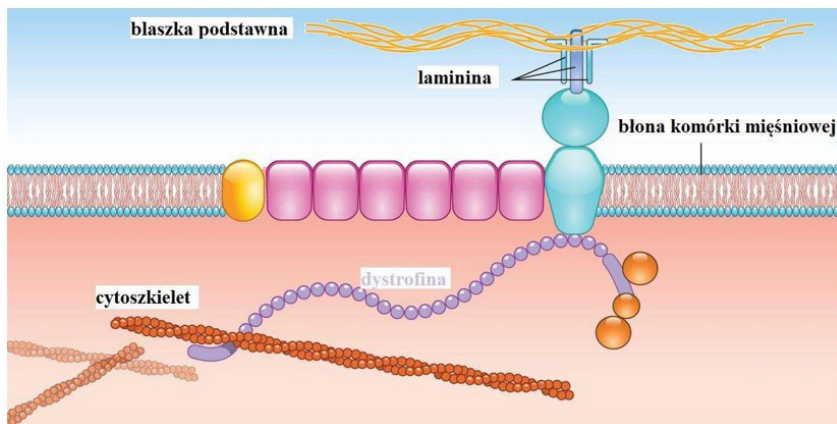
Objawy choroby ujawniają się przed 5. rokiem życia i należą do nich opóźnienie samodzielnego chodzenia i postępujące osłabienie mięśni proksymalnych. Średnio w wieku 9 lat chłopcy tracą zdolność chodzenia. U schyłku drugiej dekady życia rozwija się niewydolność oddechowa i kardiomiopatia z wysokim ryzykiem zaburzeń rytmu serca. Wśród innych manifestacji choroby wyróżnia się skoliozę i trudności w nauce. Średni okres przeżycia wynosi około 25 lat przy odpowiedniej opiece specjalistycznej.

Dystrofia mięśniowa Duchenne'a jest związana z występowaniem różnych zmutowanych alleli dużego genu DMD, który zawiera 79 eksonów i koduje dystrofinę. Dystrofina jest białkiem występującym w obrębie sarkolemy i odgrywa w niej kluczową rolę w procesie sprzęgania wewnętrznego cytoskieletu zbudowanego z F-aktyny z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej poprzez wiązanie z białkami dystroglikanu (rycina 1.).

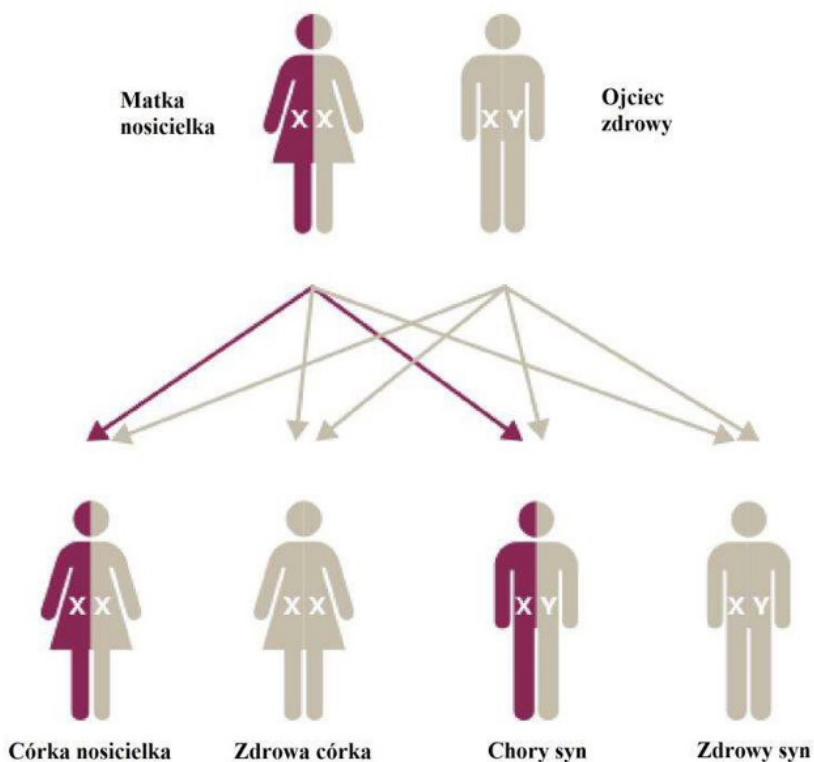
Gen DMD kodujący białko dystrofinę położony jest na chromosomie X w regionie Xp21.2. Delecje (ok. 65% mutacji genu DMD) różnej wielkości w obrębie genu DMD prowadzą do występujących od miejsca delecji zaburzeń ramki odczytu i rozwoju choroby.

Cecha ta sprzężona z chromosomem X, jest cechą recesywną, dlatego też mężczyźni posiadając tylko jeden chromosom X, będą manifestować cechy dystrofii mięśniowej Duchenne'a w przypadku przekazania wadliwego genu DMD przez jednego z rodziców (rycina 2.). Zgodnie z analizą

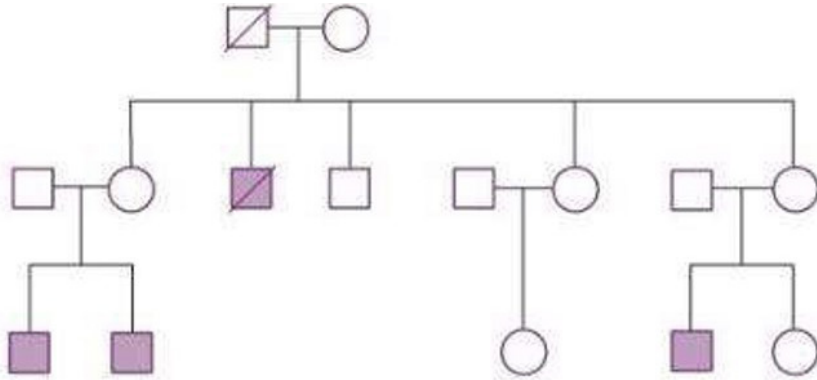
epidemiologii choroby obserwuje się znaczną przewagę chorych płci męskiej, a choroba ma przebieg ciężki i postępuje w podobny sposób u wszystkich chorych mężczyzn z uwagi na niewielką różnorodność ekspresji.



Rycina I. Schemat lokalizacji dystrofiny w komórkach mięśni [2]



Rycina 2. Schemat dziedziczenia choroby w sytuacji nosicielstwa matki [3]



Rycina 3. Rodzowód rodziny z ciężką dystrofią mięśniową sprzężoną z chromosomem X recesywną^[1]

Nieco inaczej sytuacja prezentuje się wśród kobiet. Heterozygotyczne kobiety są zwykle klinicznie zdrowe, lecz będąc nosicielkami wadliwego genu, mogą przekazać go potomstwu. Szacuje się, że u około 10-20% nosicielek mutacji genu DMD obserwuje się łagodne osłabienie siły mięśniowej, zwykle ujawniające się w 4. dekadzie życia i będące najczęściej następstwem nierównomiernej inaktywacji chromosomu X.

Klasyyczny rodowód dotkniętej chorobą rodziny wykazuje powtarzalność chorych mężczyzn zgodnie z tzw. wzorem "ruchu konika szachowego" (rycina 3.)

Aby wykryć nosicielstwo u kobiet, należy przeanalizować występowanie choroby w rodzinie, przeprowadzić analizę DNA (PCR typu multipleks, MLPA), zastosować analizę sprzężeń i zbadać stężenia kinazy kreatynowej.

Poza dystrofią mięśniową Duchenne'a istnieje także łagodniejsza postać choroby - dystrofia mięśniowa Beckera (Beckermuscular dystrophy, BMD). Jej objawy pojawiają się później (ok. 11 roku życia), chorzy mogą poruszać się samodzielnie do 70. roku życia, a długość życia może być prawidłowa. Mutacje w BMD nie zmieniają ramki odczytu - dystrofina jest produkowana, lecz jej łańcuch może być krótszy i mniej funkcjonalny od łańcucha prawidłowego.

2. LECZENIE DYSTROFII MIĘŚNIOWEJ DUCHENNE'A

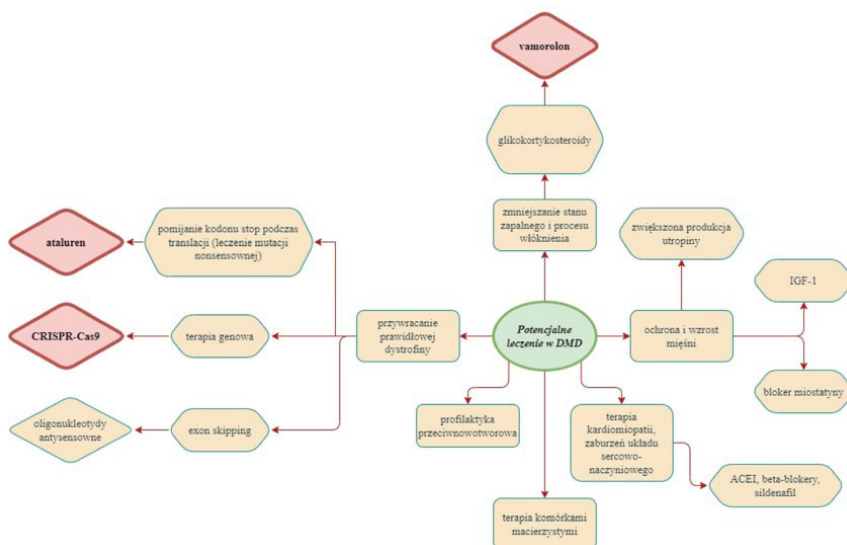
2.1. Aktualne leczenie dystrofii mięśniowej Duchenne'a

Opieka nad chorymi z dystrofią mięśniową Duchenne'a powinna polegać na współpracy wielu specjalistów z dziedziny neurologii, fizjoterapii, pulmonologii i kardiologii.

Standardową grupą leków w dystrofii mięśniowej Duchenne'a są glikokortykosteroidy opóźniające osłabienie mięśni i utratę funkcji chodu. Terapia sterydami jest wprowadzana pomiędzy 3. a 4. rokiem życia. Najczęstszymi lekami stosowanymi w DMD są prednizon (Encorton) i deflazakort (Emflaza). Deflazakort został wprowadzony na rynek amerykański w lutym 2017 roku za zgodą FDA, preparat ten nie jest dostępny w Polsce. Mimo korzystnego działania terapeutycznego GKS, należy pamiętać o licznych skutkach ubocznych tej grupy leków takich jak: rozwój otyłości, osteoporoza, nadciśnienie tętnicze, zaburzenia wzrostu, zaburzenia dojrzewania, zaburzenia nastroju, utrata włosów i zaćma. Występowanie wyżej wymienionych skutków ubocznych jest związane z łączeniem się kompleksu GKS/receptor w jądrze komórkowym z elementem wzmacniającym transkrypcję nazywanym GRE (glucocorticoid response element), którego aktywacja prowadzi do transaktywacji innych genów [4].

2.2. Innowacyjne leczenie dystrofii mięśniowej Duchenne'a - kierunki rozwoju

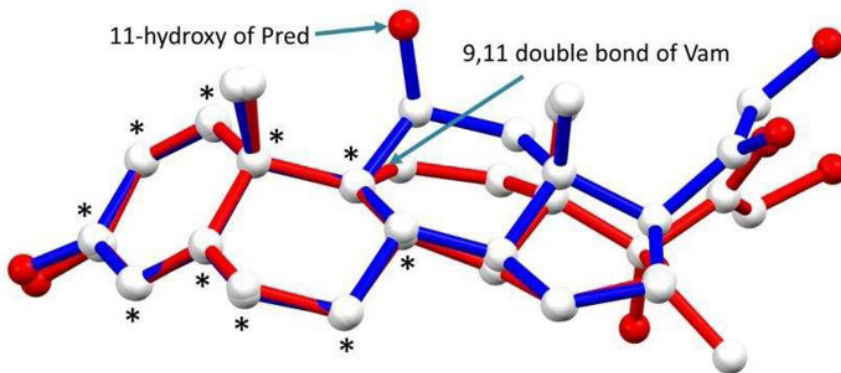
Obecnie trwają badania nad wieloma nowatorskimi terapiami, które potencjalnie mogłyby zostać wykorzystane w leczeniu DMD (rycina 4).



Rycina 4. Potencjalne leczenie w DMD (leki i mechanizm CRISPR-Cas9 umieszczone w czerwonych ramkach zostały opisane w tej monografii) [opracowanie własne]

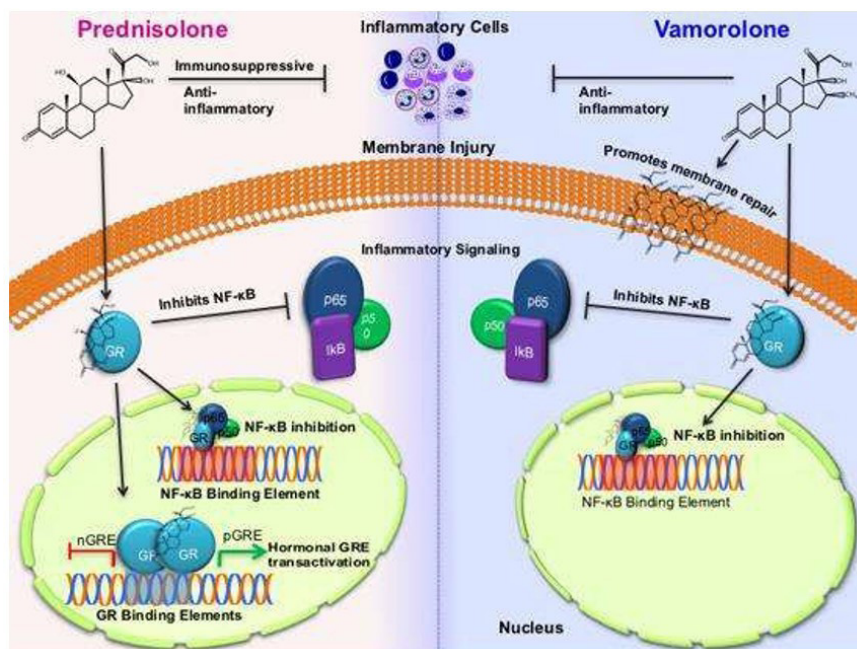
2.2.1. Vamorolon

Vamorolon (VBP15) (rycina 5.) jest nowym lekiem steroidopodobnym stosowanym w terapii DMD. VBP15 odznacza się mniejszą liczbą skutków ubocznych niż w przypadku innych GKS, co może być kamieniem milowym w terapii objawowej DMD (rycina 6.).



Rycina 5. Porównanie cząsteczek vamorolonu (Vam - kolor czerwony) i prednizolonu (Pred - kolor niebieski) ^[5]

W przeciwieństwie do prednizonu, vamorolon nie łączy się w jądrze komórkowym z elementem wzmacniającym transkrypcję nazywanym GRE (glucocorticoid response element), dlatego posiada mniej mediowanych aktywacją GRE skutków ubocznych. Wykazuje mniejszą aktywację genów (transaktywacja) i hamuje szlaki prozapalne czynnika jądrowego KB (transrepresja) ^[5,6]. Vamorolon w odróżnieniu od tradycyjnych GKS nie jest substratem dehydrogenaz 11 β -hydroksysteroidowych, które pośredniczą w chorobach kości zależnych od GKS u myszy oraz stabilizuje błonę mięśniową. U chorych na DMD, u których nie powstaje prawidłowa dystrofina, dochodzi do uszkodzenia sarkolemy w wyniku pracy włókien mięśniowych, a poziom kinazy kreatynowej we krwi wzrasta, dlatego też stabilizacja błony jest ważnym punktem uchwytu leku. Ten nowy lek w wyjątkowy sposób wiąże się z receptorem glikokortykoidowym i wykazuje aktywność antagonisty mineralokortykoidów podobnie jak eplerenon i spironolakton, co może mieć korzystny wpływ na układ sercowo-naczyniowy ^[6,7]. Najnowsze badania przedstawiają, że GKS i vamorolon są zdolne do synchronizacji remodelingu tkanek. Oznacza to, że uszkodzone włókna mięśniowe, dzięki działaniu wyżej wymienionych leków, skuteczniej się regenerują ^[8].



Rycina 6. Porównanie mechanizmu działania prednizonu i vamorolonu [6]

Badanie kliniczne prowadzone w ramach finansowanego ze środków UE projektu VISION -DMD analizuje skuteczność i bezpieczeństwo vamorolonu [7].

Etap I badania klinicznego został przeprowadzony w 2015 roku i wzięło w nim udział 83 zdrowych, dorosłych ochotników. Przeprowadzono próbę, w której podawano pojedyncze rosnące dawki (ang. single ascending dose, SAD) vamorolonu i próbę, w której podawano wielokrotnie rosnące dawki (ang. multiple ascending dose, MAD) leku przez 14 dni. Po przeprowadzeniu pierwszej próby określono okres półtrwania vamorolonu (2-4 godziny) oraz niewielką zmienność reakcji na lek między osobnikami. Po przeprowadzeniu próby MAD stwierdźno, że vamorolon nie kumuluje się w organizmie i jest bezpieczny przy najwyższej testowanej dawce (20mg/kg|24h) [5].

Etap IIa badania klinicznego został przeprowadzony przez Cooperative International Neuromuscular Research Group (CINRG) w 2016 r., wzięło w nim udział 48 chłopców w wieku od 4 do 7 lat, którzy wcześniej nie przyjmowali GKS. W 1. części etapu IIa (VBPI 5-002) utworzono 4 kohorty po 12 chłopców, które różniły się podawaną dawką vamorolonu. Lek był podawany doustnie raz dziennie przez okres 2 tygodni, po których następowała dwutygodniowa przerwa od podawania vamorolonu. Wyniki badania wskazują

na fakt, że lek jest bezpieczny w krótkoterminowym dawkowaniu, pacjenci dobrze go tolerują w zastosowanych dawkach i posiada przewagę nad GKS pod postacią ograniczenia insulinoopomości, prawidłowego obrotu kostnego, a także zmniejszenia supresji kory nadnerczy. W 2. części fazy IIa badania były kontynuowane wśród grupy pacjentów z pierwszej części etapu IIa (48 pacjentów) i trwały 24 tygodnie. W tym przypadku celem była ocena bezpieczeństwa i tolerancji długoterminowego podawania vamorolonu. Trzecia część badania trwała 2 lata i wzięło w niej udział 46 pacjentów, a pacjenci, którzy przyjmowali 2 najniższe dawki vamorolonu, zdecydowali się na większe dawki - głównie 6mg/kg/24h. Na konferencji World Muscle Society w 2019r. zgłoszono, że pacjenci po 18 miesiącach leczenia wykazują ciągłą poprawę funkcji mięśniowych, przy jednoczesnym braku efektów ubocznych takich jak np. zahamowanie wzrostu [6, 9].

Podczas etapu IIb badania klinicznego, który rozpoczęto w 2018 r., zastosowano podwójnie ślełą próbę, trwającą 48 tygodni. Wzięli w niej udział pacjenci w wieku od 4 do 7 lat, którzy nie utracili jeszcze zdolności chodzenia i nie przyjmowali wcześniej GKS [10]. Składała się ona z 121 chłopców, którzy przez 24 tygodnie losowo otrzymywali vamorolon w dawce 2mg/kg lub 6mg/kg na dobę, placebo lub prednizon w dawce 0,75mg/kg. Vamorolon podano 48 pacjentom, z których 41 leczono i obserwowano przez 2,5 roku [11]. Celem tej części badań była ocena tego, czy vamorolon wpływa korzystniej na siłę mięśni w porównaniu z zastosowaniem placebo i czy wywołuje mniej skutków ubocznych w porównaniu z terapią prednizonem. Miarą skuteczności pierwszej części fazy 2b są wyniki w zakresie funkcji motorycznych i siłowych z oceną średniego czasu do wstania z pozycji leżącej (ang. time to stand from supine, TTSTAND) jako główny punkt oceny skuteczności badania. Wartość wyjściową TTSTAND po 24 tygodniach leczenia vamorolonem (6mg/kg/24h) porównywano z TTSTAND w grupie placebo. Wśród innych ocenianych punktów końcowych były:

- porównanie TTSTAND między pacjentami leczonymi vamorolonem 2mg/kg a pacjentami otrzymującymi placebo,
- porównanie między grupami wyników testu 6-minutowego chodu (ang. 6 minute walk test, 6MWT [7]),
- ocena czasu biegu/chodu przez 10 min (ang. time to run or walk 10m, TTRW [7]),
-

- ocena czasu pokonania 4 schodów (ang. time to climb test, TTC-LIMB [7]).

W ocenie bezpieczeństwa leczenia monitorowano wzrost kośćca, biomarkery kostne i wykonywano test prowokacji kortykotropiną [7].

W 2021 r. zakończono pierwszą część fazy 2b, a vamorolon otrzymał status leku sierocego w Stanach Zjednoczonych i Europie.

W kolejnych 24 tygodniach pacjenci otrzymywali vamorolon w dawce 2mg/kg lub 6mg/kg. Obie dobowe dawki vamorolonu okazały się bezpieczne i dobrze tolerowane w trakcie leczenia [7, 10, 11]. Przewaga vamorolonu nad klasycznymi GKS jest znaczna. Z wyników badań nad vamorolonem można wyciągnąć wniosek, że ten lek pozwala na uzyskanie klinicznej poprawy w postaci dwuletniego opóźnienia sytuacji, w której spada szybkość, z jaką pacjent zmienia pozycję z leżącej na stojącą. Skutki uboczne takie jak: zmiany behawioralne czy nieprawidłowy wzrost włosów podczas terapii vamorolonem są o wiele rzadsze, a ograniczenie wzrostu praktycznie się nie zdarza [11].

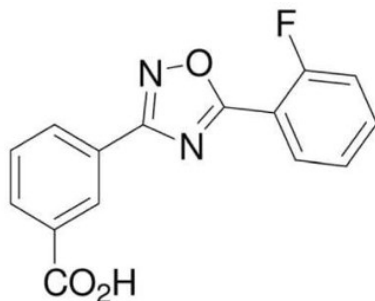
Leczenie dystrofii mięśniowej Duchenne'a w ostatnich latach znacznie się rozwinęło. Jeszcze kilka lat temu leczenie przyczynowe nie było możliwe - istniało jedynie leczenie objawowe z wykorzystaniem GKS, dzięki któremu można spowolnić rozwój choroby i poprawić standard życia osoby chorej. Od niedawna oprócz GKS na rynku farmaceutycznym pojawiają się inne leki, które mogą spowolnić progresję choroby.

2.2.2. Ataluren

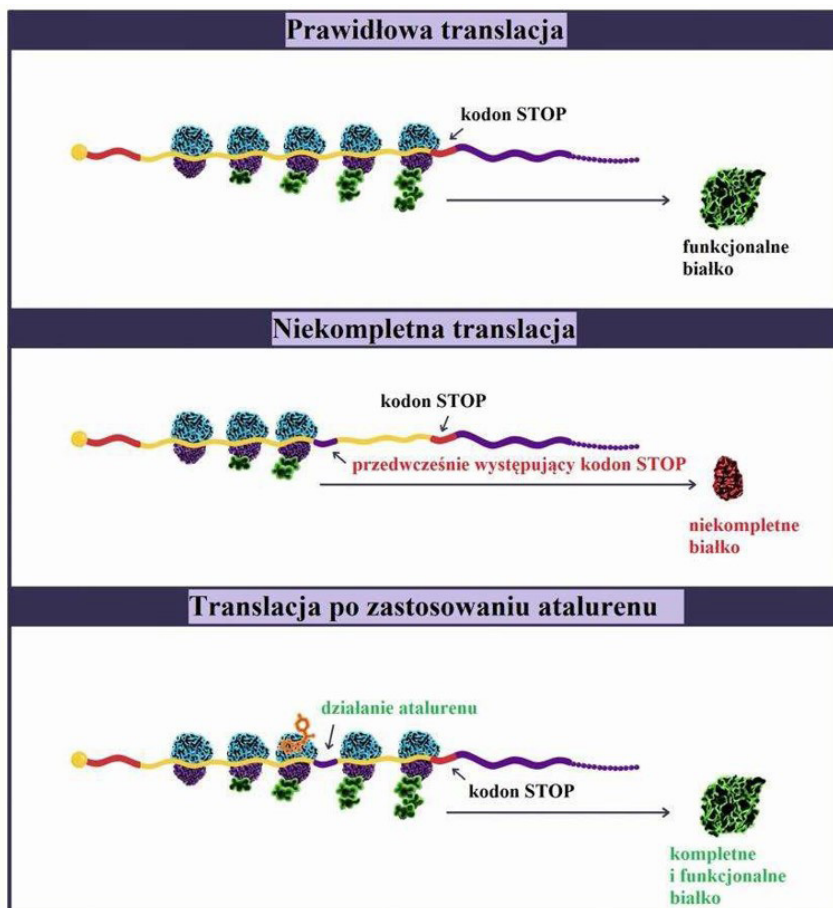
W przypadku ok. 13% pacjentów z DMD dochodzi do wystąpienia mutacji nonsensownej w genie dystrofiny [12]. Taki rodzaj mutacji powoduje zbyt wczesne występowanie kodonu stop w mRNA i prowadzi do terminacji translacji przed uzyskaniem pełnej długości łańcucha białkowego. Skrócenie łańcucha białkowego dystrofiny powoduje, że traci ona swoją funkcję.

Wysoką skuteczność w takiej sytuacji wykazuje lek ataluren (PTC124, Translarna) (rycina 7.), wytworzony i rozwijany przez PTC Therapeutics, Inc. [13]. Wpływa on niejako na samą przyczynę powstawania choroby - możliwa dzięki temu staje się ponowna produkcja dystrofiny, która budową i funkcją jest podobna do dystrofiny produkowanej u osób niedotkniętych chorobą. Lek ten umożliwia rybosomom translację pełnej cząsteczki mRNA i wytworzenie łańcucha białkowego dystrofiny o pełnej długości (rycina 8.), mimo mutacji nonsensownej [14, 15], czego dowodzą badania na myszach mdx [16].

Lek ten powinien być podawany w terapii skojarzonej z GKS podobnie jak inne leki w trakcie badań klinicznych ^[4].



Rycina 7. Wzór strukturalny atalurenu ^[16]



Rycina 8. Schematy przedstawiające prawidłową translację, translację w DMD i translację w DMD skorygowaną działaniem atalurenu ^[17]

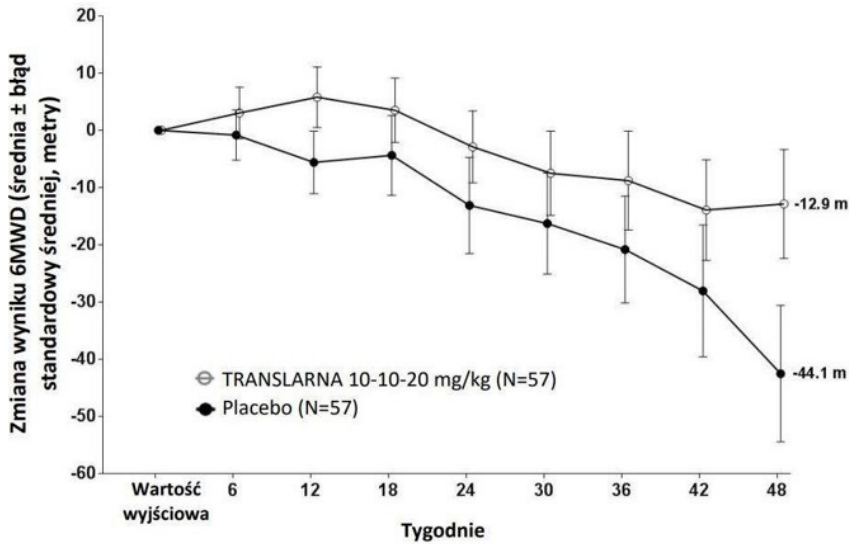
W fazie I badań nad lekiem podawano pojedyncze (SAD) lub wielokrotne (MAD) dawki 62 zdrowym, dorosłym ochotnikom (33 mężczyzn i 29 kobiet; od 18 do 30 lat). W etapie z pojedynczą dawką oceniano reakcję organizmu na dawki od 3 do 200mg/kg. W etapie z wielokrotnymi dawkami oceniano reakcję organizmu na dawki od 10 do 50mg/kg podawane 2 razy dziennie przez 14 dni. Faza I badań wykazała, że lek jest bezpieczny przy podawaniu 3 razy dziennie, a maksymalną dobrze tolerowaną dawką dzienną leku, która nie wywołuje nieprzyjemnych działań niepożądanych, jest dawka 100mg/kg ^[16].

W fazie IIa badania klinicznego wzięło udział 38 pacjentów z nmDMD w wieku od 5 do 17 lat, którym podawano przez 28 dni ataluren. Z tego etapu badań wyciągnięto wnioski, że ataluren jest dobrze tolerowany i farmakodynamicznie aktywny (ten parametr zbadano przez pomiar ekspresji C końcowego odcinka dystrofiny przed i po leczeniu w biopsjach mięśnia prostownika krótkiego palców). 28 z 38 pacjentów manifestowało wzrost ekspresji dystrofiny po leczeniu ^[18].

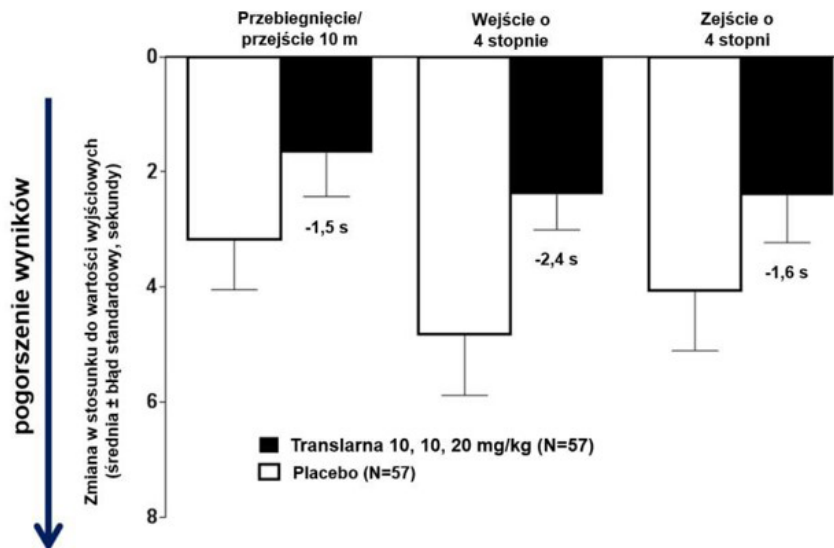
Skuteczność i bezpieczeństwo atalurenu oceniano w 2 międzynarodowych, randomizowanych badaniach, które prowadzono metodą podwójnie ślepej próby z grupą kontrolną przyjmującą placebo. Pierwszorzędownym punktem końcowym oceny skuteczności w obu badaniach była zmiana odległości przebytej podczas 6MWT chodu w 48. tygodniu.

W pierwszym badaniu (faza IIB badań klinicznych leku), które trwało od lutego 2008 r. do grudnia 2009 r. wzięło udział 174 pacjentów płci męskiej w wieku od 5 do 20 lat chorych na nmDMD ^[15, 19]. Dla każdego pacjenta faza trwała 48 tygodni. Warunkiem zakwalifikowania chorych do badania była ich zdolność do samodzielnego przejścia co najmniej 75 metrów w 6MWT. Pacjenci byli podzieleni na 3 grupy: 57 pacjentów otrzymało ataluren w dawce 40mg/kg/24h (10-10-20), 60 - ataluren w dawce 80mg/kg/24h (20-20-40), a 57 - placebo. Lek był podawany 3 razy na dobę. Najistotniejszym wynikiem badania jest fakt, że przyjmowanie atalurenu w dawce 40mg/kg/24h pozwoliło na uzyskanie lepszych wyników podczas 6MWT. Różnica odległości, którą przeszedł po 48 tygodniach terapii pacjent, przyjmujący ataluren (40mg/kg/24h) i którą przeszedł pacjent otrzymujący placebo, wynosiła 31,3 metra, na korzyść pacjenta otrzymującego lek (rycina 9.). W innych testach sprawnościowych (TTRW, TTCLIMB, zejście o 4 stopnie) grupa pacjentów przyjmujących ataluren w dawce 40mg/kg/24h również uzyskała lepsze wyniki (rycina 10.). Nie było różnicy w wynikach między grupą przyjmującą ataluren w dawce 80mg/kg /24 a grupą przyjmującą placebo.

Badanie to dowodzi, że podawanie atalurenu w dawce 40mg/kg/24h spowalnia utratę zdolności chodzenia u pacjentów z obecną mutacją nonsensowną [15].



Rycina 9. Średnia zmiana wyników 6MWT (faza IIb badań klinicznych leku) [15]

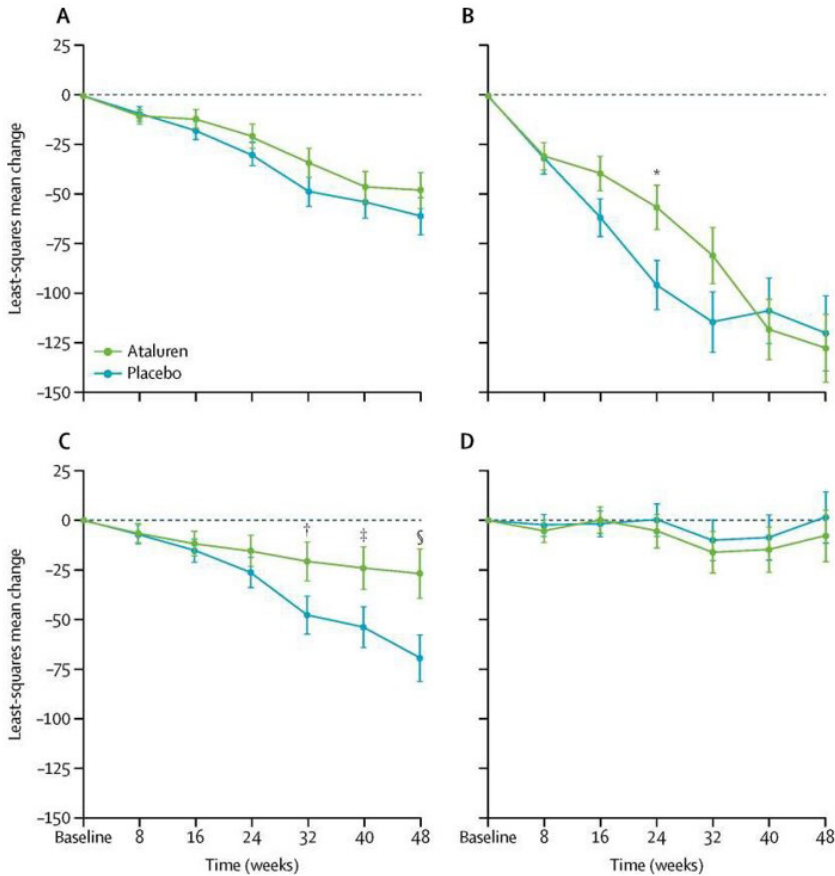


Rycina 10. Średnia zmiana wyników testów sprawnościowych (faza Hb badań klinicznych leku) [15]

W drugim badaniu (faza III badań klinicznych leku), które trwało od marca 2013r. do sierpnia 2014r, wzięło udział 230 pacjentów płci męskiej w wieku od 7 do 14 lat ^[19]. Faza ta obejmowała 2 tygodnie badań przesiewowych i 48 tygodni leczenia. Warunkiem zakwalifikowania chorych do badania, była ich zdolność do samodzielnego przejścia co najmniej 150 metrów i wykonania 6MWT, przy czym u 80% pacjentów nie przewidywano korzystania z przyrządów wspomagających. Pacjenci zostali przydzieleni do grup leczenia z zastosowaniem atalurenu w dawce 40 mg/kg/dobę (115 pacjentów) lub placebo (115 pacjentów). Lek był podawany 3 razy na dobę. Pacjenci traktowani atalurenem, tym razem również uzyskali lepsze wyniki podczas badań przeprowadzonych w 48. tygodniu - byli oni w stanie przejść średnio 15,4 metra więcej podczas 6MWT, niż pacjenci przyjmujący placebo (wyniki 6MWT u tej grupy pacjentów były lepsze już od 16. tygodnia badania) (rycina 11). Najlepszy efekt leczenia Translarną można było zauważyć w grupie chorych, którzy przed rozpoczęciem leczenia byli zdolni przejść od 300 do 400 metrów w teście 6MWT. Różnica w wynikach 6MWT grupy kontrolnej i badawczej dla tych chorych wynosiła średnio 47,2 metry. Taki wynik świadczy o tym, że przyjmowanie Translarny przez tę grupę chorych jest bardzo korzystne z klinicznego punktu widzenia, dlatego że powoduje mniejsze pogorszenie czynności mięśni w porównaniu z przyjmowaniem placebo.

W obu wyżej streszczonych badaniach randomizowanych, korzystne działanie tego preparatu było bardziej widoczne u pacjentów z umiarkowanym stopniem zaawansowania choroby ^[16].

Badania kliniczne nad lekiem wykazały, że jest on bezpieczny dla dzieci w wieku 2 lat i starszych. Aby lek zadziałał, należy go podać pacjentowi jak najszybciej po ukończeniu 2.r.ż. Podanie leku pacjentowi, który utracił już zdolność samodzielnego chodu, nie przyniesie dużych korzyści i wpłynie jedynie na niezajęte jeszcze przez chorobę mięśnie. Translarna została ogłoszona lekiem sierocym 27 maja 2005 r. W Polsce terapia Translarną jest dostępna jedynie w ramach badań klinicznych, a leczenie nie jest refundowane ^[12].



Rycina 11. Zmiany dystansu pokonanego w 6MWT po 48 tygodniach badania.

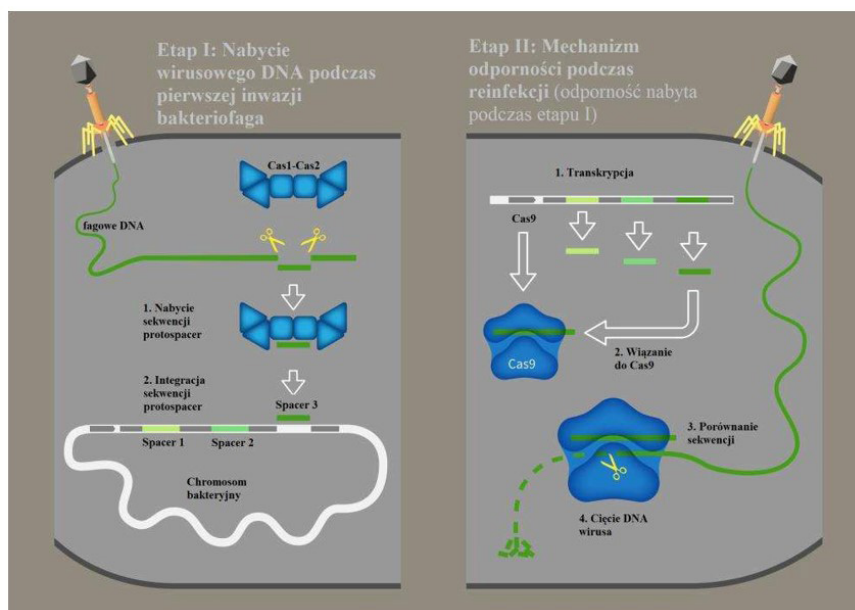
- (A) Wszyscy pacjenci przyjmujący terapię atalurem (n=114) lub placebo (n=114)
 (B) Podgrupa pacjentów, którzy przed rozpoczęciem badania byli w stanie przejść mniej niż 300m podczas 6M WT. (C) Podgrupa pacjentów, którzy przed rozpoczęciem badania byli w stanie przejść od 300 do 400m podczas 6MWT. (D) Podgrupa pacjentów, którzy przed rozpoczęciem badania byli w stanie przejść powyżej 400m podczas 6MWT. ^[18]

2.2.3. CRISPR/Cas9

CRISPR/Cas9 to nowa technika edycji genomu, która służy do dokonywania precyzyjnych zmian w DNA i może być użyta do usunięcia mutacji genu DMD z genomu u chorych z DMD.

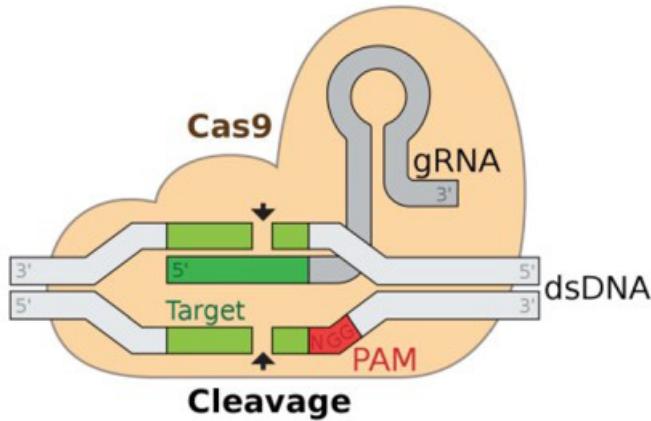
CRISPR (ang. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) to zgrupowane, regularnie przerywane, krótkie powtórzenia palindromiczne, wchodzące w skład systemu obronnego bakterii. Wykorzystywane są przez organizmy prokariotyczne podczas zwalczania infekcji

wirusowych. Yoshizumi Ishino w 1987 r. natrafił na sekwencję CRISPR podczas badania sekwencji jednego z genów bakterii pałeczki okrężnicy^[20]. Polega ona na przechowywaniu w genomie bakterii fragmentów egzogenego DNA, które jest pozyskiwane podczas wcześniejszego zakażenia bakteriofagiem. Dzięki magazynowaniu danego odcinka DNA, możliwe jest wykrycie sekwencji wirusowej podczas kolejnego kontaktu z wirusem, co prowadzi będzie do zniszczenia jego materiału genetycznego z użyciem nukleaz i skutecznego zwalczania infekcji (rycina 12).



Rycina 12. CRISPR w genomie bakterii pozwala na obronę przed ponowną inwazją bakteriofaga^[21]

Połączenie CRISPR z endonukleazą Cas9 i utworzenie systemu CRISPR/Cas9 (rycina 13.) pozwala na przecinanie nici DNA w jądrze komórkowym, usuwanie pożądanego segmentu DNA i wprowadzenie egzogenego DNA, które może pozytywnie modyfikować funkcje komórek. Wybór miejsca działania endonukleazy związany jest z parowaniem między odcinkiem gRNA (ang. guide RNA) CRISPR a DNA komórki, zgodnie z zasadą komplementarności. Wyniki badań nad tą metodą inżynierii genetycznej opublikowały w 2012 r. Jennifer Doudna i Emmanuelle Charpentier, które otrzymały z tego tytułu Nagrodę Nobla w 2020 r.^[22].

Rycina 13. CRISPR/Cas9 ^[23]

Aby system CRISPR/Cas9 sprawnie funkcjonował, sekwencja kodującej nici DNA, która ma być obiektem działania systemu, ma zawierać na początku następującą sekwencję: 5'-NGG-3' - PAM (ang. Protospacer adjacent motif; taka sekwencja jest wykrywana przez enzym Cas9 pochodzący od bakterii *Streptococcus pyogenes*), a sgRNA (ang. single guide RNA) powinno być antysensowne w stosunku do sekwencji DNA, która powinna być usunięta z genomu komórki. Przy dokonywaniu transformacji genetycznej niezbędna jest prawidłowa dostępność enzymu Cas (najczęściej Cas9) w komórce docelowej ^[24, 25].

CRISPR/Cas9 jest stosunkowo tanią, wydajną i prostą metodą, która jest uznawana za łatwiejszą i szybszą metodę modyfikacji genomu od TALEN (ang. Transcription activator-like effector nucleases) i ZFN (ang. Zinc-finger nucleases) ^[22]. W wyżej wspomnianych metodach potrzebne jest wyprodukowanie białka, które będzie działać w pożądanym miejscu DNA, a w CRISPR/Cas9 trzeba jedynie utworzyć cząsteczkę RNA, co jest o wiele łatwiejsze do zrobienia. Wadą ZFNs jest głównie brak specyficzności działania, który może prowadzić do niepożądanych cytotoksycznych efektów w komórce, a wadą TALENs jest duży rozmiar cząsteczki, co utrudnia opakowywanie leku i jego dostarczenie do komórek ^[26].

W terapii, system CRISPR/Cas9 może być wykorzystany w dwojaki sposób, biorąc pod uwagę drogę dostarczenia kompleksu do komórek pacjenta. Pierwszy z nich (edycja genomu *ex vivo*) zakłada wyizolowanie od pacjenta komórek, modyfikację ich w laboratorium i wszczepienie ich pacjentowi. Drugi (*in vivo*) polega na dostarczeniu do ciała pacjenta

kompleksu CRISPR/Cas9 (np. z wykorzystaniem nanocząsteczek) i bezpośredniej modyfikacji komórek pacjenta.

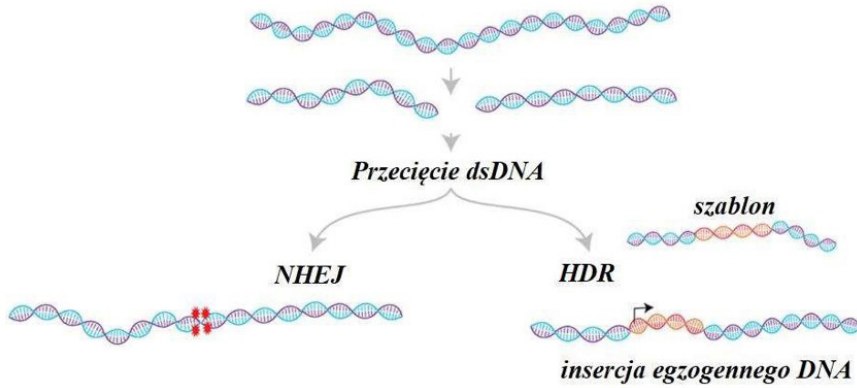
Technologię CRISPR/Cas9 wykorzystuje się również na wiele sposobów, biorąc pod uwagę zasięg ingerencji w materiał genetyczny komórki (rycina 14) [26].

Pierwszą drogą naprawy przecięć dsDNA jest NHEJ (non-homologous end joining). Ogólny mechanizm NHEJ polega na generowaniu małych insercji lub delecji (indels). Przewagą NHEJ nad HDR jest zdolność do oddziaływania w komórkach, które utraciły zdolność do podziałów. Indels pozwalają na ekspresję dystrofiny w kilku mechanizmach: exon skipping (pomijanie eksonu) i exon reframing (ponowne ramkowanie eksonu) - single-cut (pojedyncze cięcie) oraz exon deletion (delecja eksonu) - double-cut (podwójne cięcie). Exon skipping polega na celowaniu sgRNA w ekson/intron i pomijanie eksonu wywołującego przesunięcie ramki odczytu. Exon deletion wykorzystuje dwa różne sgRNA i dzięki niemu możliwa jest delecja zmutowanego eksonu i przywrócenie prawidłowej ramki odczytu. Exon reframing polega na generowaniu różnych insercji/delecji w obrębie eksonu z przesunięciem ramki odczytu, co będzie prowadzić do przywrócenia prawidłowej transkrypcji [26, 27].

Drugą drogą naprawy DNA jest HDR (homology-directed repair), który wymaga obecności egzogenego DNA. Bierze ono udział w edycji i zmutowane eksony mogą być zastąpione dostarczonym egzogenym DNA co daje możliwość powstania dystrofiny pełnej długości. Możliwe jest również wprowadzenie brakującego eksonu. Wadą tej technologii jest słaba dystrybucja w komórkach, które utraciły zdolności do podziałów, takich jak komórki mięśni szkieletowych oraz ograniczenie długości egzogenego DNA, które może być dostarczone do komórek (niemożliwa jest naprawa dużych delecji, które obejmują wiele eksonów). Wady HDR często wykluczają zastosowanie tej metody w DMD [26, 27].

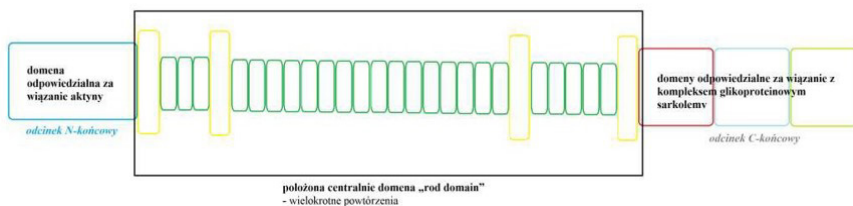
Badania sugerują, że terapia CRISPR/Cas9 może pomóc aż 60% pacjentów z DMD [29]. Pierwsze badanie, które udowodniło skuteczność terapii CRISPR/Cas9, zostało przeprowadzone przez Longa i in. w 2014 r. na myszach mdx, które posiadały w genie DMD mutację nonsensowną dotyczącą eksonu 23 [30]. Skrócenie tego eksonu spowodowało produkcję krótszej, ale nadal funkcjonalnej dystrofiny. Zygotom wstrzyknięto SpCas9, sgRNA i egzogenne DNA (metoda HDR). Myszy wykazywały różnice w ekspresji prawidłowej dystrofiny (od 2 do 100% poprawności białka), ale nie jest wymagana pełna korekta genu, aby metoda była skuteczna.

Dzięki przeprowadzonej ingerencji w genom komórek myszy mdx, doszło do poprawy siły chwytu i zmniejszenia stanu zapalnego w mięśniach tych myszy.



Rycina 14. Naprawa przerwania ciągłości DNA poprzez mechanizm NHEJ oraz HDR [28]

Cząsteczka dystrofiny zbudowana jest z 4 domen (rycina 15.) o różnej funkcji - najważniejsze z nich to odcinek N-końcowy i C-końcowy i one muszą pozostać w białku, aby mogło ono spełniać swoją funkcję i prawidłowo brać udział w integracji błon włókien mięśniowych [26]. Położona centralnie domena „rod domain” jest zbudowana z wielokrotnych powtórzeń, dlatego jej skrócenie nie spowoduje zniesienia funkcji dystrofiny w mięśniach - podobna dystrofina ze skróconym tym fragmentem cząsteczki powstaje właśnie u pacjentów z BMD, u których dystrofia przebiega łagodniej. Mikrodystrofina, również wykorzystywana w terapii genowej, nie posiada powtarzających się sekwencji białka i może być skutecznie wykorzystywana w leczeniu DMD.



Rycina 15. Struktura białka dystrofiny [opracowanie własne]

Pewne regiony genu dystrofiny są bardziej narażone na powstanie w ich obrębie mutacji - nazywane są one "gorącymi punktami" (ang. hotspots) ^[29]. Należą do nich eksony od 2 do 10 i od 45 do 55. Strategie rozwoju terapii genowej dążą do naprawy mutacji w tych eksonach, aby udało się wdrożyć taką terapię u jak największej grupy chorych z DMD.

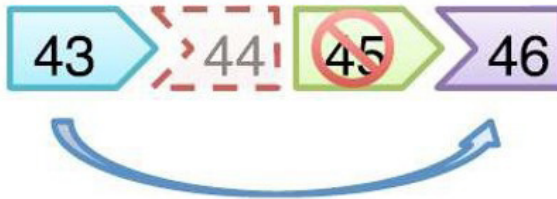
Mutacje typu zmiany ramki odczytu mogą być naprawione przy zastosowaniu antysensownych oligonukleotydów (AONs, ang. antisense oligonucleotide), które wiążą się z mRNA i są w stanie wpływać na splicing. Do AONs wykorzystywanych w leczeniu DMD należą:

- casimersen - pomijanie eksonu 45;
- eteplirsen - pomijanie eksonu 51;
- golodirsen, viltolarsen - pomijanie eksonu 53.

Wadami AONs są m.in. potrzeba częstego ich podawania, wysokie koszty leczenia, ograniczona ich dystrybucja do takich narządów jak serce oraz specyficzność danych AONs, co uniemożliwia zastosowanie jednego AON do wszystkich przypadków DMD. Terapia CRISPR/Cas9 permanentnie naprawia gen DMD, co jest jej zasadniczą zaletą.

Single-cut exon skipping (rycina 17.A) przywraca ramkę odczytu dystrofiny przez wykluczenie podczas splicingu eksonu, który uprzednio zmieniał ramkę odczytu. Sekwencja PAM dla SpCas9 jest kompatybilna z uniwersalnym akceptorowym miejscem splicingu, dzięki czemu może być miejscem działania systemu CRISPR ^[31]. Szacuje się, że ponad 70% pacjentów z DMD posiada mutacje podatne na leczenie z wykorzystaniem techniki exon skipping ^[32]. Single-cut wymaga tylko pojedynczego cięcia i jednego sgRNA, co ogranicza problemy związane z pakowaniem i dostarczaniem leku. Indukowane jest tylko jedno przerwanie ciągłości DNA, co zmniejsza prawdopodobieństwo poważnych mutacji. In vitro technika exon skipping została użyta do pomijania eksonów w hotspocie od 45. do 55. eksonu. Li i in. po raz pierwszy przeprowadzili badania w indukowanych pluripotencjalnych komórkach macierzystych pochodzących od pacjentów z DMD z delecją eksonu 44 ^[33]. SpCas9 została skierowana do akceptorowego miejsca splicingu eksonu 45. Ekson 43 został bezpośrednio połączony z eksonem 46, umożliwiając transkrypt dystrofiny w ramce odczytu (rycina 16.). Podobne badanie przeprowadzili Long i in., którzy metodę tę zastosowali do pominięcia eksonu 51 w indukowanych pluripotencjalnych komórkach macierzystych pochodzących od pacjentów z DMD z delecją eksonu 48-50 ^[34]. Oprócz przywrócenia białka dystrofiny Long i in. zauważyli poprawę siły skurczu generowanej przez

zmodyfikowany mięsień sercowy pochodzący z edytowanych kardiomiocytów (tylko ok. 40% kardiomiocytów wymagało korekty, aby poprawić siłę skurczu mięśnia sercowego). Badania nad exon skipping zostały przeprowadzone również na myszach ^[35] i psach ^[36]. W badaniach in vivo prowadzonych przez Li, Longa i in. użyto wirusów związanych z adenowirusami (AAV - ang. adeno associated virus) jako wektory do dostarczania CRISPR/Cas9. AAV wykazują tropizm dla mięśni szkieletowych i mięśnia sercowego, co jest istotne w leczeniu dystrofii. Delecja eksonu 50, która prowadzi do transkryptu DMD poza ramką odczytu jest jedną z najczęstszych delecji pojedynczego eksonu, dlatego pomijanie eksonu 51 jest obiecującą strategią terapeutyczną dla takich pacjentów, co potwierdzają badania przeprowadzone na zwierzętach ^[35, 36]. CRISPR/Cas9 może również korygować delecje eksonu 44 i może być skuteczne u ok. 12% pacjentów z DMD ^[37].



Rycina 16. Wykorzystanie exon skipping u chorych z DMD z delecją eksonu 44 ^[33]

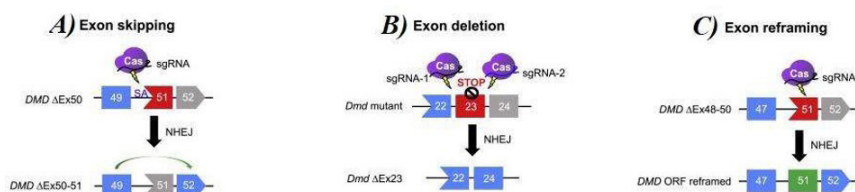
Double-cut exon deleting (rycina 17.B) wymaga dwóch sgRNA do cięcia po obu stronach eksonu. Metoda ta ma zastosowanie dla dużej grupy pacjentów z DMD, dlatego że jest mniej specyficzna dla mutacji, co pozwala na usunięcie wielu eksonów w hotspotach. Wadą tej metody jest to, że ostatecznie powstaje dużo krótsza cząsteczka dystrofiny, a użycie dwóch sgRNA i generowanie dwóch przecięć DNA może prowadzić do wystąpienia szkodliwych efektów poza celem działania takich jak dodatkowe mutacje lub rearanżacje w genomie.

Kolejnym problemem tej metody jest dostarczanie większej ilości sgRNA do komórek. Exon deleting dotyczący eksonów 45-55 ma potencjał korygowania ok. 60% delecji w DMD. Badania nad mioblastami u pacjentów z delecjami w eksonach 48-50 prowadzone przez Ousterout i in. udowodniły, że usunięcie całego regionu eksonów 45-55 pozwoliło na przewrócenie ekspresji dystrofiny ^[38]. Zauważono jednak, że usunięcie samego eksonu 51 jest bardziej wydajne, niż mnoga delecja eksonów, dlatego zawsze przy doborze terapii należy zachować równowagę między wydajnością edycji a korzyścią

wynikającą z celowania w wiele eksonów. Wieloeksonowe delecje mogą również być generowane w eksonach 2-10, które obejmują N-kończącą domenę wiążącą aktynę, co udowodnił Kyryczenko i in. [39].

Podczas celowanej w eksony 2-10 terapii należy zadbać o to, żeby zostały zachowane określone reszty aminokwasowe, dzięki którym dystrofina zachowa swoją funkcjonalność. Pojedyncze delecje eksonów i wieloeksonowe delecje zostały przetestowane *in vivo*. Usuwano ekson 23 w mysim modelu *mdx* [40], ekson 51 w świńskim modelu DMD [41], eksony 45-55 w nowym modelu mysim humanizowanego DMD [42]. Delecje w tych badaniach powiodły się i skutecznie przywróciły ekspresję dystrofiny.

Single-cut exon reframing (rycina 17.C) przywraca otwartą ramkę odczytu przez generowanie indeli. Przeprowadzone badania *in vitro* i *in vivo* świadczą o tym, że reframing może być niespójny i istnieje tylko 1/3 szansy na przywrócenie ramki odczytu, gdy generowany jestindel [26].



Rycina 17. Mechanizm edycji genomu z użyciem CRISPR/Cas9 w naprawie mutacji w DMD [32]

3. PODSUMOWANIE

Leczenie DMD stanowi duży problem, jednak badania prowadzone nad potencjalnymi lekami optymistycznie rysują przyszłość dla pacjentów z DMD. Do niedawna DMD była chorobą, którą można było leczyć jedynie z użyciem GKS, a już teraz pojawiają się na rynku leki, które za cel obierają przyczynę DMD, czyli mutacje w genie kodującym dystrofinę.

Vamorolon, który jest lekiem steroidopodobnym, w dużej mierze jest pozbawiony działań niepożądanych GKS. Badania udowodniły, że nie kumuluje się w organizmie, jego długoterminowe podawanie jest dobrze tolerowane przez pacjentów, a chorzy wykazują ciągłą poprawę funkcji mięśniowych. Vamorolon pozwala na uzyskanie klinicznej poprawy w postaci dwuletniego opóźnienia sytuacji, w której spada szybkość z jaką pacjent zmienia pozycję z leżącej na stojącą. Ataluren umożliwia rybosomom translację pełnej cząsteczki mRNA i pozwala na wytworzenie łańcucha białkowego dystrofiny

o pełnej długości. Jest skuteczny w przypadku występowania mutacji nonsensowej i może pomóc 13% pacjentów z DMD. W badaniach u większości pacjentów, którzy przyjmowali ataluren, doszło do wzrostu ekspresji dystrofiny po leczeniu. Pacjenci z umiarkowanym stopniem zaawansowania DMD po 48-tygodniowej terapii atalurem byli w stanie pokonać 47m więcej w 6MWT niż chorzy, którzy otrzymywali placebo.

CRISPR/Cas9 jest stosunkowo łatwą, tanią i wydajną metodą i ma przewagę nad innymi technikami terapii genowej takimi jak TALEN, ZFNs i AONs. Terapia z wykorzystaniem CRISPR/Cas9 wywołuje wiele kontrowersji i etycznych sporów, mimo to trwają intensywne badania nad wykorzystaniem jej w leczeniu DMD. Badania na zwierzętach prezentują obiecujące wyniki. Dzięki możliwości precyzyjnej ingerencji w materiał genetyczny komórek, CRISPR/Cas9 mogłoby zostać wykorzystane u dużego odsetka pacjentów z DMD. Delecje eksonu 44 i 50 w genie DMD, które odpowiadają za wiele przypadków tej choroby, były skutecznie pomijane podczas transkrypcji genu dystrofiny u zwierząt doświadczalnych.

Rozszerzanie dostępu do nowoczesnych terapii w DMD jest niezwykle istotne. Ta rzadka choroba ma wiele mutacji i każda z nich wymaga innego podejścia w leczeniu, a leki oparte m.in. na technice CRISPR/Cas9 byłyby w stanie je okiełznać.

REFERENCJE

- [1] Tobias E, Michael C, Ferguson-Smith M. Genetyka Medyczna. Warszawa: PZWL Wydawnictwo Lekarskie; 2013: 127-129, 216-218
- [2] Ravindran S. Infographic: Treating Duchenne Muscular Dystrophy with CRISPR. TheScientist. <https://www.the-scientist.com/infographics/infographic--gene-editing-64735>. 30.08.2018
- [3] Genetic Mutations in DMD. Duchenne.com. <https://www.duchenne.com/hcp/dmd-overview/role-genetics-dmd>
- [4] Current treatment options. VISION-DMD. <https://vision-dmd.info>.
- [5] Development of Vamorolon. VISION-DMD. <https://vision-dmd.info/history-of-vbp15>.
- [6] Vamorolone. ReveraGen BioPharma, Inc. <https://www.reveragen.com/vamorolone>.

- [7] Guglieri M, Clemens PR, Perlman SJ, i in. Efficacy and Safety of Vamorolone vs Placebo and Prednisone Among Boys With Duchenne Muscular Dystrophy. *JAMA Neurol.* 2022;79(10):1005. doi:10.1001/jamaneurol.2022.2480
- [8] Dadgar S, Wang Z, Johnston H, i in. Asynchronous remodeling is a driver of failed regeneration in Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Cell Biology.* 2014;207(1): 139-158. doi:10.1083/jcb.201402079
- [9] Conklin LS, Damsker JM, Hoffman EP, i in. Phase IIa trial in Duchenne muscular dystrophy shows vamorolone is a first-in-class dissociative steroidal anti-inflammatory drug. *Pharmacological Research.* 2018;136:140-150. doi:10.1016/j.phrs.2018.09.007
- [10] A Study to Assess the Efficacy and Safety of Vamorolone in Boys With Duchenne Muscular Dystrophy (DMD). *ClinicalTrials.gov.* <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03439670>. Updated 13.07.2022.
- [11] Stelmach M. Nowy lek umożliwi skuteczniejszą terapię dystrofii mięśniowej Duchenne'a. *Termedia.* <https://www.termedia.pl/neurologia/Nowy-lek-umozliwi-skuteczniejsza-terapię-dystrofii-miesniowej-Duchenne-a,42921.html>. Published: 04.07.2021
- [12] Chłopcy z dystrofią mięśniową Duchenne'a czekają na refundację terapii. *Medycyna praktyczna.* <https://www.mp.pl/pacjent/neurologia/aktualnosci/276091,chlopcy-z-dystrofia-miesniowa-duchennea-czekaja-na-refundacje-terapii>. Published 23.07.2021
- [13] Translama TM (ataluren) is the First Therapy Approved in Brazil for Duchenne Muscular Dystrophy. *PTC Therapeutics.* <https://ir.ptcbio.com/news-releases/news-release-details/translama-tm-ataluren-first-therapy-approved-brazil-duchenne>. Published 29.05.2019
- [14] Translama - granulata do sporządzania zawiesiny doustnej. *Medycyna praktyczna.* <https://www.mp.pl/pacjent/leki/lek/101296,Translama-granulata-do-sporzadzania-zawiesiny-doustnej>
- [15] Aneks I: charakterystyka produktu leczniczego. Europejska Agencja Leków. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/translama-epar-product-information_pl.pdf
- [16] Peltz SW, Morsy M, Welch EM, Jacobson A. Ataluren as an Agent for Therapeutic Nonsense Suppression. *Annu Rev Med.* 2013;64(1):407-425. doi:10.1146/annurev-med-120611-144851

- [17] Nonsense Suppression. PTC Therapeutics. <https://www.ptcbio.com/our-science/nonsense-suppression>.
- [18] McDonald CM, Campbell C, Torricelli RE, i in. Ataluren in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy (ACT DMD): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet*. 2017;390(10101):1489-1498. doi:10.1016/s0140-6736(17)31611-2
- [19] Translama (ataluren). Europejska Agencja Leków. <https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/translama-epar-medicine-overview-en.pdf>. Updated 06.2018
- [20] Ishino Y, Krupovic M, Forterre P. History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology. *Margolin W, red. J Bacteriol.* 2018;200(7). doi:10.1128/jb.00580-17
- [21] CRTSPR/Cas9 - Bakterien revolutionieren die Molekularbiologie. *Simply Science.* <https://www.simplyscience.ch/teens/wissen/crispr-cas9-bakterien-revolutionieren-die-molekularbiologie>. Published 10.09.2019
- [22] Rodriguez Fernandez C. CRISPR-Cas9: The Gene Editing Tool Changing the World. *Labiotech.* <https://www.labiotech.eu/in-depth/crispr-cas9-review-gene-editing-tool/>. Published 3. 11. 2021
- [23] <https://en.wikipedia.org/wiki/File:GRNA-Cas9.svg>
- [24] Nelles DA, Fang MY, O'Connell MR, i in. Programmable RNA Tracking in Live Cells with CRTSPR/Cas9. *Cell*.2016; 165(2):488-496. doi: 10.1016/j.cell.2016.02.054
- [25] Nowe zastosowanie narzędzia inżynierii genetycznej CRISPR-Cas9. *Dolina biotechnologiczna.* <https://web.archive.org/web/20170209173356/http://dolinabiotechnologiczna.pl/nowe-doniesienia/biotechnologia-nowosci/nowe-zastosowanie-narzedzia-inzynierii-genetycznej-crispr-cas9/>. Published 13.04.2016
- [26] Erkut E, Yokota T. CRISPR Therapeutics for Duchenne Muscular Dystrophy. *IJMS.* 2022;23(3):1832. doi: 10.3390/ijms23031832
- [27] Choi E, Koo T. CRISPR technologies for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Molecular Therapy.* 2021 ;29(11):3179-3191. doi:10.1016/j.ymthe.2021.04.002

- [28] Adli M. The CRISPR toolkit for genome editing and beyond. *Nat Commun.* 2018;9(1). doi:10.1038/s41467-018-04252-2
- [29] Gene editing (CRISPR/Cas9). ActionDuchenne. <https://www.actionduchenne.org/what-is-duchenne/duchenne-explained/glossary-of-research-terms/gene-editing-crispr-cas9/>
- [30] Long C, McAnally JR, Shelton JM, Mireault AA, Bassel-Duby R, Olson EN. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science.* 2014;345(6201):1184-1188. doi:10.1126/science.1254445
- [31] Min YL, Bassel-Duby R, Olson EN. CRISPR Correction of Duchenne Muscular Dystrophy. *Annu Rev Med.* 2019;70(1):239-255. doi:10.1146/annurev-med-081117-010451
- [32] Chemello F, Bassel-Duby R, Olson EN. Correction of muscular dystrophies by CRISPR gene editing. *Journal of Clinical Investigation.* 2020;130(6):2766-2776. doi:10.1172/jci136873
- [33] Li HL, Fujimoto N, Sasakawa N, et al. Precise Correction of the Dystrophin Gene in Duchenne Muscular Dystrophy Patient Induced Pluripotent Stem Cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Reports.* 2015;4(1):143-154. doi:10.1016/j.stemcr.2014.10.013
- [34] Long C, Li H, Tiburcy M, et al. Correction of diverse muscular dystrophy mutations in human engineered heart muscle by single-site genome editing. *Sci Adv.* 2018;4(1). doi:10.1126/sciadv.aap9004
- [35] Amoasii L, Long C, Li H, et al. Single-cut genome editing restores dystrophin expression in a new mouse model of muscular dystrophy. *Sci Transl Med.* 2017;9(418). doi:10.1126/scitranslmed.aan8081
- [36] Amoasii L, Hildyard JCW, Li H, et al. Gene editing restores dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Science.* 2018;362(6410):86-91. doi:10.1126/science.aau1549
- [37] Min YL, Li H, Rodriguez-Caycedo C, et al. CRISPR-Cas9 corrects Duchenne muscular dystrophy exon 44 deletion mutations in mice and human cells. *Sci Adv.* 2019;5(3). doi:10.1126/sciadv.aav4324
- [38] Ousterout DG, Kadi AM, Thakore PI, Majoros WH, Reddy TE, Gersbach CA. Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun.* 2015;6(1). doi:10.1038/ncomms7244

- [39] Kyrychenko V, Kyrychenko S, Tiburcy M, i in. Functional correction of dystrophin actin binding domain mutations by genome editing. *JCI Insight*. 2017;2(18). doi:10.1172/jci.insight.95918
- [40] Nelson CE, Wu Y, Gemberling MP, i in. Long-term evaluation of AAV-CRISPR genome editing for Duchenne muscular dystrophy. *Nat Med*. 2019;25(3):427-432. doi:10.1038/s41591-019-0344-3
- [41] Moretti A, Fonteyne L, Giesert F, i in. Somatic gene editing ameliorates skeletal and cardiac muscle failure in pig and human models of Duchenne muscular dystrophy. *Nat Med*. 2020;26(2):207-214. doi:10.1038/s41591-019-0738-2
- [42] Young CS, Mokhonova E, Quinonez M, Pyle AD, Spencer MJ. Creation of a Novel Humanized Dystrophic Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy and Application of a CRISPR/Cas9 Gene Editing Therapy. *IND*. 2017;4(2):139-145. doi:10.3233/jnd-170218

NEUROMONITORING ŚRÓDOPERACYJNY W TYROIDEKTOMII

Aleksandra Kaluża, Julia Kaczmarczyk, Piotr Granatowski,
Karolina Gancarczyk, Krzysztof Gładkowski, Barbara Grochowska

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

Abstrakt: Porażenie nerwów krtaniowych jest jednym z najczęstszych powikłań tyroidektomii. Jednostronne uszkodzenie może prowadzić do chrypki i zmiany barwy głosu, natomiast obustronne - do poważnych powikłań zagrażających życiu pacjentów. Przez lata złotym standardem w prewencji urazów była wzrokowa identyfikacja nerwów krtaniowych. Nie zapewniało to jednak o prawidłowej funkcji pomimo braku widocznych urazów. Postęp w rozwoju technologii medycznych pozwolił na opracowanie metod zmniejszających ryzyko ich wystąpienia. Śródoperacyjny neuromonitoring przerywany oraz ciągły może wpływać na poprawę bezpieczeństwa i skuteczności przeprowadzanych operacji tarczycy. Celem rozdziału jest przedstawienie metod neuromonitoringu, ich zastosowania i znaczenia w praktyce klinicznej. Nie wszystkie wyniki badań są zgodne w kwestii skuteczności monitoringu, wykazano jednak bezpieczeństwo jego stosowania. Korzyści kliniczne i edukacyjne, jakie daje neuromonitoring, przyczyniają się do akceptacji tej metody przez środowisko chirurgiczne.

Słowa kluczowe: neuromonitoring, IONM, chirurgia tarczycy, tyroidektomia

Abstract: Laryngeal nerve palsy is one of the most common complications of thyroidectomy. One-sided damage can lead to hoarseness and a change in voice timbre, while bilateral damage can lead to serious life-threatening complications. For years, the gold standard in injury prevention has been the visual identification of the laryngeal nerves. However, this did not ensure proper function despite the lack of visible injury. Progress in the medical technologies has allowed the development of methods to reduce the risk of their occurrence. Intraoperative intermittent and continuous neuromonitoring may improve the safety and effectiveness of thyroid surgeries. The purpose of this chapter is to present neuromonitoring methods, their application and importance in clinical practice. Not all research results are consistent in terms of the effectiveness of monitoring, but its safety has been demonstrated. Clinical and educational benefits of neuromonitoring contribute to the acceptance of this method by the surgical community.

Keywords: neuromonitoring, IONM, thyroid surgery, thyroidectomy

1. WSTĘP

Jednym z najczęściej występujących powikłań tyroidektomii jest porażenie nerwu krtaniowego wstecznego (RLN - recurrent larynx nerve). Ze względu na bliskie sąsiedztwo struktur usuwanej podczas zabiegu tarczycy, istnieje ryzyko jego uszkodzenia. W konsekwencji jednostronnego naruszenia może to prowadzić do pojawienia się chrypki oraz zmiany barwy głosu. Natomiast obustronne uszkodzenie grozi całkowitą jego utratą, dusznością a nawet ostrą niewydolnością oddechową^[1,2], która może wymagać przeprowadzenia tracheotomii^[3]. Trwałe uszkodzenie nerwu krtaniowego wstecznego odnotowuje się u około 2% pacjentów po operacyjnym usunięciu tarczycy^[4,5]. RLN jest bardziej narażony na uraz podczas tyroidektomii u pacjentów wysokiego ryzyka, w tym pacjentów z wolem podmostkowym, zaawansowanym rakiem tarczycy lub pacjentów poddawanych reoperacji^[6]. Drugim omawianym w tym rozdziale nerwem jest gałąź zewnętrzna nerwu krtaniowego górnego (EBSLN - external branch of the superior laryngeal nerve). Podobnie jak RLN jest odgałęzieniem nerwu błędnego (VN – vagus nerve). Jego uszkodzenie objawia się osłabieniem lub zanikiem skurczu mięśnia pierścienno-tarczowego, głos staje się niższy, a wysokie dźwięki trudne do wykonania. Cały proces mówienia wymaga od pacjenta więcej wysiłku niż było to odczuwalne przed urazem^[7]. Do uszkodzenia wymienionych nerwów może dojść wskutek trakcji, zakleszczenia szwem, przecięcia lub urazu termicznego^[6]. Trakcja stanowi najczęstszą (ok. 80%) przyczynę utraty sygnału z nerwów krtaniowych^[8]. Podstawową procedurą i złotym standardem w prewencji uszkodzeń nerwów podczas operacji tarczycy jest ich wzrokowa identyfikacja^[6]. Dążenie do zmniejszenia ilości wymienionych powikłań pooperacyjnych doprowadziło do zastosowania śródoperacyjnego neuromonitoringu przerywanego (IIONM – intermittent intraoperative neuromonitoring). Od czasu jej powstania technika ta podlega ciągłemu doskonaleniu. Dużym postępowaniem w jej rozwoju było zastosowanie ciągłego neuromonitoringu śródoperacyjnego (CIONM - continous intraoperative neuromonitoring).

2. PORÓWNANIE CIONM ORAZ IIONM

Istnieją różne techniki zastosowania neuromonitoringu śródoperacyjnego w chirurgii tarczycy. Wykorzystują one rejestrację sygnałów elektromiograficznych ze skurczu mięśni fałdów głosowych w odpowiedzi na stymulację nerwu RLN lub nerwu błędnego za pomocą elektrod znajdujących się

przy rurce dotchawiczej^[9]. Monitoring przerywany obejmuje bezpośrednią stymulację nerwu błędnego, RLN lub EBSLN za pomocą sondy, podczas gdy CIONM kontroluje je w czasie rzeczywistym z użyciem elektrody zaciskowej zamontowanej na nerwie błędnym. Urządzenia stymulujące i rejestrujące sygnały mają swoje elektrody uziemiające zlokalizowane na ramieniu lub na mostku. Interfejs łączący elektrody odbierające sygnał i sondę stymulującą pozwala na wyświetlanie występujących napięć na monitorze i kontrolę integralności nerwów^[6].

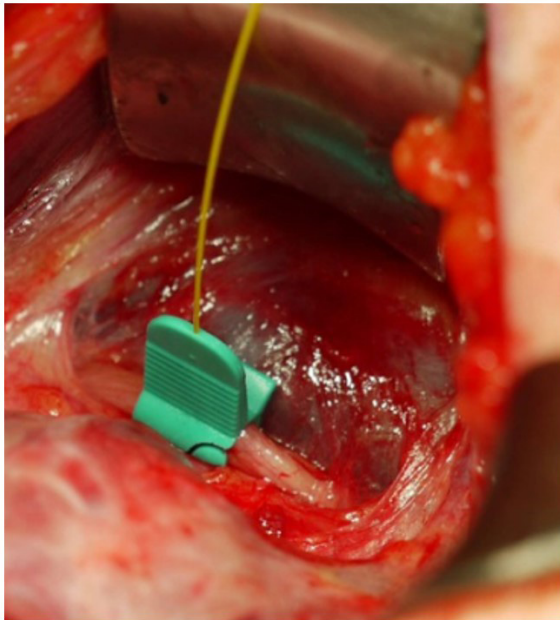
2.1. Zastosowanie IIONM

IIONM – przerywany neuromonitoring śródoperacyjny umożliwia zlokalizowanie RLN i EBSLN oraz określenie czy nastąpiła utrata sygnału z uszkodzonego nerwu^[10]. Do intubacji pacjenta stosuje się rurkę dotchawiczą wyposażoną w elektrody. Konieczne jest precyzyjne umieszczenie jej w taki sposób, aby przylegały one do fałdów głosowych. Po umieszczeniu pacjenta w odpowiedniej pozycji, w przypadku wykonywania tyroidektomii – z odchyloną głową, naprężoną szyją i ułatwionym dostępem do tarczycy, ułożenie rurki należy skontrolować za pomocą laryngoskopu lub poprzez analizę fali EMG wykazującej wahania spowodowane ruchami oddechowymi. Amplituda linii bazowej 30-70 μV świadczy o prawidłowym umieszczeniu rurki w tchawicy^[6]. Sonda stymulująca powinna zostać ustawiona na wysyłanie sygnałów o natężeniu 1-2 mA, a monitor na odbieranie sygnałów progowych o napięciu 100 μV . W razie konieczności można zwiększyć je do 200 μV , aby uniknąć fałszywie dodatnich stymulacji wywołanych spontanicznymi falami oddechowymi. Po wykonaniu nacięcia i uwidocznieniu tarczycy wraz z unerwiającymi ją strukturami, osoba operująca stymuluje uprzednio zidentyfikowany wzrokowo nerw błędny, w celu kontroli prawidłowej funkcji urządzeń monitorujących^[11]. Poprawne mapowanie przebiegu RLN i EBSLN pozwala bezpieczniej i skuteczniej dokonać wycięcia gruczołu tarczowego. W momencie wystąpienia nieprawidłowości w EMG mięśni krtani przystępuje się do kontrolnej stymulacji VN. Jeżeli nie nastąpi skurcz krtani należy podejrzewać nieprawidłowe ułożenie rurki w tchawicy a tym samym obecnych na niej elektrod. Do takiego samego wniosku można dojść po kontrolnej stymulacji nerwu błędnego znajdującego się po drugiej stronie, gdy EMG również będzie wykazywał obniżoną lub zniesioną aktywność mięśni krtani. Jeżeli funkcja nerwu po stronie przeciwnej będzie jednak zachowana należy podejrzewać uszkodzenie nerwu^[11, 12]. Utratę sygnału z nerwów

możemy podzielić na powstałą w wyniku uszkodzenia segmentowego (typ 1) lub globalnego (typ 2). O pierwszym rodzaju mówi się w sytuacji, gdy wsteczne mapowanie od dystalnego końca nerwu wykaże miejsce ucisku np. szwu na niego. Dzięki temu możliwe jest działanie zapobiegające trwałej szkodzi. Typ 2 uszkodzenia rozpoznaje się przy braku reakcji na całej długości VN i RLN bez możliwości określenia dokładnego miejsca uszkodzenia. Osoba operująca podejmuje w takiej sytuacji decyzję o kontynuowaniu bądź nie, operacji na drugim płacie tarczycy^[8].

2.2. Zastosowanie CIONM

Podczas gdy IIONM stosowane jest do mapowania i identyfikacji RLN i EBSLN oraz kontroli ich funkcji w przypadku wystąpienia uszkodzenia, do którego może dość pomiędzy stymulacjami, CIONM pozwala na uniknięcie potencjalnego urazu w czasie rzeczywistym, a więc zanim on wystąpi^[10]. CIONM kontroluje RLN za pomocą elektrody zaciskowej zamontowanej na nerwie błędnym (Rycina 1.), która w sposób ciągły wykrywa zmiany amplitudy sygnału elektrofizjologicznego. Zaleca się jednak, aby tak jak w IIONM, przy monitoringu ciągłym również stosować sondę do mapowania nerwów i posługiwać się dwoma metodami jednocześnie w celu zmaksymalizowania skuteczności wykorzystywanego neuromonitoringu.



Rycina 1. Elektroda stymulująca umieszczona na nerwie błędnym^[13]

Rurka dotchawicza z elektrodami umieszczana jest tak samo jak zostało to opisane w poprzednim podrozdziale. Po wykonaniu odpowiedniego dla tyroidektomii nacięcia szyi należy zidentyfikować nerw błędny i skontrolować jego funkcję przed założeniem elektrody. Różnicą w porównaniu do IIONM jest konieczność wypreparowania okrężnego fragmentu VN, na który nałożona zostanie elektroda. System należy skalibrować w taki sposób, aby amplituda odchyżeń od linii bazowej wynosiła $\geq 500 \mu V$ [14]. Możliwe jest ustawienie alarmu dźwiękowego i wizualnego, gdy wartości progowe zostaną przekroczone. Amplituda skorelowana jest z ilością pobudzanych włókien mięśniowych, których aktywność zaobserwować można na EMG. Latencję, czyli opóźnienie, wiąże się z szybkością depolaryzacji. Zależy ona od odległości punktu stymulacji od strun głosowych. Opóźnienie jest znacznie dłuższe po lewej stronie w porównaniu z prawą stroną ze względu na długość VN po obu stronach [11]. Zmiana kształtu fali amplitudy i latencji poprzedza utratę sygnału EMG i wskazuje na zbliżające się uszkodzenie nerwu [15]. Na ich podstawie sklasyfikowano zdarzenia niepożądane EMG w 3 kategorie:

- Łagodne – spadek amplitudy o 50 – 70 %, wzrost latencji o 5 – 10 %,
- Pośrednie – spadek amplitudy >50%, wzrost latencji >10%,
- Ciężkie – spadek amplitudy >70%, wzrost latencji >10%.

Pod koniec operacji elektroda usuwana jest z VN, fragmenty nerwu dystalnie i proksymalnie do miejsca jej umieszczenia kontrolowane są w celu wykluczenia uszkodzenia wywołanego instalacją elektrody [13].

3. DYSKUSJA

Częstość występowania porażenia nerwów krtaniowych w wyniku operacji tarczycy zależy głównie od złośliwości choroby czy resekcja wykonywana jest częściowo lub całkowicie oraz od tego czy zabieg odbywa się pierwszorazowo czy powtórnie. Zastosowanie IONM zdaje się mieć znaczenie dopiero po rozpatrzeniu wszystkich wymienionych czynników [16]. Wykonalność i bezpieczeństwo stosowania IONM zostało udowodnione w wielu badaniach [17-20]. Pomimo tego, neuromonitoring ma również swoje ograniczenia. Sygnał EMG może zostać zakłócony przez wpływ znieczulenia lub manipulowanie tchawicą. Zanik sygnału może świadczyć niekoniecznie o uszkodzeniu, a jedynie o utracie kontaktu elektrod rejestrujących ze strunami głosowymi. Przerwany IONM wykrywa uszkodzenie jedynie po jego zaistnieniu [6].

Ograniczeniem CIONM jest mnogość sposobów uszkodzenia nerwów. O ile najczęstszą przyczyną jest trakcja, zdarzają się jednak sytuacje kauteryzacji, przecięcia, podwiązania czy zaciśnięcia, które mogą być nieuniknione nawet przy stosowaniu technik CIONM. Ich szybkie wystąpienie uniemożliwia chirurgowi podjęcie w porę działań zaradczych [10].

Skuteczność IONM na podstawie niektórych badań nadal pozostaje niesprecyzowana. W części z nich zastosowanie neuromonitoringu nie wpływało na zmniejszenie częstości niepożądanych urazów [16, 21-23]. Randomizowane badanie kliniczne przeprowadzone przez Barczyński i in. wykazało, że stosowanie monitoringu obniżyło ilość porażenia zarówno tymczasowych (o 3,8%) jak i trwałych (o 1,2%) [24]. Badanie Schneider i in. na grupie 1526 pacjentów pozwoliło na wyciągnięcie wniosków, że operacje z CIONM z mniejszą częstością powodują trwałe porażenie fałdów głosowych w porównaniu z IIONM u pacjentów z łagodnymi chorobami tarczycy [25]. Można stworzyć piramidę użyteczności klinicznej technik ochrony nerwów krtanowych przed urazem zaczynając od wzrokowej identyfikacji, przez przerywany neuromonitoring śródoperacyjny aż do jego odmiany ciągłej [6]. Wśród zalet neuromonitoringu śródoperacyjnego wymienić można możliwość potwierdzenia prawidłowego funkcjonowania RLN oraz EBLSN w trakcie lub nawet przed wzrokową identyfikacją. W przypadku, gdy wizualna ocena nie wskazuje na uszkodzenie nerwu, IONM jest w stanie dostarczyć informacji o zaburzeniu jego funkcjonowania. Ostrzega przed zbliżającym się uszkodzeniem. Co warte odnotowania, jest przydatnym narzędziem dla początkujących rezydentów_ek chirurgii w celu minimalizacji ryzyka błędów i w ramach szkolenia i doskonalenia swoich umiejętności [26]. Biorąc po uwagę wszystkie przytoczone wyżej informacje zaleca się stosowanie IONM raczej w trudnych przypadkach tj. o dużej złośliwości, z wolem podmostkowym, przy reoperacjach niż profilaktycznie w każdym zabiegu [23, 27].

4. PODSUMOWANIE

Neuromonitoring śródoperacyjny wydaje się obiecującą techniką pozwalającą na zmniejszenie występowania porażenia fałdów głosowych po operacji tarczycy. Nie wszyscy badacze są zgodni co do jej skuteczności, ale wykonalność i bezpieczeństwo zostały udowodnione. Uzasadnione jest prowadzenie dalszych badań nad optymalizacją wykorzystania technik neuromonitoringu na większych populacjach, aby zapewnić lepszą ich ocenę.

REFERENCJE

- [1] Wong KP, Mak KL, Wong CK, Lang BH. Systematic review and meta-analysis on intra-operative neuro-monitoring in high-risk thyroidectomy. *Int J Surg* . 2017;38:21-30. doi:10.1016/j.ijsu.2016.12.039
- [2] Chiang FY, Wang LF, Huang YF, Lee KW, Kuo WR. Recurrent laryngeal nerve palsy after thyroidectomy with routine identification of the recurrent laryngeal nerve. *Surgery*. 2005;137(3):342-347. doi:10.1016/j.surg.2004.09.008
- [3] Caragacianu D, Kamani D, Randolph GW. Intraoperative monitoring: normative range associated with normal postoperative glottic function. *Laryngoscope* . 2013;123(12):3026-3031. doi:10.1002/lary.24195
- [4] Jeannon JP, Orabi AA, Bruch GA, Abdalsalam HA, Simo R. Diagnosis of recurrent laryngeal nerve palsy after thyroidectomy: a systematic review. *Int J Clin Pract*. 2009;63(4):624-629. doi:10.1111/j.1742-1241.2008.01875.x
- [5] Serpell JW, Lee JC, Yeung MJ, Grodski S, Johnson W, Bailey M. Differential recurrent laryngeal nerve palsy rates after thyroidectomy. *Surgery* . 2014;156(5):1157-1166. doi:10.1016/j.surg.2014.07.018
- [6] Deniwar A, Bhatia P, Kandil E. Electrophysiological neuromonitoring of the laryngeal nerves in thyroid and parathyroid surgery: A review. *World J Exp Med* . 2015;5(2):120-123. Published 2015 May 20. doi:10.5493/wjem.v5.i2.120
- [7] Barczyński M, Randolph GW, Cernea CR, et al. External branch of the superior laryngeal nerve monitoring during thyroid and parathyroid surgery: International Neural Monitoring Study Group standards guideline statement. *Laryngoscope*. 2013;123 Suppl 4:S1-S14. doi:10.1002/lary.24301
- [8] Schneider R, Randolph G, Dionigi G, et al. Prospective study of vocal fold function after loss of the neuromonitoring signal in thyroid surgery: The International Neural Monitoring Study Group's POLT study. *Laryngoscope*. 2016;126(5):1260-1266. doi:10.1002/lary.25807
- [9] Pace-Asciak P, Russell JO, Dhillon VK. Intraoperative Neuromonitoring: Evaluating the Role of Continuous IONM and IONM Techniques for Emerging Surgical and Percutaneous Procedures. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:823117. Published 2022 Feb 22. doi:10.3389/fendo.2022.823117

- [10] Sinclair CF, Téllez MJ, Ulkatan S. Continuous Laryngeal Adductor Reflex Versus Intermittent Nerve Monitoring in Neck Endocrine Surgery. *Laryngoscope*. 2021;131(1):230-236. doi:10.1002/lary.28710
- [11] Randolph GW, Dralle H; International Intraoperative Monitoring Study Group, et al. Electrophysiologic recurrent laryngeal nerve monitoring during thyroid and parathyroid surgery: international standards guideline statement. *Laryngoscope*. 2011;121 Suppl 1:S1-S16. doi:10.1002/lary.21119
- [12] Dackiw AP, Rotstein LE, Clark OH. Computer-assisted evoked electromyography with stimulating surgical instruments for recurrent/external laryngeal nerve identification and preservation in thyroid and parathyroid operation. *Surgery*. 2002;132(6):1100-1108. doi:10.1067/msy.2002.128483
- [13] Schneider R, Randolph GW, Sekulla C, et al. Continuous intraoperative vagus nerve stimulation for identification of imminent recurrent laryngeal nerve injury. *Head Neck*. 2013;35(11):1591-1598. doi:10.1002/hed.23187
- [14] Schneider R, Randolph GW, Barczynski M, et al. Continuous intraoperative neural monitoring of the recurrent nerves in thyroid surgery: a quantum leap in technology. *Gland Surg*. 2016;5(6):607-616. doi:10.21037/ggs.2016.11.10
- [15] Schneider R, Bures C, Lorenz K, Dralle H, Freissmuth M, Hermann M. Evolution of nerve injury with unexpected EMG signal recovery in thyroid surgery using continuous intraoperative neuromonitoring. *World J Surg*. 2013;37(2):364-368. doi:10.1007/s00268-012-1853-0
- [16] Dralle H, Sekulla C, Haerting J, et al. Risk factors of paralysis and functional outcome after recurrent laryngeal nerve monitoring in thyroid surgery. *Surgery*. 2004;136(6):1310-1322. doi:10.1016/j.surg.2004.07.018
- [17] Terris DJ, Anderson SK, Watts TL, Chin E. Laryngeal nerve monitoring and minimally invasive thyroid surgery: complementary technologies. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2007;133(12):1254-1257. doi:10.1001/archotol.133.12.1254
- [18] Dionigi G, Chiang FY, Dralle H, et al. Safety of neural monitoring in thyroid surgery. *Int J Surg*. 2013;11 Suppl 1:S120-S126. doi:10.1016/S1743-9191(13)60031-X

- [19] Martucci C, Madafferi S, Crocoli A, et al. Intraoperative Neuromonitoring for Thyroid Surgery in Children and Adolescents: A Single Center Experience. *Children (Basel)*. 2022;9(12):1992. Published 2022 Dec 18. doi:10.3390/children9121992
- [20] Ulmer C, Koch KP, Seimer A, et al. Real-time monitoring of the recurrent laryngeal nerve: an observational clinical trial. *Surgery*. 2008;143(3):359-365. doi:10.1016/j.surg.2007.10.007
- [21] Yarbrough DE, Thompson GB, Kasperbauer JL, Harper CM, Grant CS. Intraoperative electromyographic monitoring of the recurrent laryngeal nerve in reoperative thyroid and parathyroid surgery. *Surgery*. 2004;136(6):1107-1115. doi:10.1016/j.surg.2004.06.040
- [22] Chan WF, Lang BH, Lo CY. The role of intraoperative neuromonitoring of recurrent laryngeal nerve during thyroidectomy: a comparative study on 1000 nerves at risk. *Surgery*. 2006;140(6):866-873. doi:10.1016/j.surg.2006.07.017
- [23] Pisanu A, Porceddu G, Podda M, Cois A, Uccheddu A. Systematic review with meta-analysis of studies comparing intraoperative neuromonitoring of recurrent laryngeal nerves versus visualization alone during thyroidectomy. *J Surg Res*. 2014;188(1):152-161. doi:10.1016/j.jss.2013.12.022
- [24] Barczyński M, Konturek A, Cichoń S. Randomized clinical trial of visualization versus neuromonitoring of recurrent laryngeal nerves during thyroidectomy. *Br J Surg*. 2009;96(3):240-246. doi:10.1002/bjs.6417
- [25] Schneider R, Sekulla C, Machens A, Lorenz K, Nguyen Thanh P, Dralle H. Postoperative vocal fold palsy in patients undergoing thyroid surgery with continuous or intermittent nerve monitoring. *Br J Surg*. 2015;102(11):1380-1387. doi:10.1002/bjs.9889
- [26] Snyder SK, Hendricks JC. Intraoperative neurophysiology testing of the recurrent laryngeal nerve: plaudits and pitfalls. *Surgery*. 2005;138(6):1183-1192. doi:10.1016/j.surg.2005.08.027
- [27] Witt RL. Recurrent laryngeal nerve electrophysiologic monitoring in thyroid surgery: the standard of care?. *J Voice*. 2005;19(3):497-500. doi:10.1016/j.jvoice.2004.05.001
- [28] Chan WF, Lo CY. Pitfalls of intraoperative neuromonitoring for predicting postoperative recurrent laryngeal nerve function during thyroidectomy. *World J Surg*. 2006;30(5):806-812. doi:10.1007/s00268-005-0355-8

SZCZEPIONKI ANTYNIKOTYNOWE JAKO METODA LECZENIA UZALEŻNIENIA OD NIKOTYNY

Magdalena Stencel, Michał Janik, Błażej Pilarski, Małgorzata
Planer, Natalia Denisiewicz, Piotr Dudek

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

Abstrakt: Uzależnienie od nikotyny wciąż jest poważnym problemem, doprowadzającym do wielu poważnych konsekwencji zdrowotnych. Szczepienia przeciwko nikotynie stanowią obiecującą, nową koncepcję leczenia uzależnienia od nikotyny. Badania przedkliniczne wykazały, że mają one duży potencjał, jednak próby kliniczne nie przyniosły zadowalających wyników skuteczności w rzucaniu palenia. Prowadzone są jednak badania w celu zwiększenia skuteczności szczepionek, co w przyszłości może sprawić, że szczepionki staną się ważną terapią w leczeniu uzależnienia od nikotyny. Celem niniejszego rozdziału jest omówienie aspektów związanych z wykorzystaniem szczepionek antynikotynowych w leczeniu uzależnienia od nikotyny. W tym celu przeanalizowano związaną z tematem literaturę dostępną w bazach medycznych takich jak: PubMed, Google Scholar, Scopus.

Słowa kluczowe: szczepionka, uzależnienie, nikotyna, immunoterapia, rzucanie palenia

Abstract: Nicotine addiction is still a serious problem leading to numerous severe health consequences. Vaccinations against nicotine constitute promising, new conception of healing nicotine addiction. Preclinical studies have demonstrated their significant potential, but clinical trial have not yielded desired results in smoking cessation. However, research is being conducted to increase the effectiveness of vaccines, which in future may make them an important therapy in the treatment of nicotine addiction. The aim of this section is to discuss aspects related to use of antinicotine vaccines in treatment of nicotine addiction. To achieve that, we analyzed literature available at popular medical bases: PubMed, Google Scholar, Scopus.

Keywords: vaccine, addiction, nicotine, immunotherapy, smoking cessation

1. WSTĘP

Uzależnienie od narkotyków jest chorobą, w której dochodzi do kompulsywnego i powtarzalnego używania substancji pomimo negatywnych konsekwencji dla zdrowia, stanu psychicznego lub życia społecznego użytkownika ^[1]. Uzależnienia są problemem nie tylko samego chorego, ale także jego rodziny i całego społeczeństwa ^[2]. Nadużywanie narkotyków może dotyczyć zarówno narkotyków legalnych, takich jak alkohol i nikotyna, jak i nielegalnych, do których zaliczamy marihuanę, czy kokainę ^[3].

Uzależnienie od nikotyny jest bardzo powszechnym problemem. W Polsce papierosy pali 26% dorosłych. Spośród osób palących, regularnie palący stanowią 82%, a okazjonalnie – 18%. Popularność palenia jest zależna od płci. Mężczyźni palą znacznie częściej niż kobiety. Najczęściej palą badani między 45 a 54 rokiem życia oraz między 55 a 64 rokiem życia. Palenie najmniej popularne jest wśród osób w wieku 18–24 lat ^[4].

Pomimo tego, że aż 75% palaczy chce zerwać z nałogiem, udaje się to tylko mniej niż 5% ^[5].

Używanie tytoniu jest przyczyną rozwoju nowotworów, chorób układu krążenia i chorób płuc. Palenie papierosów jest również czynnikiem ryzyka infekcji dróg oddechowych, osteoporozy, zaburzeń rozrodu, wrzodów dwunastnicy i żołądka oraz cukrzycy. Choroba wywołana paleniem jest konsekwencją narażenia na toksyny zawarte w dymie tytoniowym. Badania wskazują, że nikotyna także może odgrywać rolę w wywoływaniu chorób spowodowanych paleniem, szczególnie niebezpieczny jest jej potencjał uzależniający, który skłania do ponownego sięgania po papierosy ^[6,7].

W krajach Europy Środkowo-Wschodniej 41% zgonów mężczyzn i 17% zgonów kobiet w wieku od 35 do 64 lat było spowodowanych paleniem tytoniu ^[8].

Cząsteczki dymu wdychanego z papierosa przenoszą nikotynę do płuc, gdzie jest ona szybko wchłaniana do płucnego krążenia żylnego. Następnie nikotyna dostaje się do krążenia tętniczego i szybko przemieszcza się z płuc do mózgu, gdzie wiąże się z nikotynowymi receptorami cholinergicznymi. Wiązanie nikotyny na styku dwóch podjednostek receptora otwiera kanał, umożliwiając w ten sposób wejście jonów sodu lub wapnia, co dodatkowo aktywuje zależne od napięcia kanały wapniowe, umożliwiając wniknięcie większej ilości wapnia. Jednym ze skutków wejścia wapnia do neuronu jest uwolnienie neurotransmiterów ^[9].

Mechanizm uzależnienia od nikotyny związany jest z interakcją nikotyny z nikotynowymi receptorami cholinergicznymi, zwłaszcza ich podtypem $\alpha 4\beta 2$ występującym w mezolimbicznym układzie nagrody. Podjednostka $\beta 2$ receptorów nikotynowych $\alpha 4\beta 2$ odgrywa szczególnie ważną rolę w uzależnieniu od nikotyny ^[10].

Stymulacja nikotynowych receptorów cholinergicznymi uwalnia różne neuroprzekaźniki w mózgu ^[11]. Jeden z nich, dopamina, sygnalizuje przyjemne doznania i ma kluczowe znaczenie dla wzmacniających efektów, które promują samodzielne podawanie nikotyny. Nikotyna uwalnia dopaminę w obszarze mezolimbicznym, ciele prążkowym i korze czołowej. Neurony dopaminergiczne w brzusznej części nakrywy śródmózgowia i w powłoce jądra połączonego mają kluczowe znaczenie dla odczuwania nagrody związanej z przyjęciem nikotyny ^[12].

Nikotyna wywołuje przyjemność oraz zmniejsza stres i niepokój. Palenie poprawia koncentrację, czas reakcji i wydajność niektórych zadań ^[6]. Zaprzestanie palenia powoduje pojawienie się objawów odstawiennych takich jak drażliwość, niepokój, trudności z koncentracją, bradykardia, niecierpliwość, dolegliwości somatyczne, bezsenność ^[13].

Podstawą uzależnienia od nikotyny jest kombinacja pozytywnych wzmocnień, w tym poprawa nastroju i unikanie objawów odstawiennych. Ponadto warunkowanie odgrywa ważną rolę w rozwoju uzależnienia od tytoniu ^[6].

Obecne metody leczenia uzależnień opierają się na farmakoterapii, psychoterapii bądź połączeniu tych dwóch. Do terapii uzależnienia od nikotyny wykorzystuje się głównie nikotynową terapię zastępczą, bupropion i wardenilinę. Jednak ich skuteczność wciąż nie jest zadowalająca ^[15].

Neurobiologiczne działanie nikotyny zależy od szybkości, z jaką nikotyna wiąże się z receptorami nikotynowymi. Tak więc podawanie szczepień w celu wytworzenia specyficznych przeciwciał, które wiążą nikotynę we krwi i zmniejszają jej ilość w mózgu, może pomóc palaczom w walce z nałogiem ^[1,16,17].

2. HISTORIA SZCZEPIONEK I ROZWOJU SZCZEPIEŃ PRZECIWKO UZALEŻNIENIOM OD SUBSTANCJI PSYCHOAKTYWNYCH

Szczepienia już od wielu lat odgrywają kluczową rolę w profilaktyce chorób zarówno bakteryjnych, jak i wirusowych. Za pierwszą stosunkowo

bezpieczną i skuteczną szczepionkę uważa się wynalezioną przez Edwarda Jennera szczepionkę na ospę prawdziwą. Do szczepienia wykorzystywano wtedy materiał z krost osób zakażonych ospą krowianką ^[18].

Obecny postęp medycyny i biotechnologii zrewolucjonizował jednak szczepienia i w dzisiejszych czasach większość szczepionek składa się z inaktywowanych lub atenuowanych patogenów. Coraz częściej wykorzystuje się także szczepionki zawierające kwasy nukleinowe ^[19].

Pomysł wykorzystania szczepionek nie tylko do celów profilaktyki chorób zakaźnych, ale także do leczenia osób uzależnionych pojawił się już w latach 70., opracowano wtedy pierwsze szczepionki przeciwko uzależnieniu od opiatów, wykonywano także pierwsze testy na zwierzętach. Na pewien czas uwaga badaczy skupiła się jednak na innych metodach leczenia, które na tamten moment wydawały się bardziej obiecujące. Gdy okazało się, że metody te mają wiele wad, powrócono do zainteresowania tematem szczepień przeciwko uzależnieniom od substancji psychoaktywnych. Doprowadziło to do opracowania szczepionek przeciwko uzależnieniu od nikotyny i kokainy. Pierwsze testy wydawały się mieć obiecujące rezultaty, co skutkowało dalszym rozwojem szczepionek przeciwko uzależnieniom ^[1,20].

3. MECHANIZM DZIAŁANIA SZCZEPIONEK ANTYNIKOTYNOWYCH

Istnieją dwie metody immunoterapii: immunizacja bierna opierająca się na przeciwciałach monoklonalnych przygotowanych w laboratorium oraz immunizacja czynna ^[9] polegająca na pobudzeniu organizmu do produkcji przeciwciał w odpowiedzi na antygen zawarty w szczepionce. Przeciwciała te wychwytyują cząsteczkę uzależniającej substancji w krwiobiegu, zanim będzie mogła ona przekroczyć barierę krew-mózg, powstałe w ten sposób cząsteczki są zbyt duże, aby przekroczyć tę barierę. Zapobiega to szybkiemu przechodzeniu narkotyku do mózgu, a także zmniejsza dawkę nikotyny, która będzie w stanie połączyć się receptorami i aktywować układ nagrody ^[21].

Szczepionki do leczenia uzależnień zazwyczaj tworzone są poprzez połączenie danej substancji uzależniającej, bądź związku chemicznie do niej pokrewnego (haptenu), z immunogennym białkiem nośnikowym. Jest to związane z faktem, że nikotyna sama w sobie jest cząsteczką nieimmunogenną i pozostaje niewykryta przez układ odpornościowy, dzięki czemu może przekraczać barierę krew-mózg i pobudzać układ nagrody ^[2, 22].

4. BADANIA PRZEDKLINICZNE

Badania przedkliniczne wykazały, że szczepionki mogą wpływać na dystrybucję nikotyny do mózgu, a także na jej fizyczne i behawioralne efekty [23-25].

W jednym z badań została oceniona możliwość wywołania przeciwciał po immunizacji podskórnej i donosowej. Ochronny efekt szczepionki mierzono 5 tygodni po szczepieniu przez porównanie napływu radioznakowanej nikotyny do mózgów szczepionych i nieszczepionych zwierząt. Immunizacja podskórna wywołuje wysoki poziom przeciwciał klasy IgG, a po szczepieniu donosowym można stwierdzić znaczny poziom przeciwciał IgA w ślinie zaszczipionych myszy. Mniej niż 10% radioznakowanej nikotyny, znajdującej się w mózgach zwierząt nieszczepionych, można znaleźć w mózgach zwierząt szczepionych [26].

W innym badaniu sprawdzono, jak immunizacja wpływa na rozkładanie się nikotyny w tkankach szczurów. Badanie wykazało, że dystrybucja nikotyny do mózgu była zmniejszona u szczepionych szczurów w sposób zależny od czasu, z większą redukcją po 1 minucie (64%) niż po 25 minutach (45%). Szczepienia zmniejszały dystrybucję nikotyny do mięśni, jąder, śledziony, wątroby, serca i nerek, ale w mniejszym stopniu niż do mózgu, podczas gdy dystrybucja nikotyny do tłuszczu była zwiększona. Przewlekle podawana nikoty na wykazywała podobnie zmieniony wzór dystrybucji tkanek u szczepionych szczurów, ale różnice były na ogół mniejsze niż po pojedynczej dawce nikotyny; stężenie nikotyny w mózgu było o 24% niższe u szczepionych szczurów, podczas gdy stężenie nikotyny w płucach było wyższe [24].

5. NICVAX

NicVAX jest szczepionką składającą się z oczyszczonej 3'-aminometylonikotyny sprzężonej z rekombinowaną egzoproteiną A *Pseudomonas aeruginosa*, zaadsorbowanej na glinie w soli fizjologicznej buforowanej fosforanami [27].

Faza pierwsza badań klinicznych wykazała, że szczepionka Nic-Vax jest bezpieczna i dobrze tolerowana, a jej immunogenność zależna jest od dawki [28].

Badano działanie szczepionki NicVAX u jedenastu palaczy. Badania wykazały, że szczepienie zmniejszyło wiązanie nikotyny do receptorów nikotynowych z podjednostką $\beta 2$, szczególnie odpowiedzialną za uzależnienie,

o 12,5%. Ponadto udowodniono, że nastąpił spadek głodu i liczby wypalanych papierosów dziennie ^[29].

Inne badanie przeprowadzono w celu ustalenia, czy wyższe stężenia przeciwciał są związane z wyższymi wskaźnikami abstynencji od palenia. W tym badaniu klinicznym oceniano wyniki dawek 200 i 400 µg podawanych cztery lub pięć razy w okresie 6 miesięcy w porównaniu z placebo. Osoby otrzymujące NicVAX, u których zidentyfikowano najwyższy poziom przeciwciał, wykazywały większe prawdopodobieństwo utrzymywania abstynencji, niż osoby otrzymujące placebo bądź osoby z niskim poziomem przeciwciał. Wskaźniki abstynencji do 6 miesięcy były znacząco wyższe w grupie z wysokim poziomem przeciwciał w porównaniu z grupą placebo (19,7% vs. 6,0%), nie wykazano istotnych różnic między wynikami dla grupy placebo i grupy o niskim poziomie przeciwciał (7,9% vs. 6,0%). Osoby z wysokim poziomem przeciwciał były również znacznie bardziej skłonne do abstynencji przez 12 miesięcy w porównaniu z grupą placebo (18,0% vs. 6,0%) ^[30].

W badaniach klinicznych trzeciej fazy osoby palące co najmniej 10 papierosów dziennie przydzielono losowo do sześciu szczepień z NicVaX lub placebo. Abstynencja była oceniana na podstawie zgłaszanej przez samych siebie konsumpcji papierosów i zweryfikowane przez wydychany tlenek węgla. Szczepionka NicVAX była dobrze tolerowana z klinicznie akceptowalnym bezpieczeństwem i profilem tolerancji. Badania nie wykazały jednak skuteczności szczepionki. Wskaźniki abstynencji wskaźniki zarówno w grupie NicVAX, jak i w grupie placebo były identyczne (11%) ^[31].

W innych badaniach także nie wykazano jednak skuteczności szczepionek nikotynowych w długoterminowym rzucaniu palenia, nawet u pacjentów z najwyższym odsetkiem przeciwciał ^[27].

Badanie fazy drugiej oceniało wiązanie nikotyny w mózgu przed i po szczepieniu za pomocą tomografii. Wiązanie nikotyny było mniejsze po szczepieniu i wynosiło odpowiednio 54,9% i 49,1% przed i po szczepieniu ^[32].

Dodatkowo w badaniu Havermans et al. nie ustalono istotnego wpływu immunizacji na aktywność mózgu w odpowiedzi na prowokację nikotyną ^[33].

Pomimo faktu, że szczepionka jest dobrze tolerowana, a jej działania niepożądane związane były głównie łagodne i miejscowe, przy minimalnych skutkach ogólnoustrojowych ^[34], większość badań nie potwierdziła jej skuteczności ^[27,31,33,35], co jest zaskakujące, biorąc pod uwagę obiecujące wyniki wcześniejszych badań ^[28-30].

6. NICQB (NIC002)

Szczepionka NicQb została opracowana na bazie haptenu nikotynowego skoniugowanego z cząsteczką wirusopodobną utworzoną przez białko kapsydu bakteriofaga Qb^[10].

W badaniach przedklinicznych wykazano, że szczepienie NicQb bez adiuwantów indukuje powstawanie wysokiego miana przeciwciał specyficznych dla nikotyny. Adiuwant na bazie wodorotlenku glinu dodatkowo zwiększał miana przeciwciał antynikotynowych 6-krotnie. Zaszczepione myszy wykazały do 90% niższy poziom nikotyny w mózgu w porównaniu z nieszczepionymi. Hamowanie wychwytu nikotyny w mózgu było wyraźnie zależne od ilości obecnych przeciwciał^[36].

NicQb został przetestowany w badaniu fazy I na zdrowych, niepalących ochotnikach. Wszyscy wykazali swoistą dla nikotyny odpowiedź IgG po pojedynczym wstrzyknięciu NicQb. Badanie wykazało szybszy początek odpowiedzi immunologicznej po szczepionce NicQb w porównaniu z konwencjonalnymi szczepionkami nikotynowymi opartymi na toksynach. Poziomy przeciwciał można było zwiększyć dzięki drugiemu wstrzyknięciu^[36].

Do podwójnie ślepego badania zrekrutowano 341 palaczy. Szczepionka była bezpieczna i dobrze tolerowana. Najczęstszymi działaniami niepożądanymi były reakcje w miejscu wstrzyknięcia i objawy grypopodobne, które wystąpiły u 69% badanych, ale zwykle ustępowały w ciągu 24 godzin po wstrzyknięciu. Abstynencję oceniano na podstawie zgłaszanego przez siebie statusu palenia i potwierdzano pomiarem CO w wydychanym powietrzu. Ciągłą abstynencję oceniano między 2 a 6 miesiącem oraz dodatkowo między 2 a 12 miesiącem. W analizie zamiaru leczenia ciągła abstynencja osób leczonych NicQb (28,3%) była wyższa niż osób otrzymujących placebo (23,4%), ale różnica ta nie osiągnęła istotności statystycznej. Grupa z wysoką odpowiedzią wykazała znacznie wyższy wskaźnik ciągłej abstynencji po 6 miesiącach (57%) w porównaniu z grupą placebo (31%). Grupy o średniej i niskiej odpowiedzi nie różniły się istotnie od placebo (32%). Ciągłe utrzymanie abstynencji do 12 miesiąca także było wyższe u osób z wysoką odpowiedzią (42%) w porównaniu z placebo (21%)^[37].

Badanie kliniczne drugiej fazy potwierdziło bezpieczeństwo i wysoką immunogenność szczepionki NicQb. Po 2 miesiącach osoby leczone NicQb wykazywały istotnie wyższy wskaźnik abstynencji (47,2%) niż grupa placebo (35,1%), ale później między 2 a 6 miesiącem różnic tych nie zaobserwowano. Jednak osoby z najwyższym stężeniem przeciwciał wykazywały większą cią-

głą abstynencję od miesiąca 2 do miesiąca 6 (56,6%) niż osoby otrzymujące placebo (31,3%). Nawet po 12 miesiącach obserwacji różnica we wskaźniku abstynencji między osobami z grupy placebo a osobami z wysokim mianem przeciwciał utrzymywała się na poziomie 20,2% [38].

7. NICCINE

Niccine jest szczepionką opracowaną na bazie skoniugowanego haptenu nikotynowego i anatoksyny tężcowej [21].

Badania udowodniły, że szczepionka jest dobrze tolerowana zarówno u osób niepalących, jak i u palaczy. Przeprowadzono randomizowane podwójnie ślepe badanie skuteczności szczepionki. Palaczom podawano szczepionkę Niccine 40 µg lub placebo. Pomiędzy dniami 56-98 pacjenci byli leczeni warenikliną w celu ułatwienia zaprzestania palenia. Po roku brak nawrotów wyniósł 43,3% w grupie Niccine w porównaniu z 51,1% w grupie placebo [39].

Ze względu na brak skuteczności szczepionka została wycofana z dalszego rozwoju [10].

8. TA-NIC

TA-NIC jest szczepionką złożoną z haptenu nikotynowego skoniugowanego z rekombinowaną podjednostką B toksyny cholery [21].

Sześćdziesięciu palaczy zostało zrekrutowanych do podwójnie ślepego, randomizowanego badania z eskalacją dawki, aby ocenić bezpieczeństwo i immunogenność szczepionki nikotynowej TA-NIC. Wstępne wyniki tego badania fazy pierwszej wykazały, że szczepionka była bezpieczna i dobrze tolerowana, z niewielką liczbą ciężkich działań niepożądanych w miejscu wstrzyknięcia. Ponadto we wszystkich aktywnie szczepionych grupach w porównaniu z placebo odnotowano większą liczbę osób, które zgłosiły zmniejszenie przyjemności z palenia lub rzuciły palenie - w szóstym tygodniu 43% osób otrzymujących TA-NIC w porównaniu z 9% otrzymujących placebo zgłosiło zmniejszoną przyjemność z palenia lub rzuciło palenie. Ponadto, wskaźniki rzucenia palenia w ciągu 12 miesięcy były znacznie wyższe wśród osób otrzymujących TA-NIC (19% i 38% w dwóch grupach otrzymujących wyższe dawki TA -NIC) niż otrzymujących placebo (8%) [40].

9. NIC7-001

NIC7-001 jest szczepionką złożoną z nikotynowego haptenu skoniugowanego z toksoidem błoniczym CRM197 [21].

Badanie fazy pierwszej zostało zakończone dla NIC7-001. W badaniu oceniono bezpieczeństwo, poziomy przeciwciał i wskaźniki abstynencji. Pomimo tego nie udało się zlokalizować wyników badania. Jest to zgodne z literaturą, w której wskazano „nie zgłoszono” i „w toku” [2].

10. SEL-068

SEL-068 ma w pełni syntetyczną strukturę, która nie wywołuje odpowiedzi immunologicznej na nośniki białkowe [10].

Przedkliniczne badanie na małpach udowodniło, że szczepionka może osłabiać działanie nikotyny [41].

Badanie fazy 1, w którym oceniano bezpieczeństwo, tolerancję i immunogenność szczepionki u osób palących i niepalących zostało zakończone w marcu 2013 r., jednak nie opublikowano żadnych wyników [2].

11. OGRANICZENIA I POWODY NISKIEJ SKUTECZNOŚCI SZCZEPIONEK ANTYNIKOTYNOWYCH

Jednym z najważniejszych aspektów związanych ze skutecznością szczepionek jest poziom przeciwciał, którego wytworzenie jest indukowane podczas ich działania. Stężenie 50–100 mg/ml wytwarzane przez niektóre szczepionki pozwala jedynie na minimalną odpowiedź. Dodatkowo ilość nikotyny spożywanej przez palaczy może być zbliżona lub przekraczać zdolności wiązania przeciwciał, co podkreśla, jak istotny jest jak najwyższy poziom przeciwciał u osób otrzymujących szczepionki [42].

Znaczną trudnością w osiągnięciu tego celu jest jednak zmniejszone wytwarzanie przeciwciał u palaczy po szczepieniu [43,44].

Ponadto ograniczeniem szczepionek jest duża indywidualna zmienność odpowiedzi immunologicznej zarówno w zakresie stężenia przeciwciał, jak i ich powinowactwa do nikotyny. Duża zmienność powoduje znaczną liczbę reagujących z bardzo niskimi poziomami przeciwciał, które prawdopodobnie nie będą skuteczne. Celem projektowania nowych szczepionek powinno być zarówno wzmocnienie odpowiedzi immunologicznej i zmniejszenie liczby osób nieodpowiadających lub odpowiadających słabo na szczepionkę [42].

Ponadto szczepionki same w sobie nie wpływają na objawy odstawienne i głód nikotynowy, mogą je jedynie łagodzić w niewielkim stopniu, dlatego prawdopodobnie konieczne będą dodatkowe środki takie jak poradnictwo lub inne leki w celu osiągnięcia optymalnej skuteczności [42,45].

Immunoterapie zmniejszają, ale nie całkowicie zapobiegają dystrybucji nikotyny do mózgu, nawet niskie stężenie nikotyny w surowicy krwi może być więc wystarczające do wywołania skutków związanych z uzależnieniem [42].

12. NOWE KIERUNKI ROZWOJU SZCZEPIONEK ANTNIKOTYNOWYCH

12.1. Wytwarzanie przeciwciał antynikotynowych w wydzielinach śluzówki płuc i nosa

Nikotyna jest pobierana głównie przez inhalację, dlatego przeprowadzono badanie mające na celu wytworzenie przeciwciał przeciwnikotynowych w wydzielinach śluzówki płuc i nosa. Koniugat nikotyna-hemocyanina (Nic-KLH) został przygotowany i zmieszany z monofosforylolipidem A (MPL) jako adiuwantem. Nic-KLH/MPL podawano myszom donosowo lub podskórnie, następnie badano miana, powinowactwo i swoistość przeciwciał specyficznych dla nikotyny w wydzielinach śluzówki nosa i płuc oraz w próbkach krwi. Nosowa immunizacja Nic-KLH/MPL wywołała pojawienie się specyficznych dla nikotyny przeciwciał IgA w mysich wydzielinach z nosa i płuc, dodatkowo do antynikotynowych przeciwciał IgG w krążeniu krwi [46]. Wykazano, że śluzówkowa szczepionka nikotynowa była zdolna do indukowania silnych przeciwciał śluzówkowych i ogólnoustrojowych [46,47].

12.2. Użycie małych, nienaturalnych sekwencji peptydowych

Przeprowadzono badanie, którego celem było ustalenie, czy małe, nienaturalne sekwencje peptydowe jako część skoniugowanej szczepionki nikotynowej mogą poprawić odpowiedź immunologiczną. Preparaty czterech peptydów testowano *in vitro* na linii komórek dendrytycznych w celu określenia kombinacji, która wywołałaby największą odpowiedź. Trzy z peptydów były w stanie zwiększyć odpowiedź cytokinową powyżej tej indukowanej przez sam system dostarczania adiuwanta. Badania szczepionek *in vivo* na myszach wykazały, że najlepszą odpowiedź immunologiczną, mierzoną poziomami

przeciwciał specyficznych dla nikotyny, uzyskano ze struktury skoniugowanej szczepionki, która zawierała peptyd. Analizy wykazały, że peptyd był w stanie zmienić odpowiedź immunologiczną w kierunku bardziej humoralnej dominacji [48].

12.3. Multiwalentne szczepionki

Zastosowanie multiwalentnej szczepionki, która aktywuje kilka populacji komórek B, może być sposobem na zwiększenie odpowiedzi przeciwciał. Trójwalentna szczepionka generowała znacząco wyższe miana i zapobiegała dystrybucji i.v. dawki nikotyny do mózgu w większym stopniu niż równoważna dawka szczepionki monowalentnej. Liczba sznurów z wysokimi mianami przeciwciał była znacząco zwiększona w grupie, której podawano szczepionkę trójwartościową w porównaniu z grupą, której podawano szczepionkę jednowartościową. Nie było korelacji między mianami generowanymi przez różne immunogeny nikotynowe w trójwalentnej szczepionce, co potwierdza hipotezę, że immunogeny generowały niezależne odpowiedzi z różnych populacji komórek B [49].

12.4. Terapia skojarzona – równoczesne stosowanie leków i szczepionek

Zarówno same szczepionki, jak i istniejące leki są tylko częściowo skuteczne, a połączenie ich może zwiększyć skuteczność obu. Szczepionki nie mogą bezpośrednio blokować głodu nikotynowego, które pojawiają się, gdy nikotyna nie jest obecna, a bupropion i wareniklina mają działanie zmniejszające głód i odstawienie [42].

Dwa badania kliniczne szczepionek nikotynowych i warenikliny zakończyły się niepowodzeniem, ale każde miało ograniczenia [39,50].

W pierwszej próbie użyto szczepionki NicVax, która w badaniach wykazała niewielką skuteczność, ponadto w badaniu był tylko krótki okres, w którym nakładało się stosowanie warenikliny i szczytowe poziomy przeciwciał [50].

Drugie badanie kliniczne badało połączenie szczepionki Niccine z warenikliną, jednak u badanych uzyskano jedynie bardzo niski poziom przeciwciał [39].

Pomimo badań wciąż nie jest pewne, czy terapia skojarzona przy użyciu szczepionek i innych leków będzie cechować się wyższym wskaźnikiem długotrwałej abstynencji od nikotyny.

12.5. Podsumowanie

Szczepienia przeciwko nikotynie to atrakcyjna koncepcja rzucania palenia i zapobiegania nawrotom. Badania przedkliniczne były bardzo obiecujące i wskazywały na fakt, że szczepienia zmniejszają przenikanie nikotyny do mózgu i jej wpływ na ośrodkowy układ nerwowy.

Najlepiej przebadana szczepionka NicVAX w początkowych badaniach wykazywała skuteczność w leczeniu uzależnienia, jednak badania kliniczne trzeciej fazy nie potwierdziły tego efektu. Szczepionka NicQb, dla której przeprowadzono badania kliniczne drugiej fazy, wykazuje potencjał w leczeniu uzależnienia od nikotyny, jednak dalsze badania nie zostały do tej pory przeprowadzone. Badania nad szczepionką Niccine zostały zakończone z powodu braku skuteczności. Pierwsze badania nad szczepionką TA-NIC wydawały się obiecujące, jednak nie zostały one do tej pory rozwinięte. Przeprowadzono także badania kliniczne pierwszej fazy dla szczepionek NIC7-001 i Sel-068, jednak ich wyniki nie zostały do tej pory opublikowane.

Możliwymi przyczynami rozczarowujących wyników badań skuteczności szczepionek jest zbyt niski poziom generowanych przez nie przeciwciał, indywidualna zmienność odpowiedzi immunologicznej, brak wpływu na głód nikotynowy i objawy odstawienne. Możliwe jest także, że niezwiązane przez przeciwciała stężenie nikotyny jest wystarczające do podtrzymania uzależnienia.

W dalszym ciągu prowadzone są jednak badania nad rozwojem szczepionek. Podejmowane są próby przewyciężenia ograniczeń wykazanych we wcześniejszych badaniach. Podejmowane są badania nad wytwarzaniem wysokich mian przeciwciał w wydzielinie płuc i nosa, użyciem małych, nie-naturalnych sekwencji peptydowych w szczepionkach do zwiększenia ich immunogenności i zastosowaniem szczepionek multiwalentnych, a także próbuje się zastosować terapię skojarzoną z użyciem zarówno szczepionek, jak i leków.

Mimo że w obecnej chwili nie można uznać szczepionek antynikotynowych za skuteczny sposób leczenia uzależnienia od nikotyny, istnieją liczne możliwości zwiększenia ich skuteczności. Konieczne są kolejne badania, aby opracować szczepionkę, która będzie mogła efektywnie pomagać w leczeniu uzależnienia od nikotyny.

REFERENCJE

- [1] Shen XY, Orson FM, Kosten TR. Vaccines against drug abuse. *Clin Pharmacol Ther.* 2012;91(1):60-70. doi:10.1038/clpt.2011.281
- [2] Bloom BT, Bushell MJ. Vaccines against Drug Abuse-Are We There Yet?. *Vaccines (Basel).* 2022;10(6):860. Published 2022 May 27. doi:10.3390/vaccines10060860
- [3] Richesson D, Hoenig JM. Key Substance Use and Mental Health Indicators in the United States: Results from the 2020 National Survey on Drug Use and Health. Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA), 2021 PEP21-07-01-003
- [4] CBOS. Komunikat z badań. Palenie papierosów. 2019
- [5] Office of the Surgeon General (US); Office on Smoking and Health (US). The Health Consequences of Smoking: A Report of the Surgeon General. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US); 2004
- [6] Benowitz NL. Nicotine addiction. *N Engl J Med.* 2010;362(24):2295-2303. doi:10.1056/NEJMra0809890
- [7] Mishra A, Chaturvedi P, Datta S, Sinukumar S, Joshi P, Garg A. Harmful effects of nicotine. *Indian J Med Paediatr Oncol.* 2015;36(1):24-31. doi:10.4103/0971-5851.151771
- [8] Zatoński WA, Mańczuk M, Sulkowska U, Przewoźniak K. Palenie tytoniu a umieralność na choroby odtytoniowe w Europie Środkowo-Wschodniej. *Zdrowie Publiczne i Zarządzanie.* 2009;7(2).
- [9] Dajas-Bailador F, Wonnacott S. Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol Sci.* 2004;25(6):317-324. doi:10.1016/j.tips.2004.04.006
- [10] Zalewska-Kaszubska J. Is immunotherapy an opportunity for effective treatment of drug addiction?. *Vaccine.* 2015;33(48):6545-6551. doi:10.1016/j.vaccine.2015.09.079
- [11] Wonnacott S. Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci.* 1997;20(2):92-98. doi:10.1016/s0166-2236(96)10073-4
- [12] Nestler EJ. Is there a common molecular pathway for addiction?. *Nat Neurosci.* 2005;8(11):1445-1449. doi:10.1038/nn1578

- [13] Hughes JR, Hatsukami D. Signs and symptoms of tobacco withdrawal. *Arch Gen Psychiatry*. 1986;43(3):289-294. doi:10.1001/archpsyc.1986.01800030107013
- [14] Liu JF, Li JX. Drug addiction: a curable mental disorder?. *Acta Pharmacol Sin*. 2018;39(12):1823-1829. doi:10.1038/s41401-018-0180-x
- [15] Cahill K, Stevens S, Perera R, Lancaster T. Pharmacological interventions for smoking cessation: an overview and network meta-analysis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;2013(5):CD009329. Published 2013 May 31. doi:10.1002/14651858.CD009329.pub2
- [16] Picciotto MR, Zoli M, Rimondini R, et al. Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. *Nature*. 1998;391(6663):173-177. doi:10.1038/34413
- [17] Benowitz NL. Pharmacology of nicotine: addiction, smoking-induced disease, and therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2009;49:57-71. doi:10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094742
- [18] Belongia EA, Naleway AL. Smallpox vaccine: the good, the bad, and the ugly. *Clin Med Res*. 2003;1(2):87-92. doi:10.3121/cm.1.2.87
- [19] Francis MJ. Recent Advances in Vaccine Technologies. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2018;48(2):231-241. doi:10.1016/j.jcvsm.2017.10.002
- [20] Myagkova MA, Morozova VS. Vaccines for substance abuse treatment: New approaches in the immunotherapy of addictions. *Russian Chemical Bulletin*. 2018;67(10):1781-1793. doi:10.1007/s11172-018-2290-5
- [21] Xu A, Kosten TR. Current status of immunotherapies for addiction. *Ann N Y Acad Sci*. 2021;1489(1):3-16. doi:10.1111/nyas.14329
- [22] Escobar-Chávez JJ, Domínguez-Delgado CL, Rodríguez-Cruz IM. Targeting nicotine addiction: the possibility of a therapeutic vaccine [published correction appears in *Drug Des Devel Ther*. 2011;5:487]. *Drug Des Devel Ther*. 2011;5:211-224. doi:10.2147/DDDT.S10033
- [23] Pentel PR, Malin DH, Ennifar S, et al. A nicotine conjugate vaccine reduces nicotine distribution to brain and attenuates its behavioral and cardiovascular effects in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2000;65(1):191-198. doi:10.1016/s0091-3057(99)00206-3

- [24] Satoskar SD, Keyler DE, LeSage MG, Raphael DE, Ross CA, Pentel PR. Tissue-dependent effects of immunization with a nicotine conjugate vaccine on the distribution of nicotine in rats. *Int Immunopharmacol.* 2003;3(7):957-970. doi:10.1016/S1567-5769(03)00094-8
- [25] Hieda Y, Keyler DE, Ennifar S, Fattom A, Pentel PR. Vaccination against nicotine during continued nicotine administration in rats: immunogenicity of the vaccine and effects on nicotine distribution to brain. *Int J Immunopharmacol.* 2000;22(10):809-819. doi:10.1016/s0192-0561(00)00042-4
- [26] Cerny EH, Lévy R, Mauel J, et al. Preclinical development of a vaccine 'against smoking'. *Onkologie.* 2002;25(5):406-411. doi:10.1159/000067433
- [27] Hoogsteder PH, Kotz D, van Spiegel PI, Viechtbauer W, van Schayck OC. Efficacy of the nicotine vaccine 3'-AmNic-rEPA (NicVAX) co-administered with varenicline and counselling for smoking cessation: a randomized placebo-controlled trial. *Addiction.* 2014;109(8):1252-1259. doi:10.1111/add.12573
- [28] Hatsukami DK, Rennard S, Jorenby D, et al. Safety and immunogenicity of a nicotine conjugate vaccine in current smokers [published correction appears in *Clin Pharmacol Ther.* 2006 Apr;79(4):396]. *Clin Pharmacol Ther.* 2005;78(5):456-467. doi:10.1016/j.clpt.2005.08.007
- [29] Esterlis I, Hannestad JO, Perkins E, et al. Effect of a nicotine vaccine on nicotine binding to $\beta 2^*$ -nicotinic acetylcholine receptors in vivo in human tobacco smokers. *Am J Psychiatry.* 2013;170(4):399-407. doi:10.1176/appi.ajp.2012.12060793
- [30] Hatsukami DK, Jorenby DE, Gonzales D, et al. Immunogenicity and smoking-cessation outcomes for a novel nicotine immunotherapeutic. *Clin Pharmacol Ther.* 2011;89(3):392-399. doi:10.1038/clpt.2010.317
- [31] Fahim RE, Kessler PD, Kalnik MW. Therapeutic vaccines against tobacco addiction. *Expert Rev Vaccines.* 2013;12(3):333-342. doi:10.1586/erv.13.13
- [32] Nicotine vaccination and nicotinic receptor occupancy - full text view. Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00996034?term=NCT00996034&draw=2&rank=1>.

- [33] Havermans A, Vuurman EF, van den Hurk J, Hoogsteder P, van Schayck OC. Treatment with a nicotine vaccine does not lead to changes in brain activity during smoking cue exposure or a working memory task. *Addiction*. 2014;109(8):1260-1267. doi:10.1111/add.12577
- [34] Ottney AR. Nicotine conjugate vaccine as a novel approach to smoking cessation. *Pharmacotherapy*. 2011;31(7):703-713. doi:10.1592/phco.31.7.703
- [35] Hartmann-Boyce J, Cahill K, Hatsukami D, Cornuz J. Nicotine vaccines for smoking cessation. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;2012(8):CD007072. Published 2012 Aug 15. doi:10.1002/14651858.CD007072.pub2
- [36] Maurer P, Jennings GT, Willers J, et al. A therapeutic vaccine for nicotine dependence: preclinical efficacy, and Phase I safety and immunogenicity. *Eur J Immunol*. 2005;35(7):2031-2040. doi:10.1002/eji.200526285
- [37] Maurer P, Bachmann MF. Vaccination against nicotine: an emerging therapy for tobacco dependence. *Expert Opin Investig Drugs*. 2007;16(11):1775-1783. doi:10.1517/13543784.16.11.1775
- [38] Cornuz J, Zwahlen S, Jungi WF, et al. A vaccine against nicotine for smoking cessation: a randomized controlled trial. *PLoS One*. 2008;3(6):e2547. Published 2008 Jun 25. doi:10.1371/journal.pone.0002547
- [39] Tonstad S, Heggen E, Giljam H, et al. Nicotine[®], a nicotine vaccine, for relapse prevention: a phase II, randomized, placebo-controlled, multicenter clinical trial. *Nicotine Tob Res*. 2013;15(9):1492-1501. doi:10.1093/ntr/ntt003
- [40] Smoking habits, a vaccine and varenicline. safety, immunogenicity and some early signs of efficacy for the nicotine vaccine, Ta-Nic. Campbell Bunce. Available at: http://www.uknsc.org/2005_UKNSCC/speakers/campbell_bunce.html (Accessed: January 5, 2023).
- [41] Desai RI, Bergman J. Effects of the Nanoparticle-Based Vaccine, SEL-068, on Nicotine Discrimination in Squirrel Monkeys. *Neuropsychopharmacology*. 2015;40(9):2207-2216. doi:10.1038/npp.2015.64
- [42] Pentel PR, LeSage MG. New directions in nicotine vaccine design and use. *Adv Pharmacol*. 2014;69:553-580. doi:10.1016/B978-0-12-420118-7.00014-7

- [43] Roseman C, Truedsson L, Kapetanovic MC. The effect of smoking and alcohol consumption on markers of systemic inflammation, immunoglobulin levels and immune response following pneumococcal vaccination in patients with arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(4):R170. Published 2012 Jul 23. doi:10.1186/ar3923
- [44] Crothers K, Daly KR, Rimland D, et al. Decreased serum antibody responses to recombinant pneumocystis antigens in HIV-infected and uninfected current smokers. *Clin Vaccine Immunol.* 2011;18(3):380-386. doi:10.1128/CVI.00421-10
- [45] Lindblom N, de Villiers SH, Semenova S, et al. Active immunisation against nicotine blocks the reward facilitating effects of nicotine and partially prevents nicotine withdrawal in the rat as measured by dopamine output in the nucleus accumbens, brain reward thresholds and somatic signs. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2005;372(3):182-194. doi:10.1007/s00210-005-0019-0
- [46] Alzhrani RF, Xu H, Valdes SA, Cui Z. Intranasal delivery of a nicotine vaccine candidate induces antibodies in mouse blood and lung mucosal secretions that specifically neutralize nicotine. *Drug Dev Ind Pharm.* 2020;46(10):1656-1664. doi:10.1080/03639045.2020.1820033
- [47] Fraleigh NL, Lewicky JD, Martel AL, Diaz-Mitoma F, Le HT. Assessing Neutralized Nicotine Distribution Using Mice Vaccinated with the Mucosal Conjugate Nicotine Vaccine. *Vaccines (Basel).* 2021;9(2):118. Published 2021 Feb 3. doi:10.3390/vaccines9020118
- [48] Le HT, Fraleigh NL, Lewicky JD, et al. Enhancing the Immune Response of a Nicotine Vaccine with Synthetic Small "Non-Natural" Peptides. *Molecules.* 2020;25(6):1290. Published 2020 Mar 12. doi:10.3390/molecules25061290
- [49] de Villiers SH, Cornish KE, Troska AJ, Pravetoni M, Pentel PR. Increased efficacy of a trivalent nicotine vaccine compared to a dose-matched monovalent vaccine when formulated with alum. *Vaccine.* 2013;31(52):6185-6193. doi:10.1016/j.vaccine.2013.10.051
- [50] Hoogsteder PH, Kotz D, van Spiegel PI, et al. The efficacy and safety of a nicotine conjugate vaccine (NicVAX®) or placebo co-administered with varenicline (Champix®) for smoking cessation: study protocol of a phase IIb, double blind, randomized, placebo controlled trial. *BMC Public Health.* 2012;12:1052. Published 2012 Dec 6. doi:10.1186/1471-2458-12-1052

TOKSYNA BOTULINOWA – ZAGROŻENIE CZY PRZYSZŁOŚĆ LECZENIA? PRZYKŁADOWE ZASTOSOWANIA W MEDYCYNIE

Anna Krawczyk, Agata Pokrzywa, Michał Maćkowski,
Sara Długosz, Klaudia Gryczka, Kacper Ruchała

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

Abstrakt: Toksyna botulinowa produkowana przez bakterie *Clostridium Botulinum* jest jedną z silniejszych poznanych toksyn ludzkości. Jej działanie polega na zablokowaniu białka, czego skutkiem jest uniemożliwienie uwolnienia acetylocholino i braku wywołania impulsu elektrycznego. Nie dochodzi wtedy do zapoczątkowania skurczu mięśni, dlatego botulinę zaczęto stosować do wszelakich rodzajów spastyczności. Nieprawidłowe zastosowanie może powodować różne działania niepożądane i prowadzić do botulizmu, czyli zatrucia jadem kiełbasianym, które manifestuje się symptomami głównie ze strony układu nerwowego, a może nawet doprowadzić do śmierci. Celem pracy było udowodnienie, iż mimo skutków ubocznych jej iniekcja, która przeprowadzona zostaje przez wykwalifikowaną kadrę oraz w odpowiedniej dawce jest skuteczna i bezpieczna, a także ma wiele zastosowań w danych jednostkach chorobowych, które można nadal poszerzać. Do takich zaburzeń możemy zaliczyć mózgowie porażenie dziecięce, dystonie ogniskowe, migrenę przewlekłą, bólową postać dysfunkcji narządu żucia oraz nadpłytność dłoni i pach. Pracę oparto na aktualnie dostępnej literaturze i dokonano przeglądu jej użycia i skuteczności w wyżej wymienionych chorobach.

Słowa kluczowe: toksyna botulinowa, botulizm, spastyczność, dystonia

Abstract: The botulinum toxin produced by the bacteria *Clostridium Botulinum* is one of the strongest known toxins of humanity. It works by blocking the protein, which results in preventing the release of acetylcholine and not causing an electrical impulse. There is no muscle contraction, which is why botulinum began to be used for all kinds of spasticity. Incorrect use can cause various side effects and lead to botulism, i.e. botulism, which manifests itself with symptoms mainly from the nervous system, and can even lead to death. The aim of the study was to prove that despite the side effects, its injection, which is carried out by qualified staff and in the right dose, is effective and safe, and has many applications in given disease entities that can still be expanded. Such disorders include cerebral palsy, focal dystonias, chronic migraine,

pain form of masticatory dysfunction and hyperhidrosis of the hands and armpits. The work is based on the currently available literature and reviews its use and efficacy in the above-mentioned diseases.

Keywords: botulinum toxin, botulism, spasticity, dystonia

1. WSTĘP

Toksyna botulinowa (BoNT) inaczej zwana botuliną lub jadem kiełbasianym wytwarzana jest przez Gram - dodatnie, beztlenowe bakterie *Clostridium Botulinum*. Należy do jednej z najbardziej toksycznych substancji poznanej człowiekowi już na początku XIX wieku ^[1,2]. Jako pierwszy skutki działania jadu kiełbasianego opisał lekarz Justin Kerner ^[3,4]. Jednak dopiero w 1897 r. udało się wyizolować szczep danej bakterii, a dokonał tego mikrobiolog Emile Pierre Marie von Ermengem ^[5]. Botulina to neurotoksyna, powodująca blokowanie transdukcji sygnału w neuronach obwodowych przez zahamowanie wydzielania acetylocholin w presynaptycznych połączeniach nerwowo - mięśniowych. Skutkiem takiego działania jest paraliż mięśni ^[6]. BoNT może powodować botulizm, czyli tak zwane zatrucie jadem kiełbasianym. Endospory tego mikroorganizmu występują nie tylko w glebie, lecz spotkać je można również w niepoprawnie przechowywanej żywności takiej, jak m.in. przetwory mięsne, rybne oraz jarzynowe ^[2,7,8]. Zakażenie toksyną botulinową jest w głównej mierze uzależnione od układu pokarmowego. Wyróżnić można infekcję w jelitach noworodków (botulizm dziecięcy), przez zakażone rany (botulizm przyranny) oraz jako skutek wdychania zakażonego toksyną powietrza, czyli przez drogi oddechowe ^[5]. Początkowe objawy zakażenia występują dopiero po 18 godzinach od wnikięcia drobnoustroju do organizmu minimalnej ilości, mogącej to zakażenie wywołać. Do występujących objawów zaliczyć można na przykład odczuwalne osłabienie wraz ze zmęczeniem, zawroty głowy oraz suchość w jamie ustnej. Do objawów występujących w późniejszej fazie zakażenia należą głównie, te które dotyczą układu nerwowego. Są nimi podwójne widzenie, zez zbieżny, światłowstręt, opadanie powiek i rozszerzenie źrenic ^[9-11]. Oprócz wymienionych wcześniej symptomów wystąpić może także niewyraźna mowa, zaburzenie połykania, zanik siły mięśni oddechowych oraz porażenie perystaltyki jelit, co może predysponować do niedrożności porażennej jelit. Wszystkie z wyżej wymienionych dolegliwości mogą prowadzić do zgonu ^[7,8]. Według danych Narodowego Instytutu

Zdrowia Publicznego PZH - Państwowego Instytutu Badawczego Zakładu Epidemiologii Chorób Zakaźnych i Nadzoru z 2021 roku liczba zachorowań w Polsce na botulizm w badanym roku wynosiła 8 przypadków na 100 tys. ludności, a zapadalność ukształtowała się na poziomie 0,021 i była niższa niż w roku poprzedzającym o 0,002 (Tabela 1.).

Tabela 1. W Tabeli przedstawiono liczbę zachorowań, zapadalność oraz liczbę i procent hospitalizowanych wg województw w Polsce w 2021 roku ^[12]

INNE BAKTERYJNE ZATRUCIA POKARMOWE: ZATRUCIA JADEM KIEŁBASIANYM /BOTULIZM/ (A05.1)

Liczba zachorowań (w kwartałach i ogółem), zapadalność oraz liczba i procent hospitalizowanych wg województw

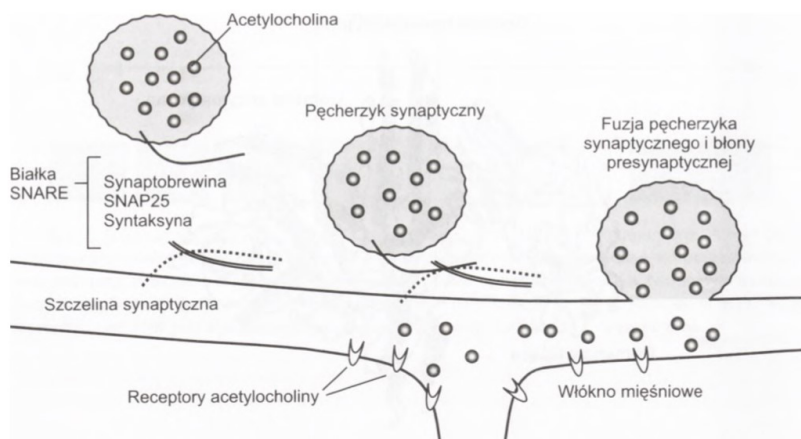
| Województwo * | | Liczba zachorowań w kwartałach | | | | Liczba zachorowań w roku | Zapadalność na 100 tys. | Hospitalizacja | |
|-------------------|---------|--------------------------------|----|-----|----|--------------------------|-------------------------|----------------|-------|
| | | I | II | III | IV | | | Liczba | % |
| POLSKA | 2020 r. | 2 | 2 | 3 | 2 | 9 | 0,023 | 9 | 100,0 |
| | 2021 r. | 1 | 3 | 2 | 2 | 8 | 0,021 | 8 | 100,0 |
| 3. Lubelskie | | - | 1 | - | 1 | 2 | 0,096 | 2 | 100,0 |
| 10. Podlaskie | | - | 1 | 1 | - | 2 | 0,171 | 2 | 100,0 |
| 11. Pomorskie | | 1 | - | - | 1 | 2 | 0,085 | 2 | 100,0 |
| 12. Śląskie | | - | - | 1 | - | 1 | 0,022 | 1 | 100,0 |
| 15. Wielkopolskie | | - | 1 | - | - | 1 | 0,029 | 1 | 100,0 |

* pominięto województwa, w których nie zarejestrowano zachorowań

Można wyróżnić siedem typów toksyn botulinowych w zależności od danego szczepu *Clostridium Botulinum*. Oznacza się je kolejno literami alfabetu tj. A, B, C1, D, E, F oraz G. Jedynie trzy z nich A, B i E są odpowiedzialne za wystąpienie botulizmu u człowieka ^[13, 14]. Toksyny C i D korelują z botulizmem występującym u zwierząt. Wszystkie typy toksyn są białkami zbudowanymi z dwóch łańcuchów. Wykazują one bardzo podobne działanie, lecz różnią się strukturą i toksycznością ^[15, 16]. Toksynę botulinową zaczęto stosować w latach 80 ubiegłego wieku w leczeniu ognisk dystonii, zęza i kurczu. Wcześniej opisano możliwość jej wykorzystania w zwalczaniu nadmiernej aktywności mięśniowej. W 1990 roku Amerykańska Akademia Neurologii oceniła wysoką skuteczność i bezpieczeństwo botuliny jednocześnie z rekomendacją do wykorzystania jej w leczeniu ogniskowych dystonii i połowiczego kurczu karku ^[17]. Aktualnie oprócz wykorzystania w zaburzeniach nerwowo-mięśniowych, jad kiełbasiany jest stosowany w medycynie estetycznej ^[5] m. in. do zmniejszania zagłębień i deformacji skórnych tzw. zmarszczek.

2. MECHANIZM DZIAŁANIA

Między neuronem ruchowym, a włóknem mięśniowym znajdują się złącze nerwowo-mięśniowe inaczej zwane synapsą. W zdrowym organizmie impulsy docierają do synapsy, powodując otwarcie kanałów zależnych od wapnia, które znajdują się w błonie presynaptycznej. Wniknięcie jonów wapnia powoduje fuzję pęcherzyków z błoną. Zostaje wtedy uwolniona acetylocholina, która łączy się z receptorem do niej przypisanym powodując depolaryzację i powstanie potencjału czynnościowego. Aby doszło do połączenia pęcherzyków synaptycznych z błoną komórkową i uwolnienia neuroprzekaźnika, konieczna jest obecność kompleksu fuzyjnego, który zostaje utworzony przez białka transbłonowe (SNARE) – syntaksyna i białko SNAP25 (błona presynaptyczna komórkowa) oraz synaptobrewina (zakorzeniona w błonie pęcherzyka pojedynczą helisą transbłonową). Wyżej opisany kompleks białkowy, który umożliwia połączenie się błon i uwolnienia przekaźnika nerwowego przedstawiony jest na rycinie niżej (rycina 1.) [18].



Rycina 1. Mechanizm uwalniania neuroprzekaźnika - Acetylocholino [2]

Toksyna botulinowa syntetyzowana jest w postaci nieaktywnej inaczej zwana protoksyną. Dopiero wskutek proteolizy enzymatycznej powstają dwa łańcuchy, które są połączone wiązaniem disiarczkowym [19]. Działanie wysokich temperatur może powodować rozpad danych wiązań. Gdy płytka nerwowo-mięśniowa połączy się z błoną presynaptyczną, toksyna przemieszcza się do cytoplazmy, a tam przez enzym – tripsynę zostaje podzielona na dwa łańcuchy. Łańcuch lekki odpowiada za toksyczność i powoduje zablokowanie m. in. białka SNAP25 i syntaksyny. Wtedy uwolnienie acetylocholino jest

niemożliwe, a impuls elektryczny nie zostaje przekazany dalej, co skutkuje brakiem wywołania skurczu [20, 21].

3. BEZPIECZEŃSTWO

Podawanie botuliny powinno odbywać się wyłącznie pod kontrolą lekarza i w odpowiednich dawkach. Wtedy zastosowanie BoNT jest bezpieczne i skuteczne. Jak każdy preparat leczniczy toksyna botulinowa może odpowiadać za wywoływanie działań niepożądanych, które mają charakter przejściowy i występują najczęściej po kilku dniach [5]. Przeciwwskazaniem do stosowania jest nadwrażliwość na którykolwiek składnik leku, miastenia gravis, zespół Eaton – Lamberta, zaburzenia krzepliwości krwi oraz ciąża i karmienie piersią [22, 23].

3.1. Działania niepożądane

Skutki uboczne toksyny botulinowej można podzielić na miejscowe i systemowe. Pierwsze z nich – miejscowe, spowodowane są przenikaniem substancji leczniczej z miejsca iniekcji do otaczających tkanek. Mogą one wywoływać zmniejszenie aktywności siły mięśni poprzecznie prążkowanych, zaburzenia połykania, podwójne widzenie, opadanie powieki, kącika ust oraz głowy, zaczerwienienie, stan zapalny, obrzęk, a nawet krwawienie w miejscu podania [24]. Działania niepożądane systemowe spowodowane są zastosowaniem botuliny ogólnoustrojowo i możemy tutaj zaliczyć np. zaburzenia połykania i oddychania czy osłabienie mięśni [24, 25]. Zaburzeniami, jakie można zaobserwować ze strony układu nerwowego są np. zaburzenia mowy, porażenie kończyn, niewydolność oddechowa, suchość w jamie ustnej, porażenie perystaltyki jelit, podrażnienie rogówki, zaburzenia akomodacji oka, trudności z oddawaniem moczu oraz krwiomocz. Czasem mogą wystąpić ortostatyczne spadki ciśnienia tętniczego, zespół grypopodobny, choroby autoimmunologiczne np. pleksopatia; dystonia mięśniowa, niewydolność nadnerczy, stany zapalne naczyń i tkanki podskórnej, zaostrzenie łuszczycy oraz anafilaksja [9, 11, 24 - 31].

4. ZASTOSOWANIE

W celach leczniczych stosowane są dwa rodzaje toksyny botulinowej typ A (BTX – A) np. Botox®, Xeomin®, Dysport® i B (BTX – B) np. MYOBLIC® [32]. Głównie stosowana jest ona w spastycznościach – hipertoniach, przez

swoje działanie obniżające napięcie mięśni ^[33]. Można ją również wykorzystać w leczeniu np. dystonii mięśni, zaburzeń z nadmierną ruchliwością mięśni gładkich, w kosmetologii, zaburzeniach widzenia i skurczy mięśni, bólu przewlekłym, poceniu się, w ślinotoku oraz alergii ^[5].

4.1. Mózgowe porażenie dziecięce

Występowanie mózgowego porażenia dziecięcego (MPD) wiąże się ze spastycznością, która utrudnia wykonywanie jakichkolwiek ruchów. Nie wszystkie mięśnie są objęte równomiernie, każdy organizm z MPD ma je zajęte inaczej. Leczenie BTX- A polega na obniżeniu napięcia mięśniowego, aby zapobiec powstawaniu zmian kostno – stawowych i do zmniejszenia ograniczeń wynikających z niepełnosprawności m. in. przez ułatwienie chodu ^[34]. Dużą rolę w terapii odgrywa wyżej wspomniany zakres zajętych mięśni. Najlepsze wyniki osiąga się, gdy zajmowane są jedna lub dwie grupy mięśni. Jednakże nie mniej ważnym aspektem jest to, że im mniejszy jest niedowład to zmniejszenie spastyczności odnosi lepszy efekt ^[35]. Obecnie BTX – A podaje się najczęściej domięśniowo na przykład w mięsień brzuchaty łydki, płaszczkowaty, przywodzicieli uda, biodrowo – lędźwiowy, prosty lub dwugłowy uda, półbłoniasty i półścięgnisty ^[36]. Terapia toksyną botulinową zmniejsza napięcie mięśniowe i poprawia ruchomość stawów ^[37]. Po podaniu substancji leczniczej należy prowadzić długotrwałą rehabilitację dzieci oraz stosowanie ortez. W badaniu prowadzonym przez Centrum Rehabilitacji im. prof. Mariana Weissa w Konstancinie, Oddział XVII w Warszawie, do którego zakwalifikowano czworo dzieci, które chodziły samodzielnie, czworo, które chodziły przy pomocy trójnogów oraz czworo, które chodziły przy pomocy balkonika. Analiza została wykonana przed zastosowaniem Botoxu oraz po 4-5 miesiącach od momentu podania leku i polegała na określeniu konkretnych parametrów np. maksymalne zgięcie w stawach biodrowych w fazie wymachu, prędkość chodu czy długość kroku. Po leczeniu troje z czworga dzieci chodzących przy pomocy balkonika zaczęło chodzić samodzielnie oraz poprawie uległy wszystkie badane parametry. Potrzebne są dalsze badania rozszerzające, natomiast te wykonane do tej pory, określają terapię toksyną botulinową jako dającą zadowalające efekty i skuteczną w leczeniu mózgowego porażenia dziecięcego, poprawiając chód i zapewniając odpowiednie przejściowe funkcjonowanie ^[38,39].

4.2. Dystonie ogniskowe

Dystonia ogniskowa zajmuje tylko jedną okolicę ciała, jej przykładami są: dystonia krtaniowa, kurcz powiek, dystonia szyjna, dystonia ustno-żuchwowa oraz kurcze pisarza ^[40].

4.2.1. Kurcz powiek

Kurcz powiek jest jedną z najczęstszych dystonii ogniskowych czaszki. Polega głównie na obustronnym, mimowolnym skurczu tonicznym mięśni oka (mimowolne mruganie, zamykanie powiek) ^[41]. Leczenie toksyną botulinową jest terapią pierwszego rzutu zarówno kurczu powiek jak i innych dystonii ogniskowych. W przeciwieństwie do leczenia dystonii szyjnej, w której toksyna otrzymała rekomendacje A, w leczeniu kurczu powiek została zaklasyfikowana przez ekspertów Amerykańskiej Akademii Neurologii na poziomie rekomendacji B w 2008 roku, co wynika głównie z braku odpowiedniej ilości badań klinicznych, które pozwoliłyby określić skuteczność leczenia tego zaburzenia ^[42]. Jedynie na podstawie niewielkiej ilości badań określono, że leczenie toksyną przynosi 72% poprawy, a efekt występuje po 3,7 dnia i utrzymuje się ok. 12,5 tygodnia. Według badań, lepszą skuteczność ma podanie toksyny w część przedtarczkową mięśnia okrężnego oka niż w przedprzegrodową. Wykazuje również dłuższy czas utrzymania efektu i mniej działań niepożądanych ^[43]. Leczenie polega na podskórnym wstrzyknięciu leku w odpowiednie obszary mięśni oraz ustawieniu odpowiedniej dawki, co przyczynia się do zmniejszenia spastyczności mięśni i tymczasowego zahamowania zaburzenia ^[44].

4.3. Migrena przewlekła

Przewlekła migrena jest to stan, w którym ból głowy występuje co najmniej przez 15 dni w miesiącu, przez minimum 3 kolejne miesiące, a dodatkowo co najmniej 8 dni w każdym miesiącu ból głowy kwalifikuje się jako migrena. Leczenie polega głównie na podawaniu leków przeciwbólowych, przeciwzapalnych oraz tryptanów ^[45]. Leczenie toksyną botulinową typu A według Amerykańskiej Akademii Neurologii skraca ilość dni z napadami migreny oraz czas trwania ich w ciągu dnia ^[46]. Działanie przeciwbólowe toksyny typu A najprawdopodobniej polega na blokowaniu uwalniania mediatorów prozapalnych i bólowych z zakończeń nerwu trójdzielnego oraz zmniejszeniu

uwalniania kwasu glutaminowego, substancji P i CGRP (Calcitonin gene-related peptide), co przyczynia się do zahamowania na pewien czas nadwrażliwości zakończeń nerwowych i zahamowania bólów migrenowych [47,48]. Lek podaje się podskórnie lub w powierzchowną warstwę mięśni. Dawka terapeutyczna wynosi 155-195j, która obejmuje 31 iniekcji koniecznych oraz 8 opcjonalnych. W każde miejsce wymagane jest podanie identycznej dawki leku (5j.). Wszystkie mięśnie ostrzykiwane są obustronnie z wyjątkiem mięśnia podłużnego. Zalecane jest regularne leczenie co 12 tygodni, dopóki nie powrócą napady migrenowe [49].

4.4. Bólowa postać dysfunkcji narządu żucia

W przebiegu dysfunkcji narządu żucia dochodzi do zaburzenia funkcjonowania mięśni żwaczowych. Objawiają się one m.in. nadmiernym i niekontrolowanym wzrostem ich napięcia, utratą symetrycznej i skoordynowanej pracy skurczowej oraz pojawiają się silne dolegliwości bólowe. Występują często w postaci napięciowych bólów głowy i bólu w okolicy stawów skroniowo-żuchwowych i mięśniowo-powięziowego mięśni żwaczowych [50]. Rola toksyny botulinowej w leczeniu tych dysfunkcji polega na zmniejszeniu wzmożonego napięcia mięśni żwaczy, co wynika z mechanizmu jej działania (wpływ na napięcie mięśni poprzez hamowanie wydzielania acetylocholino w obrębie synapsy, co zmniejsza przewodnictwo impulsów do włókien mięśniowych) [51-53]. Przeprowadzone zostały wstępne badania leczeniem toksyną botulinową typu A - Botoxu na grupie 10 pacjentów w wieku od 24-38 lat z bólową postacią dysfunkcji narządu żucia, leczonych w Uniwersyteckiej Klinice Stomatologicznej UJ w Krakowie. Pacjenci zostali zakwalifikowani na podstawie przebytego wywiadu i badania fizykalnego sprawdzającego obecność dolegliwości świadczących o dysfunkcji narządu żucia oraz na podstawie wykonanych zdjęć radiologicznych. Przy pomocy elektromiogramu określono powierzchnią aktywność elektryczną mięśni żwaczy które zostały wykonane na początku badania, 10 dni po podaniu domięśniowym toksyny w obszarze największego przekroju poprzecznego mięśnia oraz po 16 tygodniach od podania leku. Przed podaniem leku pomiar u osób badanych przekraczał fizjologiczne wartości powierzchniowej aktywności elektrycznej mięśni żwaczy, po 10 dniach spadł on 70% w porównaniu do wartości pierwotnych przed podaniem leku. Natomiast po 16 tygodniach były nieznacznie wyższe, ale zbliżone do tych, jakie zostały uzyskane po 10 dniach. Ostatecznie wstępnie wykazano, że dolegliwości bólowe ustąpiły o około 86%

w obrębie mięśni żwaczy i o około 89,8% w obrębie stawów skroniowo-żuchwowych. Wykazano trwały wpływ toksyny botulinowej typu A na obniżenie napięcia mięśni w dysfunkcjach narządu żucia [54].

4.5. Nadpotliwość dłoni i pach

4.5.1. Ogólne informacje

Nadpotliwość jest to nadmierne wydzielanie potu (spowodowane nadmierną stymulacją receptorów cholinergicznym ekrynowym gruczołom potowym) przekraczające fizjologiczny zakres potrzeb organizmu, aby utrzymać optymalną temperaturę ciała [55]. Nadmierna potliwość występuje głównie w obszarach takich jak: pachy, dłonie, stopy i twarz [56]. Nadpotliwość dzieli się na uogólnioną lub zlokalizowaną oraz pierwotną lub wtórną. Pierwotna nadpotliwość występuje, gdy nie da się określić czynnika wywołującego ją. Natomiast wtórna jest wynikiem głównie zaburzeń ogólnoustrojowych (np. cukrzyca, nadczynność tarczycy, choroba Parkinsona), zaburzeń neurologicznych, nowotworów (np. guz chromochłonny, chłoniak) oraz stosowania leków (agoniści dopaminy, leki przeciwpsychotyczne, insulina, selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny) [57]. Obecnie jest dużo sposobów leczenia nadpotliwości takich jak: miejscowe leczenie np. chlorkiem aluminium, doustne leki przeciwcholinergiczne, wodna jonoforeza, leczenie toksyną botulinową typu A oraz zabiegi chirurgiczne [58-60].

Tabela 2. Zestawienie dostępnych metod leczenia nadpotliwości [62]

| Leczenie | Sposób wykonania | Mechanizm działania | Długość utrzymywania się efektu | Korzyści | Ujemne strony |
|--|--|---------------------------------------|---------------------------------|----------------------------|--|
| Leczenie miejscowe np. chlorkiem aluminium | Aplikacja wieczorem | Zatamowanie gruczołom potowym | Tak długo jak jest stosowane | Łatwa aplikacja | Ograniczona skuteczność i podrażnienia skóry |
| Wodna jonoforeza | Immersja dotkniętych potliwością obszarów 3-5 razy | Niejasny | Tak długo jak jest stosowane | Mało niepożądanych objawów | Niezbyt szeroko dostępna, kosztowna i czasochłonna |
| Leczenie toksyną botulinową A | Iniekcje śródskórne | Zahamowanie egzocystozy acetylcholin | Około 3-9 miesięcy | Bardzo skuteczne | Konieczne powtarzanie zabiegów, wysoki koszt, konieczność znieczulenia |
| Zabiegi chirurgiczne | Miejscowe wycięcie gruczołom potowym | Zmniejszenie ilości gruczołom potowym | Stały efekt | Długoterminowa skuteczność | Powikłania chirurgiczne |

4.5.2. Leczenie toksyną botulinową typu A i mezoporacja

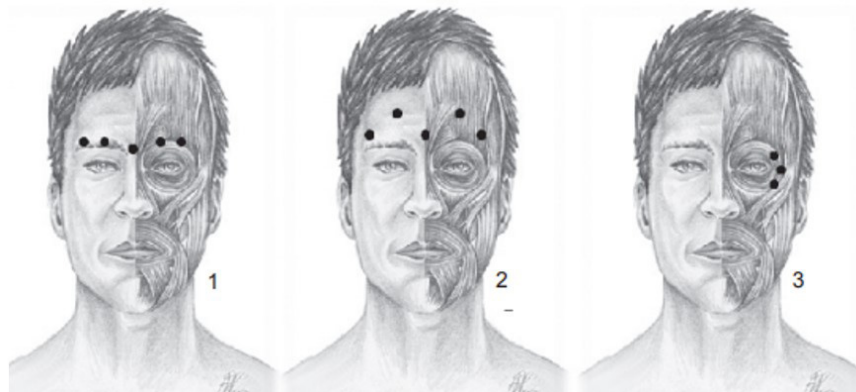
Toksyna botulinowa typu A jest najczęściej używana i skuteczna w leczeniu miejscowej nadpotliwości, stosując ją dopiero gdy inne metody takie jak doustne leki lub antyperspiranty nie przyniosły oczekiwanego efektu. Jej działanie polega na hamowaniu uwalniania acetylocholinę w okolicy płytki nerwowo-mięśniowej oraz włókien współczulnych unerwiających ekrynowe gruczoły potowe odpowiadające za proces pocenia się. Po wzajemnym oddziaływaniu w obrębie synapsy toksyny z acetylocholiną dochodzi do postępującego porażenia nerwowo-mięśniowego, dlatego może być stosowana we wcześniej wspomnianych dystoniach. Zabiegi z jej wykorzystaniem należy powtarzać, ponieważ efekt utrzymuje się ok. 3-9 miesięcy po ich wykonaniu ^[61].

Leczenie toksyną botulinową może być z zastosowaniem metody mezoporacji, która zapewnia skuteczność oraz poprawę jakości życia pacjenta. Metoda ta polega na przezskórnym transporcie aktywnych cząsteczek przy użyciu specyficznego prądu impulsywnego, który zwiększa przepuszczalność tkanek, ułatwia wnikanie i wchłanianie tych aktywnych cząsteczek na różnych poziomach. Pozwala to na kontrolowanie głębokości działania i osiągnięcie pożądanego, wysokiego stężenia aktywnych substancji w miejscu docelowego leczenia ^[62].

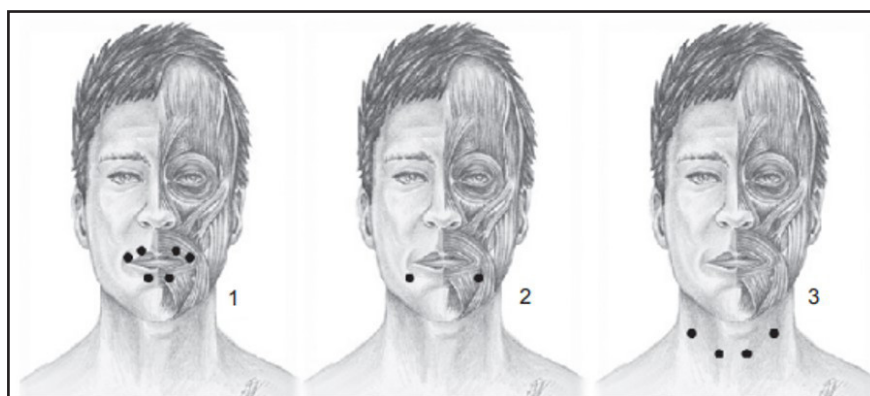
4.6. Medycyna estetyczna

Zmarszczka to zagłębienie skóry, które powstaje przez utratę kolagenu – białka budulcowego organizmu. Możemy je podzielić np. na starcze, które powstają w wyniku starzenia się skóry oraz mimiczne będące efektem nadmiernej aktywności mięśni mimicznych twarzy, które wywołują stałe ruchy skóry znajdującej się nad nimi. Najbardziej korzystne zastosowanie toksyny botulinowej zostało udowodnione do 50 roku życia, gdyż później następuje pogłębianie zmarszczek przez dalsze ścieńczenie skóry i zanik tkanki podskórnej ^[5]. Botulina jest głównie stosowana do redukcji zmarszczek mimicznych, działa ona tylko w obszarze mięśni, do których została zaaplikowana. Efekt ten utrzymuje się od 3-6 miesięcy. Przez jej zadowalające działanie wykorzystywana jest do likwidacji zmarszczek w okolicy czoła – podłużne tzw. łwią bruzdę i poprzeczne, szyi, ust – zmarszczki palacza oraz oczu tzw. kurzych łapek. Można również korygować nią tzw. uśmiech dziąsłowy czyli nadmierną ekspozycję dziąseł podczas uśmiechania, do podniesienia opadającej

powieki oka, uniesienia kąćka ust oraz brwi ^[63]. Standardowe miejsca iniekcji toksyny botulinowej w celu redukcji zmarszczek przedstawiono na rycinach poniżej (rycina 2, 3).



Rycina 2. Standardowe miejsca iniekcji toksyny botulinowej w celu redukcji zmarszczek: 1- gładziny czołowej, 2- poziomych czoła, 3- „kurzych łapek” ^[63].



Rycina 3. Standardowe miejsca iniekcji toksyny botulinowej w celu redukcji zmarszczek: 1- okolicy ust, 2- opadających kąćków ust, 3- poziomych szyi ^[63].

5. PODSUMOWANIE

Toksyna botulinowa ma zastosowanie nie tylko w medycynie estetycznej do np. zabiegów usuwania zmarszczek, ale też w leczeniu wielu schorzeń m.in. neurologicznych, urologicznych, okulistycznych i dermatologicznych. Aktualnie liczba badań klinicznych jest niewystarczająca do 100% zapewnienia

o skuteczności leczenia toksyną botulinową, ale w większości przypadków stosowanie jej daje zadowalające rezultaty przy niewielkiej ilości działań niepożądanych, a prowadzone badania dążą do poszerzenia jej zakresu terapeutycznego. Wykorzystanie działania niepożądanego jakim jest porażenie mięśni przy zatruciu toksyną dało początek leczeniu wielu chorób klinicznych poprzez wpływ na napięcie mięśni. Jednym z ważnych aspektów leczenia toksyną botulinową jest odpowiednie dawkowanie jej i sposób wstrzykiwania przez wykwalifikowany personel medyczny. Można stwierdzić, iż stosowanie botuliny, wcześniej uznawanej wyłącznie za truciznę, jest bezpieczne i skuteczne w konkretnych jednostkach chorobowych.

REFERENCJE

- [1] Wolska O, Kiebzak W, Tomaszewski W, Kowalski I, Majewski M, Szarek J, Zaborowska- Sapeta K, Zastosowanie toksyny botulinowej w praktyce klinicznej: MEDSPORTPRESS, 2008; 2(4); Vol. 8, 105-114
- [2] Mazurkiewicz-Pisarek A, Piucienniczak A, Toksyna botulinowa - cudowna trucizna: biotechnologia 2009, 2 (85) 123-133
- [3] Wissel J. Toksyna botulinowa typu A w leczeniu spastyczności: skuteczność i tolerancja u dorosłych. Med po Dyp, wyd spec, maj 2001; 37-39.
- [4] Muthane UB. Botulinum toxin: pharmacology and its current therapeutic evidence for use. Neurologica; 2/2006.
- [5] Zbrojkiewicz M, Lebedowska A, Błońska-Fajfrowska B, Toksyna botulinowa w medycynie i kosmetologii – dwustuletnia historia i nowe perspektywy: Postepy Hig Med Dosw (online), 2018; 72: 278-289 e-ISSN 1732-2693
- [6] Drożdżyńska M, Sobieraj- Garbiak I, Chlasta A, Jastrzębska M, Toksyna botulinowa i jej zastosowanie z medycynie: diagnostyka laboratoryjna Journal of Laboratory Diagnostics, Diagn Lab, 2015; 51(2): 139-146
- [7] Brock T., Madigan M., Martinko J., Parker J., (1997), Biology of Microorganism, Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, New Jersey, 802-803
- [8] Aoki K. R., (2001), journal Neurol., 248 (Suppl.1), 3-10
- [9] Chudzicka A.: Intoxication of botulinum toxin. Pol. Merkur. Lekarski, 2015; 39: 153-156

- [10] Erbguth F.J.: Historical notes on botulism, *Clostridium botulinum*, botulinum toxin, and the idea of the therapeutic use of the toxin. *Mov. Disord.*, 2004; 19 (Suppl. 8): S2-S6
- [11] Kopera D.: Botulinum toxin historical aspects: from food poisoning to pharmaceutical. *Int. J. Dermatol.*, 2011; 50: 976-980
- [12] Czarkowski P, Staszewska-Jakubik E, Wielgosz E, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego PZH - Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Epidemiologii Chorób Zakaźnych i Nadzoru: CHOROBY ZAKAŹNE I ZATRUCIA W POLSCE W 2021 ROKU, Warszawa 2022, 25
- [13] Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C.: Neurotoxins affecting neuroexocytosis, *Physiol Rev* 2000; 80: 717766
- [14] Smith TJ, Lou J, Geren IN,: Sequence variation within botulinium neurotoxin serotypes impacts antibody binding and neutralization. *Infect Immun* 2005; 73: 5450-5457
- [15] Aoki K. R., Guyer B., (2001), *Eur. j. Neurol.*, 8 (Suppl.5), 21-29.
- [16] Brin M. F. H. M., Jankovic j., (2002), *Scientific and Therapeutic Aspects of Botulinum Toxin*, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia
- [17] American Academy of Neurology Assesment. The clinical usefulness of botulinumtoxin A in treatingneurologicdisorders. *Neurology* 1990; 40: 1332-1336
- [18] Amon S., et al., 2001, *JAMA*, 285, 1059-1070
- [19] Bogucki A. Toksyna botulinowa: farmakologia i podstawy terapii. *Med po Dyp*, wyd spec, maj 2001; 29-30
- [20] Sławek J. Toksyna botulinowa w leczeniu spastyczności w przebiegu mózgowego porażenia dziecięcego. *Neurologica* 2006; 3: 23-31.
- [21] Brin MF, Aoki KR. Botulinum Toxin A. pharmacology. W *Spasticity: Etiology, evaluation, management and the rol of botulinumtoxin red.* (Mayer NH, Simpson DM). *WE MOVE*; 2002: 110-124.
- [22] SUMMARY OF PRODUCT CHARACTERISTICS NeuroBloc®http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR__Product_Information/human/000301/WC500026906.pdf(dostęp: 2013.07.21).

- [23] Sławek J., Bogucki A., Banach M.: Toksyna botulinowa typu A w leczeniu spastyczności dorosłych – stanowisko interdyscyplinarnej grupy ekspertów. *NeurolNeurochirurg Pol* 2004; 38 (6): 443-445.
- [24] Alcaly R.N., Simoes R.M., Feigin A.: Neuralgicamyotrophyfollowingbotulinumtoxininjection. *ParkinsonismRelat. Disord.*, 2010; 16: 301-302.
- [25] Schinwelski M., Sławek J.: Toksyna botulinowa w neurologii. *Neurol. Dypl.*, 2013; 8: 7-18.
- [26] Hill K.K., Smith T.J., Helma C.H., Ticknor L.O., Foley B.T., Svensson R.T., Brown J.L., Johnson E.A., Smith L.A., Okinaka R.T., Jackson P.J., Marks J.D.: GeneticdiversityamongbotulinumneurotoxinproducingClostridialstrains. *J. Bacteriol.*, 2007; 189: 818-832.
- [27] Crowner B.E., Torres-Russotto D., Carter A.R., Racette B.A.: Systemicweaknessaftertherapeuticinjections of botulinumtoxin A. A caseseries and review of the literature. *Clin. Neuropharmacol.*, 2010; 33: 243-247.
- [28] Lo T.C., Yeung S.T., Lee S., Chang E.Y.: Hematuria following Botox treatment for upper limb spasticity: a case report. *J. Pain Res.*, 2015; 8: 619-622.
- [29] Onoue H., Matsunobu A., Nagaishi A., Yukitake M., Kuroda Y.: A case report of acutepolyradiculoneuritis developing aftermultipleinjections of botulinumtoxin for cervicaldistonia. *RinshoShinkeigaku*, 2004; 44: 20-24.
- [30] Nayak P., O'Donnell B.: Central adrenalinsufficiency post botoxinjection.. 2016.AHPAA.5.FRI-458.
- [31] Namazi N., Robati R.M., Dadkhahfar S., Shafiee A., BidariZerehpoush F.: Vasculitis with panniculitisfollowingbotulinumtoxin A injection for cosmeticuse. *Dermatol. Pract. Concept.*, 2016; 6: 19-21.
- [32] Wheeler A., Smith H.S.: Botulinum toxins. Mechanisms of action, antinoception and clinicalapplications. *Toxicology*, 2013; 306: 124-146.
- [33] Sławek J. *Patofizjologia spastyczności. Med po Dypl.* wyd spec, maj 2001; 40-42.
- [34] Wądołowska B, Sińczuk B: Leczenie zaburzeń chodu u dzieci z mózgowym porażeniem dziecięcym przy pomocy wysokich dawek toksyny botulinowej i rehabilitacji w systemie kierowanego nauczania – badania wstępne, *Vol.18 /2009, nr 35.*

- [35] Sławek J.: Toksyna botulinowa typu A w leczeniu spastyczności w mózgowym porażeniu dziecięcym –podstawy teoretyczne i praktyczne skutecznej terapii. *OrtopTraumatolRehabil* 2001; 4: 541–546.
- [36] Graham H. K., Aoki K.R., Autti-Rämö I. et al.: Recommendations for the use of botulinumtoxin type A in the management of cerebralpalsy. *Gait and Posture* 2000; 11: 67–79.
- [37] Sarioglu B., Serdaroglu G., Tutumcuoglu S. et al.: The Use of Botulinum Toxin Type A Treatment In Children With Spasticity. *PediatrNeurol* 2003; 29: 299–301.
- [38] Wądołowska B., Sińczuk B., Leczenie zaburzeń chodu u dzieci z mózgowym porażeniem dziecięcym przy pomocy wysokich dawek toksyny botulinowej i rehabilitacji w systemie kierowanego nauczania – badania wstępne, Centrum Rehabilitacji im.prof. Mariana Weissa w Konstancinie, Oddział XVII w Warszawie, 2009.
- [39] Mirska A., Kułak W., Terapia spastyczności toksyną botulinową w mózgowym porażeniu dziecięcym, Klinika Rehabilitacji Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, 2009.
- [40] Albanese A, Bhatia K, Bressman SB, DeLong MR, Fahn S, Fung VS, Hallett M, Jankovic J, Jinnah HA, Klein C, Lang AE, Mink JW, Teller JK. Phenomenology and classification of dystonia: a consensus update. *MovDisord*. 2013 Jun 15;28(7):863-73.
- [41] Travis J.W. Hassell, David Charles, Treatment of Blepharospasm and Oromandibular Dystonia with Botulinum Toxins, Department of Neurology, Vanderbilt University Medical Center, 2020 Apr.
- [42] Simpson D.M., Blitzer A., Brashear A. i wsp. Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. Assessment: Botulinum neurotoxin for the treatment of movement disorders (anevidence -basedreview): report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2008; 70: 1699-1706.
- [43] Sławek J., Car H., Bonikowski M., Bogucki A., Koziarowski D., Potulska-Chromik D., Rudzińska M., Czy wszystkie preparaty toksyny botulinowej typu A są takie same? Porównanie trzech preparatów toksyny botulinowej typu A w zarejestrowanych wskazaniach w neurologii, *Neurologia i Neurochirurgia Polska* 2010; 44, 1: 43–64.

- [44] Popescu M. N., Popescu Stella I., Cernat C. C., Boariu A. M., Călin E., Vieru A., Mușat O., Injecting botulinumtoxin into the treatment of blepharospasm, Ophthalmology Department, “Dr. Carol Davila” Central University Military Emergency Hospital, Bucharest, Romania; Elias University Hospital, Bucharest, Romania. *Mai* 2018, 62(2): 162-165.
- [45] Evers S, Afra J, Frese A, et al. European Federation of Neurological Societies. EFNS guideline on the drug treatment of migraine – revised report of an EFNS taskforce. *Eur J Neurol*. 2009; 16(9): 968–981.
- [46] Simpson DM, Hallett M, Ashman EJ, et al. Practice guideline update summary: Botulinum neurotoxin for the treatment of blepharospasm, cervical dystonia, adult spasticity, and headache: Report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2016; 86(19): 1818–1826.
- [47] Luvisetto S, Gazerani P, Cianchetti C, et al. Botulinum Toxin Type a as a Therapeutic Agent against Headache and Related Disorders. *Toxins (Basel)*. 2015; 7(9): 3818–3844.
- [48] Jabbari B, Machado D. Treatment of refractory pain with botulinum toxins--an evidence-based review. *Pain Med*. 2011; 12(11): 1594–1606.
- [49] Boczarska-Jedynak M., Sławek J., Praktyczne aspekty leczenia migreny przewlekłej toksyną botulinową typu A, *Polski Przegląd Neurologiczny* 2017; 13 (4): 189–198.
- [50] Okeson J., Leczenie dysfunkcji narządu żucia i zaburzeń zżarcia. Czelej, Lublin 2005.
- [51] Coleman K., Zastosowanie toksyny botulinowej w zabiegach odmładzania skóry twarzy. Urban&Partner Wrocław 2004.
- [52] Sławek J., Banach A., Członkowska A., Fridman A., Krawczyk M., Kwolek M., Opara J., Ochudło S., Zaborski J., Toksyna botulinowa typu A w leczeniu spastyczności u dorosłych– stanowisko interdyscyplinarnej grupy ekspertów. *Neurologia i Neurochirurgia Polska*, 2004, 38, 6, 443-445.
- [53] Domżał T., Toksyna botulinowa w praktyce lekarskiej – dystonie, spastyczność i inne wskazania do leczenia. Podręcznik. Czelej 2002, wyd. 1.
- [54] Pihut M., Wiśniewska G., Majewski S., Domięśniowe iniekcje toksyny botulinowej typu A w leczeniu bólowej postaci dysfunkcji narządu żucia –

- wyniki badań pilotażowych, Z Katedry i Zakładu Protetyki Stomatologicznej Instytutu Stomatologii CMUJ Pracowni Zaburzeń Czynnościowych. 2009 Jan.
- [55] Sammons JE, Khachemoune A., Axillaryhyperhidrosis: a focusedreview. *J Dermatolog Treat.* 2017 Nov;28(7):582-590.
- [56] Menzinger S., Quenan S., Evaluation and management of hyperhidrosis. *RevMed Suisse.* 2017 Mar 29;13(556):710-714.
- [57] Romero FR, Haddad GR, Miot HA, Cataneo DC., Palmarhyperhidrosis: clinical, pathophysiological, diagnostic and therapeuticaspects. *An Bras Dermatol.* 2016 Nov-Dec;91(6):716-725.
- [58] Delort S, Marchi E, Corrêa MA., Oxybutynin as an alternativetreatment for hyperhidrosis. *An Bras Dermatol.* 2017 Mar-Apr;92(2):217-220.
- [59] Al-Hashel JY, Youssry D, Rashaed HM, Shamov T, Rousseff RT. Botulinum toxin A for palmarhyperhidrosis: assessment with sympathetic skin responseevoked by train of stimuli. *AutonAutacoidPharmacol.* 2016 Jul;36(3-4):23-26.
- [60] Hosp C, Hamm H. Safety of available and emergingdrugtherapies for hyperhidrosis. *Expert Opin DrugSaf.* 2017 Sep;16(9):1039-1049.
- [61] Wydro D. M., A treatment of axillary and palmaryhyperhidrosis by mesoporation with botulinumtoxin A, *Academy of Cosmetics and HealthCare.* 2010 Jun; 9.
- [62] Wydro D. M., A treatment of axillary and palmaryhyperhidrosis by mesoporation with botulinumtoxin A, *Academy of Cosmetics and HealthCare.* 2010 Jun; 11-24.
- [63] Przyłipiak A., *Podstawy Medycyny Estetycznej*, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, 2014.

ZASTOSOWANIE OSOCZA BOGATOPŁYTKOWEGO ORAZ FIBRYNY BOGATOPŁYTKOWEJ, JAKO OBIECUJĄCA INNOWACJA W DZIEDZINACH STOMATOLOGII

Sara Długosz, Kacper Ruchała, Klaudia Gryczka, Michał
Maćkowski, Anna Krawczyk, Agata Pokrzywa

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

Abstrakt: Zastosowanie osocza bogatopłytkowego (PRP- Platelet Rich Plasma) oraz fibryny bogatopłytkowej (PRF- Platelet Rich Fibrine) w obrębie jamy ustnej stało się obiecującym narzędziem w wielu aspektach stomatologii. Niniejszy artykuł ma na celu przedstawienie właściwości i dziedzin zastosowania PRP oraz PRF na podstawie aktualnej literatury. PRP i PRF to pochodne krwi o charakterze czysto autologicznym, oznacza to, że są uzyskiwane z krwi pobranej od pacjenta. Preparaty te stanowią źródło szerokiej gamy czynników wzrostu o roli kluczowej w regeneracji i stymulacji naturalnych procesów naprawy tkanek. Biozgodność, stosunkowa łatwość procesu pozyskiwania i przygotowania preparatu składają się na oszczędność czasu oraz kosztów, a co najważniejsze na efektywność leczenia. Te skoncentrowane źródła czynników wzrostu, mają znaczący potencjał w szeregu dziedzin, takich jak stomatologia dziecięca, periodontologia, implantologia czy chirurgia stomatologiczna oraz chirurgia szczękowo-twarzowa. Efekt ich działania, w postaci inicjacji procesów regeneracyjnych, wspomaganie odbudowy tkanki kostnej oraz tkanek miękkich to gwarancja szybszej rekonwalescencji po różnorodnych zabiegach.

Słowa kluczowe: PRP, PRF, czynniki wzrostu, wspomaganie regeneracji tkanek

Abstract: The use of Platelet Rich Plasma (PRP) and Platelet Rich Fibrin (PRF) within the oral cavity has become a promising tool in many aspects of dentistry. This article aims to present the characteristics and applications of PRP and PRF on the basis of current literature. PRP and PRF are purely autologous blood derivatives, which means that they are obtained from blood taken from the patient. These substances are a source of a wide range of growth factors that play a key role in regeneration and stimulation of natural tissue repair processes. Biocompatibility, relative ease of the process of obtaining and preparing the preparation contribute to saving

time and costs, and most importantly, to the effectiveness of treatment. Concentrated sources of growth factors have significant potential in a number of fields, such as paediatric dentistry, periodontology, implantology, dental surgery and maxillofacial surgery. The effect of their action, in the form of initiation of regenerative processes, supporting the reconstruction of bone and soft tissues, is a guarantee of faster postoperative convalescence.

Keywords: PRP, PRF, growth factors, supporting tissue regeneration

1. WPROWADZENIE

Wielokrotność preparatów zawierających płytki krwi stała się źródłem rozważania nad możliwościami ich użytkowania. Lekarze i naukowcy badają wykorzystanie PRP (Platelet Rich Plasma- osocze bogatopłytkowe) i PRF (Platelet Rich Fibrine- fibryna bogatopłytkowa) w stomatologii, jako sposobu na wzmocnienie naturalnych mechanizmów gojenia się ran w organizmie. Dyskusja ta ma na celu przegląd oraz porównanie zastosowania oraz wszelkich właściwości, jakie posiadają te materiały. Główną koncepcją badań nad PRF oraz PRP było określenie metod, dzięki którym mogłyby być użyte w różnych gałęziach stomatologii. Zasadniczym argumentem, który przemawiał za potrzebą ich stosowania jest zdolność do skutecznej promocji regeneracji zarówno kości, jak i tkanek miękkich, a także zmniejszanie krwawienia [1]. Terapia z wykorzystaniem tych preparatów opiera się na zasobach, których sposób przygotowania jest stosunkowo łatwy, a koszty eksploatacji są umiarkowane. Równie istotną zaletą jest bezpieczeństwo stosowania autologicznego PRP i PRF, gdyż w przypadku preparatów allogenicznych istnieje możliwość reakcji alergicznej lub wprowadzenia do organizmu drobnoustrojów. Autologiczność wymienionych preparatów oznacza, że biorcą i dawcą jest jedna osoba, co eliminuje ryzyko przeniesienia drobnoustrojów od obcego dawcy. Zdecydowaną innowacją w stomatologii jest zastosowanie osocza bogatopłytkowego i fibryny bogatopłytkowej- skoncentrowanej zawiesiny czynników wzrostu występujących w płytkach krwi. Te czynniki wzrostu stanowią promotory zaangażowane w gojenie się ran i regenerację tkanek [2].

2. OSOCZE BOGATOPLĄTKOWE PRP

Osocze bogatopłytkowe (PRP) definiujemy, jako wysokie stężenie autologicznych płytek krwi w małej objętości autologicznego osocza [3]. Płytki zawarte w tym koncentracji osocza autologicznego zawierają kompleks

czynników wzrostu, które promują proliferację, chemotaksję i różnicowanie komórek, które są istotne dla osteogenezy. Tak więc, oprócz działania prokoagulującego, PRP jest źródłem czynników wzrostu zaangażowanych w inicjowanie i podtrzymywanie gojenia się ran poprzez przyspieszenie naprawy kości, promowanie proliferacji fibroblastów i zwiększenie unaczynienia tkanek [4]. Główne efekty PRP wywodzą się z PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*- płytkopochodny czynnik wzrostu), który został zidentyfikowany, jako ważne białko w zakresie gojenia tkanek twardych i miękkich. Wykazano, że PDGF stymuluje chemotaksję, mitogenezę i replikację komórek macierzystych w miejscu uszkodzenia tkanki. PDGF stymuluje również produkcję fibronektyny, cząsteczki adhezji komórkowej stosowanej w proliferacji komórek i migracji podczas gojenia, a także pomaga w promowaniu obkurczania i przebudowie ran [5]. Po raz pierwszy wiadomości o klinicznym zastosowaniu PRP ukazały się w 1998r. Marx oraz inni, wykorzystali osocze bogate w płytki w rekonstrukcji żuchwy, którą poprzedzało usunięcie guza w jej obrębie. PRP zastosowali w celu integracji przeszczepu szpiku kostnego. Z badań wynikało, że użycie PRP w tym przypadku, znacznie przyspieszyło czas tworzenia się kości i regeneracji pooperacyjnej [6]. Powyższe badania pokazują wiele zalet PRP, które mają istotny wpływ na zdrowie pacjentów, wśród nich może wymienić szybsze gojenie tkanek i wspomaganie ich unaczynienia w trakcie regeneracji, zmniejszenie intensywności krwawienia oraz dostarczanie czynników wzrostu, które wraz z materiałami zastępczymi kości warunkują regenerację [7].

2.1. Klasyfikacja PRP

Klasyfikacja postaci osocza bogatego w płytki krwi przedstawia się następująco, wyróżniamy: czyste osocze bogatopłytkowe (P-PRP) oraz osocze bogate w leukocyty i płytki krwi (L-PRP) [8]. Osocze bogatopłytkowe, a także fibryna bogatopłytkowa stanowią pochodne krwi, które są bogatym źródłem czynników wzrostu (Tabela 1.). To właśnie dzięki nim mają tak duży udział w regeneracji tkanek i gojeniu ran w leczeniu stomatologicznym. W 2012 r. DeLong opublikował system klasyfikacji „PAW”, w którym zaleca się zgłaszanie PRP w oparciu o trzy elementy: bezwzględną liczbę płytek krwi (P), sposób, w jaki następuje aktywacja płytek krwi (A) oraz obecność lub brak białych krwinek (W). Liczbę płytek krwi sklasyfikowano jako P1 (\leq wartości wyjściowej [tj. stężenie w pełnej krwi]) do P4 ($> 1,2 \times 10^6$ płytek/ml), aktywację płytek krwi jako egzogenną lub nie, a obecność białych krwinki

i neutrofile, jako powyżej lub poniżej wartości wyjściowej [9]. Należy zaznaczyć, że systemy klasyfikacji służą do użytecznej kategoryzacji istotnych składników PRP, co może być pomocne w określaniu podejścia terapeutycznego przez lekarzy. Dlatego też omówione różnicowanie form PRP musi być starannie opracowane, w celu uniknięcia wyciągania nieprawidłowych wniosków w trakcie porównywaniu wyników badań klinicznych [10].

Tabela 1. Przedstawia czynniki wzrostu obecne w PRP oraz ich przykładowe funkcje [11].

| Czynnik wzrostu | Przykładowa funkcja |
|---|---|
| Transformujący czynnik wzrostu-b1 (TGF-β1, <i>transforming growth factor-β1</i>) | Promuje tworzenie macierzy pozakomórkowej |
| Czynnik wzrostu fibroblastów (FGF, <i>fibroblast growth factor</i>) | Promuje wzrost i różnicowanie chondrocytów i osteoblastów |
| Płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF, <i>platelet-derived growth factor</i>) | Stymuluje replikację komórek mezenchymalnych i osteoblastów |
| Nabłonkowy czynnik wzrostu (EGF, <i>epidermal growth factor</i>) | Promuje różnicowanie i replikację komórek nabłonkowych |
| Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF, <i>vascular-endothelial growth factor</i>) | Czynnik proangiogeny |
| Insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (IGF-1, <i>insulin-like growth factor 1</i>) | Promuje różnicowanie i replikację osteoblastów |
| Czynnik płytkowy 4 (PF-4, <i>platelet factor 4</i>) | Czynnik chemotaktyczny dla fibroblastów |
| Ludzki płytkopochodny czynnik wzrostu śródbłonka (PDGF, <i>human platelet-derived endothelial growth factor</i>) | Promuje replikację keratynocytów i fibroblastów |

2.2. Mechanizm działania PRP

Mechanizm działania PRP możemy oprzeć na wcześniej omówionym modelu regeneracji tkanki kostnej zuchwy, którego pomysłodawcą był Marx. Swoją rolę w przedstawieniu sposobu działania PRP mają także Wrotniak, Gaździk i Bielecki. Istotnym elementem obserwowanym w trakcie ich badań, była różnica między ubytkiem w tkance kostnej, a jej prawidłowymi fragmentami w zakresie utlenowania. Niższym utlenowaniem charakteryzował się ubytek, ponadto występowała również kwasica, co stało się przyczyną przyciągania makrofagów na drodze chemotaksji. Komórki fagocytyczne wykazują zdolność do oczyszczania rany, jak i stanowią uzupełniające źródło czynników

wzrostu. Procesy regeneracyjne, będące następstwem podania osocza bogatopłytkowego rozpoczynają się wraz z uwolnieniem IGF, PDGF oraz TGF- β 1 z ziarnistości płytek. Każdy z tych czynników odpowiada za odrębną funkcję, zaczynając od PDGF. Jest on odpowiedzialny za zwiększenie liczby komórek macierzystych szpiku kostnego w wyniku zwielokrotnienia intensywności podziałów komórkowych. Dodatkowo warto wspomnieć o wpływie PDGF na powstawanie nowych naczyń włosowatych na terenie przeszczepu. Transformujący czynnik wzrostu- β 1 związany jest ze zwiększaniem liczby dojrzałych osteoblastów i ich stymulowaniu do tworzenia macierzy kostnej. TGF- β 1 pobudza także fibroblasty do produkcji kolagenu, co ma swój udział w angiogenezie. Insulinopodobny czynnik wzrostu przez wpływ na osteoblasty, ma działanie wzmacniające w stosunku do kości. Okres działania pochodnych płytek krwi w obrębie uszkodzonej tkanki jest definiowany jako około 5 dni od podania pacjentowi. Jednak istnieją dwa mechanizmy wydłużenia naprawczego wpływu na tkankę kostną. Pierwszy opiera się na zwiększeniu liczby komórek macierzystych szpiku kostnego, następnie ich różnicowanie do osteoblastów, co w rezultacie będzie prowadziło do wydzielania TGF- β 1 i IGF. Drugi mechanizm bazuje na aktywacji makrofagów, które przejmują obowiązki płytek krwi w zakresie uwalniania czynników wzrostu, w momencie wyczerpania wpływu PDGF. Nowo powstająca kość jest pozbawiona spójności strukturalnej, określamy ją jako kość pierwszej fazy powstającą po około 4 tygodniach od wykonanego przeszczepu. Po upływie kolejnego miesiąca kość będzie podlegała resorpcji i reorganizuje się w kość II fazy, tj. kość blaszkowatą. Za wymienione przemiany odpowiada głównie IGF^[12].

2.3. Przedoperacyjne przygotowanie PRP

PRP jest przygotowywany w laboratorium lub w gabinecie stomatologicznym z krwi pobranej do pacjenta w okresie przedoperacyjnym^[13,14]. Pierwszym etapem w produkcji PRP jest pobranie krwi od pacjenta. Następnie umieszczamy ją w komercyjnie dostępnych probówkach, proces ten poprzedzony jest zmieszaniem krwi z antykoagulantem- cytrynianem sodu. Probówki z zawartością podlegają odwirowaniu standardowo z prędkością 1900 RPM w ciągu 8 minut, w celu wyekstrahowania warstwy płytek krwi z niewielką ilością osocza^[15]. W ten sposób przygotowany produkt jest gotowy do podania pacjentowi. Długość trwania pełnego procesu przygotowania PRP trwa około 20 minut. W momencie wprowadzenia PRP w docelowe miejsce, podaje się w postaci iniekcji jednocześnie trombinę lub chlorek

wapnia w celu poprawy hemostazy. Jak wykazali Harrison i pozostali, sposób aktywacji płytek krwi determinuje dynamikę wydzielania zawartych w nich czynników wzrostowych. Użycie trombiny czy chlorku wapnia, warunkuje natychmiastowe uwolnienie czynników. Aktywacja naturalna, która zachodzi pod wpływem kontaktu docelowej tkanki z kolagenem, sprzyja stopniowemu uwalnianiu czynników i dłuższej ekspozycji tkanek na ich utrzymujące się stężenie- co charakteryzuje fibrynę bogatą w płytki krwi ^[16]. Kluczem w preparatyce PRP jest odpowiedni dobór warunków, które będą zapobiegały zbyt wczesnej aktywacji płytek krwi, a co za tym idzie zbyt wczesnemu uwolnieniu czynników wzrostu. Dlatego tak ważne, jest zwrócenie uwagi na czas przygotowania preparatu, sposób jego pobrania, czas wirowania, a także wykorzystywane antykoagulanty i inne środki aktywujące dodawane do osocza bogatopłytkowego ^[17].

2.4. Ryzyko stosowania PRP

Obecnie stosowane terapie PRP są innowacyjnymi opcjami leczenia z klinicznymi korzyściami, o czym świadczą zachęcające wyniki badań klinicznych z udziałem pacjentów ^[18]. Mimo wielu mocnych stron terapii PRP nie można zapomnieć, iż mogą w jej trakcie występować także pewne skutki uboczne. W związku z potrzebą wkłucia w celu uzyskania materiału od pacjenta, należy pamiętać, że wszystkie zasady higieny w trakcie procedury muszą być bezwzględnie przestrzegane. Do podstawowych zasad należy stosowanie nowej pary rękawiczek, dezynfekcja miejsca wkłucia oraz utrzymywanie pomieszczenia, w którym przeprowadza się pobieranie krwi w higienicznych warunkach. Elementy te pozwalają na redukcję ryzyka zakażenia preparatu drobnoustrojami. W związku z tym, że podczas zabiegów, z wykorzystaniem iniekcji PRP, dochodzi do przerwania ciągłości powłok, stwarza to kolejne ryzyko infekcji oraz mechanicznego uszkodzenia tkanek. W związku z tym, że osocze bogatopłytkowe jest preparatem indukującym proces krzepnięcia, w momencie nieprawidłowego wprowadzenia go do naczynia krwionośnego istnieje ryzyko wystąpienia procesu wykrzepiania wewnątrznaczyniowego. W niektórych przypadkach niepożądane reakcje, wynikają z uruchomienia procesów obronnych organizmu przez PRP. Badania wykazały, że stosowanie w przeszłości trombiny bydłczej, jako inicjatora aktywacji PRP, wywoływało u niektórych pacjentów reakcje immunologiczne, ze względu na wytwarzanie przez organizm pacjenta przeciwciał skierowanych przeciwko obcym białkom w preparacie. Stosowanie terapii z użyciem PRP nie powinno być

wykorzystywane w przypadku pacjentów z zaburzeniami krzepnięcia krwi, małopłytkowością lub hipofibrynogenią ^[19]. PRP nie jest także zalecane kobietom karmiącym lub w ciąży oraz osobom u których zdiagnozowano nowotwory lub w trakcie leczenia infekcji. Ze względu na wszelkie możliwości wystąpienia reakcji niepożądanych, obowiązkiem lekarza jest poinformowanie o nich pacjenta przed wykonanym zabiegiem ^[20].

3. FIBRYNA BOGATOPŁYTKOWA

Fibryna bogatopłytkowa to koncentrat płytek krwi nowej generacji, który znalazł zastosowanie głównie w stomatologii, chirurgii jamy ustnej i chirurgii szczękowo-twarzowej. Procedura podawania PRF jest prostsza w stosunku do PRP, ponieważ nie wymaga dostarczenia substancji w postaci antykoagulantów czy aktywatorów. Działanie PRF zachodzi w sposób naturalny i w porównaniu z aktywowanym PRP, będzie charakteryzować się bardziej elastyczną sieć fibrynową, w której komórki są zdolne do migracji, a okres wydzielania czynników wzrostu jest wydłużony ^[21]. Na przestrzeni lat dostarczone zostały informacje, który umożliwiły opisanie działania PRF, która za sprawą swoich właściwości stanowi jeden z ważniejszych filarów i innowacji w pracy lekarza-dentysty. PRF cieszy się dużym zainteresowaniem w środowisku stomatologicznym ze względu na proponowane właściwości regeneracyjne i zdolność wspomaganie gojenia się ran.

3.1. Otrzymywanie oraz mechanizm działania PRF

Fibryna bogata w płytki krwi jest materiałem autogennym, jest stosowany w celu poprawy gojenia się ran i regeneracji tkanek. PRF klasyfikujemy na czystą bogatą w płytki fibrynę (P-PRF), fibrynę bogatą w leukocyty i płytki krwi (L-PRF) i wstrzykiwalny PRF (I-PRF) ^[22]. Sugeruje się, że PRF ma bezpośredni wpływ na poprawę gojenia się ran pacjenta poprzez uwolnienie i nasycenie czynnikami wzrostu miejsc o przerwanej ciągłości tkanek, co w rezultacie będzie sprzyjało ich gojeniu. Zachodzi to za sprawą faktu, iż w odpowiednim czasie uwalniane zostają zawarte w PRF czynniki wzrostu oraz cytokiny. Po okresie zapalnym, którego czas trwania wyznaczamy jako 1-4 dni, następuje etap proliferacji (2-22 dni), w trakcie, którego dochodzi do procesów takich jak- angiogeneza, gromadzenie kolagenu oraz tworzenie nowej tkanki łącznej obfitującej w naczynia włosowate. Końcowym etapem jest dojrzewanie i przebudowa kolagenu, która obejmuje dłuższy okres czasu,

nawet do 12 miesięcy ^[23]. Klinicznie, PRF charakteryzuje się łatwym pozyskaniem z własnej krwi pacjenta. Autologiczny charakter PRF sprawia, że jest ona preferowana nad alloprzeszczepami stosowanymi w stomatologii. Istnieje prawdopodobieństwo, że wraz z rozwojem badań nad PRF może ona wyprzeć z czasem osocze bogate w płytki z użytku. Wszystko to za sprawą swoich zalet, najważniejsze to autogenność, niskie koszty otrzymania, oszczędność czasu, łatwa technika pozyskiwania i przedłużone uwalnianie czynnika wzrostu. Bogactwo jej wykorzystania opiera się na leczeniu recesji dziąseł, sterowanej regeneracji kości w implantologii i endodontycznych wadach kości ^[24]. PRF ma niezwykle właściwości regeneracyjne dla tkanek miękkich i twardych, nie wywołując żadnych reakcji zapalnych ^[21].

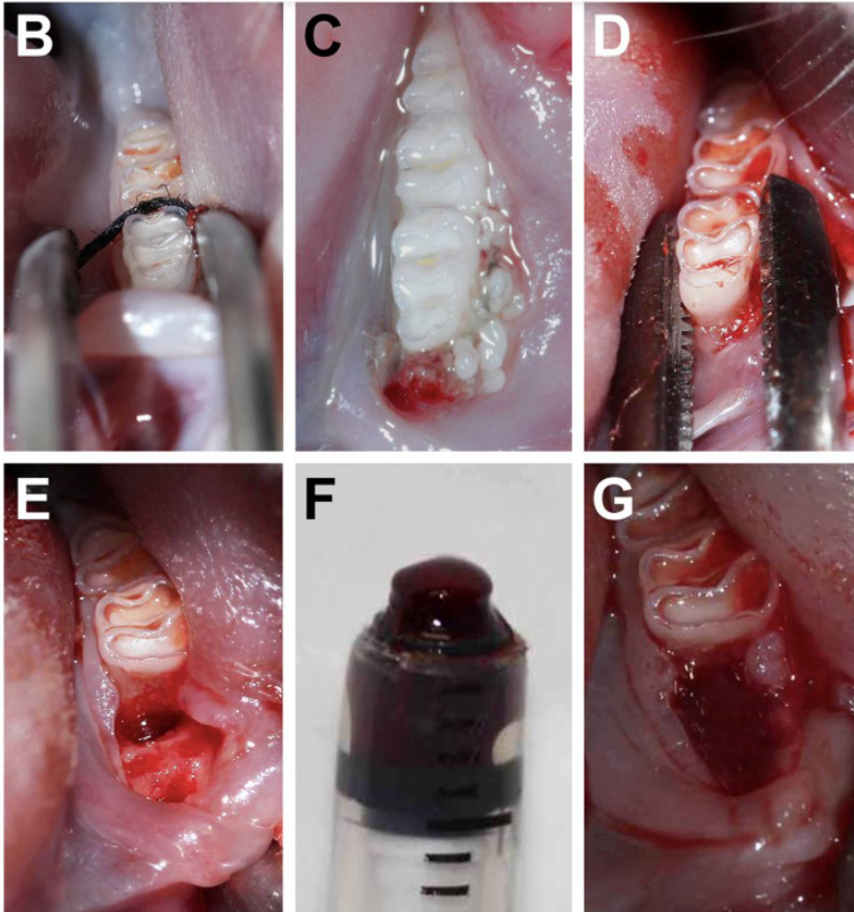
4. PERIODONTOLOGIA

Periodontologia stanowi jedną z dziedzin stomatologii, jest głównym zagadnieniem są choroby przyzębia oraz błony śluzowej jamy ustnej. Choroby przyzębia są definiowane jako stany zapalne, zazwyczaj o pochodzeniu zakaźnym, które docelowo mają wpływ na tkanki zębowe. W wyniku ich rozwoju może dojść do stanu, jaki określamy mianem zapalenia dziąseł i przyzębia. Do rozwoju zapalenia dziąseł przyczyniają się bakterie obecne w jamie ustnej, natomiast nielezione prowadzi do zapalenia przyzębia. Warto zaznaczyć, że nielezione stany zapalne w obrębie jamy ustnej prowadzą do objawów ogólnoustrojowych. Dlatego tak ważną innowacją dla tej dziedziny stała się możliwość wykorzystania PRP oraz PRF, które znacząco wpływają na regenerację tkanek przyzębia ^[25]. Regeneracja przyzębia ma na celu zachowanie zębów przy jednoczesnym przywróceniu połączenia między tkankami twardymi zęba i przyzębia. Cel ten jest wysoce osiągalny dzięki nowym technologiom włączającym użycie preparatów bogatych w płytki. Choroby przyzębia są uważane za problem zdrowia publicznego na całym świecie, ze względu na ich wysoką częstość występowania w krajach rozwiniętych i rozwijających się ^[26]. Autologiczne osocze bogatopłytkowe to przetworzona płynna frakcja krwi obwodowej pacjenta, która zawiera stężenie płytek krwi powyżej wartości wyjściowej. Zatem za sprawą swoich właściwości, stanowi klucz do regeneracji struktur podtrzymujących zęby zniszczonych przez zapalenie przyzębia, co jest głównym celem terapii periodontologicznej ^[27].

4.1. Mechanizm działania PRP w zakresie periodontologii

Mechanizm zachodzi za pośrednictwem systemów molekularnych homologicznych do mechanizmów innych komórek wydzielniczych, które są wyjątkowo sprzężone z aktywacją komórkową poprzez wewnątrzkomórkowe zdarzenia sygnalizacyjne [26]. Czynniki wzrostu są następnie uwalniane z płytek krwi i przyczyniają się do chemotaksji, różnicowania i metabolizmu komórek biorących udział w gojeniu się ran [8]. Podczas gojenia się ran przyzębia po egzogenym zastosowaniu PRP, dostarczanie autologicznych płytek krwi do rany zwiększają lokalne stężenia czynników wzrostu, które następnie wywierają regulacyjny wpływ na homeostazę tkanek przyzębia i modyfikują reakcje tkanek miękkich i twardych przyzębia w celu poprawy wyników gojenia. Poprzez dodanie PRP do alloprzeszczepu kostnego w sterowanej regeneracji tkanek zaobserwowali znaczną poprawę w klinicznym wstawianiu i wypełnianiu kości [28]. Wskazane jest przeprowadzenie długoterminowych badań z dużą liczbą próbek w celu dalszego zbadania wpływu PRP na procedury regeneracji przyzębia oraz zweryfikowania wyników badań in vitro w ocenach klinicznych. W jednej z prac naukowych znajdują się informacje o zastosowaniu autologicznego osocza bogatopłytkowego w procedurze replantacji przyzębia z udziałem prawego dolnego siekacza środkowego z 18-miesięczną obserwacją. Preparat PRP zawiera koncentraty płytek krwi i wysokie poziomy czynniki wzrostu. Materiał ten promuje czas gojenia w wielu różnych miejscach. W opisanym przypadku zęb z ciężkim złamaniem przyzębia był leczony PRP z zabiegiem zamierzonego przeszczepu. Ząb ten był uprzednio leczony leczeniem kanałowym. Ząb został usunięty i przeszczepiony autologicznym PRP. Obserwacja przez 18 miesięcy wykazała powstawanie nowych kości wokół wierzchołkowej części korzenia, a wszystkie parametry kliniczne wskazywały na tendencję do gojenia. Wynika z tego, że celowe przeszczepienie z zastosowaniem PRP może wywołać gojenie się ran i stymulację tworzenie się kości [29]. Czynniki wzrostu obecne w PRP są zdolne do promocji proliferacji fibroblastów i regulują ekspresję kolagenu typu I przez komórki więzadła przyzębia (*Periodontal Ligament*- PDL). Zatem stosowanie PRP w miejscach urazów może sprzyjać gojeniu się ran i regeneracji tkanek miękkich przyzębia [30]. Przeprowadzone badania potwierdziły, że PRP może stymulować namnażanie, przyłączanie i migrację komórek PDL. Stwierdzono, że liczba komórek po leczeniu PRP (grupa II-5% PRP i III-10% PRP) była znacząco wyższa niż w grupie bez PRP (grupa I). Badanie to wykazało, że liczba komórek fibroblastów PDL przyłączonych do płytek zębiny

znacznie wzrosła w grupie 10% PRP w porównaniu z grupą 5% PRP i grupą kontrolną ^[31]. Na podstawie eksperymentalnego badania przeprowadzonego na szczurach obserwujemy sposób aplikacji preparatu PRP wykorzystanego w leczeniu zapalenia przyzębia (Zdjęcie 1.). Kolejnym ważnym aspektem jest zdolność tych czynników do przyspieszenia naprawy kości poprzez zwiększenie podziałów komórkowych osteoblastów i unaczynienia tkanek, co stanowi kolejny przydatny element w terapii periodontologicznej ^[32].



Zdjęcie 1. Schemat ilustrujący procedurę aplikacji PRP doświadczalnie przeprowadzoną podczas badania na szczurach “(B) Podwiązanie zainstalowane w dolnym pierwszym trzonowym, aby wywołać eksperymentalne zapalenie przyzębia. (C) Eksperymentalnie wywołane zapalenie przyzębia trzy tygodnie po założeniu ligatury. (D) Zabieg chirurgiczny ekstrakcji zęba. (E) Kliniczny aspekt miejsca ekstrakcji przed zastosowaniem PRP. (F) Aspekt PRP aktywowany. (G) Kliniczny aspekt miejsca ekstrakcji po zastosowaniu PRP.” ^[33].

5. CHIRURGIA W OBREBIE JAMY USTNEJ

Zdolności regeneracyjne PRP zostały dokładnie poznane w ciągu ostatnich dwóch dekad. Kluczowym celem stosowania PRP w chirurgii jamy ustnej jest regeneracja nowych tkanek podczas procesu gojenia. Płytki krwi w PRP uwalniają pulę czynników wzrostu, które rekrutują komórki naprawcze i promują kilka procesów biologicznych niezbędnych do naprawy tkanek miękkich i regeneracji kości [11]. Co więcej, PRP jest autologiczny i stosunkowo łatwy do przygotowania nawet na etapie gabinetu stomatologicznego. Zastosowanie PRP dostarcza zatem nowe rozwiązania w dziedzinie naprawy i regeneracji tkanek w chirurgii jamy ustnej.

5.1. Zastosowanie PRP w zakresie chirurgii jamy ustnej

Preparaty zawierające PRP były badane *in vitro* i *in vivo* zarówno w chirurgii szczękowo-twarzowej, jak i chirurgii ogólnej i są obecnie szeroko stosowane [34]. Badacze kliniczni zalecają stosowanie PRP przed lub w połączeniu z implantacją dentystryczną w celu zwiększenia szybkości i jakości regeneracji kości. W wielu badaniach dotyczących chirurgii jamy ustnej i szczękowo-twarzowej, zastosowanie PRP jest na obiecującym poziomie. W zakresie chirurgii kości, jedno z badań oceniło wpływ autologicznych PRP na regenerację kości w złamaniach żuchwy. Dało ono jasne rezultaty, że bezpośrednie zastosowanie PRP wzdłuż linii złamań może poprawić regenerację kości [35]. PRP po odpowiedniej obróbce może być zastosowane do nałożenia na powierzchnię implantu, przylega wówczas do materiału, z którego wykonany jest implant i prowadzi do wytworzenia nowej powierzchni, która może być potencjalnym źródłem aktywności biologicznej. W 2006 roku wykazano, że integracja implantów została wzmocniona przez powlekanie powierzchni implantu PRP przed włożeniem do miejsca docelowego [34]. Wyniki tych badań pokazują, że PRP jest skuteczny w gojeniu tkanek miękkich i regeneracji kości. Połączenie zastosowania PRP z innymi biomateriałami wydaje się być obiecujące pod względem wielu aspektów chirurgii, ale wyniki zależą od użytego materiału. Co istotne obiecujące wyniki uzyskano również w chirurgii implantologicznej, przy użyciu samego PRP jako materiału powlekającego. Istnieje silna relacja pomiędzy stosowaniem osocza bogatego w płytki, a poprawą regeneracji i uzdrawianiem tkanek miękkich i twardych (Tabela 2). PRP może być stosowany jako ważny dodatek do wielu zabiegów w chirurgii jamy ustnej i stomatologicznej. Jak wcześniej wspomniano,

PRP zaaplikowane w miejscu po ekstrakcji zęba z pewnością jest w stanie poprawić gojenie się tkanek miękkich i pozytywnie wpłynąć na regenerację kości [36]. Koncentraty płytek krwi do użytku chirurgicznego są innowacyjnymi narzędziami medycyny regeneracyjnej i zostały szeroko przetestowane w chirurgii jamy ustnej i szczękowo-twarzowej. W dziedzinie przeszczepów kości, implantów i chirurgii rekonstrukcyjnej publikacje naukowe są szczególnie obszerne w temacie stosowania różnych form osocza bogatego w płytki [37].

Tabela 2. Związek między specyficznymi właściwościami PRP, a sprawowanymi dzięki nim funkcjami [36].

| Właściwości PRP | Funkcja |
|--|---|
| Gojenie się ran oraz regeneracja kości. | Ułatwia przyjęcie się implantów i sprzyja wczesnemu tworzeniu się kości wokół implantu. |
| Regeneracja kości w liniach złamań złamania zwichnięcia. | Poprawia regenerację kości wzdłuż linii złamań, ułatwia gojenie i kontrolę krwawienia. |
| Podniesienie dna zatoki szczękowej. | Przyspiesza tworzenie nowych kości i zwiększa ich gęstość. |

5.2. Zastosowanie PRF w zakresie chirurgii jamy ustnej

Aktualna literatura dostarcza wiedzy na temat stosowania PRP i PRF, także podczas wszczepiania implantu. Szczególnie w celu obróbki powierzchniowej do stymulacji integracji z tkanką kostną, leczeniu wad kości w okolicy implantu podczas implantacji w niewystarczającej objętości tkanki kostnej lub w okresie natychmiastowym po ekstrakcji oraz różnych złożonych zabiegów wspomaganych implantem [34]. Inne potencjalne zastosowania koncentratów płytek krwi są również podkreślane w chirurgii rekonstrukcyjnej szczękowo-twarzowej, w leczeniu pacjentów stosujących bisfosfoniany, które zapobiegają nadmiernej utracie gęstości kości, leki przeciwzakrzepowe lub po radioterapii. Należy zwrócić szczególną uwagę na perspektywy w dziedzinie wykorzystania fibryny bogatopłytkowej, poprzez opisanie wykorzystania L-PRF w intencji regeneracji wad kości w okolicy implantu, podczas zabiegu podnoszenia zatok oraz w momencie rozległej rehabilitacji wspartej implantem [38]. Podsumowując, obecnie żyjemy w okresie przejściowym w stosowaniu PRP i PRF w chirurgii jamy ustnej i szczękowo-twarzowej. PRP oraz PRF wykazały się znaczącymi przewagami strategicznymi, które mogłyby uzasadniać ich stosowanie w codziennej praktyce. Historia

koncentratów płytek krwi w chirurgii jamy ustnej i szczękowo-twarzowej pokazuje, jak techniki ewoluują i czasami promują definiowanie nowych koncepcji terapeutycznych i protokołów klinicznych w dzisiejszej erze medycyny regeneracyjnej.

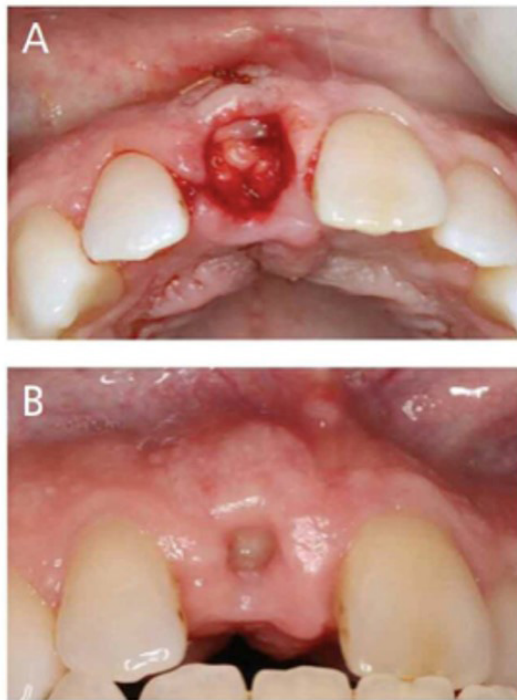
5.3. Ekstrakcja trzeciego trzonowca, czyli tzw. zęba mądrości

Opóźniony powrót do zdrowia oraz możliwe zagrożenia związane z operacją trzecich trzonowców, zniechęcają wielu pacjentów do wizyty u chirurga jamy ustnej i szczękowo-twarzowej. Aby przyspieszyć gojenie w fazie rekonwalescencji, opracowanie bioaktywnych dodatków chirurgicznych, które mają regulować stan zapalny, stanowiło duże wyzwanie w badaniach klinicznych^[39]. Operacja jest powszechnie kojarzona z krótkotrwałym pooperacyjnym bólem i obrzękiem, rzadziej mogą wystąpić stany zapalne, suchy zębodół czy uszkodzenia nerwu trójdzielnego. Włączenie PRP i PRF w terapię poekstrakcyjną koncentruje się na optymalnych metodach w celu poprawy komfortu pacjenta i zminimalizowania powikłań pooperacyjnych. W badaniach obserwowano porównanie zamykania rany z zastosowaniem produktów krwiopochodnych fibryny bogatopłytkowej i osocza bogatopłytkowego. Jednym z nich jest świadomość, że zamykanie rany za pomocą autologicznych koncentratów płytek niesie istotne korzyści również w zakresie ekstrakcji trzecich trzonowców zarówno szczęki, jak i żuchwy^[40].

5.3.1. A-PRF, czyli przełom w terapii poekstrakcyjnej

Zaawansowana fibryna bogata w płytki (A-PRF) należy do koncentratów płytek krwi i jest bogata w liczne czynniki wzrostu. Celem badania była ocena wpływu A-PRF na wybrane cechy kliniczne po chirurgicznym usunięciu uszkodzonych trzecich zębów trzonowych żuchwy. PRF składa się z trójwymiarowej matrycy fibrynowej, bogatej w płytki i leukocyty, zawierającej cytokiny, komórki macierzyste i czynniki wzrostu, stanowiącej biodegradowalne rusztowanie, które przyczynia się do rozwoju mikrounaczynienia i zachęca do migracji komórek^[41,42]. Badania nad skutecznością PRF przeprowadzono na 100 pacjentach o ogólnie dobrym stanie zdrowia, którzy w latach 2018-2019 przeszli zabieg ekstrakcji dolnego trzeciego trzonowca w Klinice Chirurgii Jamy Ustnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Podczas przeprowadzonego badania sprawdzano następujące cechy kliniczne: ból, obecność szczękoscisku lub obrzęku, stosowanie leków przeciwbólowych,

pojawienie się krwinków w obrębie otaczających tkanek, występowania gorączki czy wtórnego krwawienia. Czas krwawienia obserwowany przez pacjenta analizowano w 3, 7 i 14 dniu po zabiegu. Stwierdzono istotny związek pomiędzy wypełnieniem gniazda A-PRF a intensywnością bólu, przyjmowaniem leków przeciwbólowych, szczękościskiem i obrzękiem w 3. i 7. dobie oraz obecnością krwinków i gorączki w 3. dobie po zabiegu. Badanie wykazało, że w zmniejszaniu częstości występowania powikłań pooperacyjnych A-PRF był ważniejszy niż pozostałe standardy stosowane w typowym zabiegu ekstrakcji^[43]. Czynniki wzrostu, których źródłem jest A-PRF zmniejszają powikłania pooperacyjne, takie jak ból, obrzęk, przyjmowanie środków przeciwbólowych, obecność krwinków i szczękościsku, po ekstrakcji trzecich trzonowców oraz ekstrakcji siekacza (Zdjęcie 2.). W stomatologii z zakresu ekstrakcji trzeciego trzonowca stosuje się A-PRF w leczeniu i stymulowaniu procesu gojenia, w celu zmniejszenia ryzyka powikłań pooperacyjnych. Metoda oparta na wypełnianiu gniazda PRF może być jedną z najlepszych metod przyspieszających rekonwalescencję^[44].



Zdjęcie 2. Przedstawia ilustracje procedury wypełnienia gniazda ekstrakcyjnego przeprowadzoną przy użyciu przeszczepu bogatego w PRF (A). Zmiany po 10 dniach po zabiegu (B)^[45].

6. STOMATOLOGIA WIEKU ROZWOJOWEGO

Osocze bogatopłytkowe jest jednym z najbogatszych źródeł czynników wzrostu wspomagających regenerację kości, który znalazł również zastosowanie kliniczne w stomatologii dziecięcej. Na podstawie obecnie znanych zalet i niedawnych zastosowań, PRP okazuje się nieocenionym narzędziem dla pediatrycznych chirurgów stomatologicznych na całym świecie [46]. Powołując się na wiele opisanych przypadków z użyciem otrzymanej fibryny bogatej w płytki, można w dzisiejszych czasach zaprezentować jej funkcję również w stomatologii wieku rozwojowego. Szczególną uwagę należy zwrócić na jej użycie w przypadku leczenia zębów stałych dotkniętych problemem nieukończonego rozwoju korzenia. Do przyczyn tego zjawiska można zaliczyć urazy lub zaawansowaną próchnicę, która wymaga leczenia na specjalistycznym poziomie. Taki uszkadzający bodziec, może doprowadzić nawet do zapalenia i martwicy miazgi. Apeksogeneza, to pojęcie określające prawidłowy proces rozwoju korzenia, który pobudzany jest przez komórki miazgi, zazwyczaj jego okres trwania wyznaczany jest jako 3 lata od wyrżnięcia zęba. W leczeniu tej przypadłości znajduje zastosowanie PRF, dzięki procesowi apeksyfikacji, który zapewnia pobudzenie dalszego wzrostu korzenia oraz udroźnieniu dopływu krwi do wymagającego obszaru. Natomiast ze względu na intensywność zdolności regeneracyjnych miazgi zęba, zalecane jest pozostawienie chociaż niewielkiej jej części w okolicy wierzchołka. Podsumowując, koncentraty płytek krwi są innowacyjnymi powstającymi wewnątrz organizmu środkami terapeutycznymi [46]. Owe produkty zyskały duże zainteresowanie w różnych dyscyplinach stomatologicznych ze względu na ich potencjalną zdolność do stymulowania i zwiększania regeneracji tkanek miękkich i twardych. W stomatologii wieku rozwojowego wykorzystano także działanie produktów pochodzących z płytek krwi, które zawierają szeroki zakres czynników wzrostu. Są nie tylko produktami leczniczymi, ale autologicznymi koncentratami krwi zawierającymi aktywne cząsteczki. Chociaż istnieje wiele badań analizujących właściwości tych biomateriałów zarówno in vivo, jak i in vitro, metoda ze względu na swoją nowoczesność wymaga ciągłego doskonalenia i poznawania nowych zastosowań [47].

7. PODSUMOWANIE

PRP jest preparatem autologicznym, wykorzystującym własną krew pacjenta w niewielkiej ilości. Ponieważ jest wolny od potencjalnych zagrożeń

dla pacjentów, jak na przykład ryzyko reakcji immunologicznej, nie jest trudny do uzyskania i zastosowania, PRP może być stosowany, jako ważny dodatek do wielu zabiegów w chirurgii stomatologicznej. Koncentraty bogate w płytki krwi, takie jak PRP i PRF, są innowacjami stosowanymi w inżynierii uszkodzonych tkanek przyzębia. PRP to koncentrat czynników wzrostu uzyskiwany z krwi pełnej i odpowiednio spreparowany ^[14]. Zawarte w nim płytki krwi, które zawierają różne czynniki wzrostu i cytokiny, inicjują i regulują gojenie, a także odgrywają rolę w prawidłowych mechanizmach naprawy tkanek ^[19]. Na podstawie dotychczasowych publikacji można stwierdzić, że terapia PRP jest względnie bezpieczna klinicznie, ponieważ stosuje się w niej preparaty autologiczne ^[2]. Preparatyka PRP jest prosta, tania i szybka, często prowadzona w obecności pacjenta ^[2]. Co istotne PRP ma działanie antybakteryjne, przeciwgrzybicze i łagodzące ból, co umożliwi podawanie mniejszej ilości leków przeciwbólowych ^[48]. Osocze bogatopłytkowe stanowi nowoczesny filar we wspomaganiu procesów naprawczych i regeneracji tkanek, jego stosowanie wspiera różnorodną dziedzinę chirurgii, między innymi chirurgię szczękowo-twarzową, czy chirurgię sercowo-naczyniową. Prawidłowe gojenie tkanek jest czynnikiem priorytetowym wpływającym na sukces terapeutyczny. Efekty działania tych biomateriałów opisano jako rezultat dużej koncentracji płytek krwi, które zawierają szeroki zakres czynników wzrostu. Podsumowując, leczenie PRP wydaje się mieć świetlaną przyszłość w stomatologii klinicznej.

REFERENCJE

- [1] Chomicki-Bindas P, Zakrzewski P, Pomianowski S. Platelet concentrates, as new and promising agent in the orthopedic surgery – an introduction. *Borgis — Post Nauk Med* 2010; 23(2): 153–157.
- [2] Wang C, Xu M, Guo W, et al. Clinical efficacy and safety of platelet-rich plasma in arthroscopic full-thickness rotator cuff repair: A meta-analysis. *PLoS One*. 2019; 14(7): e0220392.
- [3] Marx RE: Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP. *Implant Dent*. 2001, 10: 225-228. 10.1097/00008505-200110000-00002.
- [4] Marx RE: Platelet-rich plasma: a source of multiple autologous growth factors for bone grafts. *Tissue Engineering: Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics*. Edited by: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE. 1999, Chicago: Quintessence, 71-82.

- [5] Yang D, Cheng J, Jing Z, Jin D: Platelet-derived growth factor (PDGF)-AA: a self-imposed cytokine in the proliferation of human fetal osteoblasts. *Cytokine*. 2000, 12: 1271-1274. 10.1006/cyto.2000.0707.
- [6] Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85(6):638–46.
- [7] Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Vasilic N, Madzarevic M, Kenney EB. Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. *J Periodontal Res* 2002; 37(4):300–6]
- [8] Varshney S., Dwivedi A., Pandey V. Antimicrobial effects of various platelet rich concentrates-vibes from in-vitro studies-a systematic review. *J. Oral Biol. Craniofacial Res.* 2019;9:299–305. doi: 10.1016/j.jobcr.2019.06.013.
- [9] Takami A. Guidelines based on scientific evidence for the application of platelet transfusion concentrates. [Rinsho ketsueki] *Jpn J Clin Hematol* 2018;59:2349–2353.
- [10] Dohan Ehrenfest DM, Andia I, Zumstein MA, Zhang CQ, Pinto NR, Bielecki T. Classification of platelet concentrates (platelet-rich plasma-PRP, platelet-rich fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles Ligaments Tendons J* 2014;4:3–9.
- [11] Eppley B.L., Woodell J.E., Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast. Reconstr. Surg.* 2004; 114: 1502–1508.
- [12] Wrotniak M, Bielecki T, Gaździk TS. Current opinion about using the platelet-rich gel in orthopaedics and trauma surgery. *Ortop Traumatol Rehabil.* 2007; 3(6): 227–238.
- [13] Gonshor A. Technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate: background and process. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2002; 22(6):547–57.
- [14] Man D, Plosker H, Winland-Brown JE. The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg* 2001; 107(1):229–37.

- [15] Foster T.E., Puskas B.L., Mandelbaum B.R., Gerhardt M.B., Romeo S.A. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am. J. Sports Med.* 2009; 37: 2259–2272.
- [16] Harrison S., Vavken P., Kevy S. i wsp. Platelet activation by collagen provides sustained release of anabolic cytokines. *Am. J. Sports Med.* 2011; 39: 729–734.
- [17] Jameson C. Autologous Platelet Concentrate for the Production of Platelet Gel. *Laboratory Medicine.* 2007; 38(1): 39–42.
- [18] Nikolidakis D, Jansen JA: The biology of platelet-rich plasma and its application in oral surgery: literature review. *Tissue Engineering: Part B.* 2008, 14: 249-258.
- [19] El-Sharkawy H, Kantarci A, Deady J, Hasturk H, Liu H, Alshahat M, Van Dyke TE: Platelet rich plasma: growth factors and pro- and anti-inflammatory properties. *J Periodontol.* 2007, 78: 661-669.
- [20] Belk J.W., Kraeutler M.J., Houck D.A., Goodrich J.A., Dragoo J.L., McCarty E.C. Platelet-Rich Plasma Versus Hyaluronic Acid for Knee Osteoarthritis: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Am. J. Sports Med.* 2020;17.
- [21] Dohan DM, Choukroun J, Diss A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 101(3): e37–e44. Mariani E., Filardo G., Canella V., Berlingeri A., Bielli A., Cattini L., Landini M.P., Kon E., Marcacci M., Facchini A. Platelet-rich plasma affects bacterial growth in vitro. *Cytotherapy.* 2014;16:1294–1304.
- [22] Mariani E., Filardo G., Canella V., Berlingeri A., Bielli A., Cattini L., Landini M.P., Kon E., Marcacci M., Facchini A. Platelet-rich plasma affects bacterial growth in vitro. *Cytotherapy.* 2014;16:1294–1304.
- [23] Huang FM, , Yang SF, , Zhao JH, et al. Platelet-rich fibrin increases proliferation and differentiation of human dental pulp cells. *J Endod.* 2010; 36 1628–1632.
- [24] Gassling V, Douglas T, Warnke PH, Açil Y, Wiltfang J, Becker ST. Platelet-rich fibrin membranes as scaffolds for periosteal tissue engineering. *Clin Oral Implant Res.* 2010;21:543–549.

- [25] Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Jun;3(1):17038. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.38>
- [26] Forni F, Marzagalli M, Tesi P, Grassi A. Platelet gel: applications in dental regenerative surgery. *Blood Transfus* 2013;11:102–107.
- [27] Tozum TF, Demiralp B. Platelet-rich plasma: a promising innovation in dentistry. *J Can Dent Assoc* 2003;69:664.
- [28] De Obarrio JJ, Arauz-Dutari JI, Chamberlain TM, Croston A. The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: platelet gel biotechnology—case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2000;20:486–497.
- [29] Yu N, Oortgiesen DA, BronckersAL, Yang F, WalboomersXF and Jansen JA 2013 Enhanced periodontal tissue regeneration by periodontal cell implantation *J. Clin. Periodontol.* 40 698–706.
- [30] Kawase T, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H: Platelet-rich plasma-derived fibrin clot formation stimulates collagen synthesis in periodontal ligament and osteoblastic cells in vitro. *J Periodontol.* 2003, 74: 858-864. 10.1902/jop.2003.74.6.858.
- [31] Kanno T, Takahashi T, Tsujisawa T, Ariyoshi W, Nishihara T: Platelet-rich plasma enhances human osteoblast-like cell proliferation and differentiation. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005, 63: 362-369. 10.1016/j.joms.2004.07.016.
- [32] Martínez-Zapata MJ, Martí-Carvajal A, Solà I, Bolibar I, Angel Expósito J, Rodríguez L, García J: Efficacy and safety of the use of autologous plasma rich in platelets for tissue regeneration: a systematic review. *Transfusion.* 2009, 49: 44-56. 10.1111/j.1537-2995.2008.01945.x.
- [33] Statkiewicz, C. et al. Photomodulation multiple sessions as a promising preventive therapy for medication-related osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in rats. *J Photochem Photobiol B.*84, 7–17 (2018).
- [34] Yang LC, Hu SW, Yan M, Yang JJ, Tsou SH, Lin YY. Antimicrobial activity of platelet-rich plasma and other plasma preparations against periodontal pathogens. *J Periodontol* 2015;86:310–318.

- [35] Zhu W, Zhu X, Huang GT, Cheung GS, Dissanayaka WL, Zhang C. Regeneration of dental pulp tissue in immature teeth with apical periodontitis using platelet-rich plasma and dental pulp cells. *Int Endod J* 2013;46:962–970.
- [36] Gentile P, Bottini DJ, Spallone D, Curcio BC, Cervelli V: Application of platelet-rich plasma in maxillofacial surgery: clinical evaluation. *J Craniofac Surg.* 2010, 21: 900-904.
- [37] Anitua EA: Enhancement of osseointegration by generating a dynamic implant surface. *J Oral Implantol.* 2006, 32: 72-76.
- [38] Alain Simonpieri , Marco Del Corso, Alain Vervelle, Ryo Jimbo, Francesco Inchingolo, Gilberto Sammartino, David M Dohan Ehrenfest: Current knowledge and perspectives for the use of platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in oral and maxillofacial surgery part 2: Bone graft, implant and reconstructive surgery. *Curr Pharm Biotechnol .* 2012 Jun;13(7):1231-56.
- [39] Chukwunke FN, Oji C, Saheeb DB. A comparative study of the effect of using a rubber drain on postoperative discomfort following lower third molar surgery. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2008;37(4):341-4.
- [40] imşek Kaya G, Yapıcı Yavuz G, Saruhan N. The influence of flap design on sequelae and quality of life following surgical removal of impacted mandibular third molars: a split-mouth randomized clinical trial. *Journal of Oral Rehabilitation* 2019;00:1-8.
- [41] 12. Upadhyaya V., Arora A., Goyal A. Bioactive Platelet Aggregates: Prp, Prgf, Prf, Cgf And Sticky Bone. *J. Dent. Med. Sci.* 2017;16:5–11.
- [42] Okuda K., Kawase T., Momose M., Murata M., Saito Y., Suzuki H., Wolff L.F., Yoshie H. Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *J. Periodontol.* 2003;74:849–857..
- [43] Xiang X., Shi P., Zhang P., Shen J., Kang J. Impact of platelet-rich fibrin on mandibular third molar surgery recovery: A systematic review and meta-analysis. *BMC Oral Health.* 2019;19:163.

- [44] Gupta A.K., Cole J., Deutsch D.P., Everts P.A., Niedbalski R.P., Panchaprateep R., Rinaldi F., Rose P.T., Sinclair R., Vogel J.E., et al. Platelet-Rich Plasma as a Treatment for Androgenetic Alopecia. *Dermatol. Surg.* 2019;45:1262–1273.
- [45] Apoorv Goel, Justin J. Villanueva, Chandni Batra, Binita Satpathy and Tyler Thompson: Applications for Platelet Rich Fibrin in Dentistry, from *Decisions in Dentistry*. April 2021;7(4):26–28,31.
- [46] Agrawa M, Agrawa V: Platelet Rich Fibrin and its Applications in Dentistry – A Review Article. *NJMDR* 2014; 2(3): 51-58
- [47] Pazera R, Szczepańska J: Nowoczesna metoda leczenia martwicy miazgi w zębach z nieukształtowanym wierzchołkiem – rewaskularyzacja miazgi. Część II. *Nowa Stomatol* 2014; 2: 110-115.
- [48] Kour P, Pudukalkatti PS, Vas AM, et al. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of platelet-rich plasma, platelet-rich fibrin, and injectable platelet-rich fibrin on the standard strains of *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetem-comitans*. *Contemp Clin Dent.* 2018; 9(Suppl 2): S325–S330.

PERSPEKTYWY LECZENIA FARMAKOLOGICZNEGO TĘTNICZEGO NADCIŚNIENIA PŁUCNEGO

Witold Kimla, Daniel Kiełtyka

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

Abstrakt: Tętnicze nadciśnienie płucne (ang. pulmonary arterial hypertension, PAH) to nieprawidłowy wzrost ciśnienia w tętnicy płucnej spowodowany zaburzeniem funkcji przedkapilarnej części krążenia płucnego. Nielezione nadciśnienie płucne szybko prowadzi do rozwoju prawokomorowej niewydolności serca i wiąże się z średnim czasem przeżycia wynoszącym 3 lata w przypadku idiopatycznego tętniczego nadciśnienia płucnego. Obecnie stosowana farmakoterapia opiera się na lekach działających na 3 szlaki uczestniczące w patogenezie PAH: szlak endoteliny, szlak tlenu azotu-cGMP i szlak prostacykliny-cAMP. Ich dominującym mechanizmem działania jest hamowanie wazokonstrykcji łożyska płucnego. Poprawiają one komfort życia pacjentów i ich przeżywalność jednak nadal wyniki leczenia nie są satysfakcjonujące - co piąty chory na PAH umiera w ciągu 2 lat od zdiagnozowania choroby i rozpoczęcia leczenia. Rozwój wiedzy na temat etiopatogenezy PAH pozwolił na odkrycie nowych potencjalnych punktów uchwytu dla leczenia farmakologicznego. Obecnie bada się rolę białek należących do nadrodziny transformujących czynników wzrostu beta, w tym białka morfogenetyczne kości(ang. bone morphogenetic proteins, BMPs) działające przez szlak BMP/SMAD. Bada się też wpływ kinaz tyrozynowych, kinaz rho, estrogenów, serotoniny, elastazy serynowej i wielu innych na rozwój i przebieg PAH. Szlaki BMP/SMAD, kinaz tyrozynowych, kinaz rho uczestniczą w remodelingu łożyska płucnego. Częsteczki modulujące te mechanizmy molekularne mają szansę stać się lekami hamującymi lub odwracającymi przebudowę naczyń krążenia płucnego, wpływając na tę komponentę choroby która jest obecnie leczona w niewystarczającym stopniu. Celem pracy jest zaprezentowanie rezultatów dotychczasowych badań nad nowymi lekami które obejmują ich skuteczność i domniemany mechanizm działania.

Słowa kluczowe: tętnicze nadciśnienie płucne, PAH, farmakoterapia, patogeneza

Abstract: Pulmonary arterial hypertension (PAH) is an abnormal increase of the pressure in the pulmonary artery due to dysfunction of pre-capillary part of the pulmonary circulation. Untreated pulmonary hypertension rapidly progresses to right ventricular failure and is associated with a median survival time of 3 years for idiopathic pulmonary arterial hypertension. Currently used pharmacotherapy is based on drugs acting on 3 pathways involved in the pathogenesis of PAH: the endothelin pathway, the nitric oxide-cGMP pathway and the prostacyclin-cAMP pathway. Their predominant mechanism of action is the inhibition of

pulmonary vasoconstriction. They improve the patients' comfort of life and their survival, however, the treatment results are still not satisfactory - every fifth PAH patient dies within 2 years from the diagnosis of the disease and the start of treatment. The development of knowledge on etiopathogenesis of PAH has allowed the discovery of new potential targets for pharmacological treatment. Currently, the role of proteins belonging to the superfamily of transforming growth factors beta is being investigated, including bone morphogenetic proteins (BMPs) acting through the BMP/SMAD pathway. The influence of tyrosine kinases, rho kinases, estrogens, serotonin, serine elastase and many others on the development and course of PAH is also being studied. BMP/SMAD pathways, tyrosine kinases, and rho kinases participate in the remodeling of the pulmonary bed. Molecules modulating these molecular mechanisms have a chance to become drugs that inhibit or reverse pulmonary vascular remodeling, affecting this component of the disease that is currently undertreated. The aim of the paper is to present the results of previous research on new drugs, which include their effectiveness and alleged mechanism of action.

Keywords: pulmonary arterial hypertension, PAH, pharmacotherapy, pathogenesis

1. WPROWADZENIE

Już w 1961 roku raport międzynarodowej komisji ekspertów Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) ds. Przewlekłego Serca Płucnego wyraźnie zaznaczył, że średnie ciśnienie w tętnicy płucnej (mPAP) u zdrowych osób zwykle nie przekracza 15 mmHg u osób w spoczynku, w pozycji leżącej. Wspomniał również, że na tą wartość niewielki wpływ ma wiek, ale nigdy nie powinna ona przekraczać 20 mmHg^[1].

Nadciśnienie płucne (ang. pulmonary hypertension, PH) do czasu odkrycia nowych terapii szybko prowadziło u większości chorych do niewydolności serca i śmierci. Choroba ta dotyka osób w każdym wieku. Szacuje się, że 1% światowej populacji cierpi na PH. Chorobowość jest większa u osób w wieku powyżej 65 lat. Choroby lewego serca stanowią 65–80% wszystkich przypadków PH, jednak to PAH znacznie częściej dotyka osób młodych i częściej ma ciężki przebieg. Chorobowość PH w UK w ciągu ostatnich 10 lat podwoiła się i wynosi obecnie 125 przypadków/milion mieszkańców^[2]. Poszczególne europejskie kraje odnotowywały występowanie 15-60 przypadków tętniczego nadciśnienia płucnego na milion mieszkańców i około 5-10 nowych zachorowań na milion mieszkańców rocznie^[3].

2. DEFINICJE

Nadciśnienie płucne (ang. pulmonary hypertension, PH) to nieprawidłowy wzrost średniego ciśnienia w tętnicy płucnej. Według najnowszej definicji opublikowanej przez Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne (2022

ESC/ERS Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension), nadciśnienie płucne opisujemy jako średnie ciśnienie w tętnicy płucnej (ang. mean pulmonary artery pressure, mPAP) > 20 mmHg w spoczynku w bezpośrednim pomiarze hemodynamicznym, oznaczonym za pomocą cewnikowania prawego serca (RHC).

Określenie PAH opisuje grupę pacjentów z PH, u których w badaniu hemodynamicznym występuje przedwłośniczkowe PH. Definiowane jest ono jako ciśnienie zaklinowania w tętnicy płucnej (ang. pulmonary arterial wedge pressure, PAWP) ≤ 12 mm Hg oraz opór naczyniowy płucny (ang. pulmonary vascular resistance, PVR), większy niż 2 jednostki Wooda (ang. Wood Units, WU) [4]. Warunkiem koniecznym jest brak innych przyczyn przedwłośniczkowego PH, takich jak PH spowodowane chorobami płuc, przewlekłe zakrzepowo zatorowe nadciśnienie płucne lub też innymi rzadkimi chorobami [5].

Ciśnienie zaklinowania w tętnicy płucnej (PAWP) jest wartością ciśnienia mierzoną w tętnicy płucnej z wykorzystaniem cewnika Swana-Ganza, która odpowiada ciśnieniu w lewym przedsionku i pośrednio w lewej komorze. Jest to parametr oceniany w inwazyjnym badaniu hemodynamicznym i niezbędny do dalszej diagnostyki. Podwyższenie PAWP (>12 mmHg) wskazuje na podwyższenie ciśnienia w lewej komorze [5]. PVR jest wskaźnikiem obliczanym na podstawie wartości mPAP, PAWP, CO które są uzyskiwane podczas cewnikowania prawego serca [6].

Tabela 1. Definicje hemodynamiczne nadciśnienia płucnego [4]

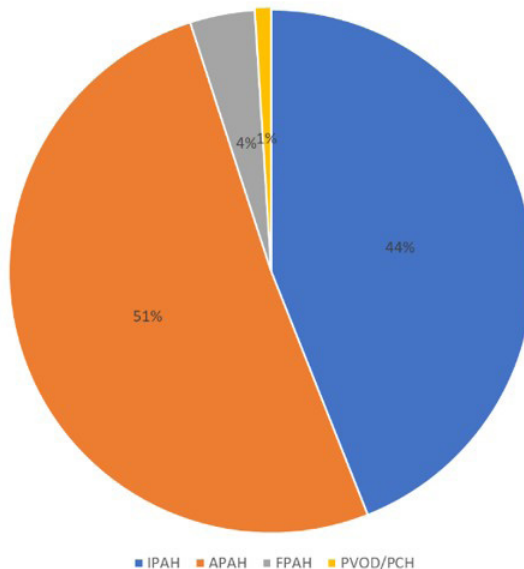
| Definicja | Cechy |
|--------------------------------------|---|
| Nadciśnienie płucne (PH) | mPAP > 20 mmHg |
| Przedwłośniczkowe | mPAP > 20 mmHg PAWP ≤ 15 mmHg PVR > 2 WU |
| Izolowane pozawłośniczkowe PH | mPAP > 20 mmHg PAWP > 15 mmHg PVR ≤ 2 WU |
| Złożone poza- i przedwłośniczkowe PH | mPAP > 20 mmHg PAWP > 15 mmHg PVR > 2 WU |
| Wysiłkowe nadciśnienie płucne | mPAP/CO slope pomiędzy wysiłkiem i spoczynkiem > 3 mmHg/L/min |

3. KLASYFIKACJA KLINICZNA NADCIŚNIENIA PŁUCNEGO

Nadciśnienie płucne ma zróżnicowaną etiologię co odzwierciedla obecnie obowiązująca klasyfikacja kliniczna według ESC. Wyróżniono 5 głównych grup PH, kolejno: tętnicze nadciśnienie płucne, nadciśnienie płucne spowodowane chorobami lewego serca, nadciśnienie płucne spowodowane chorobami płuc i/lub hipoksemią, przewlekłe zakrzepowo-zatorowe nadciśnienie płucne, nadciśnienie płucne o niejasnych lub mnogich przyczynach.

Tętnicze nadciśnienie płucne może być dziedziczne (ang. hereditary PAH, HPAH) i jest wtedy w większości spowodowane mutacją w genie BMPR2. Dziedziczenie jest autosomalne dominujące z niepełną penetracją. Do HPAH zaliczamy postać rodzinną PAH (ang. familial PAH, FPAH) gdy choroba występuje u co najmniej 2 spokrewnionych ze sobą osób oraz postać sporadyczną. Może być związane z innymi chorobami(ang. associated PAH, APAH) takimi jak wrodzone wady serca z przeciekiem lewo-prawym, nadciśnienie wrotnym, zakażenie HIV, schistosomatoza, choroby układowe tkanki łącznej, czy lekami. Tętnicze nadciśnienie płucne z negatywnym wywiadem rodzinnym i bez innej znanej przyczyny określamy jako idiopatyczne (ang. idiopathic PAH, IPAH) [4]. Częstość występowania poszczególnych typów PAH na podstawie danych z USA przedstawia wykres 1.

Grupa 1 WHO: Klasyfikacja na podstawie kryteriów klinicznych



Wykres 1.^[7]

4. PATOMECHANIZMY PROWADZĄCE DO ROZWOJU PAH ORAZ OBECNE STANDARDY LECZENIA

Powodem wzrostu ciśnienia w części tętniczej łożyska płucnego jest zwiększony opór małych tętniczek spowodowany zmniejszeniem średnicy ich światła. Jest to spowodowane wazokonstrykcją, remodelingiem wszystkich warstw ściany naczynia, zmianami zakrzepowo-zatorowymi i powstawaniem zmian splotowatych. Istotną rolę w rozwoju PAH przypisuje się dysfunkcji śródbłonna naczyń płucnych co zaburza równowagę między mediatorami hamującymi (NO, prostacyklina) a promującymi (endotelina) wyżej wymienione procesy [8].

4.1. Rola endotelin

W nadciśnieniu płucnym obserwuje się nadmierną proliferację mięśni gładkich małych tętniczek. Endotelina-1 (ET-1), posiada właściwości wazokonstrykcyjne oraz zdolność indukowania mitozy komórek, która nasila remodeling naczynia i jest uważana za ważny czynnik mogący brać udział w patogenezie nadciśnienia płucnego. Dowiedziono, że PH jest związane ze zwiększeniem ekspresji ET-1 w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych. Przyjmuje się, że wysoki poziom endoteliny-1 u osób z nadciśnieniem płucnym bierze udział w zwiększaniu oporu naczyniowego [9].

Endotelina-1 wiąże się z dwoma typami receptorów: ETA i ETB. ETA lokalizują się w komórkach mięśni gładkich oraz w kardiomiocytach. Z kolei ETB znajdują się zarówno w komórkach mięśni gładkich jak i w komórkach śródbłonna [10]. Przyłączenie ET-1 do receptorów ET mięśni gładkich prowadzi do aktywacji fosfolipazy C (PLC), zwiększenia poziomu diacyloglicerolu (DAG) oraz poziomu wewnątrzkomórkowych jonów wapnia i do długotrwałego skurczu mięśni gładkich w ścianie naczyń krwionośnych [11]. Podwyższony poziom DAG oraz wapnia pobudza również kinazę białkową C odpowiadając za mitogenne właściwości ET-1 pobudzając produkcję cytokin i czynników wzrostu nasilające remodeling naczyń [12].

Bosentan jest doustnym antagonistą zarówno receptorów ETA jak i ETB. Był pierwszą cząsteczką tej klasy leków, która została zsyntezowana. Zaobserwowano poprawienie się wyniku testu marszu 6-minutowego u pacjentów z klasą NYHA III i PH. Bosentan poprawia parametry hemodynamiczne oraz wydłuża czas do pogorszenia klinicznego [13].

Kolejne cząsteczki: ambrisentan, macitentan również wykazuje skuteczność w badaniach klinicznych ^[14, 15]. Ambrisentan hamuje działanie głównie receptorów ETA, które dominują w większych tętnicach płucnych, podczas gdy receptory ETB dominują w miocytach gładkich dróg oddechowych, tkance ścian pęcherzyków płucnych oraz naczyniach włosowatych. Receptory ETB odpowiadają za większość zdolności do usuwania endoteliny-1 z krążenia płucnego. Zablokowanie receptorów ETB może hipotetycznie zwiększać poziom krążącej ET-1 u chorych z PAH. Tak więc zablokowanie selektywne receptorów ETA może potencjalnie zapewniać protekcyjną rolę ETB przy optymalnym działaniu terapeutycznym ^[16].

4.2. Rola tlenu azotu(NO)

NO jest syntezowany jako produkt uboczny enzymatycznego przekształcenia L-argininy do L-cytruliny przez syntazę tlenu azotu (NOS). Syntaza NOS posiada trzy izoformy: śródbłonkowa syntaza tlenu azotu (eNOS), neuronalną syntazę tlenu azotu (nNOS) oraz indukowaną syntazę tlenu azotu (iNOS). Wszystkie trzy izoformy ulegają ekspresji w układzie sercowo-naczyniowym jednak różnią się lokalizacją. eNOS i nNOS są nieustannie syntezowane, podczas gdy iNOS syntezowany jest jedynie w odpowiedzi na bodziec zapalny ^[17].

Tlenek azotu zmniejsza płucny opór naczyniowy poprzez aktywację cytozolowej cyklazy guanozynowej (sGC) złożonej z podjednostek α i β . Następstwem stymulacji sGC jest zwiększenie poziomu cyklicznego monofosforanu guanozyny (cGMP) oraz aktywacja cGMP-zależnej kinazy białkowej (PKG) w miocytach gładkich naczyń płucnych pośrednicząc w wazodylatacji, oraz w kardiomiocytach zmniejszając remodeling serca. PKG-I fosforyluje i aktywuje fosfodiesterazę typu 5 (PDE-5), która odpowiedzialna jest za rozkład cGMP i fizjologicznie lokalizuje się głównie w mięśniach gładkich. Innym z proponowanych mechanizmów działania PKG jest jego działanie kardioprotekcyjne poprzez fosforylację fosfolambanu (PLN), który aktywuje Ca^{2+} - ATP-azę z błon sarkoplazmatycznego retikulum (SERCA). Aktywacja SERCA zwiększa wychwyt zwrotny jonów wapnia do siateczki sarkoplazmatycznej i zmniejsza stężenie Ca^{2+} w cytozolu podczas skurczu serca ^[17-19]. Tlenek azotu zmniejsza aktywność proteazy serynowej w miocytach gładkich zmniejszając remodeling naczyń ^[20]. Dysfunkcja zależnego od NO szlaku sygnałowego jest istotnym czynnikiem powodującym przebudowę naczyń płucnych w trakcie rozwoju PAH ^[21].

Fosfodiesteraza typu 5 kontroluje szlak sygnałowy związany z NO na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego. Selektywne inhibitory fosfodiesterazy typu 5 (sildenafil, tadalafil) blokują fosfodiesterazę typu 5 co zapobiega hydrolizie cGMP i stymuluje zależną od NO wazodylatację oraz zmniejsza nadmierną proliferację miocytów gładkich [22].

Bezpośredni stymulator cyklazy guanylowej, Riocyguat w dawce 2,5mg trzy razy dziennie zwiększa wydolność wysiłkową, wydłuża czas do osiągnięcia złożonego punktu końcowego i poprawia parametry hemodynamiczne. Wykazuje działanie wazodylatacyjne, antyproliferacyjne i przeciwzakrzepowe [23].

4.3. Rola prostacyklin

Prostacyklina produkowana jest przez komórki śródbłonna naczyniowego. Kwas arachidonowy przekształcany jest przez cyklooksygenazy do prostagladyny-H₂, która pod wpływem syntazy prostacykliny ulega przekształceniu w prostacyklinę. Główne działanie prostacykliny polega na hamowaniu agregacji płytek i wazodylatacji naczyń płucnych. Receptor dla prostacykliny (IP) po pobudzeniu stymuluje aktywność cyklazy adenylowej, która zwiększając stężenie cAMP blokuje możliwość aktywacji płytek. W PAH zauważono zmniejszoną ekspresję prostacykliny. Tromboksan A₂ produkowany jest w płytkach krwi z prostagladyny H₂. Zwiększone uwalnianie tromboksanu A₂ o zdolnościach wazokonstrykcyjnych sugeruje aktywację płytek krwi w PAH i może mieć związek z obniżoną aktywnością prostacyklin u pacjent z pierwotnym i wtórnym nadciśnieniem płucnym. Wykazano również działanie antyproliferacyjne prostacykliny [24].

Syntetyczne analogi prostacyklin posiadają podobne efekty działania przy różnych właściwościach farmakokinetycznych. Epoprostenol jest podawany w formie ciągłego wlewu przy zastosowaniu pompy infuzyjnej. Innym lekiem z tej grupy jest iloprost, który jest stabilnym analogiem prostacykliny podawanym w formie inhalacji. Treprostinil może być podawany podskórnie. Beraprost jest pierwszym ze stabilnych analogów prostacykliny może być podawany doustnie [4, 25].

Seleksipag jest podawanym doustnie selektywnym agonistą receptora dla prostacykliny. Skuteczność leku w zmniejszaniu śmiertelności u pacjentów z PAH została wykazana w dużym badaniu 3 fazy GRIPHON obejmującym 1156 pacjentów [26].

4.4. Farmakoterapia PAH

Obecny model farmakoterapii zakłada wykonanie testu reaktywności naczyń płucnych. Polega on na podaniu jednego z wazodylatorów: NO w inhalacji, iloprost w inhalacji, adenozyne dożylnie, epoprostenol dożylnie. Dodatni wynik testu oznacza spadek mPAP o nie mniej niż 10 mmHg do wartości nie większej niż 40 mmHg, przy zachowanym lub zwiększonym rzucie serca i występuje on u 10% pacjentów z PAH. Wykazano, że podanie inhibitorów kanału wapniowego (CCB) przynosi istotną korzyść dla części pacjentów z dodatnim wynikiem testu i mają oni znacznie lepsze rokowanie. Pacjenci z ujemnym wynikiem mają gorsze rokowanie i nie odpowiadają na leczenie CCB. W tej grupie stosowane są blokery receptora endoteliny, inhibitory fosfodiesterazy 5, riocyguat, prostanoidy, seleksipag. U większości chorych preferuje się leczenie skojarzone 2 lub 3 leków gdyż wykazano, że niektóre z nich wykazują synergizm w opóźnianiu progresji choroby [4].

5. NOWE KIERUNKI BADAŃ NAD FARMAKOTERAPIĄ PAH

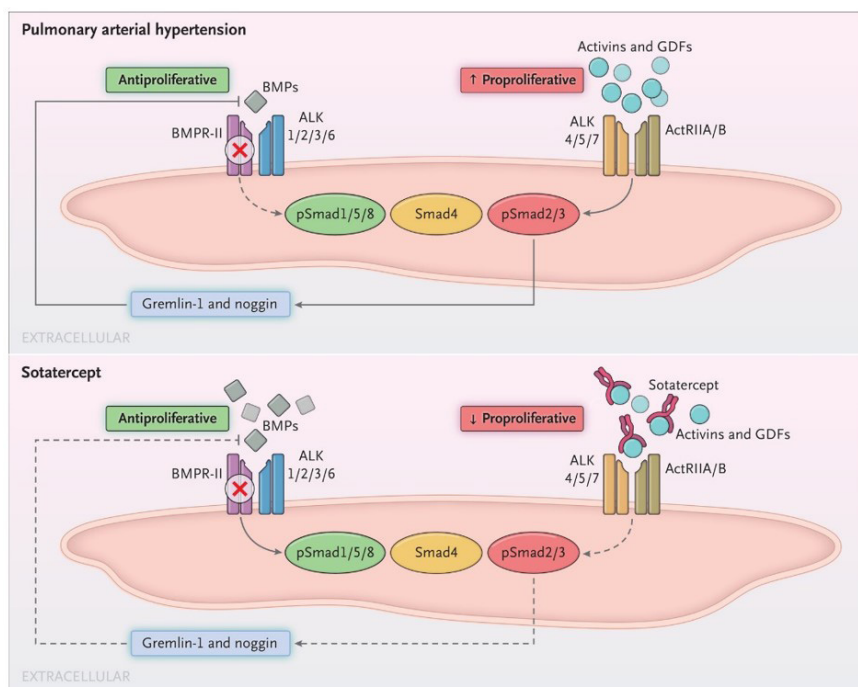
Wprowadzenie nowych leków do terapii nadciśnienia płucnego istotnie poprawiło przeżywalność chorych. Średnia długość życia pacjenta po rozpoznaniu PAH wzrosła z 2,8 lat w latach osiemdziesiątych do 6 lat obecnie. Roczna przeżywalność z 65% do 90% [27]. Nadal jednak nie są to satysfakcjonujące wyniki. Badania nad patofizjologią postępują równolegle do badań nad nowymi cząsteczkami mającymi zahamować lub odwrócić postęp choroby.

5.1. Sotatercept

Sotatercept to białko fuzyjne zbudowane z zewnątrzkomórkowej domeny ludzkiego receptora dla aktywiny typu II (ActRIIA) połączonej z fragmentem Fc ludzkiej IgG1. Ma pełnić rolę pułapki dla ligandów z nadrodziny transformujących czynników wzrostu beta (TGF- β). Uważa się, że do remodelingu naczyń płucnych może prowadzić przewaga uszkodzającego szlaku sygnałowego aktywina-ActRIIA-SMAD2/3 nad szlakiem antyproliferacyjnym BMP-BMPRII-SMAD1/5/8 [28]. Białka SMAD uczestniczą w transdukcji sygnałów z receptorów dla białek z nadrodziny TGF β . Ulegając fosforylacji, przemieszczają się do jądra komórkowego gdzie regulują ekspresję genów [29]. Sotatercept wiąże ligandy pobudzające szlak aktywina-ActRIIA-SMAD2/3

przywracając równowagę między obydwoma szlakami, co zaprezentowano na rycinie 1.

Badanie kliniczne 2 fazy PULSAR na grupie 106 chorych wykazało, że sotatercept podawany podskórnie istotnie zmniejszył opór naczyniowy w krążeniu płucnym, poprawił wydolność fizyczną w teście marszu 6 minutowego oraz obniżył poziom NT-proBNP po 24 tygodniach terapii. Co ważne sotatercept zredukował PVR zarówno u chorych leczonych wyjściowo monoterapią, terapią 2 czy 3 lekami [28]. Korzystne efekty terapeutyczne utrzymały się po 18-24 miesiącach terapii [30]. Obecnie trwają badania kliniczne 3 fazy [4].



Rycina 1. Proponowany mechanizm działania sotaterceptu [28]

5.2. Ralinepag

Ralinepag jak seleksipag jest doustnym agonistą receptora dla prostacykliny. Badanie kliniczne 2 fazy na grupie 61 pacjentów wykazało jego skuteczność w obniżaniu PVR i poprawianiu wydolności fizycznej [31]. Obecnie trwają badania kliniczne 3 fazy [4].

5.3. Szlak receptora BMPR-II i potencjalne punkty uchwytu

BMPR2 koduje receptor(BMPR-II) zaangażowany w kontrole proliferacji komórek naczyniowych [32]. Hamuje proliferację miocytów gładkich naczyń przez szlak BMP/SMAD. Krytyczny niedobór BMPR-II prowadzi do zwiększonej proliferacji tych komórek w odpowiedzi na TGF β , PDGF, 5-hydroksytryptaminę(serotoninę) i oporności na apoptozę [33, 34].

BMPR-II w endotelium tworzy kompleks z białkiem ALK-1 i ulega aktywacji w odpowiedzi na BMP9 i BMP10 [35,36] - wykazano związek między zaburzeniem tego szlaku sygnałowego w śródbłonku a rozwojem PAH, co podkreśla znaczenia śródbłonka w patofizjologii PAH [37-39].

Obecnie bada się różne kierunki wpływu na szlak receptora BMPR-II, wśród nich jest proponowana terapia genowa polegająca na dostarczeniu genu BMPR2 selektywnie do krążenia płucnego [40], a także -cząsteczki hamujące przedwczesną terminację translacji BMPR-II i cząsteczki chaperony ratujące źle sfałdowane BMPR-II [41].

Takrolimus(FK506) wiąże się do FKBP12(represor sygnalizacji BMP) i usuwa je z ALK1-3 (typy receptora BMPRI) co powoduje, że dochodzi do aktywacji szlaku BMPR2 nawet bez udziału liganda czy receptora, takrolimus zwiększył sygnalizację szlaku BMP w modelu PAH wywołanym monokrotaliną [42]. Przeprowadzono badanie kliniczne fazy IIa na pacjentach z PAH, które wykazało, że małe dawki takrolimusu są dobrze tolerowane, wywołują łagodne działania niepożądane takie jak nudności i wymioty. Wykazano także zwiększoną ekspresję BMPR2 w PBMCs (ang. peripheral blood mononuclear cells) [43].

Chlorochina/hydroksychlorochina- zapobiega lizosomalnej degradacji BMPR2. poprawiając poziom BMPR-II w miocytach gładkich i endotelium. może okazać się skuteczna nie tylko u chorych z mutacją genu, ponieważ obniżony poziom BMPR-II odnotowano również w mysim niegenowym modelu PAH(PAH indukowane monokrotaliną) [44].

Ataluren (PTC124)- lek promujący omijanie nonsensownej mutacji(ang. stop codon readthrough) podczas translacji. Został zaaprobowany do leczenia dystrofii mięśniowej Duchenna u dzieci posiadających mutację nonsensowną na terenie UE [45]. Ponad 70% przypadków dziedzicznego PAH i około 20% sporadycznego idiopatycznego PAH jest spowodowane mutacją BMPR2 [46, 47]. Około 29% przypadków HPAH jest spowodowanych mutacją nonsensowną. Badanie wykazało, że ataluren może korygować aktywność szlaku sygnałowego BMP i przez to może zostać

w przyszłości wykorzystany do leczenia chorych na HPAH posiadających mutację nonsensowną [48].

BMP9- w przeciwieństwie do BMPR2/4/6 wywołuje odpowiedź endotelium tętnic płucnych w niskim stężeniu, w którym nie dochodzi do pobudzenia miocytów gładkich tętnic i ossyfikacji. BMP9 hamuje apoptozę śródbłonna i zwiększa jego stabilność. Leczenie za pomocą BMP9 doprowadziło do cofnięcia się PAH w trzech różnych modelach zwierzęcych: heterozygotyczna mutacja BMPR2, PAH indukowane monokrotaliną, PAH indukowane inhibitorem receptora VEGF i przewlekłą hipoksją [49].

5.4. Inhibitory kinaz tyrozynowych

Inhibitory kinaz tyrozynowych to drobnocząsteczkowe leki hamujące kompetycyjnie aktywność kinaz tyrozynowych związanych z receptorami dla czynników wzrostu jak EGF, PDGF, VEGF, FGF. Czynniki wzrostu regulują proliferację, różnicowanie i apoptozę komórek. Zaburzenia aktywności szlaków kinaz tyrozynowych występują w komórkach nowotworowych gdzie związane są z neoangiogenezą, powstawaniem przerzutów i zaburzeniami proliferacji. Ze względu na swój antyproliferacyjny efekt TKI znalazły zastosowanie w onkologii [50].

W tętnicach krążenia płucnego chorych na PAH dochodzi do remodelingu charakteryzującego się proliferacją endotelium, hiperplazją i hipertrofią miocytów gładkich ściany naczyń, zmianą fenotypu śródbłonna w stronę komórek mezenchymalnych(ang. endothelial mesenchymal transformation, EMT) [51]. Istotną rolę w tych zmianach odgrywają czynniki wzrostu oddziaływające przez receptory związane z kinazą tyrozynową. Co ciekawe czynniki wzrostu wpływają nie tylko na remodeling krążenia płucnego, ale także na adaptacyjne zmiany w prawej komorze zachodzące pod wpływem zwiększonego afterloadu [52]. Z powyższych powodów inhibitory kinaz tyrozynowych wydają się być dobrym kandydatem do badania pod kątem ich skuteczności w leczeniu PAH.

Imatynib to inhibitor PDGFR, BCR-ABL, c-Kit, DDR. Wykazano jego skuteczność na modelu zwierzęcym PAH [53], oraz udowodniono dodatkowo jego aktywność wazodylatacyjną względem tętnic krążenia płucnego również na modelu zwierzęcym [54]. Badanie kliniczne 2 fazy wykazało spadek wskaźnika oporu płucnego w porównaniu z placebo oraz wzrost CO, nie zaobserwowano jednak istotnej poprawy w teście maszu 6 minutowego [55]. Badanie kliniczne 3 fazy- IMPRES wykazało istotną poprawę parametrów

hemodynamicznych(CO, PVR) u pacjentów leczonych imatynibem. Udowodniono także istotną poprawę wyniku testu marszu 6 minutowego. Duża częstość poważnych działań niepożądanych (53% pacjentów) ogranicza możliwość stosowania tego leku w terapii PAH [56].

Prowadzono także badania nad innymi lekami z tej grupy. W przypadku nilotynibu prowadzone badanie kliniczne 2 fazy zostało przerwane z powodu poważnych działań niepożądanych [57]. Sorafenib okazał się nieskuteczny, nie odnotowano poprawy w teście marszu 6 minutowego, zaobserwowano spadek CO [58].

5.5. Inhibitory kinaz rho

Kinaza Rho jest częścią szlaku sygnałowego, który funkcjonuje w endotelium i miocytach gładkich naczyń krwionośnych. Ligand wiąże się z receptorem związanym z białkiem G co prowadzi do aktywacji białka GTP-RhoA, które aktywuje swoje efekторы, do których należą 2 izoformy kinaz Rho: ROCK I i ROCK II. Aktywacja szlaku RhoA/ROCK w śródbłonku zwiększa przepuszczalność śródbłonka naczyń płucnych, ekspresję prozakrzepowych PAI-, TF, może być przyczyną zwiększonej proliferacji endotelium i może być związana z hamowaniem ekspresji i aktywności eNOS. Aktywność szlaku RhoA/ROCK w miocytach gładkich prowadzi do zahamowania aktywności fosfatazy łańcucha lekkiego miozyny(MLCP) co wiąże się z wazokonstrykcją [59]. Szlak RhoA/ROCK uczestniczy w rozwoju chorób sercowo naczyniowych jak nadciśnienie płucne, tętnicze, miażdżyca [60].

Fasudil to inhibitor ROCK1 i ROCK2, który jest wykorzystywany w leczeniu skurczu naczyń mózgowych po SAH w Chinach i Japonii. W badaniach na zwierzęcych modelach PAH wykazano jego skuteczność w krótkoterminowej wazodylatacji i długoterminowym hamowaniu remodelingu- wykazano poprawę parametrów hemodynamicznych, wydolność wysiłkową i przeżywalność. Badania kliniczne potwierdziła jego skuteczność w wywołaniu wazodylatacji krążenia płucnego- spadek PVR i mPAP, lecz nie ma jeszcze mocnych dowodów na jego długotrwałą skuteczność [61].

Poza fasudilem trwają także prace nad potencjalną skutecznością innych cząsteczek z tej grupy leków. KD025 to selektywny inhibitor ROCK2. Wykazano, że poprawia wskaźniki hemodynamiczne w modelu PAH indukowanym monokrotaliną oraz że hamuje proliferację miocytów gładkich pochodzących od pacjentów z IPAHA. ROCK2, którego ekspresja jest zwiększona u pacjentów z IPAHA może być nowym celem terapeutycznym [62].

Nowo wyprodukowaną cząsteczką jest DLC0805-1, ten inhibitor kinazy Rho wykazał na modelu zwierzęcym większą skuteczność w obniżaniu RVSP i zwiększaniu przeżywalności niż fasudil [63].

5.6. Rola estrogenów w patogenezie PAH

Niektóre metabolity estradiolu (E2) wywierają efekt proliferacyjny mogą przyczyniać się do rozwoju PAH poprzez stymulację remodelingu naczyń. Estrogen zmniejsza ekspresję BMPR2. Z drugiej strony zaobserwowano protekcyjny wpływ E2 na mięśniówkę prawej komory. Może być z tym związany tak zwany “paradoks estrogenowy”- zaobserwowano, że u kobiet IPAH i dziedziczne PAH występuje częściej lecz przebiega łagodniej niż u mężczyzn. Dodatkowo mężczyźni z wyższym poziomem estradiolu i niższym dehydroepiandrosteronu mają większe ryzyko zachorowania na PAH [64,65].

Anastrozol to inhibitor aromatazy hamujący przemianę androgenów do estrogenów. W badaniu na modelu zwierzęcym PAH wykazano jego skuteczność w obniżaniu ciśnienia w tętnicy płucnej, hamowaniu remodelingu naczyń i przerostu lewej komory. Badania kliniczne na próbie 18 osób wykazało istotną poprawę w teście marszu 6 minutowego lecz brak wpływu leczenia na parametry funkcji prawej komory [66]. Obecnie trwa większe badanie kliniczne 2 fazy na próbie 84 osób, którego celem jest zweryfikowanie wpływu leku na wynik testu marszu 6 minutowego oraz ocena bezpieczeństwa i działań niepożądanych [67].

Tamoksyfen, inhibitor receptora estrogenowego również hamuje PAH na modelu zwierzęcym [68]. Prowadzone jest badanie kliniczne 2 fazy, które ma określić jego skuteczność w leczeniu PAH [69].

5.7. Flozyny- potencjalny lek na tętnicze nadciśnienie płucne?

Flozyny to inhibitory kotransportera SGLT2 występującego w cewkach nerkowych. Te leki przeciwcukrzycowe indukujące glukozurię wykazują właściwości kardioprotekcyjne i nefroprotekcyjne i są obecnie wskazane w leczeniu cukrzycy t.2, niewydolności serca i przewlekłej choroby nerek [70-74]. Ze względu na ich korzystny wpływ na układ sercowo- naczyniowy wydaje się zasadne zbadanie wpływu tej grupy leków na przebieg nadciśnienia płucnego. W badaniach na modelu zwierzęcym PAH udowodniono, że empagliflozyna zwiększa przeżywalność, poprawia parametry hemodynamiczne, zmniejsza remodeling naczyń i prawej komory [75,76]. Takie zachęcające rezultaty stanowią

podstawę do rozpoczęcia badań klinicznych, które zweryfikują skuteczność flozyn w PAH.

5.8. Komórki progenitorowe endotelium/syntaza tlenu azotu

PAH charakteryzuje się dysfunkcją endotelium, która prowadzi do przewagi mediatorów wazokonstrykcyjnych, prozakrzepowych, prozapalnych, stymulujących proliferację i migrację miocytów gładkich nad mediatorami wazodylatacyjnymi, przecizakrzepowymi, przeciwzapalnymi, hamującymi proliferację i migrację miocytów gładkich [59]. Podstawowym mediatorem, którego zmniejszoną produkcję stwierdza się w naczyniach płucnych chorych na PAH jest NO wytwarzany przez eNOS. Wprowadzenia do krążenia płucnego autologicznych komórek progenitorowych śródbłonna transfekowanych genem eNOS mogłoby prowadzić do wyrównania niedoboru tego mediatora. Badanie na modelu zwierzęcym PAH pokazało potencjalną skuteczność takiej terapii [77, 78]. Obecnie trwa badanie kliniczne 2 fazy SAPPHIRE, które ma się zakończyć w 2025 roku [79].

5.9. Inne badane cząsteczki

Obecnie bada się także wiele innych cząsteczek, które na podstawie wyników prób na modelach zwierzęcych mają potencjał terapeutyczny [80–83].

Tabela 2. Inne potencjalne leki na PAH [64]

| Cząsteczka o potencjale terapeutycznym udowodnionym na modelu zwierzęcym | Potencjalny mechanizm działania | Badania kliniczne |
|--|---|---|
| Rodatristat | Inhibitor hydroksylazy tryptofanu hamujący obwodową produkcję serotoniny, która powoduje wazokonstrykcję i proliferację miocytów gładkich w przebiegu PAH | Faza 2 badań klinicznych-aktywna w trakcie rekrutacji |
| Bardoksolon | Aktywuje czynnik transkrypcyjny Nrf2 co prowadzi do zmniejszenia stresu oksydacyjnego i ekspresji NF-κB | Faza 2 badań klinicznych-LARIAT-wykazano tymczasową poprawę w PAH związanym z chorobami układowymi tkanki łącznej Faza 3 badań klinicznych-badanie ANGER i badanie CATALYST-przerwane z powodu wybuchu pandemii COVID19 |

| | | |
|------------|---|---|
| Elafina | Inhibitor elastazy serynowej, który ma zwiększać integralność macierzy pozakomórkowej | Faza 1 badań klinicznych-zakończona, wyników jeszcze nie opublikowano |
| Apabetalon | Inhibitor białka 4 Zawierającego bromodomenę (BRD4) zapobiega połączeniu się białka BDR4 z ogonem acetylowanego histonu co ma prowadzić do spadku ekspresji genów zaangażowanych w patogenezę PAH | Faza 1 badań klinicznych-zakończona, wyników jeszcze nie opublikowano |

W tabeli 2 zestawiono potencjalny związek niektórych cząsteczek z patogenezą PAH i toczące się lub zakończone badania kliniczne.

6. DYSKUSJA I WNIOSKI

Bez wątplenia w ciągu ostatnich trzydziestu lat dokonał się olbrzymi postęp w leczeniu tętniczego nadciśnienia płucnego, jednak jego wyniki nadal nie są satysfakcjonujące. Stosowane dzisiaj leczenie moduluje tylko 3 szlaki, których zaburzenia obserwujemy w PAH: szlak endoteliny, prostacykliny-cAMP, tlenku azotu-cGMP. Obecnie obserwujemy szybki postęp wiedzy o mechanizmach molekularnych prowadzących do rozwoju PAH co pozwala na wytypowanie potencjalnych nowych punktów uchwytu dla leczenia farmakologicznego. W rozwoju choroby bardzo ważną rolę odgrywają białka BMP i ich receptor BMPR-II, białka SMAD, kinazy tyrozynowe, kinazy rho, estradiol i wiele innych. Bardzo wiele cząsteczek okazuje się skutecznych w badaniach na modelach zwierzęcych co daje nadzieje, że przynajmniej część z nich udowodni swoją skuteczność i bezpieczeństwo w badaniach klinicznych i zostanie zatwierdzonych do leczenia.

Szeroka selekcja potencjalnych leków do badań klinicznych niesie ze sobą także zagrożenia. Pośpieszne rozpoczynanie licznych nowych badań klinicznych przy ograniczonej puli chorych na PAH prowadzi do tego, że pojedyncze badania analizują mniejszą grupę chorych a przez to ich wyniki są mniej wiarygodne. Na podstawie takich wątpliwych rezultatów podejmuje się decyzje o kontynuowaniu lub wstrzymaniu badań nad cząsteczkami, które nie zostały dokładnie ocenione. Dlatego tak ważna jest precyzyjna przedkliniczna selekcja leków o największej szansie na powodzenie w badaniach

klinicznych. Istnieje bardzo duża liczba badań na modelach zwierzęcych udowadniająca skuteczność licznej grupy związków, których nie sposób porównać lub nawet odtworzyć [84]. W latach 90tych 21% leków, nad którymi rozpoczęto badania kliniczne trafiło ostatecznie na rynek. Teraz ten odsetek wynosi 16% [85]. Powinno się zwiększyć stopień standaryzacji badań przedklinicznych dotyczących rozwoju leków dla danych jednostek chorobowych. Pracę przestrzegającą opracowanych wymagań powinny być traktowane priorytetowo przy wybieraniu cząsteczek do badań klinicznych. Kolejnym aspektem utrudniającym rozwój leków na PAH niedostosowanie badanych parametrów do oczekiwanego mechanizmu działania leku. Głównym celem analizowanych cząsteczek jest zahamowanie i odwrócenie remodelingu naczyń krążenia płucnego, żeby go ocenić należałoby wykonać badania histopatologiczne. Wykonanie biopsji płuca u chorego z IPF niesie za sobą ryzyko powikłań a ocena histopatologiczna w badaniach przedklinicznych jest kosztowna, dlatego często ogranicza się weryfikację efektów leczenia do oceny parametrów hemodynamicznych. Presja ekonomiczna sprawia, że poszukuje się szybkich rezultatów a nie bada efektów długoterminowych na modelach zwierzęcych. Skutkiem jest odrzucenie cząsteczek, których efekt działania rozwija się powoli i jest obserwowalny poza zakresem trwania badania.

Podsumowując postęp w dziedzinie farmakologii PAH wymaga nie tylko rozwoju wiedzy o samej chorobie, ale także doskonalenia metod oceny skutków działania leków zarówno w fazie przedklinicznej jak i klinicznej i ich lepszej organizacji.

REFERENCJE

- [1] Chronic cor pulmonale. Report of an expert committee. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 1961;213:35.
- [2] Humbert M. Combination of bosentan with epoprostenol in pulmonary arterial hypertension: BREATHE-2. *European Respiratory Journal.* 2004;24(3):353-359. doi:10.1183/09031936.04.00028404
- [3] Peacock AJ, Murphy NF, McMurray JJ v., Caballero L, Stewart S. An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension. *European Respiratory Journal.* 2007;30(1):104-109. doi:10.1183/09031936.00092306
- [4] Humbert M, Kovacs G, Hoeper MM, et al. 2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Heart J.* 2022;43(38):3618-3731. doi:10.1093/eurheartj/ehac237

- [5] Hoepfer MM, Bogaard HJ, Condliffe R, et al. Definitions and Diagnosis of Pulmonary Hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(25):D42-D50. doi:10.1016/j.jacc.2013.10.032
- [6] Tamimi O, Mohammed MHA. Pulmonary Vascular Resistance Measurement Remains Keystone in Congenital Heart Disease Management. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8. doi:10.3389/fcvm.2021.607104
- [7] Badlam JB, Badesch DB, Austin ED, et al. United States Pulmonary Hypertension Scientific Registry. *Chest*. 2021;159(1):311-327. doi:10.1016/j.chest.2020.07.088
- [8] Montani D, Chaumais MC, Guignabert C, et al. Targeted therapies in pulmonary arterial hypertension. *Pharmacol Ther*. 2014;141(2):172-191. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.10.002
- [9] Parikh V, Bhardwaj A, Nair A. Pharmacotherapy for pulmonary arterial hypertension. *J Thorac Dis*. 2019;11(S14):S1767-S1781. doi:10.21037/jtd.2019.09.14
- [10] Seo B, Oemar BS, Siebenmann R, von Segesser L, Lüscher TF. Both ETA and ETB receptors mediate contraction to endothelin-1 in human blood vessels. *Circulation*. 1994;89(3):1203-1208. doi:10.1161/01.CIR.89.3.1203
- [11] Pollock DM, Keith TL, Highsmith RF. Endothelin receptors and calcium signaling¹. *The FASEB Journal*. 1995;9(12):1196-1204. doi:10.1096/fasebj.9.12.7672512
- [12] Ohlstein EH, Arleth A, Bryan H, Elliott JD, Cheng Po Sung. The selective endothelin ETA receptor antagonist BQ123 antagonizes endothelin-1-mediated mitogenesis. *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology*. 1992;225(4):347-350. doi:10.1016/0922-4106(92)90109-9
- [13] Channick RN, Simonneau G, Sitbon O, et al. Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebocontrolled study. *The Lancet*. 2001;358(9288):1119-1123. doi:10.1016/S0140-6736(01)06250-X
- [14] Pulido T, Adzerikho I, Channick RN, et al. Macitentan and Morbidity and Mortality in Pulmonary Arterial Hypertension. *New England Journal of Medicine*. 2013;369(9):809-818. doi:10.1056/NEJMoa1213917

- [15] Galie N, Olschewski H, Oudiz RJ, et al. Ambrisentan for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation*. 2008;117(23):3010-3019. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.742510
- [16] Dupuis J, Goresky CA, Fournier A. Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ET_B receptors. *J Appl Physiol*. 1996;81(4):1510-1515. doi:10.1152/jappl.1996.81.4.1510
- [17] Park M, Sandner P, Krieg T. cGMP at the centre of attention: emerging strategies for activating the cardioprotective PKG pathway. *Basic Res Cardiol*. 2018;113(4):24. doi:10.1007/s00395-018-0679-9
- [18] Lux A, Pokreisz P, Swinnen M, et al. Concomitant Phosphodiesterase 5 Inhibition Enhances Myocardial Protection by Inhaled Nitric Oxide in Ischemia-Reperfusion Injury. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2016;356(2):284-292. doi:10.1124/jpet.115.227850
- [19] Runo JR, Loyd JE. Primary pulmonary hypertension. *The Lancet*. 2003;361(9368):1533-1544. doi:10.1016/S0140-6736(03)13167-4
- [20] Mitani Y, Zaidi SHE, Dufourcq P, Thompson K, Rabinovitch M. Nitric oxide reduces vascular smooth muscle cell elastase activity through cGMP-mediated suppression of ERK phosphorylation and AML1B nuclear partitioning. *The FASEB Journal*. 2000;14(5):805-814. doi:10.1096/fasebj.14.5.805
- [21] Mandegar M, Fung YCB, Huang W, Remillard C v., Rubin LJ, Yuan JXJ. Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: role in the development of pulmonary hypertension. *Microvasc Res*. 2004;68(2):75-103. doi:10.1016/j.mvr.2004.06.001
- [22] Tabima DM, Frizzell S, Gladwin MT. Reactive oxygen and nitrogen species in pulmonary hypertension. *Free Radic Biol Med*. 2012;52(9):1970-1986. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.041
- [23] Ghofrani HA, Galie N, Grimminger F, et al. Riociguat for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *New England Journal of Medicine*. 2013;369(4):330-340. doi:10.1056/NEJMoa1209655
- [24] Christman BW, McPherson CD, Newman JH, et al. An Imbalance between the Excretion of Thromboxane and Prostacyclin Metabolites in Pulmonary Hypertension. *New England Journal of Medicine*. 1992;327(2):70-75. doi:10.1056/NEJM199207093270202

- [25] Galiè N, Manes A, Branzi A. Prostanoids for Pulmonary Arterial Hypertension. *American Journal of Respiratory Medicine*. 2003;2(2):123-137. doi:10.1007/BF03256644
- [26] Rosenkranz S, Channick R, Chin KM, et al. The impact of comorbidities on selexipag treatment effect in patients with pulmonary arterial hypertension: insights from the GRIPHON study. *Eur J Heart Fail*. 2022;24(1):205-214. doi:10.1002/ejhf.2369
- [27] Deshwal H, Weinstein T, Sulica R. Advances in the management of pulmonary arterial hypertension. *Journal of Investigative Medicine*. 2021;69(7):1270-1280. doi:10.1136/jim-2021-002027
- [28] Humbert M, McLaughlin V, Gibbs JSR, et al. Sotatercept for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *New England Journal of Medicine*. 2021;384(13):1204-1215. doi:10.1056/NEJMoa2024277
- [29] Derynck R, Zhang Y, Feng XH. Transcriptional Activators of TGF- β Responses: Smads. *Cell*. 1998;95(6):737-740. doi:10.1016/S0092-8674(00)81696-7
- [30] Humbert M, McLaughlin V, Gibbs JSR, et al. Sotatercept for the treatment of pulmonary arterial hypertension: PULSAR open-label extension. *European Respiratory Journal*. Published online August 30, 2022:2201347. doi:10.1183/13993003.01347-2022
- [31] Torres F, Farber H, Ristic A, et al. Efficacy and safety of ralinepag, a novel oral IP agonist, in PAH patients on mono or dual background therapy: results from a phase 2 randomised, parallel group, placebo-controlled trial. *European Respiratory Journal*. 2019;54(4):1901030. doi:10.1183/13993003.01030-2019
- [32] Soubrier F, Chung WK, Machado R, et al. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62 (25 Suppl):D13-21. doi:10.1016/j.jacc.2013.10.035
- [33] Morrell NW, Yang X, Upton PD, et al. Altered Growth Responses of Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells From Patients With Primary Pulmonary Hypertension to Transforming Growth Factor- β_1 and Bone Morphogenetic Proteins. *Circulation*. 2001;104(7):790-795. doi:10.1161/hc3201.094152

- [34] Yang X, Long L, Southwood M, et al. Dysfunctional Smad Signaling Contributes to Abnormal Smooth Muscle Cell Proliferation in Familial Pulmonary Arterial Hypertension. *Circ Res.* 2005;96(10):1053-1063. doi:10.1161/01.RES.0000166926.54293.68
- [35] David L, Mallet C, Mazerbourg S, Feige JJ, Bailly S. Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood.* 2007;109(5):1953-1961. doi:10.1182/blood-2006-07-034124
- [36] Upton PD, Davies RJ, Trembath RC, Morrell NW. Bone Morphogenetic Protein (BMP) and Activin Type II Receptors Balance BMP9 Signals Mediated by Activin Receptor-like Kinase-1 in Human Pulmonary Artery Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry.* 2009;284(23):15794-15804. doi:10.1074/jbc.M109.002881
- [37] Jerkic M, Kabir MG, Davies A, et al. Pulmonary hypertension in adult Alk1 heterozygous mice due to oxidative stress. *Cardiovasc Res.* 2011;92(3):375-384. doi:10.1093/cvr/cvr232
- [38] Hong KH, Lee YJ, Lee E, et al. Genetic Ablation of the *Bmpr2* Gene in Pulmonary Endothelium Is Sufficient to Predispose to Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation.* 2008;118(7):722-730. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.736801
- [39] Trembath RC, Thomson JR, Machado RD, et al. Clinical and Molecular Genetic Features of Pulmonary Hypertension in Patients with Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *New England Journal of Medicine.* 2001;345(5):325-334. doi:10.1056/NEJM200108023450503
- [40] Reynolds AM, Holmes MD, Danilov SM, Reynolds PN. Targeted gene delivery of BMP2 attenuates pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal.* 2012;39(2):329-343. doi:10.1183/09031936.00187310
- [41] Sobolewski A, Rudarakanchana N, Upton PD, et al. Failure of bone morphogenetic protein receptor trafficking in pulmonary arterial hypertension: potential for rescue. *Hum Mol Genet.* 2008;17(20):3180-3190. doi:10.1093/hmg/ddn214
- [42] Spiekerkoetter E, Tian X, Cai J, et al. FK506 activates BMP2, rescues endothelial dysfunction, and reverses pulmonary hypertension. *Journal of Clinical Investigation.* 2013;123(8):3600-3613. doi:10.1172/JCI65592

- [43] Spiekerkoetter E, Sung YK, Sudheendra D, et al. Randomised placebo-controlled safety and tolerability trial of FK506 (tacrolimus) for pulmonary arterial hypertension. *European Respiratory Journal*. 2017;50(3):1602449. doi:10.1183/13993003.02449-2016
- [44] Dunmore BJ, Drake KM, Upton PD, Toshner MR, Aldred MA, Morrell NW. The lysosomal inhibitor, chloroquine, increases cell surface BMPR-II levels and restores BMP9 signalling in endothelial cells harbouring BMPR-II mutations. *Hum Mol Genet*. 2013;22(18):3667-3679. doi:10.1093/hmg/ddt216
- [45] Michorowska S. Ataluren—Promising Therapeutic Premature Termination Codon Readthrough Frontrunner. *Pharmaceuticals*. 2021;14(8):785. doi:10.3390/ph14080785
- [46] Machado RD, Aldred MA, James V, et al. Mutations of the TGF- β type II receptor BMPR2 in pulmonary arterial hypertension. *Hum Mutat*. 2006;27(2):121-132. doi:10.1002/humu.20285
- [47] Thomson JR. Sporadic primary pulmonary hypertension is associated with germline mutations of the gene encoding BMPR-II, a receptor member of the TGF-beta family. *J Med Genet*. 2000;37(10):741-745. doi:10.1136/jmg.37.10.741
- [48] Drake KM, Dunmore BJ, McNelly LN, Morrell NW, Aldred MA. Correction of Nonsense *BMPR2* and *SMAD9* Mutations by Ataluren in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013;49(3):403-409. doi:10.1165/rcmb.2013-0100OC
- [49] Long L, Ormiston ML, Yang X, et al. Selective enhancement of endothelial BMPR-II with BMP9 reverses pulmonary arterial hypertension. *Nat Med*. 2015;21(7):777-785. doi:10.1038/nm.3877
- [50] Jiao Q, Bi L, Ren Y, Song S, Wang Q, Wang Y shan. Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance. *Mol Cancer*. 2018;17(1):36. doi:10.1186/s12943-018-0801-5
- [51] Shimoda LA, Laurie SS. Vascular remodeling in pulmonary hypertension. *J Mol Med*. 2013;91(3):297-309. doi:10.1007/s00109-013-0998-0
- [52] Csósza G, Karlócai K, Losonczy G, Müller V, Lázár Z. Growth factors in pulmonary arterial hypertension: Focus on preserving right ventricular function. *PhysiolInt*. 2020;107(2):177-194. doi:10.1556/2060.2020.00021

- [53] Schermuly RT. Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *Journal of Clinical Investigation*. 2005;115(10):2811-2821. doi:10.1172/JCI24838
- [54] Abe K, Toba M, Alzoubi A, et al. Tyrosine Kinase Inhibitors Are Potent Acute Pulmonary Vasodilators in Rats. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;45(4):804-808. doi:10.1165/rcmb.2010-0371OC
- [55] Ghofrani HA, Morrell NW, Hoeper MM, et al. Imatinib in Pulmonary Arterial Hypertension Patients with Inadequate Response to Established Therapy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182(9):1171-1177. doi:10.1164/rccm.201001-0123OC
- [56] Hoeper MM, Barst RJ, Bourge RC, et al. Imatinib Mesylate as Add-on Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation*. 2013;127(10):1128-1138. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000765
- [57] ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01179737.
- [58] Moreno-Vinasco L, Gomberg-Maitland M, Maitland ML, et al. Genomic assessment of a multikinase inhibitor, sorafenib, in a rodent model of pulmonary hypertension. *Physiol Genomics*. 2008;33(2):278-291. doi:10.1152/physiolgenomics.00169.2007
- [59] Morrell NW, Adnot S, Archer SL, et al. Cellular and Molecular Basis of Pulmonary Arterial Hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(1):S20-S31. doi:10.1016/j.jacc.2009.04.018
- [60] Hartmann S, Ridley AJ, Lutz S. The Function of Rho-Associated Kinases ROCK1 and ROCK2 in the Pathogenesis of Cardiovascular Disease. *Front Pharmacol*. 2015;6. doi:10.3389/fphar.2015.00276
- [61] Zhang Y, Wu S. Effects of fasudil on pulmonary hypertension in clinical practice. *Pulm Pharmacol Ther*. 2017;46:54-63. doi:10.1016/j.pupt.2017.08.002
- [62] Yamamura A, Nayeem MJ, Sato M. The Rho kinase 2 (ROCK2)-specific inhibitor KD025 ameliorates the development of pulmonary arterial hypertension. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021;534:795-801. doi:10.1016/J.BBRC.2020.10.106

- [63] Chen D, Yuan T, Chen Y, et al. DL0805-1, a novel Rho-kinase inhibitor, attenuates lung injury and vasculopathy in a rat model of monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Eur J Pharmacol.* 2022;919:174779. doi:10.1016/J.EJPHAR.2022.174779
- [64] Condon DF, Agarwal S, Chakraborty A, et al. Novel Mechanisms Targeted by Drug Trials in Pulmonary Arterial Hypertension. *Chest.* 2022;161(4):1060-1072. doi:10.1016/j.chest.2021.10.010
- [65] Sommer N, Ghofrani HA, Pak O, et al. Current and future treatments of pulmonary arterial hypertension. *Br J Pharmacol.* 2021;178(1):6-30. doi:10.1111/bph.15016
- [66] Kawut SM, Archer-Chicko CL, DeMichele A, et al. Anastrozole in Pulmonary Arterial Hypertension. A Randomized, Double-Blind, Placebo-controlled Trial. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017;195(3):360-368. doi:10.1164/rccm.201605-1024OC
- [67] *ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03229499.*
- [68] Hajra A, Safiriyu I, Balasubramanian P, et al. Recent Advances and Future Prospects of Treatment of Pulmonary Hypertension. *Curr Probl Cardiol.* Published online April 2022:101236. doi:10.1016/j.cpcardiol.2022.101236
- [69] *ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03528902.*
- [70] Gao YM, Feng ST, Wen Y, Tang TT, Wang B, Liu BC. Cardiorenal protection of SGLT2 inhibitors—Perspectives from metabolic reprogramming. *EBioMedicine.* 2022;83:104215. doi:10.1016/j.ebiom.2022.104215
- [71] Vallon V. Renoprotective Effects of SGLT2 Inhibitors. *Heart Fail Clin.* 2022;18(4):539-549. doi:10.1016/j.hfc.2022.03.005
- [72] 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. *Eur Heart J.* 2021;42(36):3599-3726. doi:10.1093/eurheartj/ehab368

- [73] Wheeler DC, Stefansson B v, Batiushin M, et al. The dapagliflozin and prevention of adverse outcomes in chronic kidney disease (DAPA-CKD) trial: baseline characteristics. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2020;35(10):1700-1711. doi:10.1093/ndt/gfaa234
- [74] Cosentino F, Grant PJ, Aboyans V, et al. 2019 ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: The Task Force for diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Eur Heart J*. 2020;41(2):255-323. doi:10.1093/eurheartj/ehz486
- [75] Chowdhury B, Luu V, Luu A, et al. THE SGLT2 INHIBITOR EMPAGLIFLOZIN REDUCES MORTALITY IN EXPERIMENTAL PULMONARY HYPERTENSION. *Canadian Journal of Cardiology*. 2019;35(10):S32-S33. doi:10.1016/j.cjca.2019.07.415
- [76] Chowdhury B, Luu AZ, Luu VZ, et al. The SGLT2 inhibitor empagliflozin reduces mortality and prevents progression in experimental pulmonary hypertension. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020;524(1):50-56. doi:10.1016/j.bbrc.2020.01.015
- [77] Zhao YD, Courtman DW, Ng DS, et al. Microvascular Regeneration in Established Pulmonary Hypertension by Angiogenic Gene Transfer. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006;35(2):182-189. doi:10.1165/rcmb.2005-0115OC
- [78] Zhao YD, Courtman DW, Deng Y, Kugathasan L, Zhang Q, Stewart DJ. Rescue of Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension Using Bone Marrow-Derived Endothelial-Like Progenitor Cells. *Circ Res*. 2005;96(4):442-450. doi:10.1161/01.RES.0000157672.70560.7b
- [79] ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03001414.
- [80] van der Feen DE, Kurakula K, Tremblay E, et al. Multicenter Preclinical Validation of BET Inhibition for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019;200(7):910-920. doi:10.1164/rccm.201812-2275OC
- [81] Nickel NP, Spiekerkoetter E, Gu M, et al. Elafin Reverses Pulmonary Hypertension via Caveolin-1-Dependent Bone Morphogenetic Protein Signaling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;191(11):1273-1286. doi:10.1164/rccm.201412-2291OC

- [82] Cheng Y, Gong Y, Qian S, et al. Identification of a Novel Hybridization from Isosorbide 5-Mononitrate and Bardoxolone Methyl with Dual Activities of Pulmonary Vasodilation and Vascular Remodeling Inhibition on Pulmonary Arterial Hypertension Rats. *J Med Chem.* 2018;61(4):1474-1482. doi:10.1021/acs.jmedchem.7b01153
- [83] Carpenter D, Keller L, Palacios M, et al. ONCE DAILY ORAL DOSING OF RODATRISTAT ETHYL (RVT-1201) ACHIEVES REDUCTIONS IN SEROTONIN BIOSYNTHESIS COMPARABLE TO THOSE ASSOCIATED WITH REVERSAL OF VASCULAR REMODELING IN PAH ANIMAL MODELS. *Chest.* 2019;156(4):A1175-A1176. doi:10.1016/j.chest.2019.08.1068
- [84] Prinz F, Schlange T, Asadullah K. Believe it or not: how much can we rely on published data on potential drug targets? *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(9):712-712. doi:10.1038/nrd3439-c1
- [85] Hay M, Thomas DW, Craighead JL, Economides C, Rosenthal J. Clinical development success rates for investigational drugs. *Nat Biotechnol.* 2014;32(1):40-51. doi:10.1038/nbt.2786

KSENOTRANSPLANTACJA I BIODRUK 3D JAKO PRZYSZŁOŚĆ KARDIOLOGII

Katarzyna Grudnik, Anna Krakowczyk, Joanna Bączyk,
Dariusz Kucias, Eliza Barczyk, Wojciech Dobczyński

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

Abstrakt: W ostatniej dekadzie transplantologia stała się bardzo popularną dziedziną medycyny. Przeszczepianie zdrowych organów stanowi obecnie główną metodę leczenia dla pacjentów ze schyłkową, nieodwracalną niewydolnością najważniejszych dla życia narządów. Prowadzone statystyki donoszą, że liczba osób oczekujących na narząd znacznie przewyższa liczbę potencjalnych dawców, a organem, na które jest największe zapotrzebowanie jest serce. Choroby układu krążenia są najczęstszą przyczyną śmierci ludzi na całym świecie i coraz częściej spotykaną chorobą w krajach wysoko rozwiniętych. W związku z narastającym problemem naukowcy podjęli próby znalezienia nowych alternatyw leczenia i terapii chorób kardiologicznych. Jednym z przedstawionych pomysłów były przeszczepy od zwierząt. Niestety pierwsze operacje serca kończyły się szybkim zgonem pacjentów. Obecnie podejmuje się próby genetycznej modyfikacji ssaków, przeznaczonych na bycie dawcą ksenogenicznym, aby wystarczająco zmniejszyć bariery immunologiczne jakie dzieli przeszczepiany organ od układu odpornościowego dawcy. Rozwój technologii laboratoryjnej pozwolił również na stworzenie pierwszych tkanek tworzonej metodą biodruku 3D. Polega ona na nanoszeniu materiałów zawierających żywe komórki oraz nośniki zapewniające środowisko i ochronę dla nich podczas procesu drukowania. Technologia pozwala na tworzenie złożonych, trójwymiarowych struktur mogących pełnić zarówno rolę funkcjonalnego organu do zastosowania w procedurach medycznych jak i zastąpić zwierzęta w badaniach klinicznych. W niniejszym artykule przedstawiono przegląd badań nad postęпами w ksenotransplantologii oraz biodruku 3D w kontekście omawianej kardiologii.

Słowa kluczowe: ksenotransplantacja, biodruk 3D, kardiologia

Abstract: Over the past decade, transplantation has become a very popular field of medicine. Transplantation of healthy organs is now the main method of treatment for patients with end-stage, irreversible failure of vital organs. Statistics kept report that the number of people waiting for an organ far exceeds the number of potential donors, and the organ in highest demand is the heart. Cardiovascular disease is the most common cause of death for people around the world and an increasingly common disease in developed countries. As a result of the growing problem, scientists have attempted to find new alternatives for treating and curing cardiovascular diseases. One of the ideas brought up was transplants from animals. Unfortunately, the first heart's operations ended in the rapid death of patients. Currently, attempts are being made to genetically modify mammals, destined to be xenogenic donors, to sufficiently reduce the immune barriers that separate the transplanted organ from the donor's immune system. Developments in laboratory technology have also made it possible to create the first

tissues created by 3D bioprinting. It involves the application of materials containing living cells and media that provide an environment and protection for them during the printing process. The technology makes it possible to create complex, three-dimensional structures that can act as both a functional organ for use in medical procedures and replace animals in clinical trials. This article provides an overview of research on advances in xenotransplantation and 3D bioprinting in the context of cardiology.

Keywords: xenotransplantation, 3D bioprinting, cardiology

1. WPROWADZENIE

Przeszczepienie (inaczej transplantacja, łac. transplantare) jest przeniesieniem komórek, tkanek, a także całych narządów z organizmu dawcy do organizmu biorcy. Celem procedury jest polepszenie stanu zdrowia pacjenta przyjmującego materiał transplantacyjny ^[1].

Liczba pacjentów kardiologicznych ciągle rośnie co jest szczególnie zauważalne w krajach wysoko rozwiniętych ^[2]. Choroby układu sercowo-naczyniowego stanowią obecnie najczęstszą przyczynę śmierci na świecie. Pomimo ciągłego rozwoju kardiologii, farmakologii i technologii to przeszczepianie jest nierzadko jedyną terapią w leczeniu schyłkowej, nieodwracalnej niewydolności serca i innych elementów układu krążenia.

Niestety dane statystyczne wskazują, że liczba dawców, zarówno tych żywych jak i zmarłych nie jest w stanie spełnić zapotrzebowania na organy ^[3].

Celem niniejszej pracy jest zapoznanie się z zagadnieniem transplantacji narządów odzwierzęcych oraz biodruku 3D, które dają nadzieję na rozwój terapii leczenia chorób kardiologicznych oraz na dłuższe życie pacjentów.

2. STATYSTYKA

Z obecnych statystyk wynika, że liczba potencjalnych biorców znacznie przewyższa liczbę potencjalnych dawców. Trzeba też wspomnieć, że rozwój medycyny przyczynił się do popularyzacji przeszczepień co skutkuje nieustannie zwiększającą się liczbą oczekujących na nie pacjentów ^[3]. Potwierdzają to dane na stronie Poltransplant, które donoszą wzrost przeszczepów w Polsce o 325 zabiegów pomiędzy 2007 (922 wykonane przeszczepy) a 2021 rokiem (1274 przeszczepienia) ^[4].

Dane z 2020 roku opublikowane na platformie Statistica donoszą, że na całym świecie wykonano 129 681 przeszczepień organów z czego najwięcej to przeszczepienia serca (8101) ^[5]. W Polsce w 2021 roku wykonano

200 transplantacji kardiologicznych^[3]. Z analizy statystyki wynika, że średnio rocznie 50,3% pacjentów zapisanych w danym roku na listę oczekujących na przeszczepienie serca nie zostaje zoperowanych. Średni czas oczekiwania na ten narząd wynosił 603 dni, w trybie pilnym 91 dni^[4].

Przedstawione liczby udowadniają, że rozwój transplantacji i poszukiwanie nowych źródeł pozyskiwania narządów i tkanek jest niezwykle istotny.

3. PRZESZCZEPY ALLOGENICZNE

Przeszczep allogeniczny to procedura medyczna polegająca na pobraniu narządu, tkanki lub komórek z organizmu dawcy będącego genetycznie nieidentycznym przedstawicielem tego samego gatunku co potencjalny biorca.

3.1. Regulacje prawne

W przypadku narządów parzystych takich jak nerki czy fragmenty wątroby, a także tkanki regenerujące się takie jak szpik kostny, mogą być pobrane od żywego dawcy^[6]. Należy zwrócić uwagę na wyraźną, świadomą i wolną zgodę dawcy poprzedzona odpowiednią informacją dotyczącą procedury.

Narządy takie jak serce, płuca i trzustka mogą być pobrane do przeszczepu tylko od osoby zmarłej, ze względu na to jak kluczowe dla życia dawcy są te organy. Wyróżnia się dwa główne modele prawne regulujące pobranie materiałów transplantacyjnych *ex mortuo*.

Zasada wyraźnej zgody (opt-in) wymaga zezwolenia pacjenta, aby móc pobrać jego narządy po jego śmierci. Zazwyczaj zgoda na pobranie organów wymaga pisemnego oświadczenia potencjalnego dawcy lub uzyskania zgody od jego najbliższych po jego śmierci. Choć zasada spełnia wymogi poszanowania woli zmarłego to wielu chorych nie zastanawia się nad losami swojego ciała po śmierci. Skutkuje to tym, że wiele osób, które potencjalnie wyraziłyby zgodę na zostanie dawcą nie wyraża żadnej opinii za życia, a to utrudnia proces pobrania narządów i ma niekorzystny wpływ na liczbę przeszczepów^[7]. Taki model został przyjęty np. w USA, Kanadzie, Niemczech czy na Cyprze.

Zasada domniemanej zgody (opt-out) dopuszcza pobranie narządów do przeszczepienia od osoby zmarłej tylko wtedy, gdy ta nie wyrazi na to sprzeciwu za życia. Taka zasada reguluje prawo na terenie np. Francji, Austrii czy Polski^[8].

3.2. Problemy medyczne allotransplantacji

W ostatniej dekadzie doszło do znaczącego postępu transplantologii. Dzięki ulepszeniu procesu poboru i ochrony narządów, a także opracowaniu nowych leków immunosupresyjnych, przeszczepy przeszły z metody eksperymentalnej do powszechnego wyboru leczenia w schyłkowych fazach choroby ^[9].

Tak jak w przypadkach większości nowych terapii medycznych, transplantacja została początkowo proponowana u dorosłych pacjentów, a dopiero później wprowadzono ją w pediatrii. W przeciwieństwie do dorosłych, których organizm łatwiej radzi sobie z przyjęciem przeszczepu, dzieci niestety wymagają organów odpowiedniej do ich wieku wielkości. Stanowi to problem w transplantologii pediatrycznej i przyczynę zgonów pacjentów w oczekiwaniu na narząd spełniający kryteria rozmiarów ^[10].

Kolejną przeszkodą w przeszczepianiu allogenicznym jest zgodność tkankowa biorcy i dawcy. Podstawowym czynnikiem warunkującym jest układ AB0. Wyjątek stanowią bardzo małe dzieci w wieku poniżej 12 miesięcy ^[11]. Niemowlęta nie mają dobrze rozwiniętego układu odpornościowego, dzięki czemu możliwe jest przyjęcie przez nich opisanego przeszczepu. Podobny sukces osiągnięto w transplantacji serca niezgodnych z AB0 u dorosłych, ale tylko u tych pacjentów, którzy mieli niski poziom przeciwciał anty-A lub anty-B ^[12, 13].

3.3. Problemy etyczne i moralne

Wraz z popularyzacją transplantologii pojawiły się problemy etyczne.

Najczęstszą przeszkodą w przypadku pobierania narządów z zasadą domniemanej zgody jest obawa rodziny zmarłego o słuszność pobrania jego organów ^[14]. Nierzadko krewni mają nadzieję, że członek rodziny wyzdrowieje. Akceptacja informacji o śmierci bliskiej osoby i podjęcie decyzji o zgodzie na pobranie narządów jest bardzo trudnym emocjonalnie doświadczeniem i nie rzadko wymaga więcej czasu. Niestety w transplantologii czas działa na niekorzyść. Aby zwiększyć szanse na udany przeszczep i wesprzeć członków rodziny zmarłego, lekarz powinien jak najszybciej powiadomić o śmierci mózgu pacjenta oraz zapytać o możliwość pobrania organów patrząc na dobro oczekujących na nie innych pacjentów.

Zasada opt-out choć zwiększa szanse na pobór materiału transplantacyjnego to działa tylko na domniemaniu opinii zmarłego ^[15]. W krajach,

w których ta zasada reguluje prawo to osoby trzecie takie jak rodzina, bliscy lub lekarz decydują o losach ciała zmarłego. Choć działa się dla dobra większości to opinia potencjalnego dawcy nie jest w pełni potwierdzona.

Kolejną kwestią poruszaną w debatach o słuszności przeszczepów jest temat religii oraz przekonań kulturowych. Większość odłamów religii chrześcijańskich uważa dawstwo organów za najwyższy akt altruizmu oraz pochwała idee zgody domniemanej^[16]. Wynika to z wierzenia w brak jedności duchowocieleśnej po śmierci człowieka.

W kulturze islamu choć większość muzułmańskich duchownych pochwała transplantacje to w przypadkach przeszczepów *ex mortuo* wymaga się świadomej zgody dawcy oraz śmierci mózgu^[16].

Podobnie jest w buddyzmie, który choć jasno głosi, że oddanie organów jest szczytnym aktem to zasada zgody domniemanej działa wbrew tej filozofii^[16].

W kulturze judaistycznej bycie dawcą jest również wielką zasługą, ale napotyka się więcej utrudnień. Część żydów uważa, że zwłokom w czasie przeszczepienia nie oddaje się należytego szacunku co mogłoby utrudnić zmartwychwstanie ciała. Cała procedura transplantacji musi odbyć się zgodnie z prawem *pikuach nefes*. Innym znaczącym problemem jest też rozbieżność w definiowaniu śmierci^[16]. Niektórzy traktują zgon jako ustanie działania nie tylko układu nerwowego, lecz także układu sercowo-naczyniowego oraz oddechowego. Nie we wszystkich krajach prawo łączy się z przekonaniem religijnymi, dlatego w obowiązku personelu medycznego powinno być zawsze poszanowanie woli pacjenta.

W społeczności świadków Jehowy pod koniec XX wieku były prowadzone debaty dotyczące tematu transplantacji^[17]. Ostatecznie członkowie zgromadzenia postanowili, że decyzyja o oddaniu czy przyjęciu organów należy do dawcy i biorcy. Nie wydano stanowiska w sprawie zgody domniemanej.

4. PRZESZCZEPY KSENOGENICZNE

Przeszczep ksenogeniczny to procedura pobrania narządów, tkanek lub komórek od osobnika jednego gatunku i wszczepieniu ich do organizmu osobnika drugiego gatunku.

Ze względu na ciągle rosnące zapotrzebowanie na materiał transplantacyjny naukowcy podjęli próby wykorzystania organów odzwierzęcych u ludzi.

4.1. Historia i postępy w ksenotransplantacji

Pierwsze próby ksenotransplantacji zostały opisane w literaturze naukowej w 1905 roku ^[18]. Zainteresowanie transplantologią odzwierzęcą spadło, gdy opisano immunologiczne podstawy procesu odrzucania narządu. Wznowienie badań było możliwe dzięki stworzeniu leków immunosupresyjnych.

Pierwszy znaczący dla nauki przeszczep ksenogeniczny został wykonany w 1964 roku ^[19]. 68-letni mężczyzna otrzymał serce szympansa, lecz pacjent zmarł w ciągu 2 godzin po wybudzeniu.

W styczniu 2022 roku lekarze pod kierownictwem kardiochirurga B. Griffith'a i M. Mohiuddin'a przeprowadzili operację przeszczepu serca od genetycznie zmodyfikowanej świni do śmiertelnie chorego pacjenta, który nie kwalifikował się do standardowego przeszczepu allogenicznego ^[20]. Zwierzę, od którego był pobrany narządu przeszło specyficzną edycję genów w celu zmniejszenia ryzyka wystąpienia nadostrego odrzucenia przeszczepu u pacjenta. Niestety biorca zmarł dwa miesiące po przeszczepie. Podczas autopsji lekarze stwierdzili ślady obecności wirusa cytomegalii świńskiej w przeszczepionym sercu, na podstawie którego wnioskuje, że patogen mógł się przyczynić do śmierci mężczyzny. Choć pacjent nie żył długo po operacji to jego przypadek przyczynił się do rozwoju ksenotransplantologii. Badacze uzyskali informacje przydatne do dalszych prac dotyczących tymczasowego wszczepiania serc świni u pacjentów oczekujących na ludzki narząd jak i długoterminowych przeszczepów odzwierzęcych.

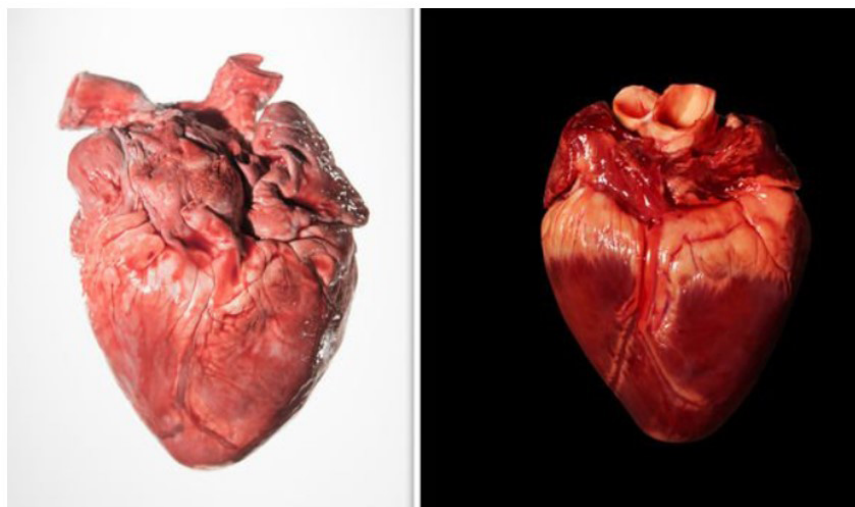
4.2. Potencjalni dawcy narządów dla ludzi

Najbliżsi krewni ludzi to małpy naczelne, dlatego je brano pod uwagę jako pierwszych potencjalnych dawców narządów. W związku z podobną wielkością organów i dobrą kompatybilnością grup krwi do ludzi to szympany zostały wybrane na kandydatów do ksenotransplantacji ^[21]. Niestety z racji, że są one na liście gatunków zagrożonych, a inne rodzaje małp naczelnych nie spełniały kryteriów rozmiarów ciała, cechowały się rzadko występującą grupą krwi 0 (uniwersalny dawca), miały długi okres ciąży czy niewielką ilość potomstwa to naukowcy kontynuowali poszukiwania idealnego dawcy ksenogenicznego.

Takim zwierzęciem okazała się świnka. Użycie jej narządów do przeszczepów w przeciwieństwie do małp, które wykazują się sporym pokrewieństwem do ludzi zmniejsza ryzyko przenoszenia chorób międzygatunkowych ^[22].

Ponadto świnia ma krótki okres ciąży, ma wiele młodych, a jej hodowla jest stosunkowo łatwa i tania. Zwierzę po około 6 miesiącach życia ma organy podobnej wielkości do dorosłego człowieka [23].

Badania przedkliniczne ksenotransplantacji przeprowadzano pomiędzy świniami a małpami naczelnymi [24]. Niestety eksperymenty okazały się bardzo trudne ze względu na występowanie u małp naturalnych przeciwciał przeciwko komórkom świnia, które nie zawsze występują w surowicy ludzkiej [25]. Ponadto stosowanie naczelnych jako modeli uważano za nieetyczne ze względu na bliską filogenetyczność do ludzi. Same badania oraz hodowla okazały się bardzo kosztowne, lecz wielu badaczy uważa, że było to niezbędne dla rozwoju ksenotransplantologii.



Zdjęcie 1. Na zdjęciu porównano serce świnia (z lewej strony) do serca człowieka (z prawej strony) [24]

4.3. Terapie genetyczne zwierząt

Modyfikacje genetyczne zwierząt przeznaczonych do ksenotransplantacji jest ważne ze względu na zmniejszenie ryzyka odrzucenia przeszczepu [26]. Po wszczępieniu obcej tkanki mogą wystąpić trzy rodzaje odrzucenia: nadostre, ostre humoralne lub ostre komórkowe odrzucenie przeszczepu [24].

Typ humoralny, który pojawia się w ciągu kilku minut do kilku godzin po transplantacji jest zależny od antygeny α -Gal (galaktoza- α 1,3-galaktoza). Wstępuje on na komórkach śródbłonna świńskiego narządu. Innymi czynnikami aktywującymi układ odpornościowy biorcy są antygeny inne niż Gal,

Neu5Gc (kwas N-glikoliloneuraminowy) oraz antygen grupowy Sda. Ich obecność wywala łańcuch aktywacji białka dopełniacza, co skutkuje zniszczeniem układu naczyniowego przeszczepu^[27]. W celu uniknięcia ostrego i hiperostrego odrzucenia typu humoralnego modyfikuje się genetycznie świnię poprzez usunięcie wspomnianych antygenów tkankowych zwierzęcia^[28].

W ostrym odrzuceniu przeszczepu typu komórkowego zaangażowane są komórki NK, makrofagi, neutrofile, limfocyty T i B biorcy. Chociaż wykazano, że delecja antygenów α -Gal i ekspresja ludzkich CRP po ksenoprzeszczepie jest związana ze zmniejszoną odpowiedzią komórek T biorcy, to ta modyfikacja genetyczna nie wystarcza do pomyślnego długoterminowego przeżycia przeszczepionego narządu^[29].

Obecnie udało się stworzyć 3 typy ksenogenicznych świń^[30]. Wykorzystano do tego metody polegające na wstrzykiwaniu mikroiniekcją DNA do przedjądrzy zygot pobranych od samicy, a następnie przenoszono powstały zarodek do świni biorcy na czas ciąży^[31]. Metodą alternatywną jest transdukcja oocytów. Wykorzystuje ona wirusa z genem niedoboru replikacji. Umożliwia on dostarczenie transgenu do oocytu świni co skutkuje zwiększeniem odsetka transgenicznego potomstwa^[32].

4.4. Niegenetyczne czynniki wpływające na odrzucenie ksenoprzeszczepu

Ksenotransplantacja narządów od świń wymaga wzięcia pod uwagę różnic fizjologicznych mających wpływ na przyjęcie i funkcjonowanie przeszczepu^[24].

Hematologia świń różni się kilkoma znaczącymi parametrami od hematologii ludzkiej. Liczba erytrocytów, leukocytów i trombocytów u tych zwierząt jest wyższa niż u gatunku ludzkiego, zaś poziom hemoglobiny jest niższy^[33]. Istnieje również zmienność aminokwasów między erytropoetyną wytwarzaną przez świnię a tym samym hormonem u ludzi, co może przyczyniać się do stopniowego rozwoju niedokrwistości normocytarnej u biorcy.

Ksenoprzeszczepy serca związane są z potencjalnymi patologicznymi skutkami dla biorcy. Niezmienione ksenoprzeszczepy serca ulegną nieadaptacyjnemu przerostowi, prowadzącemu do rozkurczowej niewydolności serca we wczesnym okresie po wszczepieniu^[34]. Podejrzewa się, że masywny przerost serca związany ze zwiększoną ekspresją mTOR w przeszczepionym narządzie i wyższym ciśnieniem krwi u biorcy, zarówno u naczelnych jak i ludzi.

Naczelnne mają ogólnoustrojowy opór naczyniowy i średnie ciśnienie tętnicze znacznie wyższe niż świnie, co może stanowić zewnętrzną przyczynę przerostu ksenoprzeszczepu. Przyszli biorcy ksenoprzeszczepów wymagają ścisłej kontroli ciśnienia krwi, aby zmniejszyć zewnętrzną nacisk na przeszczep.

4.5. Przeszczep ksenoserca

7 stycznia 2022 roku lekarze z Uniwersytetu Maryland w Baltimore przeprowadzili ksenotransplantację serca [24]. Narząd został pobrany od genetycznie zmodyfikowanej świni i został przeniesiony do organizmu mężczyzny, który nie kwalifikował się do przeszczepu allogenicznego ani do wszczepienia urządzenia wspomagającego pracę komory.

Po zabiegu heteroprzeszczep funkcjonował natychmiast, a ciągłe pozaustrojowe natlenianie krwi (ang. Extra Corporeal Membrane Oxygenation, ECMO) zostało odłączone po kilku dniach. Pacjenta udało się ekstubować i rozpocząć rehabilitację.

Wczesne wyniki po zabiegu wskazywały, że serce działało wyjątkowo dobrze. Jednak w 8 tygodniu po transplantacji jego stan zaczął się pogarszać i niestety zmarł z powodu niewydolności wielonarządowej.

Choć doszło do nadostrego odrzucenia ksenoprzeszczepu to operacja pozwoliła przedłużyć życie tego pacjenta, a jego przypadek przyczynił się do rozwoju ksenotransplantologii. Zdobyte doświadczenie badaczy pozwoli na podjęcie dalszych kroków w opracowywaniu nowych metod dotyczących tymczasowego wszczepiania serc świni u pacjentów oczekujących na ludzki narząd jak i długoterminowych przeszczepów odzwierzęcych.

4.6. Kwestie etyczne ksenotransplantacji

Wykorzystanie zwierząt zmodyfikowanych genetycznie do hodowli narządów ksenogenicznych budzi szereg wątpliwości etycznych. Istnieje jednak wiele korzyści społecznych, które ksenotransplantacja może przynieść m. in. pozwoli ona na skrócenie czasu oczekiwania na odpowiedni alloprzeszczep, a w przyszłości zaspokoi zapotrzebowania na materiały transplantacyjne [35].

W niektórych kulturach stosowanie materiałów pochodzenia wieprzowego jest tematem tabu. Część badaczy należących do wspomnianej grupy wyznaniowej pozwala na przeszczepy ksenogeniczne, ale tylko w przypadkach, gdy pacjent bez wszczepienia narządu umrze [36].

Świnie hodowane jako źródło ksenoprzeszczepów prawdopodobnie wymagałyby zamknięcia w celu zmniejszenia ryzyka infekcji i późniejszego zakażenia przyszłego biorcy. Zwierzęta trzymane w takich warunkach nie znajdowałyby się w środowisku, w którym mogłyby swobodnie wędrować i wchodzić w interakcje z innymi zwierzętami, jak niektóre ich odpowiedniki hodowane w gospodarstwach rolnych^[37]. Prowadzi to do konfliktu pomiędzy troską się o dobrostan zwierząt, a potrzebami społeczeństwa. Problem wymaga dalszych dyskusji i prób rozwiązania problemu z korzyścią zarówno dla zwierząt jak i potencjalnych biorców.

Nierzadko poruszonym problemem w debatach dotyczących ksenotransplantacji jest narażenie pacjenta z obniżoną odpornością na ryzyko zakażenia chorobą odzwierzęcą. Świnie są nosicielami niektórych wirusów, które są realnym zagrożeniem dla potencjalnego biorcy. Przedstawicielami takich są endogenne retrowirusy świńskie i wirus Nipah^[37]. Rozwiązaniem dla zmniejszenia ryzyka zarażeń jest już wspomniana sterylna hodowla oraz testy molekularne na obecność wirusów.

Ksenotransplantologia znajduje się na razie w sferze badań, lecz już teraz powinno się myśleć o etyce projektu.

5. BIODRUK 3D

Trójwymiarowy biodruk to technika polegająca na łączeniu komórek, czynników wzrostu i/lub biomateriałów w celu wytworzenia złożonej struktury naśladującej naturalne tkanki^[38, 39]. Do druku wykorzystuje się specjalne materiały nazywane bioatramentami. Zawierają one żywe komórki oraz nośniki zapewniające środowisko i ochronę dla nich podczas procesu drukowania. Biodruk 3D nakłada materiał warstwa po warstwie tworząc skomplikowane struktury.

Uważa się, że tworzone przy pomocy tej technologii modele mogą pełnić zarówno rolę funkcjonalnego organu do zastosowania w procedurach medycznych jak i zastąpić zwierzęta w badaniach klinicznych.

5.1. Możliwości i etapy biodruku

Procedury biodruku 3D obejmują zarówno drukowanie macierzy pozakomórkowej, jak i mieszanie komórek z hydrożelami nakładanymi warstwowo w celu wytworzenia pożądanej tkanki.

Biodrukarka zapewnia wysoka precyzję wykonania, swobodę w budowie modelu i kontrole porowatości czy połączeń międzykomórkowych. Ponadto pozwala na mieszanie różnych materiałów, w tym precyzyjnego umieszczania komórek, białek, leków, DNA i innych czynników biochemicznych ^[40].

Typowy proces biodrukowania składa się z trzech etapów: przetwarzania wstępnego (ang. pre-processing), przetwarzania (ang. processing) i przetwarzania końcowego (ang. post-processing) ^[41].

Wstępne przetwarzanie obejmuje obrazowanie tkanki lub narządu za pomocą tomografii komputerowej (ang. Computed tomography, CT), obrazowania metodą rezonansu magnetycznego (ang. magnetic resonance imaging, MRI) i technik obrazowania ultrasonograficznego. Wygenerowane modele 3D są następnie konwertowane do formatu plików STL ^[41].

Proces przetwarzania obejmuje biodrukowanie laserowe, kropelkowe, drukowanie oparte na wytlaczaniu oraz oparte na stereolitografii w celu stworzenia pożądanej struktury ^[41].

Przetwarzanie końcowe jest niezbędne do utrzymania stabilności otworzonego modelu biologicznego ^[41]. Potrzeba do tego zarówno stymulacji mechanicznej jak i chemicznej. Polega to na wysyłaniu sygnału do komórek, aby kontrolować przebudowę i wzrost tkanki. Ponadto wydrukowana struktura ma zapewniony transport składników odżywczych. Tworzy to środowiska mikrogravitacyjne, o odpowiednim ciśnieniu zapewniające przepływ roztworu przez komórki. Umożliwia to szybkie dojrzewanie otrzymanego modelu, lepsze jego unaczynienie i zwiększa szanse na przeżycie potencjalnego przeszczepu.

Biodruk 3D znajduje szerokie zastosowanie w medycynie, w tym w modelowaniu chorób, odkrywaniu i testowaniu leków oraz w przyszłości jako główne źródło materiałów transplantacyjnych.

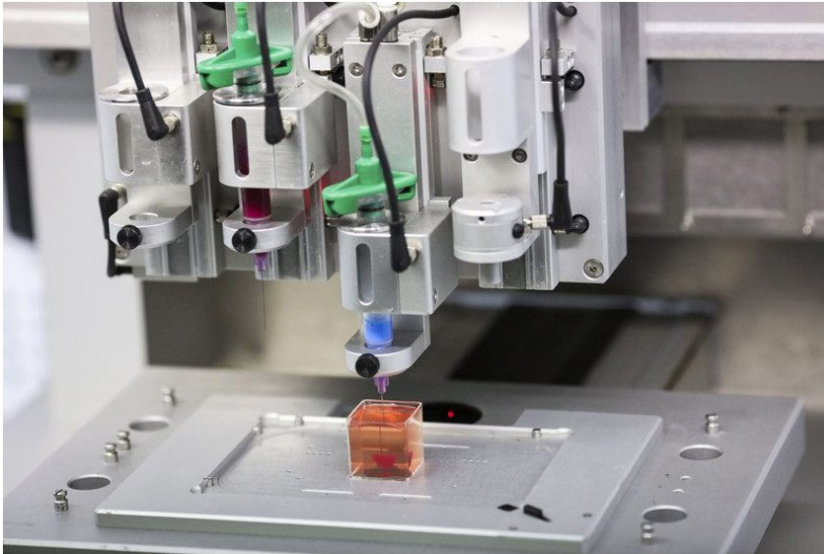
5.2. Biodruk w kardiologii

Biodrukowanie może rozwiązać stale narastający kryzys niedoboru narządów do transplantacji. Choć omawiana metoda dopiero pozwala na drukowanie prostych modeli biologicznych to już wykorzystuje się je do przeszczepów. Przykładem jest niemowlę cierpiące na tracheobronchomalację, które otrzymało szynę tchawicy wykonaną za pomocą biodruku 3D ^[42].

Serce jako najbardziej pożądany narząd w transplantologii niestety na obecną chwilę jest zbyt skomplikowany na możliwości biodruku 3D. Model bowiem musi spełniać nie tylko wymagania strukturalne, ale także

wymagania dotyczące unaczynienia, obciążenia mechanicznego i propagacji sygnału elektrycznego ^[43].

W 2019 roku izraelscy naukowcy wydrukowali serce wielkości serca królika z ludzkich komórek ^[44]. Stworzona struktura zawiera naczynia krwionośne, komory i inne struktury, których serce potrzebuje do normalnego funkcjonowania. Badacze wykorzystali do stworzenia bioatramentu tkankę tłuszczową pobraną od pacjentów. Następnie przekształcili adipocyty w komórki macierzyste i przenieśli je do żelu, w którym mogły przekształcać się dalej w komórki serca. Tak otrzymany materiał został wykorzystany do zbudowania eksperymentalnego organu warstwa po warstwie. Choć serce z biodruku jest małe i nie bije to uważa się, że to duży postęp w działaniach na rzecz odkrycia nowych metod leczenia chorób sercowych.



Zdjęcie 2. Na zdjęciu przedstawiono proces biodruku serca drukarką 3D na Uniwersytecie Tel Aviv ^[45]

Biodruk 3D można też wykorzystać do personalizowanych implantów, takich jak stenty, łąty chirurgiczne, naczynia krwionośne czy zastawki serca ^[44]. Projekty są jeszcze nadal w początkowych fazach rozwoju, lecz już widać korzyści z wytwarzania implantów wykonanych z własnych komórek macierzystych pacjenta.

5.3. Wady modeli z biodruku 3D

Biodruk 3D jest stosunkowo nową technologią i posiada problemy, które będą z czasem rozwiązywane.

Głównym z nich jest jakość wydrukowanego modelu w porównaniu z żywym organizmem ^[46]. Planuje się, aby otrzymywane struktury tkankowe spełniały funkcje fizjologiczne. Już została omówiona kwestia drukowania bardzo złożonych narządów takich jak serce, które musi precyzyjnie działać i wytrzymać duże obciążenie mechaniczne. Obecnie tak skomplikowane modele jeszcze nie mogą być wszczepiane u pacjentów.

Biodruki mają zastąpić też zwierzęta w badaniach, co rozwiązałoby kwestie etyczne takich działań, lecz potrzeba jeszcze dużo czasu, aby opisywana technologia odzwierciedlała faktyczne działanie organizmu.

6. PODSUMOWANIE

Transplantologia jest wciąż rozwijającą się gałęzią medycyny. Jej zadowalające efekty zdrowotne dają nadzieję na przyszłość terapii wielu chorób kardiologicznych, które obecnie możemy leczyć jedynie objawowo.

Niestety choć widać wiele korzyści płynących z przeszczepów to największym problemem w dalszych postęпах jest proces pozyskiwania materiałów transplantacyjnych. Liczba oczekujących na nowy narząd pacjentów znacznie przewyższa liczbę potencjalnych dawców.

Xenotransplantacja oraz biodruk 3D zdają się być rozwiązaniem kryzysu transplantologii i dają nadzieje na przyszłość nie tylko dla kardiologii, ale i innych dziedzin medycyny.

REFERENCJE

- [1] Wagner, I. (2003). Społeczna wiedza o transplantacjach narządów w Polsce- przesłanki dawców i biorców. Dar życia i jego społeczny kontekst. *Zabiegi transplantacyjne w świadomości społecznej*, Tychy, 56.
- [2] Timmis, A., Vardas, P., Townsend, N., Torbica, A., Katus, H., De Smedt, D., ... & Kaliská, G. (2022). *European Society of Cardiology: cardiovascular disease statistics 2021*. *European Heart Journal*, 43(8), 716-799.
- [3] Steffel, M., Williams, E. F., & Tannenbaum, D. (2019). Does changing defaults save lives? Effects of presumed consent organ donation policies. *Behavioral Science & Policy*, 5(1), 68-88.

- [4] http://www.poltransplant.org.pl/statystyka_2021.html.
- [5] <https://www.statista.com/statistics/398645/global-estimation-of-organ-transplantations>.
- [6] http://www.kidney.org/professionals/KDOQI/guidelines_ckd/toc.htm.
- [7] Chazan, B. (1998). Transplantacja komórek, tkanek i narządów w świetle obowiązującego prawa na tle rozwiązań przyjętych przez Radę Europy i ustawodawstwa innych krajów.
- [8] Załuski, W. (2014). Czy słuszna jest zasada domniemanej zgody na pobieranie narządów od pacjentów? *Prawo i Więź*, 3(3 (9)).
- [9] Broelsch, C. E., Emond, J. C., Thistlethwaite, J. R., Whittington, P. F., Zucker, A. R., Baker, A. L., ... & Lichtor, J. L. (1988). Liver transplantation, including the concept of reduced-size liver transplants in children. *Annals of surgery*, 208(4), 410.
- [10] Guzik-Makaruk, E. M. (2014). System źródeł prawa RFN z uwzględnieniem obszaru medycyny transplantacyjnej. In Człowiek i prawo międzynarodowe. Księga dedykowana Profesorowi Bogdanowi Wierzbickiemu, red. nauk. Maciej Perkowski, Janusz Szymański, Mieczysława Zdanowicz (pp. 131-144). Temida 2.
- [11] Palma, J. M. (2005). What's New, What's Hot in Organ Transplantation. *IMMUNOLOG IMMUNOLOGY REPORTTM*, 29.
- [12] Tydén, G., Hagerman, I., Grinnemo, K. H., Svenarud, P., van der Linden, J., Kumlien, G., & Wernerson, A. (2012). Intentional ABO-incompatible heart transplantation: a case report of 2 adult patients. *The Journal of heart and lung transplantation*, 31(12), 1307-1310.
- [13] Tydén, G., Hagerman, I., Grinnemo, K. H., Svenarud, P., van der Linden, J., Kumlien, G., & Wernerson, A. (2012). Intentional ABO-incompatible heart transplantation: a case report of 2 adult patients. *The Journal of heart and lung transplantation*, 31(12), 1307-1310.
- [14] Michaut, C., Baumann, A., Gregoire, H., Laviale, C., Audibert, G., & Ducrocq, X. (2019). An assessment of advance relatives approach for brain death organ donation. *Nursing ethics*, 26(2), 553-563.
- [15] Trzcińska, M., Woderska, A., & Włodarczyk, Z. (2014). Psychological principles in regard to the interview with the deceased donor's family. *Anesthesiology Intensive Therapy*, 46(3), 200-207.

- [16] Lubas, S., Krzyżanowski, F. (2017). Transplantacja w świetle wielkich religii świata, *W drodze do brzegu życia, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Białystok*, s. 64-73.
- [17] <https://piotrandryszczak.pl/vademecum/czy-swiadkowie-jehowy-sa-kompetentni-w-orzekaniu-o-transfuzji-krwi-przeszczepy-transplantacje.html>
- [18] Reemtsma, K. (1995). Xenotransplantation: a historical perspective. *ILAR journal*, 37(1), 9-12.
- [19] Cooper, D. K. (2012, January). A brief history of cross-species organ transplantation. In *Baylor University Medical Center Proceedings* (Vol. 25, No. 1, pp. 49-57). Taylor & Francis.
- [20] Kotz, D. (2022). University of Maryland School of Medicine Faculty Scientists and Clinicians Perform Historic First Successful Transplant of Porcine Heart into Adult Human with End-Stage Heart Disease. 2022.
- [21] Michler, R. E. (1996). Xenotransplantation: risks, clinical potential, and future prospects. *Emerging infectious diseases*, 2(1), 64.
- [22] Dooldeniya, M. D., & Warrens, A. N. (2003). Xenotransplantation: where are we today?. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 96(3), 111-117.
- [23] Carrier, A. N., Verma, A., Mohiuddin, M., Pascual, M., Muller, Y. D., Longchamp, A., ... & Meier, R. P. (2022). Xenotransplantation: A new era. *Frontiers in Immunology*, 13.
- [24] Carrier, A. N., Verma, A., Mohiuddin, M., Pascual, M., Muller, Y. D., Longchamp, A., ... & Meier, R. P. (2022). Xenotransplantation: A new era. *Frontiers in Immunology*, 13.
- [25] <https://www.express.co.uk/news/science/1169312/heart-transplant-pig-heart-human-transplant-science>
- [26] Wolf, E., Kemter, E., Klymiuk, N., & Reichart, B. (2019). Genetically modified pigs as donors of cells, tissues, and organs for xenotransplantation. *Animal Frontiers*, 9(3), 13-20.
- [27] Grafals, M., & Thurman, J. M. (2019). The role of complement in organ transplantation. *Frontiers in Immunology*, 10, 2380.
- [28] Lu, T., Yang, B., Wang, R., & Qin, C. (2020). Xenotransplantation: current status in preclinical research. *Frontiers in immunology*, 10, 3060.

- [29] Ezzelarab, M. B., Ayares, D., & Cooper, D. K. (2015). Transgenic expression of human CD 46: does it reduce the primate T-cell response to pig endothelial cells?. *Xenotransplantation*, 22(6), 487-489.
- [30] Meier, R. P., Muller, Y. D., Balaphas, A., Morel, P., Pascual, M., Seebach, J. D., & Buhler, L. H. (2018). Xenotransplantation: back to the future?. *Transplant international*, 31(5), 465-477.
- [31] Hammer, R. E., Pursel, V. G., Rexroad, C. E., Wall, R. J., Bolt, D. J., Ebert, K. M., ... & Brinster, R. L. (1985). Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*, 315(6021), 680-683.
- [32] Cabot, R. A., Kühholzer, B., Chan, A. W. S., Lai, L., Park, K. W., Chong, K. Y., ... & Prather, R. S. (2001). Transgenic pigs produced using in vitro matured oocytes infected with a retroviral vector. *Animal biotechnology*, 12(2), 205-214.
- [33] Iwase, H., Klein, E. C., & Cooper, D. K. (2018). Physiologic aspects of pig kidney transplantation in nonhuman primates. *Comparative Medicine*, 68(5), 332-340.
- [34] Goerlich, C. E., Singh, A., Treffalls, J. A., Griffith, B., Ayares, D., & Mohiuddin, M. M. (2022). An intrinsic link to an extrinsic cause of cardiac xenograft growth after xenotransplantation: Commentary (in response to): Zaman, R. et al. Selective loss of resident macrophage-derived insulin-like growth factor-1 abolishes adaptive cardiac growth to stress. *Immunity* 54, 2057–2071. e6 (2021). *Xenotransplantation*, 29(1), e12724.
- [35] Wijkstrom, M., Iwase, H., Paris, W., Hara, H., Ezzelarab, M., & Cooper, D. K. (2017). Renal xenotransplantation: experimental progress and clinical prospects. *Kidney international*, 91(4), 790-796.
- [36] Loike, J. D., & Kadish, A. (2018). Ethical rejections of xenotransplantation? The potential and challenges of using human-pig chimeras to create organs for transplantation. *EMBO reports*, 19(8), e46337.
- [37] Loike, J. D., & Kadish, A. (2018). Ethical rejections of xenotransplantation? The potential and challenges of using human-pig chimeras to create organs for transplantation. *EMBO reports*, 19(8), e46337.
- [38] Cui, X., & Boland, T. (2009). Human microvasculature fabrication using thermal inkjet printing technology. *Biomaterials*, 30(31), 6221-6227.

- [39] Xu, T., Zhao, W., Zhu, J. M., Albanna, M. Z., Yoo, J. J., & Atala, A. (2013). Complex heterogeneous tissue constructs containing multiple cell types prepared by inkjet printing technology. *Biomaterials*, 34(1), 130-139.
- [40] Colina, M., Serra, P., Fernández-Pradas, J. M., Sevilla, L., & Morenza, J. L. (2005). DNA deposition through laser induced forward transfer. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(8), 1638-1642.
- [41] Vijayavenkataraman, S., Yan, W. C., Lu, W. F., Wang, C. H., & Fuh, J. Y. H. (2018). 3D bioprinting of tissues and organs for regenerative medicine. *Advanced drug delivery reviews*, 132, 296-332.
- [42] Bracci, R., Maccaroni, E., & Cascinu, S. (2013). Bioresorbable airway splint created with a three-dimensional printer. *New England Journal of Medicine*, 368(21), 2043-5.
- [43] Cui, H., Miao, S., Esworthy, T., Zhou, X., Lee, S. J., Liu, C., ... & Zhang, L. G. (2018). 3D bioprinting for cardiovascular regeneration and pharmacology. *Advanced drug delivery reviews*, 132, 252-269.
- [44] <https://www.nbcnews.com/mach/science/israeli-scientists-create-world-s-first-3d-printed-heart-using-ncna996031>
- [45] <https://www.euractiv.com/section/digital/news/eu-industry-touts-3d-printing-as-immediate-solution-to-covid-19-shortages/>
- [46] Xu, H., Su, Y., Liao, Z., Liu, Z., Huang, X., Zhao, L., ... & Huang, D. (2022). Coaxial bioprinting vascular constructs: A review. *European Polymer Journal*, 111549.

Dziesiąta część *Innowacji w medycynie*, jest kolejnym w serii kompendium poświęconym najnowszym osiągnięciom współczesnej medycyny. Monografia zawiera 14 rozdziałów naukowych skupionych wokół problemu chorób cywilizacyjnych.

(...) seria książek składa się z marzeń i wiary studentów w możliwość współudziału w aktywności naukowej, tworzenia lepszej medycyny, sprawniejszej, precyzyjnej, efektywnej i powszechnie dostępnej (czyli tańszej), w to, że można i warto być lekarzem, nie tylko dlatego, że czekają pacjenci, ale też dlatego, że to jest pasjonująca przygoda na całe życie. Bo lekarz nie leczy pacjenta, tylko naprawia kawałek świata. Musi go zatem rozumieć. Wiemy, że te książki składają się ze wielu godzin szukania i składania słów w większą całość przez autorów tak, byś Ty Czytelniku uzyskał wiedzę, czyli informacje ułożone w sens i potencjał użyteczności.

Z przedmowy
dr hab. n. med. Zbigniew Nawrat, prof. IPS

ISBN: 978-83-67527-60-6