

INNOWACJE W MEDYCYNIE

PRZEGLĄD WYBRANYCH TECHNOLOGII XXI W.

TOM VIII

Redakcja

Jakub Kufel Piotr Lewandowski

ARCHAEGRAPH
Wydawnictwo Naukowe

INNOWACJE W MEDYCYNIE

- PRZEGLĄD WYBRANYCH TECHNOLOGII XXI W.

TOM 8

REDAKCJA

JAKUB KUFEL
PIOTR LEWANDOWSKI

INNOWACJE W MEDYCYNIE
PRZEGLĄD WYBRANYCH TECHNOLOGII XXI W.
TOM VIII

Redakcja
Jakub Kufel Piotr Lewandowski

ARCHAEGRAPH
Wydawnictwo Naukowe

REDAKCJA

JAKUB KUFEL, PIOTR LEWANDOWSKI

OPIEKA NAUKOWA

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

RECENZENCI

LEK. KATARZYNA BARGIEŁ

LEK. MICHAŁ DUDA

MGR WERONIKA GWIŹDZIK

LEK. PAULA NOWOCIEŃ

LEK. WIKTORIA BARTNIKOWSKA

LEK. MATEUSZ OŻÓG

MGR KAROL KRYSZEK

KOREKTA REDAKTORSKA

KAROL ŁUKOMIAK

DIANA ŁUKOMIAK

SKŁAD I PROJEKT OKŁADKI

KAROL ŁUKOMIAK

© COPYRIGHT BY AUTHORS & ARCHAEGRAPH

ISBN: 978-83-67527-35-4

WERSJA ELEKTRONICZNA DOSTĘPNA NA STRONIE INTERNETOWEJ WYDAWCY:

www.archaeograph.pl

ARCHAEGRAPH
Wydawnictwo Naukowe

ŁÓDŹ, WRZESIEŃ 2022

SPIS TREŚCI

Przedmowa.....	7
Wolne krążące DNA jako potencjalny wskaźnik uszkodzenia mięśnia sercowego	9
Piotr Lewandowski, Maciej Baron	
Przegląd innowacji w przeczewnikowych metodach naprawy wad zastawkowych serca	19
Karol Żmudka, Aleksandra Włosowicz, Patrycja Pabis, Hanna Porwolik, Aleksandra Spychał	
Zastosowanie terapii V-V ECMO u pacjentów z COVID-19 w stadium z ostrą niewydolnością oddechową	51
Dominika Majer, Krzysztof Krukowski, Michał Wilk, Emilia Słabońska	
Immunoterapia Alzheimerera Aducanumabem – przeciwciałem monoklonalnym redukującym złogi amyloidu beta	71
Krzysztof Gładkowski, Rafał Górka, Julia Kaczmarczyk, Aleksandra Kaluża	
Innowacje w leczeniu migreny	83
Emilia Słabońska, Dominika Majer, Krzysztof Krukowski	
Zastosowanie komórek macierzystych w leczeniu zaburzeń neurologicznych	107
Aleksandra Kaluża, Julia Kaczmarczyk, Krzysztof Gładkowski, Rafał Górka	
Zastosowanie noża gamma w leczeniu nerwobólu nerwu trójdzielnego oraz czynniki wpływające na powodzenie terapii	121
Marta Leidgens, Angelika Garbacik	
Nowoczesne metody ablacji guza falami o częstotliwości radiowej (RFA) oraz falami o spektrum mikrofal (MWA) – nowa nadzieja w leczeniu nowotworów	133
Anna Kozub, Eliza Barczyk, Joanna Bączyk, Wojciech Dobczyński, Zofia Graca, Martyna Żurek	

Potencjał technologii szczepionek mRNA w terapii chorób nowotworowych	155
Julia Kaczmarczyk, Karolina Gancarczyk, Rafał Górka, Aleksandra Kaluża	
Urazy rdzenia kręgowego – metody naprawcze i perspektywy leczenia	173
Marcin Borzęcki, Julia Wnuk, Hanna Porwolik	
Wykorzystanie biomateriałów w procesie sterowanej regeneracji kości	205
Tomasz Furgot, Tola Kotkiewicz, Julia Gawron, Agnieszka Sawina, Michalina Masternak, Agnieszka Nowotarska	
Wpływ stresu na długość telomerów i w konsekwencji na proces starzenia się komórek. Wykorzystanie telomerazy w terapii przeciwstarzeniowej	237
Natalia Denisiewicz, Michał Bielówka, Łukasz Czogalik, Michał Janik, Magdalena Stencel, Jakub Kufel	
CRISPR-Cas9: przegląd badań klinicznych nowej metody terapii genowej	263
Łukasz Czogalik, Magdalena Stencel, Natalia Denisiewicz, Michał Janik, Michał Bielówka, Jakub Kufel	
Doustna antykoncepcja dla mężczyzn	283
Dominika Majer, Krzysztof Krukowski, Emilia Słabońska	
Terapia komórkami macierzystymi w chorobach jelita cienkiego oraz grubego	287
Maciej Smreczak, Julia Cieśla, Kinga Dworak, Natalia Trędotą	
Rola witamin w zapobieganiu i leczeniu depresji	313
Michał Janik, Michał Bielówka, Łukasz Czogalik, Natalia Denisiewicz, Magdalena Stencel, Jakub Kufel, Maciej Koźlik	
Terapia z wykorzystaniem technik wirtualnej rzeczywistości w leczeniu fobii społecznej	331
Magdalena Stencel, Michał Bielówka, Łukasz Czogalik, Natalia Denisiewicz, Michał Janik, Jakub Kufel	
Postowie	349

Przedmowa

Ósma część *Innowacji w medycynie*, jest kolejnym w serii kompendium poświęconym najnowszym osiągnięciom współczesnej medycyny.

Monografia zawiera 17 rozdziałów naukowych skupionych wokół problemu chorób cywilizacyjnych. Pierwsze rozdziały omawiają tematykę uszkodzenia mięśnia sercowego, wad zastawkowych czy zastosowania ECMO. W kolejnych rozdziałach odkrywamy zagadnienia związane z leczeniem choroby Alzheimera, migreny oraz zaburzeń neurologicznych. Następnie przechodzimy do tematyki leczenia chorób nowotworowych – metod ablacji czy szczepionek miRNA. Książkę kończą tematy nowych metod leczenia z wykorzystaniem osiągnięć biotechnologii czy wirtualnej rzeczywistości, a także niewykorzystanego potencjału witamin.

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

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

Jakub Kufel
Piotr Lewandowski

Redaktorzy naukowci

WOLNE KRAŻĄCE DNA JAKO POTENCJALNY WSKAŹNIK USZKODZENIA MIĘŚNIA SERCOWEGO

PIOTR LEWANDOWSKI, MACIEJ BARON

Katedra Histologii i Patologii Komórki, Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Abstrakt: Wolne krążące DNA (cfDNA) to cząsteczki kwasów deoksyrybonukleinowych, które powstają wskutek uszkodzenia komórek, a następnie przedostają się do krwi. W przypadku serca cfDNA uwalniane jest z uszkodzonych kardiomiocytów do krążenia wieńcowego. Wolne krążące DNA posiada charakterystyczne tkankowo wzorce metylacji, co pozwala określić jego pochodzenie, tym samym umożliwiając diagnostykę stanu chorobowego określonego narządu. Wyniki badań doświadczalnych wskazują na wzrost stężenia cfDNA w przebiegu szeregu schorzeń mięśnia sercowego przebiegających z martwicą kardiomiocytów takich, jak niewydolność serca czy ostre zapalenie mięśnia sercowego. Obecnie, jednym z potencjalnych zastosowań cfDNA jest monitorowanie ostrego odrzucenia przeszczepu serca. Wykazano bowiem, iż czułość oceny stężenia cfDNA pochodzącego od dawcy przewyższa czułość klasycznej biopsji endomiokardialnej. Zatem może ona w sposób istotny ograniczyć inwazyjne monitorowanie odrzutu potransplantacyjnego serca. Celem niniejszej monografii jest zbiorcze przedstawienie aktualnego stanu wiedzy dotyczącego cfDNA.

Słowa kluczowe: wolne krążące DNA (cfDNA), płynna biopsja, uszkodzenie mięśnia sercowego, transplantacja serca

Abstract: Circulating free DNA (cfDNA) are particles of a DNA that have passed from the damaged cell into the peripheral blood. In case of heart, cfDNA is released from damaged cardiomyocytes into coronary circulation. Circulating free DNA exhibits unique tissue-specific methylation patterns that allow its origin to be determined and a pathological condition to be diagnosed. Elevated levels of cfDNA in plasma have been observed in many different cardiac diseases such as heart failure and myocarditis. One of the most important potential applications of cfDNA is monitoring acute rejection in heart transplantation, where the method sensitivity higher than standard biopsy. This method can significantly reduce invasive monitoring of posttransplant heart rejection. In this monograph, we summarize the current knowledge of circulating free DNA, methods for its isolation and quantification, and highlight its diagnostic potential in cardiac muscle damage.

Keywords: circulating free DNA, liquid biopsy, heart muscle damage, heart transplant

1. Wstęp

Przyjętą obecnie w oparciu o standardy towarzystw kardiologicznych metodą określenia uszkodzenia mięśnia sercowego jest biochemiczna diagnostyka enzymów uszkodzenia mięśnia sercowego (troponina T i I oraz peptydy natriuretyczne)¹. Ocena tych wskaźników pozwala na określenie stopnia uszkodzenia serca oraz jego monitorowanie. Kolejną metodą wykorzystywaną do diagnostyki i monitorowania uszkodzenia mięśnia sercowego jest biopsja endomiokardialna. Jednakże ze względu na inwazyjny charakter a także potencjalne powikłania jest wykorzystywana w nielicznych ośrodkach kardiologicznych.

Obecnie prowadzone badania koncentrują się na poszukiwaniu nowych biomarkerów pozwalających rozpoznawać mikrouszkodzenia serca. Jednym z czynników, który wydaje się mieć największy potencjał diagnostyczny jest cfDNA. Jest ono traktowane jak potencjalny kandydat do tzw. płynnej biopsji (ang. *liquid biopsy*), mogącej w przyszłości zastąpić klasyczną biopsję endomiokardialną.

Celem pracy było podsumowanie dotychczasowych badań poświęconych zastosowaniu wolnego krążącego DNA w kardiologii. Do realizacji pracy wykorzystano bazę literaturową PubMed i Scopus.

2. Czym jest wolne krążące DNA?

Wolne krążące DNA, czyli cfDNA (*circulating free DNA*), to fragmenty DNA o długości od około 50 do 200 par zasad pochodzące z komórek, ulegających apoptozie i nekrozie. Na skutek rozpadu jądra komórkowego i mitochondriów materiał genetyczny przedostaje się do krwi². Wolne krążące DNA może zostać również uwolnione do krwi poprzez aktywny transport z komórki.

W przypadku apoptozy DNA jest cięte na mniejsze, równe fragmenty, a sama komórka jest fagocytowana przez makrofagi. W sytuacji, w której komórek apoptotycznych jest zbyt wiele, lub aktywność makrofagów zostanie zahamowana, część DNA może przedostać się do krwioobiegu². W przypadku nekrozy naruszona zostaje struktura błony komórkowej co skutkuje uwolnieniem cytoplazmy komórki, w tym DNA do przestrzeni śródmiąższowej, skąd może się przedostać do krwi. Innym znanym na obecną chwilę mechanizmem na uwolnienie DNA jest aktywny transport z komórki, w którym

cfDNA może zostać upakowane w mikropęcherzyki i wydzielone na drodze egzosomalnej lub w szlaku zależnym od amfisu³ do inhalacji nab.

Eliminacja cfDNA z krwi zachodzi w wątrobie, śledzionie i nerkach. Szacowany okres półtrwania wolnego krążącego DNA w krwi wynosi od ok. kilku minut do 1-2 h⁴.

3. Metodyka oznaczeń wolnego krążącego DNA

3.1. Izolacja wolnego krążącego DNA

Do izolacji wolnego krążącego DNA wykorzystuje się krew pobraną do próbki zawierającej wersenian potasu (EDTA), a następnie poddaje dwukrotnemu wirowaniu celem oczyszczenia osocza. Osocze bezpośrednio po izolacji należy głęboko zamrozić, żeby zabezpieczyć cfDNA przed degradacją. Istnieją na rynku również dedykowane próbki z odczynnikami stabilizującym pozwalającym na transport pobranej krwi, transport w temperaturze pokojowej i jej zwirowanie w ciągu nawet kilku dni od pobrania^{5,6}.

Z oczyszczonej surowicy następnie przeprowadza się procedurę izolacji z wykorzystaniem mikrokolumnienek ze złożem wiążącym cfDNA (najczęściej krzemionkowym). Po naniesieniu próbki na złożę jest ono przepłukiwane buforami płuczącymi. Na koniec cfDNA jest ekstrahowane ze złoża i może być poddane dalszym oznaczeniom⁷.

3.2. Ilościowe oznaczanie wolnego krążącego DNA

Po wyizolowaniu cfDNA, można je oznaczyć ilościowo spektrofotometrycznie, fluorymetrycznie, z wykorzystaniem elektroforezy lub ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym (qRT-PCR). Ograniczeniami metody pomiaru są niskie stężenia cfDNA oraz fakt, iż zostają one wyizolowane z różnych frakcji DNA. Dodatkowo krew stanowi źródło licznych białek i innych, trudnych do usunięcia, zanieczyszczeń.

Spektrofotometria stanowi najprostszą metodę oznaczania ilościowego cfDNA. Wykorzystuje ona zjawisko różnicy w absorpcji fal świetlnych przez kwasy nukleinowe. Fluorymetria polega na zmieszaniu próbki z barwnikiem fluorescencyjnym, który selektywnie wiąże DNA. Barwnik w zależności od stężenia cfDNA wykazuje różny stopień fluorescencji, umożliwiając tym samym odczytanie stężenia. Elektroforeza kapilarna, pozwala na pomiar stężenia próbek DNA o konkretnej długości metodą fluorescencyjną. Kwasy

nukleinowe po rozdzieleniu normalizuje się do drabinki i dwóch markerów DNA, które następnie reprezentowane są jako wirtualny prążek, którego długość mierzona jest komputerowo. Kolejnym popularnym sposobem jest ilościowa reakcja PCR, której wyniki porównywane z krzywą standardową, powstałą na bazie pięciu różnych rozcieńczeń genomowego DNA, pozwalają odczytać stężenie cfDNA. Wyniki qRT-PCR oraz Fluorymetrii są najbardziej zbliżone ze wszystkich powyższych metod, co pozwala przyjąć założenie, że z największym prawdopodobieństwem są one najdokładniejsze.

3.3. Określanie pochodzenia wolnego krążącego DNA

Obecnie wiadomo, że cząsteczki DNA pochodzące z różnych typów komórek ludzkiego organizmu, mają charakterystyczne wzorce metylacji, skorelowane z ekspresją genów przez różne komórki. Bazując na tkankowo specyficznym stopniu metylacji, możliwe jest ustalenie pochodzenia komórkowego danego cfDNA. Jednym z potencjalnych celów diagnostycznych jest grupa cytozyn sąsiadująca z locus FAM101A. Stopień zmetylowania DNA w tym genie jest znacznie niższy w przypadku kardiomiocytów niż pozostałych komórek organizmu. Określając procentowy stosunek stężeń cfDNA ze zmetylowanym i niezmetylowanym genem można określić na ile oznaczone wolne krążące DNA pochodzi z komórek serca⁸.

Do określenia stopnia metylacji genu stosuje się technikę traktowania kwasów nukleinowych wodorosiarczanami (ang. *bisulfite*) i poddaje reakcji PCR. W trakcie reakcji wszystkie niezmetylowane cytozyny zastąpione zostają uracyłem. Uracyl w reakcji PCR rozpoznawany jest jako tymina. Dzięki wykorzystaniu specyficznego zestawu starterów i sond można określić udział sercowego cfDNA w ogólnie frakcji wolnego krążącego DNA⁹.

4. Wolne krążące DNA jako narzędzie do monitorowania ostrego odrzucenia serca

Jednym z potencjalnych zastosowań wolnego krążącego DNA jest monitorowanie pacjentów poddawanych przeszczepowi serca. Ci pacjenci narażeni są na ryzyko odrzucenia narządu. Żeby zapobiegać odrzuceniu są oni poddawani regularnym biopsjom endomiokardialnym. Postuluje się, że badanie cfDNA ma stać się mniej inwazyjną i bardziej czułą alternatywą dla klasycznej biopsji.

North i in. jako pierwsi wykazali przydatność analizy frakcji cfDNA pochodzącej od dawcy (dd-cfDNA ang. *donor derived circulating free DNA*) do przewidywania ostrego odrzucenia przeszczepu. Zastosowana metoda opierająca się na analizie polimorfizmu 94 genów zarówno we krwi dawcy, jak i biorcy pozwalała przewidzieć średniozaawansowane i ciężkie odrzucenie przeszczepu (2R i 3R wg skali ISHLT 1990)¹⁰. Xiaoxiao i in. w przeprowadzonym przeglądzie wykazali, że analizy dd-cfDNA pozwalają przewidzieć ostre odrzucenie przeszczepu z negatywną wartością predykcyjną na poziomie 81-100 % (AUCROC 0,72-0,92). Jednocześnie kliniczne zastosowanie analizy dd-cfDNA pozwoliło ograniczyć o ponad 80% konieczność wykonywania biopsji endomiokardialnych¹¹.

Z uwagi na trudność polegającą na konieczności posiadania krwi dawcy w celu wykonywania oznaczeń u biorcy poszukiwano nowych rozwiązań. Beck i in. opracowali uniwersalną metodę pozwalającą z wykorzystaniem cyfrowego PCR (dPCR, ang. *digital PCR*) badać frakcję dd-cfDNA bez potrzeby analizy krwi dawcy. Metoda bazuje na założeniu, że przy analizie odpowiednio dużej ilości polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP, ang. *single nucleotide polymorphism*), dobranych tak by rozkład wariantów w populacji był w stosunku ok. 50/50, możliwe będzie wykrycie śladów cfDNA posiadających wzorzec polimorfizmów innych niż natywnych biorcy. Następnie określa się stężenie wykrytej frakcji i szacuje ryzyko odrzutu¹². Wykorzystanie omawianej technologii pozwala uzyskać równie wysokie możliwości predykcji ostrego odrzucenia serca co opisane wcześniej technologie¹³.

W opublikowanym badaniu porównawczym przeprowadzonym na grupie 171 biorców serca wykazano wysoką zgodność (99,2%) pomiędzy niskim poziomem dd-cfDNA, a brakiem rozpoznanego ostrego odrzucenia narządu w badaniu histopatologicznym biopsji mięśnia sercowego. Zgodność w przypadku wyników uznanych na podstawie podwyższonego poziomu dd-cfDNA była już znacznie niższa (19,6%). Postuluje się jednak, że badanie dd-cfDNA pozwala rozpoznać odrzucenie zanim jeszcze pojawią się pierwsze oznaki w badaniu morfologicznym. Jednocześnie autorzy wskazują, że badanie dd-cfDNA ma wyższą czułość w rozpoznawaniu odrzucenia o podłożu zależnym od przeciwciał niż odpowiedzi komórkowej¹⁴.

5. Wolne krążące DNA w diagnostyce ostrego zawału mięśnia sercowego

Wolne krążące DNA jako biomarker uszkodzenia miocytów serca może być wykorzystane w predykcji rokowania u pacjentów z ostrym zawałem mięśnia sercowego. Dotychczasowe badania udowodniły korelację pomiędzy podwyższonym stężeniem cfDNA a gorszym rokowaniem u pacjentów z ostrym zawałem mięśnia sercowego¹⁵. W innych badaniach udowodniono podwyższony poziom cfDNA u pacjentów po przebytych zawałach mięśnia sercowego¹⁶. Sudakov i in. wskazali na możliwość predykcji śmierci u pacjentów po zawałach serca na bazie pomiarów mitochondrialnej frakcji cfDNA¹⁷. Jednocześnie zastosowania pomiarów stężenia cfDNA nie jest rekomendowane jako marker zawału serca¹⁸.

6. Wolne krążące DNA w niewydolności serca

Yokokawa i wsp. wykonali pomiary poziomu cfDNA u grupy 32 pacjentów chorujących na niewydolność serca oraz 28 zdrowych ochotników. Badanie nie wykazało różnic w stężeniu cfDNA w obu grupach. Jednocześnie dokonane pomiary wskazały istotnie podwyższone stężenie frakcji sercowej cfDNA, które korelowały z poziomem troponiny T. Jednocześnie wykazano brak korelacji z poziomem NT-proBNP¹⁹. Wskazana praca wskazuje, że frakcja sercowa cfDNA może być markerem uszkodzenia kardiomiocytów o czułości porównywalnej z troponiną T.

W innych badaniach określano zależność przebiegu niewydolności serca ze stężeniem cfDNA. Wykazano, że stężenie koreluje z gorszym rokowaniem i zwiększoną śmiertelnością²⁰.

7. Dyskusja

Badanie cfDNA ze względu na ograniczoną inwazyjność (surowica) może w przyszłości stanowić istotną alternatywę do klasycznej biopsji endomiokardialnej. Dotychczasowe badania wskazują, iż ilościowe oznaczenie wolnego krążącego DNA we krwi posiada nikłe znaczenie diagnostyczne, jednak po rozszerzeniu o pomiar stężenia cfDNA dawcy przeszczepionego narządu czułość i przydatność kliniczna zdecydowanie wzrasta¹¹. Istotnym ograniczeniem metody detekcji cfDNA jest duże skomplikowanie metody skutkujące koniecznością zakupu drogich odczynników i specjalistycznego sprzętu. Metoda

jest również pracochłonna, jednak przy utworzeniu wyspecjalizowanych, zrobotyzowanych centrów diagnostycznych możliwe jest jej zautomatyzowanie.

Potencjalnie największe znaczenie kliniczne wolnego krążącego DNA należy upatrywać w diagnostyce odrzucenia przeszczepionego narządu. Opisana w literaturze czułość i swoistość dostępnych testów przewyższa dotychczas stosowaną metodę – biopsję endomiokardialną. Jednocześnie koszt metody przy powszechnym stosowaniu może być od niej niższy. Podejrzewamy, że w najbliższych latach pojawią się na rynku komercyjne zestawy do monitorowania dd-cfDNA oraz zostaną dopuszczone jako alternatywa dla biopsji. Warto pomyśleć o próbie zastąpienia oznaczenia dd-cfDNA znacznie tańszym oznaczeniem frakcji sercowej cfDNA.

Oznaczenia cfDNA w zawale mięśnia sercowego i niewydolności serca są możliwe, jednak prawdopodobnie koszt przewyższa realne korzyści. Dotychczas stosowane markery biochemiczne zapewniają wystarczający poziom czułości i swoistości. Jednocześnie prawdopodobnie możliwe jest znalezienie wielu prostszych i tańszych metod pozwalających na predykcję klinicznych rokowań pacjentów np. z wykorzystaniem sztucznej inteligencji.

Uważamy, że pomimo braku dotychczas przeprowadzonych badań, analiza cdDNA ma szansę wspomóc diagnostykę schorzeń mięśnia sercowego wymagających wykonania biopsji endomiokardialnych np. zapalenia mięśnia sercowego czy amyloidozy.

Referencje

1. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: Developed by the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) With the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European Heart Journal*. 2021;42(36):3599-3726. doi:10.1093/eurheartj/ehab368
2. van der Vaart M, Pretorius PJ. The Origin of Circulating Free DNA. *Clinical Chemistry*. 2007;53(12):2215-2215. doi:10.1373/clinchem.2007.092734
3. Hu Z, Chen H, Long Y, Li P, Gu Y. The main sources of circulating cell-free DNA: Apoptosis, necrosis and active secretion. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2021/01/01/ 2021;157:103166. doi:https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2020.103166

4. Kustanovich A, Schwartz R, Peretz T, Grinshpun A. Life and death of circulating cell-free DNA. *Cancer Biol Ther.* 2019;20(8):1057-1067. doi:10.1080/15384047.2019.1598759
5. PAXgene Blood ccfDNA Tubes. Accessed 30.07.2022, <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/sample-collection-stabilization/dna/paxgene-blood-ccfdna-tube/>
6. S-Monovette® cfdDNA Exact, 9.2 ml, cap blackberry coloured, (LxØ): 100 x 15 mm, with paper label. Accessed 30.07.2022, <https://www.sarstedt.com/en/products/diagnostic/venous-blood/s-monovetter/product/01.2040.001/>
7. QIAamp® MinElute® ccfDNA Handbook. In: Qiagen, editor. 2020.
8. Zemmour H, Planer D, Magenheim J, et al. Non-invasive detection of human cardiomyocyte death using methylation patterns of circulating DNA. *Nature Communications.* 2018/04/24 2018;9(1):1443. doi:10.1038/s41467-018-03961-y
9. Bisulfite Begginer Guide. Accessed 30.07.2022, <https://www.zymoresearch.com/pages/bisulfite-beginner-guide>
10. North PE, Ziegler E, Mahnke DK, et al. Cell-free DNA donor fraction analysis in pediatric and adult heart transplant patients by multiplexed allele-specific quantitative PCR: Validation of a rapid and highly sensitive clinical test for stratification of rejection probability. *PLOS ONE.* 2020;15(1):e0227385. doi:10.1371/journal.pone.0227385
11. Qian X, Shah P, Agbor-Enoh S. Noninvasive biomarkers in heart transplant: 2020–2021 year in review. *Current Opinion in Organ Transplantation.* 2022;27(1)
12. Beck J, Bierau S, Balzer S, et al. Digital Droplet PCR for Rapid Quantification of Donor DNA in the Circulation of Transplant Recipients as a Potential Universal Biomarker of Graft Injury. *Clinical Chemistry.* 2013;59(12):1732-1741. doi:10.1373/clinchem.2013.210328
13. Knüttgen F, Beck J, Dittrich M, et al. Graft-derived Cell-free DNA as a Noninvasive Biomarker of Cardiac Allograft Rejection: A Cohort Study on Clinical Validity and Confounding Factors. *Transplantation.* 2022;106(3)

14. Agbor-Enoh S, Shah P, Tunc I, et al. Cell-Free DNA to Detect Heart Allograft Acute Rejection. *Circulation*. 2021/03/23 2021;143(12):1184-1197. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.120.049098
15. Grosse GM, Blume N, Abu-Fares O, et al. Endogenous Deoxyribonuclease Activity and Cell-Free Deoxyribonucleic Acid in Acute Ischemic Stroke: A Cohort Study. *Stroke*. 2022/04/01 2022;53(4):1235-1244. doi:10.1161/STROKEAHA.121.036299
16. Agiannitopoulos K, Samara P, Papadopoulou E, et al. Study on the admission levels of circulating cell-free DNA in patients with acute myocardial infarction using different quantification methods. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 2020/07/01 2020;80(4):348-350. doi:10.1080/00365513.2020.1729400
17. Sudakov NP, Apartsin KA, Lepekhova SA, et al. The level of free circulating mitochondrial DNA in blood as predictor of death in case of acute coronary syndrome. *Eur J Med Res*. 2017/01/03 2017;22(1):1. doi:10.1186/s40001-016-0241-x
18. Lippi G, Sanchis-Gomar F, Cervellin G. Cell-free DNA for diagnosing myocardial infarction: not ready for prime time. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2015;53(12):1895-1901. doi:doi:10.1515/cclm-2015-0252
19. Yokokawa T, Misaka T, Kimishima Y, Shimizu T, Kaneshiro T, Takeishi Y. Clinical Significance of Circulating Cardiomycocyte-Specific Cell-Free DNA in Patients With Heart Failure: A Proof-of-Concept Study. *Canadian Journal of Cardiology*. 2020/06/01/ 2020;36(6):931-935. doi:https://doi.org/10.1016/j.cjca.2019.10.016
20. Salzano A, Israr MZ, Garcia DF, et al. Circulating cell-free DNA levels are associated with adverse outcomes in heart failure: testing liquid biopsy in heart failure. *European Journal of Preventive Cardiology*. 2021;28(9):e28-e31. doi:10.1177/2047487320912375

PRZEGLĄD INNOWACJI W PRZECZEWNIKOWYCH METODACH NAPRAWY WAD ZASTAWKOWYCH SERCA

Karol Żmudka, Aleksandra Włosowicz, Patrycja Pabis,
Hanna Porwolik, Aleksandra Spychał

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

Abstrakt: Wady zastawkowe stanowią jedną z głównych grup nabytych wad serca oraz często współistnieją z wrodzonymi wadami serca. Pierwsze zabiegi kardiochirurgiczne, polegające na modyfikowaniu funkcji zastawek, sięgają połowy XX wieku. Operacje kardiochirurgiczne są inwazyjne, często wymagają użycia płucoserca, wiążą się z uszkodzeniem otaczających tkanek, dłuższym czasem rekonwalescencji, a w określonych grupach wyższym ryzykiem zgonu w porównaniu z metodami przeczewnikowymi. Ostatnie dwie dekady zaowocowały szerokim wachlarzem produktów i technik pozwalających na korekcje wad zastawkowych metodami przeczewnikowymi. Należy jednak pamiętać, że obecne rozwiązania mają swoje ograniczenia i wymagają dalszego rozwoju i pogłębionych badań. Poniżej przedstawiam przegląd stosowanych, a także tych będących na etapie badań innowacyjnych produktów i technik służących związanych z naprawą wad zastawkowych serca. Pozwoli to spojrzeć na zmiany zachodzące w kardiochirurgii oraz kardiologii inwazyjnej.

Słowa kluczowe: Przeczewnikowa wymiana zastawki, Zastawka aortalna, Zastawka mitralna, Zastawka płucna, Zastawka trójdzielna

Abstract: Valvular diseases are one of the main groups of acquired heart diseases and often valvular diseases are coexisting with congenital heart diseases. First cardiosurgical operations of heart valves are dated to mid XX-century. Cardiosurgical procedures are invasive and frequently require cardiopulmonary bypass, are associated with destruction of surrounding tissues and longer convalescence time. Moreover, in particular high risk operation groups of patients these procedures are associated in higher mortality. Recent two decades provided wide range of products and procedures allowing for correction of valves' function via catheter. It is ought to be reckoned that current solutions

have their own limitations and require further development and in-depth research. Presented beneath overview of product and procedures associated with transcatheter valve replacement or repair will allow to evaluate probable objectives of further research and also look at the forthcoming prospects of therapy in cardio surgery and invasive cardiology.

Keywords: Transcatheter valve replacement, Aortic valve, Mitral valve, Pulmonary valve, Tricuspid valve

1. Wprowadzenie

Szacuje się, że 40 milionów ludzi na świecie cierpi z powodu chorób zastawki aortalnej i mitralnej, a wrodzone wady serca, których duża część wiąże się z wadami zastawkowymi, stanowią jedną trzecią wszystkich większych wad wrodzonych^{1,2}. Pierwsza operacja zastawki serca została wykonana w 1952 roku. Od tego czasu rozwój operacji kardiologicznych, dzięki użyciu nowych materiałów i technik, pozwalał na coraz lepsze wyniki leczenia. Niestety, są one bardzo inwazyjne i wiążą się między innymi z znaczną utratą krwi oraz koniecznością torakotomii czy sternotomii by uzyskać dostęp do zastawek. Ponadto często konieczne jest zastosowanie płucoserca, co samo w sobie niesie wiele niekorzystnych konsekwencji³. Potencjalne komplikacje oraz wymienione wyżej czynniki powodują, że niektóre grupy pacjentów o wysokim ryzyku operacyjnym nie mogą zostać zakwalifikowane do operacji. Relatywnie nową metodą jest przezcewnikowe leczenie wad zastawkowych. Zabiegi te stają się coraz częstszą praktyką, a kolejne wytyczne wskazują na możliwość ich szerszego zastosowania⁴. Narzędzia i metody wykonywania zabiegów są obecnie rozwijane proporcjonalnie do liczby pacjentów z daną wadą i możliwościami leczenia metodami przezcewnikowymi. Tłumaczy to większy rozwój zabiegów przezcewnikowych u dorosłych w przypadku zastawki aortalnej i mitralnej niż trójdzielnej. W przypadku wad zastawki płucnej w większości przypadków wiąże się ona z wadami wrodzonymi serca, przez co większość stanowią pacjenci pediatryczni lub wymagający zabiegu po korekcji chirurgicznej. Podobieństwo w funkcji, jak i anatomii zastawek wiąże się z tym, że opracowane rozwiązania znajdują zastosowanie w leczeniu wad o zróżnicowanych przyczynach i lokalizacji. Obecne innowacje obejmują zastosowanie nowych materiałów, metod obrazowania, technik zamykania naczyń, druku 3D, czy algorytmów matematycznych pozwalających określić siły działające na zastawkę. W poniższej publikacji przedstawiono podobieństwa

jak i różnice oraz konkretne przykłady rozwiązań rozwijanych oraz stosowanych w korekcji wad zastawkowych dla różnych zastawek.

2. Przezcewnikowe wszczepienie zastawki aortalnej

Wraz z rosnącą oczekiwaną długością życia stenoz aortalna (AS) stanie się rosnącą przyczyną dysfunkcji zastawek⁵. Korekcję funkcji zastawki lub jej wymiana była do niedawna możliwa wyłącznie przy pomocy zabiegu kardiochirurgicznego. Pierwszy zabieg TAVI (Transcatheter aortic valve implantation) przeprowadzony w 2002 roku był początkiem rewolucji, pozwalając na zastosowanie znacznie mniej inwazyjnych zabiegów przezcewnikowych u pacjentów wymagających wcześniej operacji kardiochirurgicznych⁶.

Ostatnie dziesięciolecie przyniosło wiele innowacji związanych z przezcewnikowymi metodami naprawy zastawki aortalnej. Jeszcze na początku ubiegłej dekady zabieg TAVI w badaniach klinicznych był przedstawiany jako wskazany tylko w przypadku ciężkiej stenoz oraz grup wysokiego lub bardzo wysokiego ryzyka okołoperacyjnego^{7,8}. Obecnie wskazania te są rozszerzane, a rocznie w Stanach Zjednoczonych rocznie wykonuje się około 78 000 zabiegów TAVI rocznie². Obecnie, pomimo że do najszerzej przebadanych zastawek stosowanych w TAVI należą między innymi zastawki Sapien, to nie należy zapominać o innych projektach. Przykładem może być projekt InFlow (CardValve Consortium), którego celem jest stworzenie Polskiego systemu do TAVI w rozmiarze 12F – mniejszym niż obecnie dostępne⁹.

2.1 TAVI u pacjentów średniego ryzyka operacyjnego

Rozwój technologii konstrukcji zastawek, umiejętności operatorów w tym metod umieszczania, pozwolił podejrzewać, że zastosowanie zabiegów przezcewnikowych może być korzystne również dla pacjenta w grupach średniego ryzyka. Opublikowane na początku 2016 roku badanie PARTNER II, będące randomizowanym wieloośrodkowym badaniem klinicznym, potwierdziło skuteczność przezcewnikowych metod wymiany zastawki aortalnej u pacjentów z AS z grupy średniego ryzyka okołoperacyjnego¹⁰. Jako punkty końcowe badania obrano śmierć lub powodujący znaczną niepełnosprawność udar mózgu i wykazano, że ryzyko w grupie pacjentów poddanych operacji kardiochirurgicznej oraz zabiegowi przezcewnikowemu jest porównywalne. W badaniu PARTNER II przeprowadzonym 6 lat po pierwszym badaniu PARTNER użyto nowszych systemów zastawek SAPIEN XT (Edwards

Lifescience), różniących się cieńszą kobaltowo-chromową ramą oraz zmienioną geometrią bydlęcych płatków zastawki. Zmiany te wpłynęły korzystnie na hemodynamiczne właściwości zastawki oraz na zmniejszenie ryzyka wywołania zmian w układzie przewodzącym serca¹¹. Badanie pokazało, że stosowanie TAVI w specjalistycznych ośrodkach w grupach średniego ryzyka nie wiąże się z gorszymi wynikami leczenia niż w przypadku chirurgicznej wymiany zastawki aortalnej (SAVR). W badaniu PARTNER II zaobserwowano większe pole powierzchni zastawki po TAVI niż po operacji kardiochirurgicznej oraz mniejszy odsetek powikłań, takich jak intensywne krwawienie, ostre uszkodzenie nerek i indukowania migotania przedsionków¹⁰. Podsumowując zaobserwowano, że pacjenci zarówno z wysokiej jak i średniej grupy ryzyka odnosili korzyści z zabiegów przezcewnikowych.

2.2 TAVI u pacjentów niskiego ryzyka operacyjnego

Kolejnym etapem rozwoju zabiegów TAVI było sprawdzenie korzyści płynących z zastosowania tej metody u pacjentów z niskim ryzykiem operacji kardiochirurgicznej w porównaniu z SAVR. Badanie PARTNER III zweryfikowało dotychczas niejednoznaczne dane dotyczące korzyści zabiegów TAVI u pacjentów z grup niskiego ryzyka operacji kardiochirurgicznej z dużą AS¹². Nowe badanie wiązało się również z zastosowaniem nowych systemów zastawek Sapien 3 (Edwards Lifescience). Umieszczane przezcewnikowo, rozprężane balonem zastawki składają się z bydlęcych osierdziowych płatków wszytych w kobaltowo chromową ramę i różniące się między innymi zastosowaniem zewnętrznej warstwy uszczelniającej wykonanej z politereftalanu etylenu, w celu ograniczenia przecieku okołozastawkowego¹³. Ponadto niska rama oraz geometria nowej zastawki ułatwiają dostęp do ujść naczyń wieńcowych na wypadek przyszłych interwencji. Wykazano, że różnice między użytymi w badaniu PARTNER II zastawkami Sapien XT, a zastawkami Sapien 3 wiążą się ze zmniejszoną częstotliwością poważnych incydentów naczyniowych oraz przecieków okołozastawkowych kosztem większego ryzyka zaburzeń rytmu, powodujących konieczność wszczęcia nowego stymulatora serca¹⁴. Autorzy badania wskazują jednak na znaczącą rolę wizualizacji pozycji wszczepianej zastawki w odniesieniu do elementów kompleksu zastawki aortalnej, co ma wpływ na ograniczenie konieczności wszczęcia nowego stymulatora serca¹⁴. Ponadto zastawki starszej generacji w porównaniu do SAVR mają 5-krotnie wyższe prawdopodobieństwo uszkodzenia struktury zastawki, podczas gdy zastawki Sapien 3 nie ustępują zastawkom umieszczanym chirurgicznie¹⁵.

Wszystkie wspomniane wyżej czynniki czyli zastosowanie nowych zastawek, duże doświadczenie operatorów i wypracowane standardy wykonywania zabiegów przyczyniły się do uzyskania lepszej przeżywalności, mniejszego prawdopodobieństwa udarów oraz mniejszej ilości rehospitalizacji u pacjentów przechodzących TAVI w ciągu roku od wykonanego zabiegu w porównaniu do grupy zabiegów chirurgicznych¹². Badanie wykazało wiele innych korzyści dla pacjentów poddanych TAVI, takich jak niższe ryzyko indukowania migotania przedsionków, szybszą poprawę wydolności serca w skali NYHA i innych parametrów¹². Podobne rezultaty uzyskano w badaniu NOTION¹⁶.

Pomimo bardzo optymistycznych rezultatów należy brać pod uwagę, że badanie to obejmowało jedynie roczną obserwację pacjentów. W przypadku najnowszych wyników 8 letniej obserwacji pacjentów z dużą AS którzy przebyli TAVI lub operacje kardiochirurgiczną i stanowili grupę niskiego ryzyka operacyjnego nie zaobserwowano wyższej śmiertelności, ryzyka udaru, zawału serca ani wyższego ryzyka niewydolności wszczepianej zastawki¹⁷. Biorąc pod uwagę korzystne wyniki leczenia TAVI należy oczekiwać rosnącej ilości wykonywanych zabiegów, jednak pamiętać trzeba, że wciąż brakuje danych dotyczących ponad 10 letniej obserwacji pacjentów, a tym samym wytyczne wskazują na rozważne stosowanie TAVI u pacjentów nie będących w wieku podeszłym^{4,18}. Biorąc natomiast pod uwagę pacjentów pediatrycznych, istnieją opisy wskazujące na potencjalne korzyści z zastosowania TAVI u pacjentów, nie będących dobrymi kandydatami do SAVR z wrodzonymi wadami zastawki aortalnej^{19,20}. Kolejnym ograniczeniem szerszego stosowania zabiegów TAVI jest dostęp do kardiochirurgów, jednak istnieją badania wskazujące, by zabieg wykonywać w określonych okolicznościach w ośrodkach nie posiadających oddziału kardiochirurgicznego²¹.

Ostatnim wartym zwrócenia uwagi aspektem przeprowadzania TAVI u pacjentów poddawanych wcześniej SAVR, jest ograniczenie kosztów ekonomicznych. Szacuje się, że wskaźnik stanu zdrowia osoby, wyrażający długość życia skorygowaną o jego jakość (QUALY) dla TAVI jest wyższy przy jednocześnie mniejszym koszcie dla systemu opieki zdrowotnej^{22,23}.

2.3 Nowoczesne metody obrazowania u pacjentów z wadliwą zastawką aortalną

Metody obrazowe pozwalające na ocenę morfologii i wymiarów pierścienia aortalnego umożliwiają dobranie odpowiedniego rozmiaru implantowanej zastawki. Zwężenie zastawki aortalnej, będącej najczęstszą niewrodzoną wadą

serca, może zostać zobrazowane i opisane badaniem echokardiograficznym (UKG)²⁴. Powszechna dostępność UKG pozwala na wstępną ocenę zmian oraz ich progresji. Ograniczone okno akustyczne przezklatkowego UKG (TTE) jest częściowo obrazowane przy pomocy przezprzełykowego UKG (TEE), będącego złotym standardem. Badanie dopplerowskie umożliwia pomiar prędkości i gradientu ciśnień, potrzebnych do oceny zaawansowania AS²⁵. Kolejną po ograniczonym oknie akustycznym wadą UKG jest brak możliwości obrazowania 3D dla większości stosowanych aparatów. Problem ten w najbliższym czasie może rozwiązać 3D-TTE. Jest to metoda obrazowania, pozwalająca uzyskać trójwymiarowy obraz bez użycia tomografii komputerowej (CT) czy rezonansu magnetycznego (MR). Należy jednak pamiętać, że technologia ta jest cały czas rozwijana, a przeprowadzone badania wykazały, że nie jest ona skuteczna w dobieraniu odpowiedniego rozmiaru zastawki aortalnej w porównaniu z wielorzędową tomografią komputerową (MSCT) w przypadku TAVI²⁶. Nawet najmniejsze artefakty mogą wpłynąć na pomiar rozmiarów pierścienia zastawki. Należy podkreślić, że wiek pacjentów wymagających przecewnikowych zabiegów zastawek predysponuje do występowania licznych zwapnień utrudniając sprawne przechodzenie i odbijanie fal akustycznych. Na ten moment technologia 3D-UKG wymaga dalszego rozwoju i nie stanowi alternatywy dla MSCT^{26,27}.

Tomografia komputerowa jako metoda inwazyjna wiąże się z narażeniem pacjenta na promieniowanie jonizujące, jednak umożliwia ona dokładną ocenę elementów, takich jak pierścień zastawki aortalnej, zatoki Valsalvy czy unaczynienie wieńcowe²⁵. Jest to szczególnie ważne biorąc pod uwagę występujące różne warianty anatomiczne występujących patologii, MSCT pozwala na indywidualną ocenę pacjenta i dobór odpowiedniej zastawki i ułatwia precyzyjny wybór umiejscowienia zastawki²⁸. W przypadku badania PARTNER I i II MSCT nie zostało zastosowane u wszystkich pacjentów natomiast wyniki badania PARTNER III obejmują analizę budowy zastawki metodami MSCT¹². MSCT stanowi ważną metodę w przygotowaniu zabiegu co potwierdzają badania kliniczne²⁹.

2.4 Metody wprowadzania zastawki

Istnieją 2 główne metody przecewnikowego wprowadzenia zastawki aortalnej do serca. Obecnie najczęściej stosowana jest droga przezudowa^{30,31}. Pozostałe zabiegi wykonywane drogą przezklatkową odbywają się najczęściej z użyciem dostępu przezkoniuszkowego lub przezaortalnego. W przypadku

badania PARTNER II dominującą metodą wprowadzania zastawki była droga przez tętnicę udową 1550 (76,3%), pozostali pacjenci 482 (23,7%) otrzymali zastawkę drogą przezklatkową – przekoniuszkową (174) lub przezaortalną (62). Za główną przyczynę znacznej dominacji metody przezudowej można wyznaczyć mniejszą inwazyjność, na którą składa się brak konieczności chirurgicznego nacięcia klatki wiążącego się z sedacją oraz dłuższym okresem rekonwalescencji, jednak w przypadku zaawansowanej choroby naczyń sięgających dalej na obwód metody przezklatkowe mogą okazać się skuteczniejsze³². Częstsze stosowanie metod przezklatkowych u pacjentów z gorszymi parametrami naczyń może znaleźć odzwierciedlenie w gorszych parametrach punktów końcowych analizowanych raportów dla zabiegów przezklatkowych dając nieprawidłowy obraz skuteczności wspomnianych metod³³. Ograniczone dane dotyczące TAVI u pacjentów pediatrycznych pokazują, że inne od przezudowej drogi mogą być preferencyjne w tej grupie pacjentów^{19,20}.

2.5 Zamykanie naczyń

Wszystkie metody umieszczania zastawek wiążą się z bezpośrednim uszkodzeniem ciągłości dużych tętnic (dostęp przez tętnicę udową lub aortę) lub ściany serca (w przypadku dostępu przekoniuszkowego). W przypadku dostępu przezudowego, po usunięciu cewnika w celu zapobiegania krwawieniu można w najprostszy sposób użyć kompresji manualnej. Przez około 20 minut uciskać miejsce arteriotomii, a następnie zaopatrzyć ranę. Metoda ta wiąże się z koniecznością unieruchomienia pacjenta na najbliższe godziny i jest stosunkowo czasochłonna. Ponadto dojść może do powstania hematomy, seromy, a następnie wtórnej infekcji oraz martwicy. Rozwiązaniem są narzędzia do zamykania naczyń. W zależności od wybranego narzędzia mogą one działać poprzez wytworzenie zakrzepu w sąsiedztwie punktu arteriotomii, poprzez umieszczenie wchłaniającej masy w sąsiedztwie miejsca przerwania ciągłości naczynia lub poprzez zszycie ścian naczynia w uszkodzonym miejscu. Stosowanie takich rozwiązań zwiększa komfort pacjenta po zabiegu oraz upraszcza procedurę TAVI, należy jednak pamiętać, że zastosowanie VCD może wiązać się z ryzykiem infekcji, zwężeniem ściany naczynia, wzmożonym wapnieniem lub nieprawidłową funkcją urządzenia^{34,35}. Ze względu na fakt, że dostęp przez udowy jest dominującą metodą wprowadzania zastawki urządzenia do zamykania naczyń znajdują szerokie zastosowanie w zabiegach naprawczych zastawek, a metoda ta jest szeroko badana. Do najczęściej stosowanych narzędzi należą te bazujące na zatykaniu naczynia np. MANTA VCD (Teleflex,

Wayne, Pennsylvania) oraz zszywające uszkodzoną ścianę naczyń np. ProGlide i Prostar (Abbott Vascular, Abbott Park, Illinois). Odmienne metody lub produkty służące do zamknięcia naczyń, wiążą się z pewnymi zaletami jak i wadami każdego z nich. W celu systematyzacji oceny powikłań naczyniowych posłużyć mogą kryteria Valve Academic Research Consortium (VARC-2), wyznaczające większe i mniejsze incydenty naczyniowe³⁶. W przypadku VCD zszywających naczyń zastosowanie produktów ProGlide, wiąże się z niższym ryzykiem większych incydentów naczyniowych jednak nie wpływa on na ogólną śmiertelność wewnątrzszpitalną u pacjentów poddanych TAVI³⁷.

Narzędzia ProGlide wymagają dwóch urządzeń do przeprowadzenia zamknięcia naczyń, podczas gdy Manta jednego i można przyjąć, że jest ona prostsza w obsłudze³⁸. W kontekście większych oraz mniejszych komplikacji naczyniowych badania nie są jednoznaczne. Część z nich nie wskazuje na wyższość Manta nad ProGlide^{38,39}, jednak niektóre badania wykazują większe korzyści z użycia VCD Manta⁴⁰. Ponadto sygnalizuje się, że kierowana przy pomocy USG VSD Manta może zmniejszyć ryzyko niepowodzenia zamknięcia naczyń⁴¹.

W kontekście TAVI przeprowadzone na próbie 524 pacjentów badanie z zastosowaniem VCD (Manta) wykazało, że VCD może być stosowane do zamykania tętnicy udowej u pacjentów przechodzących ten zabieg⁴². W badaniu zaobserwowano 28 większych i 5 mniejszych incydentów naczyniowych, związanych z zastosowaniem urządzeń Manta. Jako czynniki predysponujące do wspomnianych incydentów, należy zaliczyć płeć żeńską, nielinijne ułożenie naczyń lub wapnienie w miejscu arteriotomii⁴². W przypadku zastosowania VCD (Manta) u pacjentów, u których przeprowadzono minimalnie inwazyjne zabiegi naprawcze zastawki mitralnej, również zaobserwowano korzystne efekty zastosowania VCD⁴³. W przypadku grupy 268 pacjentów dla grupy VCD nie zauważono seromy ani infekcji rany, jednak zaobserwowano zwiększone ryzyko komplikacji naczyniowych (VARC-2) takich jak krwawienie lub nieprawidłowe działanie VCD⁴³. Podsumowując użycie VCD jest szeroko oceniane, jako skuteczna metoda zamykania naczyń, w tym u pacjentów poddanych przezskórnym zabiegom zastawek serca³⁷⁻⁴⁴. Jako czynniki, mogące w większym stopniu wpłynąć na ograniczenie ryzyka niepowodzenia w przypadku zastosowania VCD, wyróżniono zwiększone planowanie procedur oraz ocenę ryzyka⁴⁴.

2.6 Druk 3D

Rosnąca popularność druku 3D w ostatnich latach, bierze się między innymi z relatywnie ułatwionego dostępu do spersonalizowanego modelu 3D, który można otrzymać z obrazów CT, MR oraz wspomnianego 3D USG⁴⁵. Umożliwia to uzyskanie repliki, dostosowanej do anatomicznej budowy pacjenta. Modele te mogą służyć do szkolenia operatorów, planowania zabiegu oraz ułatwia komunikację z pacjentem poprzez zobrazowanie mu przebiegu zabiegu.⁴⁶ Szczególną rolę i duży potencjał przypisuje się planowaniu operacji przy użyciu spersonalizowanych modeli 3D.⁴⁷ Potencjalną skuteczność takich modeli pokazują doświadczenia w przewidywaniu przecieków około zastawkowych u pacjentów, u których we wcześniej przygotowanych modelach 3D, umieszczono zakładaną przeczewnikowo zastawkę⁴⁸. Ponadto wskazuje się, że druk 3D może być wykorzystywany w planowaniu zabiegów w przypadku konieczności reoperacji lub ponownego TAVI, gdyż zabieg u tych pacjentów może wiązać się ze zwiększonymi komplikacjami⁴⁹.

3. Przeczewnikowe zabiegi na zastawce trójdziennej

Najczęstszą wadą zastawki trójdziennej jest jej niedomykalność i często towarzyszy ona wadom innych zastawek⁵⁰. Duży sukces metod przeczewnikowych w leczeniu stenozy aortalnej i innych wad tej zastawki spowodowały, że rozwiązania te zaczynają być implementowane w leczeniu innych zastawek.

Istnieją przeciwwskazania do wykonywania chirurgicznej małoinwazyjnej naprawy zastawki trójdziennej związane z ograniczonym dostępem, takie jak przebyta wcześniej operacja kardiochirurgiczna, operacja płuc lub choroby płuc. Biorąc pod uwagę wyżej wymienione trudności zabiegi przeczewnikowe mogą okazać się korzystną alternatywą. Niedomykalność zastawki występuje z dużą częstością i w większości przypadków jest łagodna. Wskazuje się, że wada ta może zostać zobrazowana w badaniu EKG u od 80% do 90% populacji, natomiast istotna klinicznie wada u 2,7%^{51,52}. Może mieć ona charakter pierwotny - wynikający z patologii aparatu zastawkowego lub częściowej czynnościowy i wynikać z poszerzenia pierścienia zastawki trójdziennej⁵³. Badania kliniczne wskazują, że łagodna niedomykalność zastawki trójdziennej (TR) nie wpływa znacząco na śmiertelność, podczas gdy średniozaawansowana lub większa wada jest związana z niższą przeżywalnością nawet przy braku dysfunkcji komorowych czy nadciśnienia płucnego⁵⁴. Wykonywanie zabiegów kardiochirurgicznych w sąsiedztwie zastawki trójdziennej wiąże się

z pewnymi trudnościami, jak bliskie sąsiedztwo ważnych struktur⁵⁵. Obecnie chirurgiczna naprawa zastawki trójdzielnej z anuloplastyką jest złotym standardem leczenia w ciężkiej TR⁵⁶surgical tricuspid repair with anuloplasty is the gold standard treatment. However, the prohibitive risks of open surgery and increasing evidence that severe TR should be intervened on early has led to an outburst in the development and evolution of transcatheter tricuspid valve interventions (TTVI. Jednak nie brakuje pacjentów, którzy nie mogą skorzystać z wspomnianych opcji terapeutycznych i przezcewnikowa naprawa lub implantacja zastawki może być dla nich jedyną bezpieczną metodą leczenia⁵⁷⁻⁵⁹. Zastosowanie zabiegów implantacji lub naprawy zastawki przezcewnikowo może być dobrym rozwiązaniem u pacjentów z wysokim ryzykiem operacji kardiochirurgicznej^{50,56,60}.

3.1 Małoinwazyjne metody naprawcze zastawki trójdzielnej

Jednym ze sposobów ograniczenia TR jest modulacja funkcjonowania patologicznych zastawek poprzez korekcie zakresu ruchu płatków. U 119 pacjentów z ciężką niedomykalnością zastawki trójdzielnej (TR) hospitalizowanych z niewydolnością serca dokonano zabiegów przezcewnikowej naprawy zastawki trójdzielnej⁶¹. Badanie to wykazało, że TTVR wiązało się z obniżeniem hospitalizacji spowodowanych HF oraz polepszeniem parametrów sercowych (poprawa stopnia niewydolności w skali NYHA, lepszy wynik 6 minutowego testu marszowego i innych) u pacjentów poddanych TTVR w porównaniu do grupy poddanej chirurgicznej łączonej naprawie zastawki mitralnej i trójdzielnej. Zabiegi przeprowadzono przy użyciu sytemów naprawy MitraClip [Abbott, Santa Clara, California] lub PASCAL [Edwards Lifesciences, Irvine, California]. Systemy te stosowane są z powodzeniem w korygowaniu niedomykalności zastawki mitralnej⁶². Wprowadzana przezcewnikowo do serca zapinka, umożliwia zbliżenie płatków zastawki, co zapobiega cofaniu się krwi i pomaga odtworzyć fizjologiczny przepływ krwi⁶¹. Pomimo oryginalnego przeznaczenia zestawów do operacji na zastawkach mitralnych, systemy sprawdziły się też dla zabiegów na zastawce trójdzielnej (98% udanych prób trwałego założenia zapinki)⁶¹. Należy się spodziewać, że opracowanie dedykowanych systemów naprawczych oraz szersze badania nad potencjalnymi korzyściami płynącymi z izolowanego zabiegu TTVR, mogą mieć wpływ na QoL (Quality of Life) pacjentów z TR.

3.2 Przewcewnikowa annuloplastyka pierścienia zastawki trójdzielnej

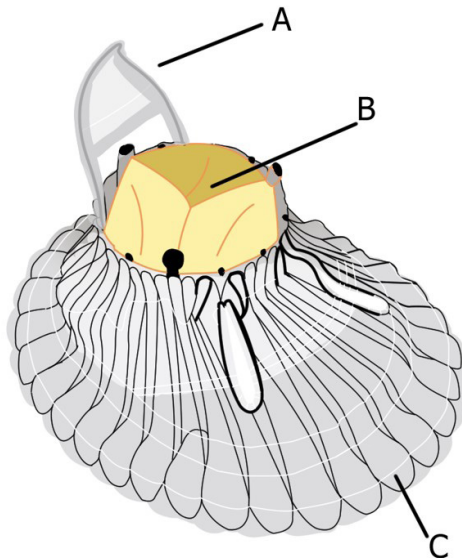
Inną metodą ograniczenia TR jest annuloplastyka pierścienia zastawki trójdzielnej. W tym przypadku zwężenie pierścienia wykonane metodą przewcewnikową pozwala zmniejszyć niedomykalność, poprzez zwężenie światła zastawki. Zabieg ten może zostać wykonany przewcewnikowo, a efekty zostały opisane w badaniu TRI-REPAIR⁶³. Pacjenci cierpiący na objawowe TR poddani zostali zabiegowi z wykorzystaniem systemu Cardioband. Zabieg ten w dwuletniej obserwacji znacząco zwiększył wydolność serca, ograniczył niedomykalność zastawki, poprzez zmniejszenie pierścienia oraz poprawił QoL pacjentów.

3.3 Przewcewnikowe wszczępienie zastawki trójdzielnej

Innym sposobem ograniczenia TR jest implantacja sztucznej zastawki. Jednym z takich systemów jest zastawka EVOQUE, która jest w fazie badań klinicznych TRISCEND II (NCT04482062) rozpoczętych na początku 2021, i których koniec planowany jest na 2028 rok. Składa się on z 9 kotwic ufiksowanych w pierścieniu zastawek. System zaprojektowano z myślą o dostępie żylnym przezudowym⁵⁵. Zastawka zdaje się spełniać oczekiwania, o czym świadczą pierwsze opisy przypadków zastosowania u pacjentów z ciężką TR⁶⁴. W badaniu obserwowano powodzenie umieszczenia zastawki oraz ocenę niewydolności w skali NYHA, nasilenie TR, większe incydenty sercowo naczyniowe oraz zdarzenia nieporządane dotyczące ośrodkowego układu nerwowego. Pomimo znacznych ograniczeń badania, takich jak mała próba pacjentów, krótki czas obserwacji oraz przeprowadzanie zabiegów wyłącznie w ośrodkach specjalizujących się w zabiegach przewcewnikowych, można wnioskować, że system EVOQUE cechuje się akceptowalnym poziomem bezpieczeństwa, wysokim poziomem sukcesu umieszczania zastawek oraz poprawą klinicznego stanu pacjenta. Potrzebne są dalsze badania z większą liczbą pacjentów, które pozwolą lepiej ocenić korzyści płynące z TTVR z zastosowaniem systemu EVOQUE. Warto wspomnieć, że w przypadku przewcewnikowej wymiany zastawki trójdzielnej (TTVR) pierścień zastawki cechuje się rozmiarem, umożliwiającym metodę „zastawka w zastawkę”, w razie uszkodzenia wcześniej wszczępionej zastawki⁶⁵.

Kolejnym systemem do TTVR, będącym na etapie badań klinicznych, jest NaviGate (NaviGate Cardiac Structures Inc, Lake Forest, CA). Największe badanie opisywało wyniki leczenia 30 pacjentów z ciężką TR, którzy pod-

dali się TTVR systemem NaviGate. Zastawkę GATE udało się umieścić u 26 pacjentów i u wszystkich udało się ograniczyć TR⁶⁶. Szkielet zastawki zbudowany jest ze stożkowego stopu z 12 kotwicami, mocującymi się od strony komory. Mechanizm zastawkowy jest trój płatkowy wykonany z końskiego osierdzia⁵⁵. W przypadku zastawki NaviGate preferowany jest dostęp przezkońszkowy lub przez naczynia żyłne szyi⁶⁶. Badanie dowiodło sukcesu w możliwości implantacji zastawki pierwszej generacji. Wskazuje też na potrzebę badań z większą próbą pacjentów i pozwalających na długofalową ocenę wpływu na QoL pacjentów. Jednocześnie wskazuje się na oczywiste korzyści z mniej inwazyjnych zabiegów.



Rycina 1. Zastawka Lux-Valve LuX-Valve(Jenscare Biotechnology, Ningbo, Chiny), wyposażona w kotwice wystającą poza główny obrys zastawki i sięgającą aż do przegrody międzykomorowej na charakterystycznym języku. A – „język”, B – zastawki, C- dysk zastawki [opracowanie własne].

Istnieją inne systemy implantacji zastawki trójdzielnej, jednak w ich przypadku efekty leczenia nie zostały szeroko opisane na dużej grupie pacjentów i należą do nich LuX-Valve(Jenscare Biotechnology, Ningbo, Chiny), Intrepid oraz Cardiovalve (Boston Medical, Shrewsbury, MA) oraz Trisol (Trisol Medical, Yokneam, Israel). Nietypowym mechanizmem działania cechuje się zastawka LuX-Valve, wyposażona w kotwice, wystającą poza główny obrys zastawki i sięgającą aż do przegrody międzykomorowej na charakterystycznym języku^{67,68}. Konstrukcja ta umożliwiła zminimalizowanie efektu siły radialnej, działającej na zastawkę, co ma przeciwdziałać przeciekom. Szeroka

gama produktów będących w fazie badań klinicznych świadczy o dużym potencjale rozwoju dalszych technologii TTVR. Pacjenci z wysokim ryzykiem okołoperacyjnym i ci, u których nie możliwe są zabiegi naprawcze, odniosą duże korzyści z nowych metod terapii. Przyszłe badania pozwolą na usystematyzowanie selekcji pacjentów, określa które zastawki najlepiej odpowiadają poszczególnym pacjentom, biorąc pod uwagę budowę anatomiczną oraz wcześniejsze interwencje w obrębie struktur serca.

4. Przeczewnikowe zabiegi na zastawce mitralnej

Niedomykalność zastawki mitralnej MR jest drugą najczęstszą wadą zastawkową w Europie⁶⁹. W krajach rozwiniętych choroba ma najczęściej etiologię zwyrodnieniową, a w krajach rozwijających się reumatyczną. Obecnie wytyczne wskazują na przeczewnikową naprawę zastawki sposobem „brzeg do brzegu” (TEER), w przypadku pacjentów objawowych niekwalifikujących się do operacji lub należących do grupy dużego ryzyka operacyjnego, jeżeli zabiegu nie uważa się za daremny⁷⁰⁻⁷².

Wykonywanie zabiegów naprawczych w obrębie pierścienia, jak i implantacja nowej zastawki stwarza duże wyzwania techniczne wykonania takiego zabiegu przez cewnikowo.

Badanie EVEREST II potwierdziło skuteczność MitraClip, czyli systemów pozwalających na złączenie płatków zastawki. Pomimo niższej efektywności w ograniczeniu MR niż w przypadku operacji kardiochirurgicznej, to zabieg przeczewnikowy cechował się większym bezpieczeństwem oraz podobnymi efektami klinicznymi u pacjentów przy rocznej obserwacji^{70,71}. W przypadku pięciorocznej obserwacji opisano mniejszą przeżywalność oraz zwiększone szanse na nawrót MR⁷¹. Powyższe obserwacje prowadzą do wniosków, że przeczewnikowy zabieg naprawczy może być dedykowany dla dość ograniczonej grupy pacjentów, jednak dalsze usprawnianie metod może prowadzić do rozszerzenia wytycznych na większą grupę pacjentów. Inny opisany wyżej produkt działający według podobnego mechanizmu to PASCAL [Edwards Lifesciences, Irvine, California].

4.1 Przeczewnikowa annuloplastyka zastawki mitralnej

Przedstawione wyżej systemy działające na zasadzie naprawy „brzeg do brzegu”. Niestety, część pacjentów nie może, ze względu na patologiczną budowę zastawki, poddać się takiemu zabiegowi. Przykładem jest nadmierne

poszerzenie pierścienia. Część z tych pacjentów nie może przystąpić też do operacji ze względu na przeciwwskazania. Rozwiązanie dla tej grupy pacjentów może być przecewnikowa annuloplastyka zastawki. Wykonanie annuloplastyki przecewnikowej w obrębie zastawki mitralnej zostało opisane po rocznej obserwacji na niewielkiej grupie pacjentów i wykazano zadowalającą skuteczność i poziom bezpieczeństwa⁷³. System ten pozwala umieścić implant na wysokości pierścienia zastawek, następnie 12 do 17 kotwiczek przytwierdza go wewnątrz przedsionka, a następnie operator dokonuje regulacji napięcia implantu tym samym powodując obkurczenie pierścienia do pożądanego rozmiaru⁷⁴. Pomimo obiecujących wyników u części pacjentów, badania na niewielkiej próbie nie pozwalają na daleko idące wnioski. Dalsze badania są prowadzone pod nazwą ACTIVE (NCT03016975) i pozwolą lepiej ocenić skuteczność wybranej metody w ograniczaniu MR.

4.2 Przecewnikowo implantowane systemy imitujące funkcję strun ścięgniastych

Poprawa hemodynamicznych właściwości zastawki mitralnej może być uzyskana poprzez systemy imitujące funkcję strun ścięgniastych. W przypadku wypadania płotka zastawki system NeoChord (NeoChord, Inc., St. Louis Park, MN, USA) pozwala na przecewnikowe ograniczenie mobilności płotka, poprzez naśladowanie funkcji strun ścięgniastych serca. Liczne opisy wykonanych zabiegów pozwalają ocenić, że metoda ta może być skuteczna u pacjentów z ciężką MR, wynikającą ze zmian degeneracyjnych⁷⁵. Wykazano też, że konkurencyjne systemy innych firm mają potencjał skutecznej poprawy QoL u pacjentów ze wspomnianej grupy⁷⁶.

4.3 Przecewnikowe wszczepienie zastawki mitralnej

Niektóre zaawansowane zmiany patologiczne w obrębie zastawki nie pozwalają na jej naprawę i jedyną interwencyjną możliwością terapii jest wymiana zastawki. Pacjenci, którzy wymagają takiej terapii mogą nie spełniać warunków dla bezpiecznego przeprowadzenia operacji kardiologicznej. Przykładem może być ciężkie zwapnienie pierścienia zastawki mitralnej, gdzie pacjenci nie są dobrymi kandydatami do operacji kardiologicznej⁷⁷. Ta grupa pacjentów w przyszłości, być może, będzie mogła skorzystać z zabiegu implantacji zastawki mitralnej wykonanym metodą przecewnikową. Na ten moment zabieg ten wykonano w wielu badaniach klinicznych i zaczyna być

coraz częściej stosowaną metodą leczenia. Sukcesy w przeprowadzaniu TAVI spowodują dalszą popularyzację badań nad tą metodą. Obecnie szacuje się, że w Stanach Zjednoczonych wykonuje się rocznie 10 000 takich zabiegów².

Systemem, który uzyskał akceptację FDA jako BDD, czyli oznaczenie przełomowego urządzenia jest Medtronic Intrepid™. System ten pozwala na implantację zastawki mitralnej metodą przezcewnikową, najczęściej dostępem przekoniuszkowym, chociaż inne dostępy też zostały pojedynczo wykonane⁷⁸. Na ten moment dostępne są dane z 30 dniowej obserwacji 15 pacjentów, jednak prowadzone jest badanie APOLLO (NCT03242642) którego celem jest ocena skuteczności produktu na większej grupie pacjentów i przy dłuższej obserwacji. Pomimo dużych ograniczeń danych, takich jak mała próba oraz czas obserwacji, opisano, że zaimplantowane zastawki spełniają swoje funkcję. Z grupy 15 pacjentów sukces proceduralny osiągnięto u 14, a u jednego pacjenta dokonano konwersji. U wszystkich pacjentów, u których dokonano implantacji, nie zaobserwowano po 30 dniach MR ani przecieku okołozastawkowego⁷⁸.

Implantacja zastawki wiąże się z licznymi trudnościami, takimi jak ryzyko powstawania zakrzepów czy kolonizacji przez patogeny. Istnieje wiele produktów, dla których wykonano pierwszy przezcewnikowy zabieg, jednak wiele z nich pomimo początkowych sukcesów, nie zapewnia odpowiednich efektów leczenia, a tym samym dalsze badania zostały zaniechane. Przykładem może być system FORTIS (Edwards Lifesciences, Irvine, USA)⁷⁶. Zastawka ta zbudowana z samorozprężalnej nitynolowej ramy, a najczęściej umieszcza się ją przekoniuszkowo⁷⁹.

Wymianę zastawki umożliwia też system Cardiovalve (Cardiovalve Ltd., Or Yehuda, Israel), będący przezcewnikowym dedykowanym systemem, umożliwiającym umieszczenie zastawki mitralnej metodą przezścienną, co odróżnia go od innych systemów implantacji zastawki mitralnej⁸⁰. Przedstawiona obserwacja u pacjenta, który z powodu ciężkiej objawowej MR poddał się implantacji zastawki Cardiovalve pokazuje, że innowacyjna metoda ma potencjał na dalszy rozwój i może rozwiązać wspomniane wyżej problem techniczne innych produktów.⁸⁰ System ten może też zostać użyty, celem wymiany zastawki trójdzielnej u pacjenta z TR.⁸¹

Warto wspomnieć, że do wymiany zastawki mitralnej wykorzystano nie tylko dedykowane systemy, ale też adaptowany do zastawki mitralnej wspomniany zestaw do TAVI – SAPIEN M3⁷⁶. Początkowe doświadczenia z tym systemem oraz sukcesy odmiany tego systemu w TAVI pokazują,

że liczne doświadczenia w TAVI mogą zostać zaimplementowane dla innych zastawek dając korzystne efekty^{76,82}.

5. Przezcewnikowa wymiana zastawki płucnej

Przezcewnikowe zabiegi zastawki płucnej są alternatywną metodą leczenia u części pacjentów z nieprawidłowo funkcjonującą zastawką, którzy wcześniej musieli być poddawani operacji kardiochirurgicznej. Zastawka płucna jest najmniej podatna na nabyte uszkodzenie⁸³. Jako, że większa część wad zastawki płucnej wiąże się z występowaniem wrodzonych wad serca (CHD), chirurgicznie wymieniona lub naprawiona zastawka, będzie musiała spełniać swoje funkcje przez dłuższy czas niż inne zastawki które są najczęściej implantowane w późniejszym wieku, lub będą one musiały być zastępowane czy wymagać reoperacji⁸³. Powoduje to, że naprawiana lub wymieniana na wczesnym etapie życia zastawka, ulega wraz z rozwojem pacjenta degradacji. Wykonanie reoperacji wiąże się z koniecznością powtórnej sternotomii lub torakotomii i realizacji krążenia pozaustrojowego⁸⁴. Ponadto dzięki wczesnemu rozpoznawaniu wad, odpowiedniemu leczeniu chirurgicznemu, jak i farmakologicznemu, oczekiwana długość życia pacjentów z CHD ulega wzrostowi. Dożycie 25 roku życia w przypadku niekrytycznych wad serca stanowi ponad 90%, natomiast krytycznych wad serca powyżej 60%, a tendencja zmian prowadzić będzie do coraz lepszej przeżywalności⁸⁵. Powoduje to, że liczna grupa pacjentów wymagać będzie wielokrotnych reoperacji lub TPVR.

Wykonywanie wielokrotnych zabiegów chirurgicznych w obrębie zastawki płucnej, powoduje degeneracje otaczających tkanek oraz powstawanie licznych zrostów. Ponadto każdy taki zabieg wiąże się z krwawieniem długą rekonwalescencją i zwiększonymi szansami na powikłania⁸⁶. Z wyżej wymienionych przyczyn interwencje kardiochirurgiczne są opóźniane na tyle, na ile jest to możliwe, celem ograniczenia ilości wykonywanych zabiegów kardiochirurgicznych. Niestety, może to skutkować powstaniem nieodwracalnych zmian⁸⁷. Przezcewnikowe zabiegi u pacjentów z dysfunkcją zastawki prawej drogi odpływu (RVOT) są mniej inwazyjną metodą przywrócenia fizjologicznej funkcji hemodynamicznej obiegu płucnego.

W przypadku pacjentów ze stenozą zastawki płucnej (PS) preferowaną metodą jest walwuloplastyka płucna, która daje zadowalające efekty leczenia ponad 80% pacjentów⁸⁸. Pozwala ona na osiągnięcie efektów porównywalnych z operacją kardiochirurgiczną, przy jednoczesnym mniejszym ryzyku i mniejszej inwazyjności zabiegu. Niestety, nie wszyscy pacjenci są dobrymi

kandydatami dla tego typu zabiegów. Występowanie dysplastycznych zastawek lub zwężenie pod zastawkowe stanowią przeciwwskazania do takich zabiegów i zabieg kardiochirurgiczny często bywa jedyną alternatywą⁸³.

5.1 Umieszczane przezcewnikowo zastawki płucne

W przypadku pacjentów z CHD takimi jak tetralogia Fallota, czy wspólny pień płucny, u których wykonano już chirurgiczny zabieg wymiany zastawki, najpewniej znajdzie konieczność ponownej wymiany. Pacjent taki może kwalifikować się do przezcewnikowej wymiany zastawki płucnej TPVR, co wiąże się z ograniczeniem wymienionych wyżej skutków operacji kardiochirurgicznej. Pierwszy taki zabieg wykonano u 12 letniego chłopca w 2000 roku zabieg ten zakończył się sukcesem⁸⁹. Obecnie zabieg ten został rozpowszechniony i wykonywany jest głównie przy użyciu zastawek Melody (Medtronic Inc.) oraz SAPIEN (Edwards Lifescience). Zastawka Melody dostępna jest w średnicach 18, 20, and 22 mm podczas gdy Sapien 20, 23, 26 i 29 mm.

Pomimo, że konieczność reinterwencji po TPVR w ciągu pierwszego roku jest rzadkością, wraz z biegiem lat wielu pacjentów będzie wymagało zabiegów naprawczych lub wymiany zastawki. W obserwacyjnym badaniu 100 pacjentów, u których wykonano TPVI zastawkami Melody lub Sapiens wykazano, że 14% pacjentów po 5,5 roku od wykonania zabiegu doznało poważnych zdarzeń niepożądanych. Główną przyczyną było infekcyjne zapalenie wsierdzia⁹⁰.

Ponadto przeprowadzona metaanaliza wykazała, że ryzyko takie jest znacząco wyższe dla zastawki Melody niż Sapien odpowiednio 4.9% i 1.3%⁹¹. Retrospektywne badanie kohortowe, obserwujące echokardiograficzne efekty TPVR przy użyciu zastawek Melody i Sapien, nie wykazały większych różnic w efektywności obu zastawek.⁹²

5.2 Zastawka Melody

Badania, obejmujące swoją obserwacją 10 i więcej lat oraz liczną grupę pacjentów, nie są liczne, ze względu na innowacyjny charakter zabiegów. Obserwacja obejmowała 170 pacjentów z defektem zastawki RVOT, z czego 150 poddano zabiegowi TPVR zastawką Melody⁹³. Jako obserwowane parametry wybrano brak ponownej implantacji, stopień lub brak występowania niedomykalności zastawki oraz gradient RVOT, konieczność reinterwencji przezcewnikowej, uszkodzenie stentu, interwencje chirurgiczną oraz śmierć.

Mediana wieku pacjentów wynosiła 19 lat i u 149 pacjentów zastawkę udało się skutecznie zaimplantować, przy różnicy gradientu ciśnień po obu stronach zastawki na poziomie 17mmHg. Po 10 latach doszło do zgonu 10% pacjentów, dysfunkcje zastawki zaobserwowano u 47%, ponadto zaobserwowano szybszą degradację u dzieci niż dorosłych. Infekcyjne zapalenie wsierdzia zaobserwowano w badaniu z częstością 2% na rok, co stanowiło główną przyczynę zgonów, a wyniki te potwierdzają obserwacje z innych ośrodków^{91,93,94}. Opisano, że zastawka Melody może wiązać się z ryzykiem uszkodzenia stentu⁹⁵. Ryzyko to może być obniżone przez pre-stentowanie.

Podsumowując, zastawka Melody umożliwia pacjentom poddanym wcześniej kardiochirurgicznemu operacją RVOT funkcjonowanie z prawidłowo działającą zastawką płucną, jednak należy mieć na uwadze ryzyko zakażenia czy uszkodzenia stentu^{90,91,93,95}.

5.3 Zastawki Sapien

Zastawka Sapien może okazać się szczególnie pomocna przy dużym poszerzeniu średnicy RVOT, ze względu na możliwość wyboru większej średnicy zastawki oraz możliwość jej rozszerzenia, niż zastawki Melody⁹⁶. W przypadku TPVR zastawką Sapien obserwację 3 letnią opisano na próbie 57 pacjentów, u których zaobserwowano wzrost wydolności serca w skali NYHA (97,1% pacjentów), znaczący spadek średniego ciśnienia skurczowego w prawej komorze oraz duży odsetek pacjentów, u których nie wykryto większej niż łagodna niedomykalności zastawki⁹⁷. Ponadto śmiertelność wynosiła zaledwie 2,9% po 3 latach i nie zaobserwowano u żadnego pacjenta uszkodzeń stentu.

Podsumowując, zastawki Sapien cechują się korzystnymi efektami leczenia ciężkiej stenozy i niedomykalności zastawki płucnej. Ocena długotrwałych efektów leczenia może być utrudniona ze względu na innowacyjny charakter zabiegów, lecz przyjęło się, że większość zastawek będzie najprawdopodobniej wymagać wymiany. W przypadku zastawkę Sapien możemy częściowo bazować na liczniejszych obserwacjach dotyczących produktów tej gamy wszczepianych w pozycję aortalną^{10–15}.

5.4 TPVR dalsze perspektywy rozwoju

Podsumowując, zabiegi TPVR znacząco poprawiły rokowania wielu pacjentów, potrzebujących wymiany zastawki, po wcześniej przeprowadzonych

zabiegach kardiochirurgicznych. Zabiegi te są znacznie mniej inwazyjne niż reoperacja, a tym samym wpływają na zwiększony komfort pacjentów oraz ciągle rosnącą średnią długość życia u pacjentów z CHD^{85,98}. Wraz z rosnącą przeżywalnością tej grupy pacjentów, takie zabiegi będą coraz częściej przeprowadzane, a tym samym umożliwi to dalszy rozwój metod, diagnostyki, metod obrazowania i sprzętu potrzebnego do przeprowadzenia zabiegów. Obecnie korzyści i zagrożenia związane z zastosowaniem zastawek Melody i Sapien są dobrze poznane dzięki licznej grupie pacjentów, u których zaimplantowano wspomniane zastawki. Pomimo licznych korzyści płynących z TPVR, należy pamiętać o ryzyku związanym z takim zabiegiem, takimi jak uszkodzenie stentu czy zapalenie wsierdza⁹⁹.

6. Dyskusja

Metody kardiochirurgiczne dalej stanowią dominującą metodę leczenia wad zastawkowych serca, jednak obecnie rozwijane metody przecewnikowe, mogą stanowić przyszłość leczenia. Terapie metodami przecewnikowymi pozwoliły na przywrócenie fizjologicznych właściwości hemodynamicznych zastawek u pacjentów, którzy nie mogli być kwalifikowani do chirurgicznych metod leczenia. Ponadto, w przypadku zastawki aortalnej metoda ta może być korzystniejsza nawet u pacjentów z niskich grupy ryzyka¹². Omówione wyżej zalety metod przecewnikowych nad chirurgicznymi, przemawiają za ich dalszym potencjałem rozwoju. Ponadto wzrost umiejętności operatorów wraz z krzywą uczenia, dowodzi dodatkowemu potencjałowi rozwoju⁹. Nie znaczy to, że zabiegi przecewnikowe nie mają swoich wad takich jak ograniczony dostęp do struktur anatomicznych czy możliwości manewrowania cewnikiem. Ponadto kolonizacja przez patogeny i przecieki stanowią problem wielu preparatów. Druk 3D może być wykorzystywany podczas przygotowań do zabiegów lub w celach szkoleniowych. Pozwala on na wytworzenie wzorów o dużym zróżnicowaniu oraz przedstawić indywidualną budowę anatomiczną, jednak nie pozwala na zastosowanie odpowiednich materiałów spełniających fizjologiczne funkcje zastawki. Zastawki następnej generacji, być może, cechować się będą możliwością aktywnej naprawy, remodelingu i regeneracji¹⁰⁰. W uzyskaniu korzystnej geometrii oraz właściwości hemodynamicznych zastawek, pomogły modele matematyczne pozwalające na ocenę sił działających na pracującą strukturę¹⁰¹. Nowe zastawki i materiały, z których one powstaną, będą opracowywane z myślą o minimalizowaniu ryzyka wykrzepiania, kalcyfikacji czy zasiedlania przez patogeny. Rozwój technik obrazowania

pozwole na większą precyzję wykonywania zabiegów. Należy też zwrócić uwagę, że niektóre wady zastawkowe dotyczą wąskiej grupy pacjentów, a tym samym rozwiązania dla nich są wolniej opracowywane. Tym samym część z rozwiązań, które mogłyby być korzystne nie mogą zostać szerzej przebadane, co za tym idzie zaimplementowane u większej grupy pacjentów. Wyżej ukazano zróżnicowane mechanizmy mocowania jak i dostarczania mechanizmu. Część z opracowanych rozwiązań nie będzie dalej rozwijana przez skomplikowany, wieloletni i kosztowny proces komercjalizacji projektów, a tym samym istnieje ryzyko, że tylko najlepiej dofinansowane projekty będą mogły zostać zastosowane wprowadzone na rynek. Wiele produktów rozwijanych z myślą o jednej zastawce, może zostać zaimplementowanych do stosowania w innym położeniu w sercu. Głównym problemem, jeśli chodzi o ocenę efektów leczenia jest obecny brak 20 letniej i dłuższej obserwacji większej liczny pacjentów. Najbliższe lata z pewnością zaowocują w dalszy rozwój nowoczesnych technik zabiegów przezcewnikowych oraz materiałów i konstrukcji sztucznych zastawek.

7. Referencje

1. van der Linde D, Konings EEM, Slager MA, et al. Birth Prevalence of Congenital Heart Disease Worldwide. *Journal of the American College of Cardiology*. 2011;58(21):2241-2247. doi:10.1016/j.jacc.2011.08.025
2. Davidson LJ, Davidson CJ. Transcatheter Treatment of Valvular Heart Disease: A Review. *JAMA*. 2021;325(24):2480. doi:10.1001/jama.2021.2133
3. Baehner T, Boehm O, Probst C, et al. Kardiopulmonaler Bypass in der Herzchirurgie. *Anaesthesist*. 2012;61(10):846-856. doi:10.1007/s00101-012-2050-0
4. Vahanian A, Beyersdorf F, Praz F, et al. 2021 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *European Heart Journal*. 2022;43(7):561-632. doi:10.1093/eurheartj/ehab395
5. Kanwar A, Thaden JJ, Nkomo VT. Management of Patients With Aortic Valve Stenosis. *Mayo Clin Proc*. 2018;93(4):488-508. doi:10.1016/j.mayocp.2018.01.020

6. Cribier A, Eltchaninoff H, Bash A, et al. Percutaneous transcatheter implantation of an aortic valve prosthesis for calcific aortic stenosis: first human case description. *Circulation*. 2002;106(24):3006-3008. doi:10.1161/01.cir.0000047200.36165.b8
7. Leon MB, Smith CR, Mack M, et al. Transcatheter Aortic-Valve Implantation for Aortic Stenosis in Patients Who Cannot Undergo Surgery. *N Engl J Med*. 2010;363(17):1597-1607. doi:10.1056/NEJMoa1008232
8. Popma JJ, Adams DH, Reardon MJ, et al. Transcatheter Aortic Valve Replacement Using a Self-Expanding Bioprosthesis in Patients With Severe Aortic Stenosis at Extreme Risk for Surgery. *Journal of the American College of Cardiology*. 2014;63(19):1972-1981. doi:10.1016/j.jacc.2014.02.556
9. Kachel M, Milewski K, Buszman P, et al. State-of-the-art of transcatheter treatment of aortic valve stenosis and the overview of the InFlow project aiming at developing the first Polish TAVI system. *Cardiol J*. 2017;24(6):685-694. doi:10.5603/CJ.a2017.0134
10. Leon MB, Smith CR, Mack MJ, et al. Transcatheter or Surgical Aortic-Valve Replacement in Intermediate-Risk Patients. *N Engl J Med*. 2016;374(17):1609-1620. doi:10.1056/NEJMoa1514616
11. Binder RK, Webb JG, Toggweiler S, et al. Impact of Post-Implant SAPIEN XT Geometry and Position on Conduction Disturbances, Hemodynamic Performance, and Paravalvular Regurgitation. *JACC: Cardiovascular Interventions*. 2013;6(5):462-468. doi:10.1016/j.jcin.2012.12.128
12. Mack MJ, Leon MB, Thourani VH, et al. Transcatheter Aortic-Valve Replacement with a Balloon-Expandable Valve in Low-Risk Patients. *N Engl J Med*. 2019;380(18):1695-1705. doi:10.1056/NEJMoa1814052
13. Kodali S, Thourani VH, White J, et al. Early clinical and echocardiographic outcomes after SAPIEN 3 transcatheter aortic valve replacement in inoperable, high-risk and intermediate-risk patients with aortic stenosis. *Eur Heart J*. 2016;37(28):2252-2262. doi:10.1093/eurheartj/ehw112

14. Sawaya FJ, Spaziano M, Lefèvre T, et al. Comparison between the SAPIEN S3 and the SAPIEN XT transcatheter heart valves: A single-center experience. *WJC*. 2016;8(12):735. doi:10.4330/wjc.v8.i12.735
15. Pibarot P, Ternacle J, Jaber WA, et al. Structural Deterioration of Transcatheter Versus Surgical Aortic Valve Bioprostheses in the PARTNER-2 Trial. *Journal of the American College of Cardiology*. 2020;76(16):1830-1843. doi:10.1016/j.jacc.2020.08.049
16. Waksman R, Rogers T, Torguson R, et al. Transcatheter Aortic Valve Replacement in Low-Risk Patients With Symptomatic Severe Aortic Stenosis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2018;72(18):2095-2105. doi:10.1016/j.jacc.2018.08.1033
17. Jørgensen TH, Thyregod HGH, Ihlemann N, et al. Eight-year outcomes for patients with aortic valve stenosis at low surgical risk randomized to transcatheter vs. surgical aortic valve replacement. *European Heart Journal*. 2021;42(30):2912-2919. doi:10.1093/eurheartj/ehab375
18. Otto CM, Nishimura RA, Bonow RO, et al. 2020 ACC/AHA Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*. 2021;143(5). doi:10.1161/CIR.0000000000000932
19. Sinha S, Khan A, Qureshi AM, et al. Application of transcatheter valves for aortic valve replacement in pediatric patients: A case series. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2020;95(2):253-261. doi:10.1002/ccd.28505
20. Fernandez-Doblas J, Perez-Andreu J, Betrian P, Abella RF. Pediatric Tricuspid Valve Replacement With Transcatheter Bioprosthetic Valve: An Alternative Option in High-Risk Patients. *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2020;32(4):1021-1023. doi:10.1053/j.semtcvs.2019.06.006
21. Kobo O, Saada M, Roguin A. Can transcatheter aortic valve implantation [TAVI] be performed at institutions without on-site cardiac surgery department? *Cardiovascular Revascularization*

- Medicine*. Published online December 2021:S1553838921008071. doi:10.1016/j.carrev.2021.12.009
22. Goodall G, Lamotte M, Ramos M, Maunoury F, Pejchalova B, de Pouvourville G. Cost-effectiveness analysis of the SAPIEN 3 TAVI valve compared with surgery in intermediate-risk patients. *Journal of Medical Economics*. 2019;22(4):289-296. doi:10.1080/13696998.2018.1559600
 23. Eaton J, Mealing S, Thompson J, et al. Is transcatheter aortic valve implantation (TAVI) a cost-effective treatment in patients who are ineligible for surgical aortic valve replacement? A systematic review of economic evaluations. *Journal of Medical Economics*. 2014;17(5):365-375. doi:10.3111/13696998.2014.903256
 24. Badiani S, Bhattacharyya S, Lloyd G. Role of Echocardiography Before Transcatheter Aortic Valve Implantation (TAVI). *Curr Cardiol Rep*. 2016;18(4):38. doi:10.1007/s11886-016-0715-z
 25. La Grutta L, Toia P, Grassedonio E, et al. TAVI imaging: over the echocardiography. *Radiol med*. 2020;125(11):1148-1166. doi:10.1007/s11547-020-01281-0
 26. Vaquerizo B, Spaziano M, Alali J, et al. Three-dimensional echocardiography vs. computed tomography for transcatheter aortic valve replacement sizing. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. Published online October 1, 2015:jev238. doi:10.1093/ehjci/jev238
 27. Zamorano J, Pardo A. 3D-ECHO for TAVI: two arrows, just in case. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. Published online November 20, 2015:jev282. doi:10.1093/ehjci/jev282
 28. Wang X, Chen F, Xiong TY, et al. A CT-based technique to predict optimal projection for self-expanding TAVI in patients with different aortic valve anatomies. *BMC Cardiovasc Disord*. 2021;21(1):590. doi:10.1186/s12872-021-02387-7
 29. Jilaihawi H, Kashif M, Fontana G, et al. Cross-Sectional Computed Tomographic Assessment Improves Accuracy of Aortic Annular Sizing for Transcatheter Aortic Valve Replacement and Reduces the Incidence of Paravalvular Aortic Regurgitation. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012;59(14):1275-1286. doi:10.1016/j.jacc.2011.11.045

30. Holmes DR, Nishimura RA, Grover FL, et al. Annual Outcomes With Transcatheter Valve Therapy. *Journal of the American College of Cardiology*. 2015;66(25):2813-2823. doi:10.1016/j.jacc.2015.10.021
31. Katarzyna Byczkowska, Agnieszka Pawlak, Piotr Suwalski, Radosław Smoczyński, Dominik Drobiński, Aleksandra Bobel, Marzena Pietraszek, Anna Smolarczyk, Tomasz Pawłowski, Robert J. Gil. Przezcewnikowa implantacja zastawki aortalnej jako metoda leczenia ciężkiej stenozы aortalnej – wyniki leczenia i trzydziestodniowej obserwacji w jednym z ośrodków. *Kardiologia Inwazyjna* 2017; 12 (2), 27–36.
32. Block PC, Mack M. If TAVR Cannot Be Transfemoral, Then What? *JACC: Cardiovascular Interventions*. 2016;9(22):2326-2328. doi:10.1016/j.jcin.2016.09.021
33. Walther T, Kempfert J. Transapical vs. transfemoral aortic valve implantation: Which approach for which patient, from a surgeon's standpoint. *Ann Cardiothorac Surg*. 2012;1(2):216-219. doi:10.3978/j.issn.2225-319X.2012.07.10
34. Al-Ani A, Hoffmann P, Lueder T, Opdahl A. Safety and efficacy of hybrid vascular closure technique using both a suture- and collagen-mediated closure device after transfemoral transcatheter aortic valve implantation. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2020;95(6):1171-1175. doi:10.1002/ccd.28419
35. Noori VJ, Eldrup-Jørgensen J. A systematic review of vascular closure devices for femoral artery puncture sites. *Journal of Vascular Surgery*. 2018;68(3):887-899. doi:10.1016/j.jvs.2018.05.019
36. Kappetein AP, Head SJ, Généreux P, et al. Updated standardized endpoint definitions for transcatheter aortic valve implantation: The Valve Academic Research Consortium-2 consensus document. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2013;145(1):6-23. doi:10.1016/j.jtcvs.2012.09.002
37. Barbash IM, Barbanti M, Webb J, et al. Comparison of vascular closure devices for access site closure after transfemoral aortic valve implantation. *Eur Heart J*. 2015;36(47):3370-3379. doi:10.1093/eurheartj/ehv417

38. van Wiechen MP, Tchétché D, Ooms JF, et al. Suture- or Plug-Based Large-Bore Arteriotomy Closure. *JACC: Cardiovascular Interventions*. 2021;14(2):149-157. doi:10.1016/j.jcin.2020.09.052
39. Medranda GA, Case BC, Zhang C, et al. Propensity-matched comparison of large-bore access closure in transcatheter aortic valve replacement using MANTA versus Perclose: A real-world experience. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2021;98(3):580-585. doi:10.1002/ccd.29786
40. Dumpies O, Kitamura M, Majunke N, et al. Manta versus Perclose ProGlide vascular closure device after transcatheter aortic valve implantation: Initial experience from a large European center. *Cardiovascular Revascularization Medicine*. Published online July 2021:S1553838921005054. doi:10.1016/j.carrev.2021.06.134
41. Moriyama N, Dahlbacka S, Vähäsilta T, et al. The Efficacy of the Ultrasound-Navigated MANTA Deployment Following Transfemoral Transcatheter Aortic Valve Replacement. *JACC: Cardiovascular Interventions*. 2019;12(24):2564-2566. doi:10.1016/j.jcin.2019.09.018
42. Kmiec L, Zerditzki M, Schmid C, et al. Evaluation of the MANTA Vascular Closure Device in Transfemoral TAVI. *Thorac Cardiovasc Surg*. Published online June 27, 2021:s-0041-1730972. doi:10.1055/s-0041-1730972
43. Kastengren M, Svenarud P, Källner G, Settergren M, Franco-Cereceda A, Dalén M. Percutaneous Vascular Closure Device in Minimally Invasive Mitral Valve Surgery. *The Annals of Thoracic Surgery*. 2020;110(1):85-91. doi:10.1016/j.athoracsur.2019.10.038
44. Nuis RJ, Wood D, Kroon H, et al. Frequency, Impact, and Predictors of Access Complications With Plug-Based Large-Bore Arteriotomy Closure - A Patient-Level Meta-Analysis. *Cardiovascular Revascularization Medicine*. 2022;34:69-74. doi:10.1016/j.carrev.2021.02.017
45. Wang DD, Gheewala N, Shah R, et al. Three-Dimensional Printing for Planning of Structural Heart Interventions. *Interventional Cardiology Clinics*. 2018;7(3):415-423. doi:10.1016/j.iccl.2018.04.004

46. Giannopoulos AA, Steigner ML, George E, et al. Cardiothoracic Applications of 3-dimensional Printing. *Journal of Thoracic Imaging*. 2016;31(5):253-272. doi:10.1097/RTI.0000000000000217
47. Alkhouli M, Sengupta PP. 3-Dimensional-Printed Models for TAVR Planning. *JACC: Cardiovascular Imaging*. 2017;10(7):732-734. doi:10.1016/j.jcmg.2017.05.002
48. Thorburn C, Abdel-Razek O, Fagan S, et al. Three-dimensional printing for assessment of paravalvular leak in transcatheter aortic valve implantation. *J Cardiothorac Surg*. 2020;15(1):211. doi:10.1186/s13019-020-01255-3
49. Levin D, Mackensen GB, Reisman M, McCabe JM, Dvir D, Ripley B. 3D Printing Applications for Transcatheter Aortic Valve Replacement. *Curr Cardiol Rep*. 2020;22(4):23. doi:10.1007/s11886-020-1276-8
50. Arsalan M, Walther T, Smith RL, Grayburn PA. Tricuspid regurgitation diagnosis and treatment. *Eur Heart J*. 2017;38(9):634-638. doi:10.1093/eurheartj/ehv487
51. Singh JP, Evans JC, Levy D, et al. Prevalence and clinical determinants of mitral, tricuspid, and aortic regurgitation (the Framingham Heart Study). *The American Journal of Cardiology*. 1999;83(6):897-902. doi:10.1016/S0002-9149(98)01064-9
52. d’Arcy JL, Coffey S, Loudon MA, et al. Large-scale community echocardiographic screening reveals a major burden of undiagnosed valvular heart disease in older people: the OxVALVE Population Cohort Study. *Eur Heart J*. 2016;37(47):3515-3522. doi:10.1093/eurheartj/ehw229
53. Dutka, M., Wojakowski, W. Niedomykalność zastawki trójdzielnej - niedoceniany problem “zapomnianej” zastawki. *Kardiologia Inwazyjna*. 2018;(5):13-22.
54. Nath J, Foster E, Heidenreich PA. Impact of tricuspid regurgitation on long-term survival. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;43(3):405-409. doi:10.1016/j.jacc.2003.09.036
55. Greenbaum AB, Babaliaros VC, Eng MH. Orthotopic Transcatheter Tricuspid Valve Replacement. *Interventional Cardiology Clinics*. 2022;11(1):87-94. doi:10.1016/j.iccl.2021.09.009

56. Faries CM, Sengupta A, Alexis SL, et al. Transcatheter Tricuspid and Pulmonary Valve Repair and Replacement. *Surg Technol Int.* 2020;36:217-223.
57. Asmarats L, Dagenais F, Bédard E, et al. Transcatheter Tricuspid Valve Replacement for Treating Severe Tricuspid Regurgitation: Initial Experience With the NaviGate Bioprosthesis. *Can J Cardiol.* 2018;34(10):1370.e5-1370.e7. doi:10.1016/j.cjca.2018.07.481
58. Navia JL, Kapadia S, Elgharably H, et al. First-in-Human Implantations of the NaviGate Bioprosthesis in a Severely Dilated Tricuspid Annulus and in a Failed Tricuspid Annuloplasty Ring. *Circ Cardiovasc Interv.* 2017;10(12):e005840. doi:10.1161/CIRCINTERVENTIONS.117.005840
59. Colli A, Gerosa G, Bartus K, Tarantini G. Transcatheter tricuspid valve replacement with a self-expanding bioprosthesis. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery.* 2018;156(3):1064-1066. doi:10.1016/j.jtcvs.2018.03.096
60. Tagliari AP, Perez-Camargo D, Taramasso M. Tricuspid regurgitation: when is it time for surgery? *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2021;19(1):47-59. doi:10.1080/14779072.2021.1854734
61. Orban M, Rommel KP, Ho EC, et al. Transcatheter Edge-to-Edge Tricuspid Repair for Severe Tricuspid Regurgitation Reduces Hospitalizations for Heart Failure. *JACC Heart Fail.* 2020;8(4):265-276. doi:10.1016/j.jchf.2019.12.006
62. Sugiura A, Vogelhuber J, Öztürk C, et al. PASCAL versus MitraClip-XTR edge-to-edge device for the treatment of tricuspid regurgitation: a propensity-matched analysis. *Clin Res Cardiol.* 2021;110(3):451-459. doi:10.1007/s00392-020-01784-w
63. Nickenig G, Weber M, Schüler R, et al. Tricuspid valve repair with the Cardioband system: two-year outcomes of the multicentre, prospective TRI-REPAIR study. *EuroIntervention.* 2021;16(15):e1264-e1271. doi:10.4244/EIJ-D-20-01107
64. Fam NP, von Bardeleben RS, Hensey M, et al. Transfemoral Transcatheter Tricuspid Valve Replacement With the EVOQUE System. *JACC: Cardiovascular Interventions.* 2021;14(5):501-511. doi:10.1016/j.jcin.2020.11.045

65. Gilles D, Dreyfus, Essayagh B. Transcatheter Treatment Options for Severe Tricuspid Regurgitation. *JACC: Cardiovascular Interventions*. 2021;14(5):512-514. doi:10.1016/j.jcin.2021.01.012
66. Hahn RT, Kodali S, Fam N, et al. Early Multinational Experience of Transcatheter Tricuspid Valve Replacement for Treating Severe Tricuspid Regurgitation. *JACC: Cardiovascular Interventions*. 2020;13(21):2482-2493. doi:10.1016/j.jcin.2020.07.008
67. Lu FL, Ma Y, An Z, et al. First-in-Man Experience of Transcatheter Tricuspid Valve Replacement With LuX-Valve in High-Risk Tricuspid Regurgitation Patients. *JACC: Cardiovascular Interventions*. 2020;13(13):1614-1616. doi:10.1016/j.jcin.2020.03.026
68. Lu FL, An Z, Ma Y, et al. Transcatheter tricuspid valve replacement in patients with severe tricuspid regurgitation. *Heart*. 2021;107(20):1664. doi:10.1136/heartjnl-2020-318199
69. Lung B, Delgado V, Rosenhek R, et al. Contemporary Presentation and Management of Valvular Heart Disease: The EURObservational Research Programme Valvular Heart Disease II Survey. *Circulation*. 2019;140(14):1156-1169. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.119.041080
70. Feldman T, Foster E, Glower DD, et al. Percutaneous Repair or Surgery for Mitral Regurgitation. *N Engl J Med*. 2011;364(15):1395-1406. doi:10.1056/NEJMoa1009355
71. Feldman T, Kar S, Elmariah S, et al. Randomized Comparison of Percutaneous Repair and Surgery for Mitral Regurgitation. *Journal of the American College of Cardiology*. 2015;66(25):2844-2854. doi:10.1016/j.jacc.2015.10.018
72. Buzzatti N, Van Hemelrijck M, Denti P, et al. Transcatheter or surgical repair for degenerative mitral regurgitation in elderly patients: A propensity-weighted analysis. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2019;158(1):86-94.e1. doi:10.1016/j.jtcvs.2019.01.023
73. Messika-Zeitoun D, Nickenig G, Latib A, et al. Transcatheter mitral valve repair for functional mitral regurgitation using the Cardioband system: 1 year outcomes. *European Heart Journal*. 2019;40(5):466-472. doi:10.1093/eurheartj/ehy424

74. Nickenig G, Hammerstingl C, Schueler R, et al. Transcatheter Mitral Annuloplasty in Chronic Functional Mitral Regurgitation. *JACC: Cardiovascular Interventions*. 2016;9(19):2039-2047. doi:10.1016/j.jcin.2016.07.005
75. Colli A, Adams D, Fiocco A, et al. Transapical NeoChord mitral valve repair. *Ann Cardiothorac Surg*. 2018;7(6):812-820. doi:10.21037/acs.2018.11.04
76. Goode D, Dhaliwal R, Mohammadi H. Transcatheter Mitral Valve Replacement: State of the Art. *Cardiovasc Eng Tech*. 2020;11(3):229-253. doi:10.1007/s13239-020-00460-4
77. Yoon SH, Makkar R. Transcatheter Mitral Valve Replacement in Patients with Severe Mitral Annular Calcification. *Interventional Cardiology Clinics*. 2019;8(3):301-312. doi:10.1016/j.iccl.2019.02.008
78. Zahr F, Song HK, Chadderdon SM, et al. 30-Day Outcomes Following Transfemoral Transseptal Transcatheter Mitral Valve Replacement. *JACC: Cardiovascular Interventions*. 2022;15(1):80-89. doi:10.1016/j.jcin.2021.10.018
79. Abdul-Jawad Altisent O, Dumont E, Dagenais F, et al. Initial Experience of Transcatheter Mitral Valve Replacement With a Novel Transcatheter Mitral Valve. *Journal of the American College of Cardiology*. 2015;66(9):1011-1019. doi:10.1016/j.jacc.2015.06.1322
80. Maisano F, Benetis R, Rumbinaite E, et al. 2-Year Follow-Up After Transseptal Transcatheter Mitral Valve Replacement With the Cardiovalve. *JACC: Cardiovascular Interventions*. 2020;13(17):e163-e164. doi:10.1016/j.jcin.2020.05.032
81. Aoi S, Wiley J, Ho E, Goldberg Y, Chau M, Latib A. Transcatheter tricuspid valve implantation with the Cardiovalve system. *Future Cardiology*. 2021;17(6):963-969. doi:10.2217/fca-2020-0181
82. Whisenant B, Kapadia SR, Eleid MF, et al. One-Year Outcomes of Mitral Valve-in-Valve Using the SAPIEN 3 Transcatheter Heart Valve. *JAMA Cardiol*. 2020;5(11):1245. doi:10.1001/jamacardio.2020.2974
83. Fitzgerald KP, Lim MJ. The Pulmonary Valve. *Cardiology Clinics*. 2011;29(2):223-227. doi:10.1016/j.ccl.2011.01.006

84. Baumgartner H, De Backer J, Babu-Narayan SV, et al. 2020 ESC Guidelines for the management of adult congenital heart disease. *European Heart Journal*. 2021;42(6):563-645. doi:10.1093/eurheartj/ehaa554
85. Oster ME, Lee KA, Honein MA, Riehle-Colarusso T, Shin M, Correa A. Temporal trends in survival among infants with critical congenital heart defects. *Pediatrics*. 2013;131(5):e1502-1508. doi:10.1542/peds.2012-3435
86. Vida VL, Berggren H, Brawn WJ, et al. Risk of Surgery for Congenital Heart Disease in the Adult: A Multicentered European Study. *The Annals of Thoracic Surgery*. 2007;83(1):161-168. doi:10.1016/j.athoracsur.2006.07.045
87. Alkashkari W, Alsubei A, Hijazi ZM. Transcatheter Pulmonary Valve Replacement: Current State of Art. *Curr Cardiol Rep*. 2018;20(4):27. doi:10.1007/s11886-018-0966-y
88. El-Saeidi SA, Hamza HS, Agha HM, et al. Experience with balloon pulmonary valvuloplasty and predictors of outcome: a ten-year study. *Cardiol Young*. 2020;30(4):482-488. doi:10.1017/S1047951120000360
89. Bonhoeffer P, Boudjemline Y, Saliba Z, et al. Percutaneous replacement of pulmonary valve in a right-ventricle to pulmonary-artery prosthetic conduit with valve dysfunction. *The Lancet*. 2000;356(9239):1403-1405. doi:10.1016/S0140-6736(00)02844-0
90. Rużyłło W, Biernacka EK, Woźniak O, et al. Transcatheter pulmonary valve implantation in 100 patients: a 10-year single-center experience. *pwki*. 2020;16(3):235-243. doi:10.5114/aic.2020.99257
91. Lehner A, Haas NA, Dietl M, et al. The risk of infective endocarditis following interventional pulmonary valve implantation: A meta-analysis. *Journal of Cardiology*. 2019;74(3):197-205. doi:10.1016/j.jcc.2019.04.007
92. Samayoa JC, Boucek D, McCarthy E, et al. Echocardiographic Assessment of Melody Versus Sapien Valves Following Transcatheter Pulmonary Valve Replacement. *JACC Cardiovasc Interv*. 2022;15(2):165-175. doi:10.1016/j.jcin.2021.11.002

93. Jones TK, McElhinney DB, Vincent JA, et al. Long-Term Outcomes After Melody Transcatheter Pulmonary Valve Replacement in the US Investigational Device Exemption Trial. *Circ: Cardiovascular Interventions*. 2022;15(1):e010852. doi:10.1161/CIRCINTERVENTIONS.121.010852
94. McElhinney DB, Sondergaard L, Armstrong AK, et al. Endocarditis After Transcatheter Pulmonary Valve Replacement. *Journal of the American College of Cardiology*. 2018;72(22):2717-2728. doi:10.1016/j.jacc.2018.09.039
95. Nordmeyer J, Khambadkone S, Coats L, et al. Risk Stratification, Systematic Classification, and Anticipatory Management Strategies for Stent Fracture After Percutaneous Pulmonary Valve Implantation. *Circulation*. 2007;115(11):1392-1397. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.674259
96. Shivaraju A, Kodali S, Thilo C, et al. Overexpansion of the SAPIEN 3 Transcatheter Heart Valve. *JACC: Cardiovascular Interventions*. 2015;8(15):2041-2043. doi:10.1016/j.jcin.2015.10.006
97. Kenny D, Rhodes JF, Fleming GA, et al. 3-Year Outcomes of the Edwards SAPIEN Transcatheter Heart Valve for Conduit Failure in the Pulmonary Position From the COMPASSION Multicenter Clinical Trial. *JACC: Cardiovascular Interventions*. 2018;11(19):1920-1929. doi:10.1016/j.jcin.2018.06.001
98. Reid GJ, Webb GD, Barzel M, McCrindle BW, Irvine MJ, Siu SC. Estimates of Life Expectancy by Adolescents and Young Adults With Congenital Heart Disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;48(2):349-355. doi:10.1016/j.jacc.2006.03.041
99. Balzer D. Pulmonary Valve Replacement for Tetralogy of Fallot. *Methodist DeBakey Cardiovascular Journal*. 2019;15(2):122. doi:10.14797/mdcj-15-2-122
100. Fioretta ES, Motta SE, Lintas V, et al. Next-generation tissue-engineered heart valves with repair, remodelling and regeneration capacity. *Nat Rev Cardiol*. 2021;18(2):92-116. doi:10.1038/s41569-020-0422-8

101. Bui HT, Khair N, Yeats B, Gooden S, James SP, Dasi LP. Transcatheter Heart Valves: A Biomaterials Perspective. *Adv Healthcare Materials*. 2021;10(15):2100115. doi:10.1002/adhm.202100115

ZASTOSOWANIE TERAPII V-V ECMO U PACJENTÓW Z COVID-19 W STADIUM Z OSTRĄ NIEWYDOLNOŚCIĄ ODDECHOWĄ

Dominika Majer, Krzysztof Krukowski, Michał Wilk, Emilia Słabońska

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

Abstrakt: Zakażenie wirusem SARS-CoV-2 prowadzi do rozwoju ostrej choroby zakaźnej układu oddechowego, COVID-19. Konwencjonalne metody tj.: wysokoprzepływowa tlenoterapia czy stosowanie wentylacji mechanicznej, w połączeniu z ułożeniem pacjenta na brzuchu, są skuteczne w przypadku leczenia pacjentów w stadium z niewydolnością oddechową. Pogarszający się stan zdrowia osoby zakażonej COVID-19 może doprowadzić do rozwoju stadium ostrej niewydolności oddechowej ARDS (*ang. Acute Respiratory Distress Syndrom*). W najcięższych przypadkach, gdy metody konwencjonalnego leczenia są niewystarczające, eksperymentalnie stosowana jest terapia V-V ECMO (*ang. Veno-venous Extra-Corporeal Membrane Oxygenation*) – żylna-żylna pozaustrojowa oksygenacja membranowa, która umożliwia zastąpienie funkcji niewydolnych płuc. Jego rola pozostaje kontrowersyjna, dlatego zaleca się stosowanie ECMO w przypadkach, które wykorzystały wszystkie możliwe sposoby leczenia.

Słowa kluczowe: Covid-19, stadium ostrej niewydolności oddechowej ARDS, terapia V-V ECMO

Abstract: Sars-CoV-2 infection leads to the development of severe respiratory disease, widely known as COVID-19. Conventional methods such as high-flow oxygen therapy and mechanical ventilation, combined prone position are highly effective in the treatment of any respiratory failures. The health of people infected with COVID-19 is consciously deteriorating and may lead to the development of ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrome). The most severe cases, in which conventional methods of treatment have failed, may require the new V-V ECMO (Veno-Venous Extra-Corporeal Membrane Oxygenation) method of treatment. The venous extracorporeal membrane oxygenation is substitute the insufficient functions of the lungs. The ECMO method is still under supervision, and it is recommended only in cases in which other possible treatment methods have failed.

Keywords: Covid-19, Acute Respiratory Distress Syndrom, Veno-venous Extra-Corporeal Membrane Oxygenation

1. Wstęp

Pozaustrojowa oksygenacja membranowa umożliwia natlenowanie krwi poza organizmem pacjenta objętego tą terapią. Urządzenie zbudowane jest z pompy oraz oksygenatora. W zależności od potrzeb, może wspomagać układ krążenia w sytuacji ostrej niewydolności krążeniowej – V-A ECMO (*ang. Veno-Arterial Extra-Corporeal Membrane Oxygenation*), zastępując funkcję zarówno serca jak i płuc lub jak w sytuacji niewydolności oddechowej – V-V ECMO, zastępuje funkcję tylko niewydolnych płuc. W przypadku pacjentów ciężko chorujących na COVID-19 wykorzystuje się terapię V-V ECMO, jednak jest ona przeznaczona dla osób, u których standardowe sposoby leczenia nie przynoszą rezultatów.

2. Zespół ostrej niewydolności oddechowej u osób z COVID-19, a zastosowanie ECMO

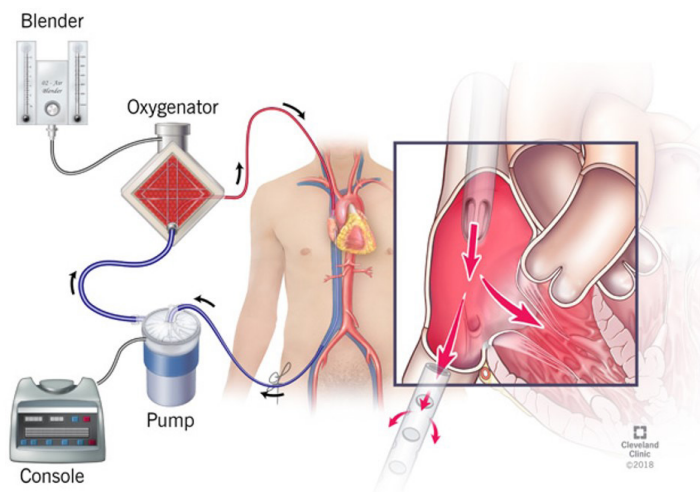
Ciężki przebieg COVID-19 prowadzi do rozwoju zespołu ostrej niewydolności oddechowej zwanej ARDS (*ang. Acute Respiratory Distress Syndrome*). Charakterystyczna dla tego zespołu jest obecność płynu w płucach oraz obniżenie ciśnienia parcjalnego tlenu we krwi tętniczej poniżej 60 mm Hg zwane hipoksemią. Nagromadzony w płucach płyn wpływa na zapadanie się pęcherzyków płucnych¹. Zmniejsza to zdolność płuc do przenoszenia tlenu do krwi, co powoduje niedotlenienie tkanek i narządów organizmu. ARDS towarzyszy uwalnianie cytokin oraz neutrofilii w miejscu objętym uszkodzeniem¹. Dochodzi do powstania stanu zapalnego, który może rozprzestrzenić się poprzez naczynia krwionośne na cały organizm, prowadząc do niewydolności wielonarządowej¹.

Do czynników ryzyka, które mogą zwiększać prawdopodobieństwo rozwoju ARDS u osób chorujących na COVID-19 zalicza się nadciśnienie tętnicze, cukrzycę, choroby układu krążenia, choroby nerek, otyłość, podeszły wiek oraz choroby płuc¹⁻⁴.

U większości pacjentów z ARDS stosuje się leczenie, które umożliwi zwiększenie poziomu tlenu we krwi. W tym celu umieszcza się pacjentów pod respiratorem na oddziale intensywnej terapii¹. Można zastosować leki przeciwbólowe oraz leki moczopędne, które umożliwiają usuwanie płynu zalegającego w płucach¹.

W przypadku, gdy standardowe leczenie nie pomaga pacjentowi, a jego stan pogarsza się można go zakwalifikować jako kandydata do pozaustrojowej

oksygenacji membranowej – ECMO (*ang. Extra Corporeal Membrane Oxygenation*)^{1,5}. Jest to terapia stosowana w celu leczenia osób, u których rozwinęła się zagrażająca życiu niewydolność serca i/lub płuc⁶. Zastępuje ona funkcje serca i/lub płuc⁶. Istnieją różne rodzaje ECMO. Możemy wyróżnić m.in.: V-A ECMO oraz V-V ECMO. Światowa Organizacja Zdrowia zaleca stosowanie V-V ECMO u osób chorych na COVID-19, u których rozwinęło się ARDS^{7, 8}. Istnieją jednak przeciwwskazania do zastosowania terapii ECMO u pacjenta np.: wiek powyżej 65 r.ż. czy otyłość¹⁰. Do bezwzględnych przeciwwskazań należą: zaawansowany nowotwór złośliwy, zaawansowana choroba płuc, marskość wątroby, demencja, niewydolność wielonarządowa, zatrzymanie akcji serca oraz przebyty w niedawnym czasie krwotok do ośrodkowego układu nerwowego⁸⁻¹⁰.



Ryc.1. Schemat przedstawiający działanie V-V ECMO. <https://consultqd.clevelandclinic.org/venovenous-extracorporeal-membrane-oxygenation-for-lung-failure/>

3. Ograniczenia w zastosowaniu procedury ECMO u pacjentów z COVID-19

W przypadku pacjentów, u których niewydolność oddechowa związana jest z przebiegiem zakażenia COVID-19 zastosowanie ECMO wydaje się być skuteczną interwencją. Może być stosowana u ściśle określonej grupy pacjentów, którzy nie reagują na konwencjonalne formy terapii¹¹. Procedurę tę uznaje się jednak za ostateczną formę terapii jaką można zaoferować pacjentowi z ciężkim ARDS¹².

Zastosowanie ECMO wiąże się z wykorzystaniem dużej ilości zasobów, gdyż wymaga skoordynowanej pracy wielodyscyplinarnego zespołu złożonego z doświadczonego personelu medycznego, należycie przeszkolonego w inicjowaniu, podtrzymaniu i przerywaniu ECMO u pacjentów w stanie krytycznym¹³. Problem związany z deficytem personelu medycznego, szczególnie w trakcie pandemii, może stanowić utrudnienie w zastosowaniu tej metody u pacjentów^{14, 15}. Tego typu opieka jest możliwa do zapewnienia jedynie w specjalistycznych ośrodkach referencyjnych. Często wiąże się to z koniecznością międzyszpitalnego transportowania zakaźnego pacjenta w ciężkim stanie ogólnym (nawet 60% pacjentów, u których zastosowano ECMO¹⁶, co stanowi istotne wyzwanie logistyczne. Procedura wdrożenia terapii ECMO, opieka nad pacjentem oraz transport wiążą się z wysokim ryzykiem transmisji wirusa. Istnieje bezwzględna konieczność wyposażenia licznego personelu medycznego, biorącego udział w jej przebiegu, w odpowiednie PEE (*ang. Personal Protective Equipment*). Której dostępność w okresie zaostrzenia pandemii może być znacząco ograniczona^{17, 18}. Metoda ta wymaga także dużego nakładu finansowego (całkowity koszt procedury może znacząco różnić się między poszczególnymi placówkami medycznymi), jednak są to wartości rzędu 42,554 – 537,554 USD [dla kursu z 2013 roku stanowiło to odpowiednio równowartość 134,470 – 1,698,670 PLN]¹⁹. W przypadku zaostrzenia pandemii, powyższe ograniczenia mogą sprawić, że zastosowanie ECMO może być postrzegane jako nieuzasadnione etycznie lub wręcz niewykonalne. Przy dostępności odpowiednich zasobów w szczególnych przypadkach należy rozważyć zastosowanie ECMO u pacjentów z COVID-19, pamiętając że jest to metoda deficytowa – stąd kluczowe jest zastosowanie odpowiednich, obiektywnych kryteriów kwalifikacji do jej przeprowadzenia^{18, 20}. Istotną trudność natury etycznej stanowi także podjęcie decyzji o zaprzestaniu wspomagania ECMO u danego pacjenta. Kluczowe jest opracowanie a priori przejrzystych algorytmów postępowania i kryteriów klasyfikacji do wszczęcia wspomagania²⁰. Metoda ECMO jest wysoce inwazyjna, przez co wiąże się z wieloma poważnymi powikłaniami mogącymi wystąpić w jej przebiegu.

Zakrzepica stanowi jedno z najczęstszych i zarazem najpoważniejszych powikłań mogących wystąpić u pacjenta w trakcie stosowania terapii ECMO^{21, 22}. W 10-16% przypadków zator występował w obrębie oksygatora²³. Zastosowanie krążenia pozaustrojowego ma związek z występowaniem kontaktu między krwią a powierzchniami sztucznymi, co w konsekwencji aktywuje szlaki krzepnięcia, powoduje następczą fibrynolizę oraz stan zapalny mediowany układem dopełniacza.

Do metod wykrywania skrzepów w obrębie układu ECMO zalicza się: ocenę wizualną (z zastosowaniem latarki) oraz codzienną ocenę poziomu D-dimerów^{25, 26}.

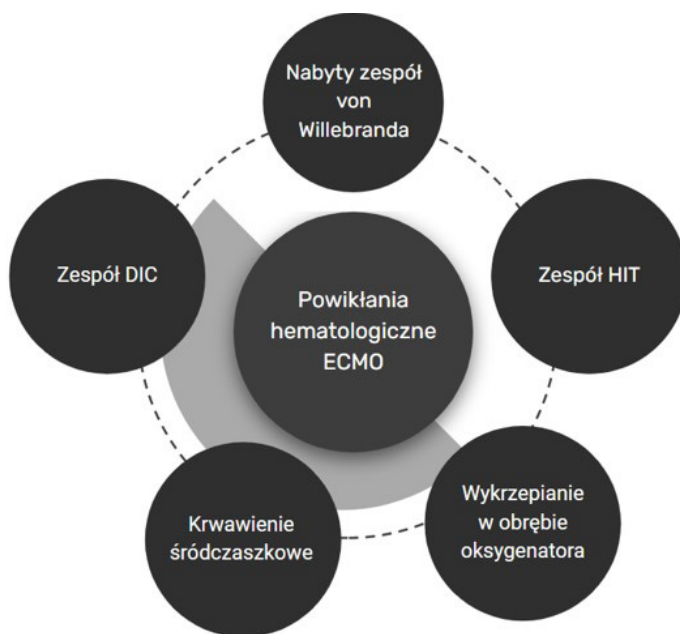


Ryc.2. Główne ograniczenia w zastosowaniu procedury ECMO u pacjentów z COVID-19 [opracowanie własne]

Jeśli powstały w obrębie kaniuli skrzep przemieści się do pompy odśrodkowej, z uwagi na jej budowę i charakterystykę działania, może dojść do uszkodzenia erytrocytów. Powoduje to wzrost osoczowego stężenia wolnej hemoglobiny pfHb (*ang. plasma-free hemoglobin*). Wysoki poziom pfHb może prowadzić do rozwoju ostrego uszkodzenia nerek. W takim przypadku, mimo opanowania zakrzepicy, długofalowe efekty leczenia będą niekorzystne²⁷. Powszechnie stosowanym wskaźnikiem w wykrywaniu skrzepu w obrębie pompy jest dehydrogenaza mleczanowa. Z uwagi na niską swoistość jej zastosowanie kliniczne jest utrudnione, dlatego preferowane jest nadzorowanie poziomu pfHb²⁸, szczególnie gwałtownych fluktuacji tego parametru.

HIT (*ang. heparin-induced thrombocytopenia*) stanowi stosunkowo rzadki, przemijający stan nadkrzepliwości związany z obecnością przeciwciał przeciwko kompleksowi heparyny z płytkowym czynnikiem 4²⁹. Przed przystąpieniem do procedury należy pozyskać informacje o tolerowaniu przez pacjenta heparyny. W przypadku przeciwwskazań do stosowania heparyny, możliwą alternatywą jest zastosowanie bezpośrednich inhibitorów trombiny (m.in. argatrobanu³⁰), fondaparynuksu³¹ oraz danaparoidu³².

Pacjenci hospitalizowani z powodu infekcji COVID-19 są szczególnie narażeni na powikłania zakrzepowo-zatorowe. Jednym z proponowanych patomechanizmów tego zjawiska jest interakcja cząsteczek powierzchniowych wirusa z receptorami ACE2 (*ang. Angiotensin-Converting Enzyme 2*) obecnymi na powierzchni śródbłonna naczyń krwionośnych. Powstająca stan zapalny i uszkodzenie struktury ściany naczynia co może skutkować aktywacją kaskady krzepnięcia³³.



Ryc.3. Powikłania hematologiczne w przebiegu procedury ECMO
[opracowanie własne]

Kolejną istotną grupę powikłań w przebiegu ECMO stanowią krwawienia (średnio u 30% pacjentów)³⁴ często o nagłym i trudnym do opanowania przebiegu. Są one jednym z głównych czynników śmiertelności u pacjentów, u których zastosowano ECMO^{35, 36}. U osób zakażonych wirusem H1N1, które zostały poddane terapii ECMO, najczęściej występował krwotok wewnątrzczaszkowy (6 na 10 pacjentów zmarłych z powodu krwotoku)³⁷. Przyczyny krwawienia, tak jak w przypadku innych form wspomagania mechanicznego, są słabo poznane i najprawdopodobniej wiążą się z udziałem wielu wzajemnie powiązanych mechanizmów. Pacjenci, u których podejmuje się decyzję o zastosowaniu ECMO, często są w stanie krytycznym. Jeszcze przed wykonaniem procedury występują u nich poważne zaburzenia hemostazy, które są dodatkowo pogłębiane przez zastosowanie krążenia pozaustrojowego^{24, 38}.

Małopłytkowość jest częstym zaburzeniem u pacjentów będących w stanie krytycznym. Występuje u 20-50% osób hospitalizowanych na OIT. Umiarkowana i ciężka postać są związane ze wzrostem śmiertelności³⁹⁻⁴¹.

Inną istotną przyczyną krwawienia u pacjentów z ECMO jest zespół rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego DIC (*ang. Disseminated Intravascular Coagulation*). Zespół ten jest wynikiem koagulopatii „ze zużycia” wywołanej wykrzepianiem krwi w obrębie układu ECMO oraz wpływem zakażenia COVID-19 na hemostazę⁴⁵⁻⁴⁷. W przebiegu kontroli opisanego powikłania zaleca się jednoczesną kontrolę wielu parametrów hemostazy, w celu uzyskania najbardziej miarodajnego obrazu stanu pacjenta⁴⁸, jednocześnie należy pamiętać o wpływie samej procedury ECMO na wartości niektórych z nich (m.in. na poziom D-dimerów).

U pacjentów, u których stosuje się pozaustrojowe utlenowanie krwi często obserwuje się hiperfibrinolizę, określaną jako nadmierny proces fibrynolizy prowadzący do krwawień⁴⁹. Gwałtowna aktywacja tego procesu może być wynikiem powstania skrzepu w obwodowej części ECMO, szczególnie w obrębie oksygenatora membranowego. W następstwie dochodzi do znacznego wzrostu D-dimerów i krwawienia (m.in. z błon śluzowych).

Inną, rzadszą przyczyną krwawień u pacjentów poddanych terapii ECMO może być nabyty zespół von Willebranda. Jest to stan, w którym strukturalne lub funkcjonalne defekty czynnika von Willebranda (vWF) są skutkiem innych zaburzeń (m.in. chorób sercowo naczyniowych). Zespół ten prezentuje objawy przypominające te, które obecne są w przebiegu choroby von Willebranda typu 2 (z defektem jakościowym)⁵¹. Opisano związek AVWS z występowaniem: (1) wysokich sił naprężenia ścinającego w obrębie naczyń krwionośnych⁵², (2) krążenia pozbawionego pulsowania^{53, 54}. Cechy te są charakterystyczne dla specyfiki działania ECMO. Aktualnie istnieje duże zainteresowanie występowaniem tego powikłania u pacjentów, u których zastosowano ten typ wspomaganie pozaustrojowego⁵⁵⁻⁵⁷. Postępowanie w przypadku wystąpienia AVWS obejmuje zmniejszenie prędkości przepływu oraz w skrajnych przypadkach zaprzestanie wspomaganie z użyciem ECMO²⁴.

4. Kryteria kwalifikujące pacjenta do zastosowania V-V ECMO

Ze względu na inwazyjność metody jaką jest V-V ECMO, jej kosztowność⁵⁸, ograniczoną dostępność i konieczność dysponowania przeszkolonym personelem medycznym^{17,59,60}, zakwalifikowanie pacjenta do terapii przy

użyciu ECMO powinno być dokładnie przekalkulowane dla każdego przypadku indywidualnie. Na chwilę obecną nie ma danych sugerujących odstępstwo od konwencjonalnego postępowania podczas stosowania ECMO u pacjentów z COVID-19²⁰.

Należy w tym miejscu wspomnieć raz jeszcze, iż ECMO jest wysoce specjalistyczną metodą obciążoną dużym ryzykiem, stąd powinna ona zostać użyta (przy braku innych przeciwwskazań) dopiero w sytuacji gdy standardowe, mniej inwazyjne metody postępowania w przypadku ARDS⁶¹ (np. wentylacja mechaniczna, ułożenie pacjenta na brzuchu) okażą się nieskuteczne⁶².

ELSO (*Extracorporeal Life Support Organization*) odradza inicjowanie ECMO przed zmaksymalizowaniem tradycyjnych metod terapii ARDS.

Zastosowanie terapii ECMO można rozpatrywać w sytuacji gdy PFR (stosunek PaO₂ do FiO₂) jest niższy niż 150 mm Hg oraz zastosowano poniższe metody poprawy wymiany gazowej (kolejność według siły zalecenia):

- ułożenie pacjenta na brzuchu (*prone positioning*) - silnie zalecane;
- blokadę nerwowo-mięśniową - zalecane;
- rekrutację pęcherzyków płucnych przy użyciu wysokich ciśnień PEEP – zalecane;
- wziewne leki rozszerzające naczynia płucne - do rozważenia;
- manewry rekrutacyjne - do rozważenia.

Zaleca się także rozważenie terapii ECMO jeśli stosunek PaO₂ do FiO₂ jest wyższy lub równy 150 mm Hg i wystąpiła kwasica oddechowa (pH < 7.25 i PaCO₂ ≥ 60 mm Hg) utrzymująca się ponad 6 godzin.

Jeżeli powyższe kryteria zostaną spełnione, należy upewnić się, że stan pacjenta nie przejawia przeciwwskazań do wdrożenia ECMO. Nie ma uzgodnionych bezwzględnych przeciwwskazań, z wyjątkiem schyłkowej niewydolności oddechowej, gdy przeszczep płuca nie będzie brany pod uwagę⁶³. Istnieją natomiast względne przeciwwskazania za które przyjmuje się kryteria wykluczenia w badaniu EOLIA⁶².

- Kryteria wyłączenia z badania EOLIA:
 - wiek < 18 lat;
 - odbiór wentylacji mechanicznej przez 7 dni lub dłużej;
 - ciąża;
 - masa ciała powyżej 1 kilogram na centymetr wzrostu lub BMI większy niż 45 kg/m²;
 - długotrwała, przewlekła niewydolność oddechowa wymagająca tlenoterapii lub nieinwazyjnej wentylacji (NIV);

- niewydolność serca prowadząca do żylno-tętniczego (V-A) ECMO;
- historia małopłytkowości wywołanej przez heparynę (HIT) w wywiadzie;
- choroba nowotworowa z prognozowanym przeżyciem poniżej 5 lat;
- stan agonalny lub wartość uproszczonej oceny ostrej fizjologii (SAPS-II) powyżej 90;
- trwający stan śpiączki nefarmakologicznej po zatrzymaniu akcji serca;
- nieodwracalne ubytki neurologiczne;
- wcześniejsze podjęcie decyzji o niepodjęciu/odstąpieniu od terapii daremnej;
- spodziewane trudności w uzyskaniu odpowiedniego dostępu naczyniowego dla ECMO w żyłę udową lub szyjną;
- brak dostępności ECMO.
 - Kryteria kwalifikacji do ECMO (wg. badania EOLIA):
 - rozpoznanie ARDS zgodne z American-European Consensus Conference on ARDS;
 - odbiór wentylacji mechanicznej poniżej 7 dni;
 - ciężkie zaburzenia wymiany gazowej ($\text{PaO}_2:\text{FiO}_2 < 50$ przez ponad 3 godziny, lub $\text{PaO}_2:\text{FiO}_2 < 80$ przez > 6 godzin, lub pH krwi tętniczej < 7.25 przy $\text{PaCO}_2 \geq 60$ oraz RR 35/min oraz ciśnieniem plateau ≤ 32 cm H_2O) pomimo zoptymalizowanej wentylacji ($\text{FiO}_2 \geq 0.8$, TV 6 ml/kg NMC oraz PEEP ≥ 10 cm H_2O).

Dodatkowe aspekty, które należy wziąć pod uwagę przed zakwalifikowaniem pacjenta do ECMO zostały przedstawione w tabeli 1⁶⁰.

Tab.1. Stopniowa ocena wskazań do wdrożenia pozaustrojowej oksygenacji błonowej w zespole ostrej niewydolności oddechowej (ARDS)⁶⁰.

Uzasadnione i zdecydowanie zalecane	Być może wskazane w indywidualnych warunkach	Brak wskazania (duże prawdopodobieństwo)
Wiek < 60 lat	Wiek 60-69 lat	Wiek > 70 lat
Dobre lub umiarkowane rokowanie co do akceptowalnej jakości życia	Niepewne prognozy dotyczące akceptowalnej jakości życia	Prawdopodobna nieakceptowalna jakość życia (np. ciągłe uzależnienie od terapii zastępczych narządów, sztucznej wentylacji, wspomaganie hemodynamicznego i/lub przewlekłego unieruchomienia)
Brak dodatkowej niewydolności narządów (z wyjątkiem płuc)	Łagodna dodatkowa niewydolność narządów (z wyjątkiem płuc)	Dodatkowa niewydolność wielonarządowa z małym prawdopodobieństwem wyzdrowienia (z wyjątkiem płuc)

Początek ciężkiego ARDS < 3 dni	Początek ciężkiego ARDS 4-7 dni	Początek ciężkiego ARDS > 7 dni z towarzyszącymi objawami zwłóknienia płuc
Brak istotnych chorób współistniejących, dobry ogólny stan zdrowia	Umiarkowane choroby współistniejące bez konieczności wymiany narządów (np. dializy)	Ciężkie choroby współistniejące wymagające ciągłego wsparcia (np. dializy, leki inotropowe), wysoka słabość, zły ogólny stan zdrowia
Deklarowana lub domniemana wola pacjenta: pro-	Wola pacjenta niejasna, krewni niezdecydowani	Deklarowana lub domniemana wola pacjenta: kontra
Brak chorób przewlekłych ze skróceniem oczekiwanej długości życia	Przewlekła choroba z niepewnością skrócenia życia	Przewlekła choroba z wyraźnym skróceniem oczekiwanej długości życia

Dostępne są także skale predykcyjne (np. RESP score), pozwalające ograniczyć ryzyko ewentualnych powikłań oraz prowadzenia terapii daremnej.

Warto zwrócić uwagę na wiek pacjenta. Prawie wszystkie badania wykazują najkorzystniejsze przeżycie u pacjentów poniżej 50. roku życia ze znacznym wzrostem śmiertelności powyżej 60. roku życia⁶⁰. Stąd też młodszy pacjenci z niewielkimi chorobami współistniejącymi lub bez chorób współistniejących powinni mieć najwyższy priorytet w kwestii dostępu do ECMO szczególnie w sytuacji mocno ograniczonych zasobów szpitalnych⁶³.

Co ważne, podkreśla się, że jeśli pacjenci spełniają wskazania, ECMO należy rozpocząć jak najszybciej - nie ma dowodów uzasadniających opóźnianie rozpoczęcia ECMO gdy jest ono wskazane⁶³ natomiast zauważono wzrost śmiertelności przy późnym uruchomieniu ECMO oraz przedłużonej ekspozycji na wentylację mechaniczną przed ECMO²⁰.

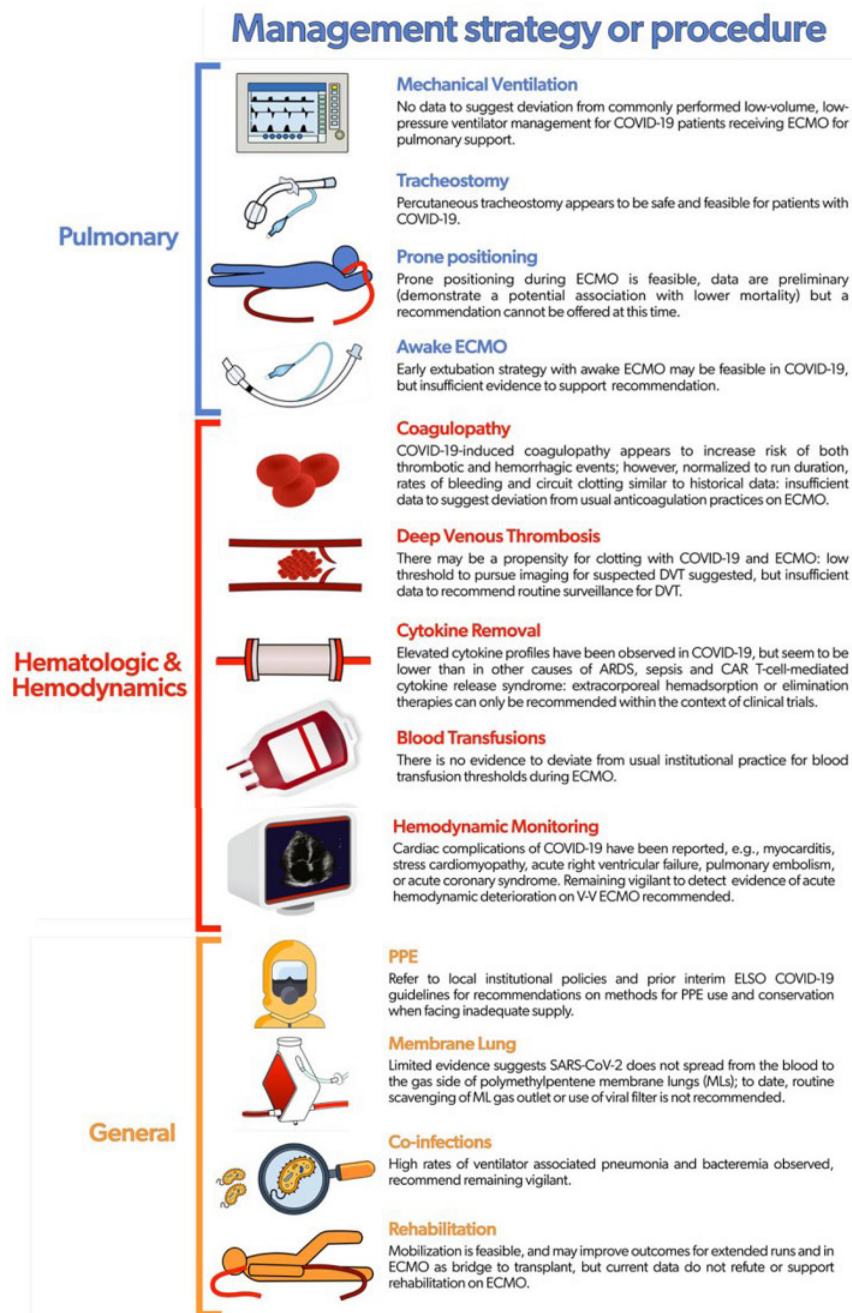
Mimo przedstawionych zaleceń postępowania ostateczna ocena musi zostać dokonana przez lekarza oraz pacjenta w świetle wszystkich okoliczności przedstawionych przez indywidualnego pacjenta oraz znanej zmienności biologicznego zachowania stanu klinicznego. Tym samym każde skierowanie do ECMO powinno być rozpatrywane indywidualnie dla każdego przypadku²⁰.

5. Zalecenia dotyczące stałej opieki nad pacjentami z COVID-19 otrzymującymi ECMO.

Zgodnie z informacjami podanymi przez ELSO²⁰:

- Nie ma wystarczającej ilości danych, które wskazywałyby na niekorzystny wpływ stosowania wentylacji respiratorem pod niskim ciśnieniem u osób, które są poddane terapii V-V ECMO.

- Przeskórna tracheostomia może być bezpiecznie wykonywana u pacjentów chorujących na COVID-19²⁰.
- Istnieją dane, które wskazują na związek ułożenia pacjenta na brzuchu w trakcie terapii V-V ECMO z niższą śmiertelnością²⁰.
- Do powikłań po zastosowaniu terapii V-V ECMO zaliczamy krzepnięcie krwi w obwodzie pozaustrojowym, zwiększone występowanie incydentów zatorowości płucnej oraz krwotoku śródczaszkowego²⁰.
- Zaleca się wykonywanie badań obrazowych u pacjentów z podejrzeniem zakrzepicy żył głębokich, gdyż po dekaniulacji może wystąpić skłonność do powstawania zakrzepów u pacjentów z COVID-19²⁰.
- Należy szczególnie uważać na sytuacje ostrego pogorszenia stanu hemodynamicznego podczas terapii V-V ECMO. Prowadzić do tego mogą powikłania u pacjentów chorujących na COVID-19 np.: zapalenie mięśnia sercowego, kardiomiopatia wysiłkowa, ostra niewydolność prawej komory, zatorowość płucna albo ostry zespół wieńcowy²⁰.
- Obecnie uważa się, że wiriony nie mogą migrować z układu oddechowego przez błonę polimetyloptenową, dlatego nie zaleca się rutynowego oczyszczania urządzenia²⁰.
- Należy uważać na możliwie występujące koinfekcje i nadkażenia bakteryjne, które prowadzą do rozwoju zapalenia płuc²⁰.



Ryc.2. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8078022/>

6. Czynniki decydujące o odstawieniu V-V ECMO

Niestety nie u każdego pacjenta nastąpi poprawa stanu zdrowia, stąd zgodnie z raportem wydanym przez ELSO w maju 2021 roku w oparciu o dane pochodzące z trzech dużych badań obserwacyjnych, czas trwania ECMO (>90% VV) dla COVID-19 wyniósł medianę 13,9 dni (zakres międzykwartyłowy [IQR], 7,8–23,3 dni), mediana 20 dni (IQR, 10–40 dni), i średnio 18 dni. Należy zauważyć, że po długotrwałym (>28 dni) wsparciu V-V ECMO odnotowano pomyślny powrót do pierwotnego stanu płuc²⁰. Tym samym do klinicystów powinna należeć ocena o stosunku korzyści do ryzyka w kwestii dalszego prowadzenia terapii z użyciem ECMO i jednocześnie podjęcie decyzji o ewentualnym powrocie do konwencjonalnych metod leczenia bez względu na to jak długo pacjent był na ECMO. W przypadku braku powrotu do zdrowa płuc pacjenta po około 21 dniach na ECMO, dalsze stosowanie tej metody można uznać za daremne i powrócić do leczenia konwencjonalnego⁶³. Decyzja o przerwaniu leczenia wykorzystującego ECMO nie powinna być podejmowana jedynie w oparciu o czas trwania samej terapii ECMO, lecz po dokładnej naradzie w zespole leczącym prowadzącej do wspólnych wniosków, że pacjent ma minimalny potencjał do wyzdrowienia. Powinno się także brać pod uwagę zdanie członków rodziny pacjenta dotyczące inicjacji, kontynuacji i zakończenia ECMO aby wspólnie wypracować najlepsze możliwe rozstrzygnięcie¹⁷.

7. Wnioski

Pozaustrojowe natlenianie krwi z zastosowaniem ECMO u pacjentów z ciężkim przebiegiem zakażenia COVID-19 stanowi szansę na powrót do zdrowia. Należy pamiętać że jest to głównie postępowanie mające na celu leczenie objawowe (m.in. hipoksemii, niewydolności narządowej). Uzyskany w wyniku zastosowania tej metody czas może pozwolić na przeprowadzenie przeszczepu narządowego, z drugiej strony uzyskanie poprawy może być niemożliwe a potrzymanie funkcji pacjenta z użyciem ECMO stanowi tzw. „pomost donikąd”. Zastosowanie tej techniki jest obarczone wieloma dylematami, zarówno natury logistyczno-ekonomicznej, jak i związanymi z wysokim ryzykiem poważnych powikłań, mogących często skutkować zgonem pacjenta. Z uwagi na zastosowanie ECMO często uznaje się za ostateczność, gdy zawiodą inne strategie postępowania.

Referencje

1. <https://www.yalemedicine.org/conditions/ards>
2. Stasi C, Fallani S, Voller F, Silvestri C. Treatment for COVID-19: An overview. *Eur J Pharmacol.* 2020;889:173644. doi:10.1016/j.ejphar.2020.173644
3. Gold MS, Schayek D, Gabrielli S, Zhang X, McCusker C, Ben-Shoshan M. COVID-19 and comorbidities: a systematic review and meta-analysis. *Postgrad Med.* 2020;132(8):749-755. doi:10.1080/0325481.2020.1786964
4. Biswas M, Rahaman S, Biswas TK, Haque Z, Ibrahim B. Association of Sex, Age, and Comorbidities with Mortality in COVID-19 Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis [published online ahead of print, 2020 Dec 9]. *Intervirology.* 2020;1-12. doi:10.1159/000512592
5. <https://ctsurgerypatients.org/lung-esophageal-and-other-chest-diseases/vv-ecmo#being-placed-on-ecmo>
6. <https://www.yalemedicine.org/conditions/ecmo>
7. Ramanathan K, Shekar K, Ling RR, et al. Extracorporeal membrane oxygenation for COVID-19: a systematic review and meta-analysis [published correction appears in Crit Care. 2021 Oct 27;25(1):375]. *Crit Care.* 2021;25(1):211. Published 2021 Jun 14. doi:10.1186/s13054-021-03634-1
8. Makdisi G, Wang IW. Extra Corporeal Membrane Oxygenation (ECMO) review of a lifesaving technology. *J Thorac Dis.* 2015;7(7):E166-E176. doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2015.07.17
9. <https://www.uptodate.com/contents/covid-19-extracorporeal-membrane-oxygenation-ecmo>
10. Shekar K, Badulak J, Peek G, et al. Extracorporeal Life Support Organization Coronavirus Disease 2019 Interim Guidelines: A Consensus Document from an International Group of Interdisciplinary Extracorporeal Membrane Oxygenation Providers. *ASAIO J.* 2020;66(7):707-721. doi:10.1097/MAT.0000000000001193

11. K. Ramanathan *et al.*, “Extracorporeal membrane oxygenation for COVID-19: a systematic review and meta-analysis,” *Crit. Care*, vol. 25, no. 1, pp. 1–11, 2021, doi: 10.1186/s13054-021-03634-1.
12. S. P. Singh and M. P. Hote, “Ventilatory management of patients on ECMO,” *Indian J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 37, no. April, pp. 248–253, 2021, doi: 10.1007/s12055-020-01021-z.
13. K. Shekar *et al.*, “Extracorporeal Life Support Organization Coronavirus Disease 2019 Interim Guidelines: A Consensus Document from an International Group of Interdisciplinary Extracorporeal Membrane Oxygenation Providers,” *ASAIO J.*, pp. 707–721, 2020, doi: 10.1097/MAT.0000000000001193.
14. F. Sasangohar *et al.*, “Provider Burnout and Fatigue during the COVID-19 Pandemic: Lessons Learned from a High-Volume Intensive Care Unit,” *Anesth. Analg.*, vol. I, no. Xxx, pp. 106–111, 2020, doi: 10.1213/ANE.0000000000004866.
15. E. J. Emanuel *et al.*, “Fair Allocation of Scarce Medical Resources in the Time of Covid-19,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 382, no. 21, pp. 2049–2055, 2020, doi: 10.1056/nejmsb2005114.
16. J. H. Kim *et al.*, “Venovenous ECMO treatment, outcomes, and complications in adults according to large case series: A systematic review,” *Int. J. Artif. Organs*, vol. 44, no. 7, pp. 481–488, 2021, doi: 10.1177/0391398820975408.
17. K. Ramanathan *et al.*, “Planning and provision of ECMO services for severe ARDS during the COVID-19 pandemic and other outbreaks of emerging infectious diseases,” *Lancet Respir. Med.*, vol. 8, no. 5, pp. 518–526, 2020, doi: 10.1016/S2213-2600(20)30121-1.
18. R. Grey, I. Arora, T., Thomas, J., Saneh, A., Tohme, P., & Abi-habib, “Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ’ s public news and information.,” *Psychiatry Res.*, vol. 14(4), no. January, p. 293, 2020.
19. M. J. Harvey, M. G. Gaies, and L. A. Prosser, “US and International In-Hospital Costs of Extracorporeal Membrane Oxygenation:

- a Systematic Review,” *Appl. Health Econ. Health Policy*, vol. 13, no. 4, pp. 341–357, 2015, doi: 10.1007/s40258-015-0170-9.
20. J. Badulak *et al.*, “Extracorporeal Membrane Oxygenation for COVID-19: Updated 2021 Guidelines from the Extracorporeal Life Support Organization,” *ASAIO J.*, pp. 485–495, 2021, doi: 10.1097/MAT.0000000000001422.
21. W. C. Oliver, “Anticoagulation and coagulation management for ECMO,” *Semin. Cardiothorac. Vasc. Anesth.*, vol. 13, no. 3, pp. 154–175, 2009, doi: 10.1177/1089253209347384.
22. J. Thomas, V. Kostousov, and J. Teruya, “Bleeding and Thrombotic Complications in the Use of Extracorporeal Membrane Oxygenation,” *Semin. Thromb. Hemost.*, vol. 44, no. 1, pp. 20–29, 2018, doi: 10.1055/s-0037-1606179.
23. S. R. Olson *et al.*, “Thrombosis and Bleeding in Extracorporeal Membrane Oxygenation (ECMO) without Anticoagulation: A Systematic Review,” *ASAIO J.*, pp. 290–296, 2021, doi: 10.1097/MAT.0000000000001230.
24. D. A. Murphy *et al.*, “Extracorporeal membrane oxygenation-hemostatic complications,” *Transfus. Med. Rev.*, vol. 29, no. 2, pp. 90–101, 2015, doi: 10.1016/j.tmr.2014.12.001.
25. C. Dornia *et al.*, “D-dimers Are a Predictor of Clot Volume Inside Membrane Oxygenators During Extracorporeal Membrane Oxygenation,” *Artificial Organs*, vol. 39, no. 9, pp. 782–787, 2015, doi: 10.1111/aor.12460.
26. A. Chandel, S. Patolia, M. Looby, N. Bade, V. Khangoora, and C. S. King, “Association of D-dimer and Fibrinogen With Hypercoagulability in COVID-19 Requiring Extracorporeal Membrane Oxygenation,” *J. Intensive Care Med.*, vol. 36, no. 6, pp. 689–695, 2021, doi: 10.1177/0885066621997039.
27. J. R. Neal, E. Quintana, R. B. Pike, J. D. Hoyer, L. D. Joyce, and G. Schears, “Using daily plasma-free hemoglobin levels for diagnosis of critical pump thrombus in patients undergoing ECMO or VAD support,” *J. Extra. Corpor. Technol.*, vol. 47, no. 2, pp. 103–108, 2015.

28. T. Kuroda *et al.*, “Efficacy of Plasma free Hemoglobin for detecting centrifugal pump thrombosis,” *Perfus. (United Kingdom)*, vol. 36, no. 6, pp. 620–625, 2021, doi: 10.1177/0267659120957183.
29. T. Chiasakul and A. Cuker, “Clinical and laboratory diagnosis of TTP: An integrated approach,” *Hematol. (United States)*, vol. 2018, no. 1, pp. 530–538, 2018, doi: 10.1182/asheducation-2018.1.530.
30. M. Beiderlinden, T. Treschan, K. Görlinger, and J. Peters, “Argatroban in extracorporeal membrane oxygenation,” *Artificial Organs*, vol. 31, no. 6, pp. 461–465, 2007, doi: 10.1111/j.1525-1594.2007.00388.x.
31. V. Cegarra-Sanmartín *et al.*, “Fondaparinux as a safe alternative for managing heparin-induced thrombocytopenia in postoperative cardiac surgery patients,” *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.*, vol. 28, no. 4, pp. 1008–1012, 2014, doi: 10.1053/j.jvca.2013.09.008.
32. C. Bauer *et al.*, “Extracorporeal membrane oxygenation with danaparoid sodium after massive pulmonary embolism,” *Anesth. Analg.*, vol. 106, no. 4, pp. 1101–1103, 2008, doi: 10.1213/ane.0b013e31816794d9.
33. S. Biswas, V. Thakur, P. Kaur, A. Khan, S. Kulshrestha, and P. Kumar, “Blood clots in COVID-19 patients: Simplifying the curious mystery,” *Med. Hypotheses*, vol. 146, no. November 2020, p. 110371, 2021, doi: 10.1016/j.mehy.2020.110371.
34. C. Aubron *et al.*, “Predictive factors of bleeding events in adults undergoing extracorporeal membrane oxygenation,” *Ann. Intensive Care*, vol. 6, no. 1, 2016, doi: 10.1186/s13613-016-0196-7.
35. M. L. Paden, S. A. Conrad, P. T. Rycus, and R. R. Thiagarajan, “Extracorporeal life support organization registry report 2012,” *ASAIO J.*, vol. 59, no. 3, pp. 202–210, 2013, doi: 10.1097/MAT.0b013e3182904a52.
36. G. T. Zangrillo A, Landoni G, Biondi-Zoccai G, Greco M, “A meta-analysis of complications and mortality of extracorporeal membrane oxygenation,” *Crit. Care Resusc.*, vol. 15, no. 3, pp. 172–178, 2013.
37. T. Aokage, K. Palmér, S. Ichiba, and S. Takeda, “Extracorporeal membrane oxygenation for acute respiratory distress syndrome,” *J. Intensive Care*, vol. 3, no. 1, 2015, doi: 10.1186/s40560-015-0082-7.

38. C. Heilmann *et al.*, “Acquired von Willebrand syndrome in patients with extracorporeal life support (ECLS),” *Intensive Care Med.*, vol. 38, no. 1, pp. 62–68, 2012, doi: 10.1007/s00134-011-2370-6.
39. M. M. Vanderschueren S., De Weerd A., “Thrombocytopenia and prognosis in intensive care,” *Crit. Care Med.*, vol. 28, no. 6, pp. 1871–1876, 2000, doi: 10.1097/00003246-200006000-00031.
40. M. A. Crowther *et al.*, “Thrombocytopenia in medical-surgical critically ill patients: Prevalence, incidence, and risk factors,” *J. Crit. Care*, vol. 20, no. 4, pp. 348–353, 2005, doi: 10.1016/j.jcrc.2005.09.008.
41. D. R. Williamson *et al.*, “Thrombocytopenia in critically ill patients receiving thromboprophylaxis: Frequency, risk factors, and outcomes,” *Chest*, vol. 144, no. 4, pp. 1207–1215, 2013, doi: 10.1378/chest.13-0121.
42. L. Lieberman, R. S. Bercovitz, N. S. Sholapur, N. M. Heddle, S. J. Stanworth, and D. M. Arnold, “Platelet transfusions for critically ill patients with thrombocytopenia,” *Blood*, vol. 123, no. 8, pp. 1146–1151, 2014, doi: 10.1182/blood-2013-02-435693.
43. A. Greinacher and K. Selleng, “Thrombocytopenia in the intensive care unit patient,” *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, vol. 2010, no. Table 1, pp. 135–143, 2010, doi: 10.1182/asheducation-2010.1.135.
44. M. M. Bembea, G. Annich, P. Rycus, G. Oldenburg, I. Berkowitz, and P. Pronovost, “Variability in anticoagulation management of patients on extracorporeal membrane oxygenation: An international survey,” *Pediatr. Crit. Care Med.*, vol. 14, no. 2, pp. 1–15, 2013, doi: 10.1097/PCC.0b013e31827127e4.
45. X. Zhou *et al.*, “Incidence and impact of disseminated intravascular coagulation in COVID-19 a systematic review and meta-analysis,” *Thrombosis Research*, vol. 201, pp. 23–29, 2021, doi: 10.1016/j.thromres.2021.02.010.
46. M. Levi and T. Iba, “COVID-19 coagulopathy: is it disseminated intravascular coagulation?,” *Intern. Emerg. Med.*, vol. 16, no. 2, pp. 309–312, 2021, doi: 10.1007/s11739-020-02601-y.

47. H. Asakura and H. Ogawa, "COVID-19-associated coagulopathy and disseminated intravascular coagulation," *Int. J. Hematol.*, vol. 113, no. 1, pp. 45–57, 2021, doi: 10.1007/s12185-020-03029-y.
48. J. Taylor, C. H. Toh, W. K. Hoots, H. Wada, and M. Levi, "Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation: On behalf of the scientific subcommittee on Disseminated Intravascular Coagulation (DIC) of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH)," *Thromb. Haemost.*, vol. 86, no. 5, pp. 1327–1330, 2001, doi: 10.1055/s-0037-1616068.
49. B. J. Hunt, "Bleeding and Coagulopathies in Critical Care," *N. Engl. J. Med.*, vol. 370, no. 9, pp. 847–859, 2014, doi: 10.1056/nejmra1208626.
50. T. G. Seelhammer, J. Mangla, and O. Demirci, "The Use of Thromboelastography to Titrate Tranexamic Acid Therapy for Abatement of Lysis-Induced Hemorrhagic Complications During Venous Arterial Extracorporeal Membrane Oxygenation," *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.*, vol. 33, no. 4, pp. 1059–1062, 2019, doi: 10.1053/j.jvca.2018.07.024.
51. A. Mital, "Acquired von Willebrand syndrome," *Adv. Clin. Exp. Med.*, vol. 25, no. 6, pp. 1337–1344, 2016, doi: 10.17219/acem/64942.
52. D. M. Shindler, "Aortic Stenosis and Gastrointestinal Bleeding," *Arch. Intern. Med.*, vol. 164, no. 1, pp. 103–104, 2004, doi: 10.1001/archinte.164.1.103.
53. S. Crow *et al.*, "Gastrointestinal bleeding rates in recipients of non-pulsatile and pulsatile left ventricular assist devices," *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 137, no. 1, pp. 208–215, 2009, doi: 10.1016/j.jtcvs.2008.07.032.
54. L. W. Miller, "The development of the von Willebrand syndrome with the use of continuous flow left ventricular assist devices: A cause-and-effect relationship," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 56, no. 15, pp. 1214–1215, 2010, doi: 10.1016/j.jacc.2010.06.009.
55. O. Bilen, L. Loftis, and J. Teruya, "Severe thrombotic and bleeding complications in a baby with heterozygous factor V Leiden

- and acquired von Willebrand disease on ECMO,” *J. Extra. Corpor. Technol.*, vol. 43, no. 2, pp. 64–69, 2011.
56. S. Pasala, R. T. Fiser, K. C. Stine, C. J. Swearingen, and P. Prodhan, “Von willebrand factor multimers in pediatric extracorporeal membrane oxygenation support,” *ASAIO J.*, vol. 60, no. 4, pp. 419–423, 2014, doi: 10.1097/MAT.0000000000000084.
57. A. Phrenic, N. Stimulation, I. N. Two, T. O. R. Dependent, C. Using, and S. Light, “Successful predictors of weaning and extubation in pediatric intensive care patients.,” vol. 15, no. 4, p. 2014, 2014.
58. MacLaren G, Fisher D, Brodie D. Preparing for the Most Critically Ill Patients With COVID-19: The Potential Role of Extracorporeal Membrane Oxygenation. *JAMA*. 2020;323(13):1245-1246. doi:10.1001/jama.2020.2342
59. Ma X, Liang M, Ding M, et al. Extracorporeal Membrane Oxygenation (ECMO) in Critically Ill Patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Pneumonia and Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS). *Med Sci Monit*. 2020;26:e925364. Published 2020 Aug 6. doi:10.12659/MSM.925364
60. Karagiannidis C, Bein T, Welte T. ECMO during the COVID-19 pandemic: moving from rescue therapy to more reasonable indications. *Eur Respir J*. 2022;59(2):2103262. Published 2022 Feb 10. doi:10.1183/13993003.03262-2021
61. Banavasi H, Nguyen P, Osman H, Soubani AO. Management of ARDS - What Works and What Does Not. *Am J Med Sci*. 2021;362(1):13-23. doi:10.1016/j.amjms.2020.12.019
62. Abrams D, Ferguson ND, Brochard L, et al. ECMO for ARDS: from salvage to standard of care? [published correction appears in *Lancet Respir Med*. 2019 Feb;7(2):e9]. *Lancet Respir Med*. 2019;7(2):108-110. doi:10.1016/S2213-2600(18)30506-X
63. Bartlett RH, Ogino MT, Brodie D, et al. Initial ELSO Guidance Document: ECMO for COVID-19 Patients with Severe Cardiopulmonary Failure [published correction appears in *ASAIO J*. 2020 Aug;66(8):e113]. *ASAIO J*. 2020;66(5):472-474. doi:10.1097/MAT.0000000000001173

IMMUNOTERAPIA ALZHEIMERA ADUCANUMABEM – PRZECIWCIAŁEM MONOKLONALNYM REDUKUJĄCYM ZŁOGI AMYLOIDU BETA

KRZYSZTOF GŁADKOWSKI, RAFAŁ GÓRKA, JULIA KACZMARCZYK, ALEKSANDRA KALUŻA

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

Abstrakt: Choroba Alzheimera (AD) jest postępującym zaburzeniem neurodegeneracyjnym i główną przyczyną otępienia u ludzi. Podłożem tego schorzenia jest odkładanie się w mózgu złogów amyloidu- β pod wpływem wielu nie do końca poznanych czynników. W 2021 roku Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (FDA) zatwierdziła Aducanumab (BIIB037), będący przeciwciałem monoklonalnym IgG1, jako pierwszy lek, który redukuje przyczynę choroby i znacznie spowalnia jej postęp. Immunoterapia Alzheimera Aducanumabem w niezależnych badaniach powodowała konsekwentny, zależny od czasu i dawki wpływ na zmniejszenie złogów amyloidu- β . Lek ten ze względu na stwierdzoną badaniami skuteczność w leczeniu choroby uznanej za nieuleczalną jest ogromnym przełomem, który może zmienić pogląd na tą chorobę i pomóc milionom dotkniętych nią ludzi.

Słowa kluczowe: Alzheimer, Aducanumab, immunoterapia

Abstract: Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder and the leading cause of dementia in humans. The basis of this condition is the deposition of β -amyloid deposits in the brain under the influence of many not fully understood factors. In 2021, the US Food and Drug Administration (FDA) approved Aducanumab (BIIB037), an IgG1 monoclonal antibody, as the first drug to reduce the cause of the disease and significantly slow its progression. Alzheimer's immunotherapy with Aducanumab in independent studies resulted in a consistent, time- and dose-dependent effect in the reduction of β -amyloid deposits. This drug, due to its proven effectiveness in the treatment of an incurable disease, is a huge breakthrough that can change the view on this disease and help millions of people affected by it.

Keywords: Alzheimer, Aducanumab, immunotherapy

1. Wstęp

Na początku XX wieku niemiecki neuropatolog Alois Alzheimer opisał po raz pierwszy chorobę Alzheimera (AD) jako postępująca i nieuleczalna choroba neurodegeneracyjna prowadząca do śmierci pacjenta. Od tamtej pory ilość chorych rosła bardzo szybko i obecnie wynosi około 50 milionów, a wartość ta wzrosnąć ma do 2050 roku dwukrotnie według przewidywań naukowców. Wzrost ten związany jest z rozwojem cywilizacji i starzeniem się społeczeństwa. W leczeniu bardzo ważna jest diagnoza, ponieważ wszystkie terapie opierają się na zatrzymaniu choroby. W tym przypadku przełomem są biomarkery molekularne, które umożliwiają postawienie diagnozy zanim pojawią się objawy. Innowacją w leczeniu jest natomiast zatwierdzony przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA) w 2021 roku Aducanumab (BIIB037), przeciwciało monoklonalne. Rozdział ten poświęcony jest chorobie Alzheimera oraz jej innowacyjnemu sposobowi leczenia z wykorzystaniem immunoterapii BIIB037.

2. Choroba Alzheimera

Choroba Alzheimera jest zaburzeniem neurodegeneracyjnym oraz główną przyczyną otępienia na świecie a liczbę osób chorych szacuje się na 50 milionów. Liczba ta, według przewidywań naukowców, zwiększyć się ma do 2050 dwukrotnie¹. Choroba Alzheimera jest jedną z głównych chorób cywilizacyjnych co wynika z faktu, że istotnymi czynnikami wpływającymi na zwiększanie częstości jej występowania jest styl życia i stale rosnąca długość życia. Warunkami modyfikowalnymi wpływającymi na zwiększanie ryzyka wystąpienia choroby jest na przykład niskie wykształcenie, palenie tytoniu, izolacja, depresja, niska aktywność fizyczna, otyłość, urazowe uszkodzenia mózgu. Na zwiększenie ryzyka oczywiście w największym stopniu wpływa wiek oraz czynniki genetyczne które są jednak wieloczynnikowe i nie do końca poznane, ryzyko zwiększać może historia choroby Alzheimera w rodzinie oraz obecność genotypu apolipoproteiny E4^{2,3}.

2.1. Obraz kliniczny

W chorobie Alzheimera następuje stopniowy rozwój objawów związanych z utratą funkcji korowej. Klinicznie istnieją dwa fenotypy choroby, jest to postać amnestyczna i nieamnestyczna. W formie amnestycznej choroba

debiutuje z obniżoną pamięcią do ostatnich zdarzeń lub rozmów (pamięć epizodyczna) a także problemami z orientacją w czasie. Z czasem rozwijają się objawy, takie jak zmniejszona zdolność komunikacji, analizy, logicznego myślenia i trudności językowe. W postaci nieamnestycznej do głównych objawów należą zmiany zachowania, depresja, trudności językowe, zaburzenia orientacji lub problemy ze wzrokiem. Z biegiem czasu u każdego dochodzi jednak do ogólnego upośledzenia funkcji poznawczych, różnych objawów behawioralnych i psychologicznych oraz dysfunkcji w funkcjonowaniu w życiu codziennym^{3,4}. Z czasem problematyczne staje się wykonywanie najprostszych czynności. W zaawansowanej fazie chory uzależniony jest od opiekuna i wymaga stałej opieki. Ostatecznie choroba prowadzi do całkowitej niepełnosprawności i śmierci⁴.

2.2. Mechanizm powstawania

Zmiany patologiczne w mózgu rozpoczynają się nawet 10-20 lat przed pojawieniem się objawów. Choroba zaczyna się od tworzenia i odkładania pozakomórkowo nierozpuszczalnych blaszek amyloidowych, które składają się ze złogów peptydów β -amyloidu, głównie jego 42-aminokwasowej izoformy. Wewnątrzkomórkowo zachodzi fosforylacja białek tau, co powoduje powstawanie splotów neurofibrylarnych^{3,5}. Neuropatologicznie AD charakteryzuje się utratą neuronów w określonych obszarach mózgu, zwłaszcza w strukturach przyśrodkowego płata skroniowego i skroniowo-ciemieniowej korze asocjacyjnej⁵.

2.3. Diagnostyka

Leczenie choroby Alzheimera jest najskuteczniejsze w początkowych jej etapach, dlatego ważne jest jej jak najszybsze wykrycie. Tradycyjnie diagnoza otępienia opiera się na historii choroby, wzorze deficytów poznawczych oraz na dodatkowych parametrach ocenianych w badaniach klinicznych, w tym badaniach krwi i obrazowaniu strukturalnym mózgu, w celu wykluczenia nie zwyrodnieniowych przyczyn objawów. Obecnie jednak coraz częściej stosuje się w diagnostyce biomarkery molekularne umożliwiające wykrycie choroby jeszcze przed wystąpieniem objawów. Przykładowo 42-aminokwasowa izoforma β -amyloidu ($A\beta_{42}$) jest głównym składnikiem płytek starczych. Stężenie $A\beta_{42}$ można zmierzyć w płynie mózgowo-rdzeniowym (CSF) technikami opartymi na przeciwciałach, takimi jak test immunoenzymatyczny (ELISA),

a także technikami niezależnymi od przeciwciał, takimi jak spektrometria mas^{5,6}. Poziomy peptydu beta-amyloidu (A β), całkowitego tau (t-tau) i fosfo-tau (p-tau) w płynie mózgowo-rdzeniowym są stosowane jako specyficzne biomarkery AD, ponieważ odzwierciedlają patologiczne procesy agregacji A β 42 i hiperfosforylacji tau i są istotnymi kryteriami wspierającymi diagnozę kliniczną prawdopodobnej AD^{6,7}.

3. Aducanumab

Aducanumab to ludzkie przeciwciało monoklonalne selektywne dla zagregowanych form beta amyloidu⁸. Jest immunoterapeutycznym sklasyfikowanym jako ludzkie przeciwciało monoklonalne immunoglobuliny gamma 1 (IgG1). Aducanumab otrzymał przyspieszone zatwierdzenie FDA w 2021 r. na podstawie osób z łagodnymi zaburzeniami poznawczymi lub łagodną demencją związaną z AD wykazującymi zmniejszenie płytek A β . BIIB037 jest dostępny w postaci przezroczystego do opalizującego i bezbarwnego do żółtego roztworu, obecnie dostępnego w fiolkach z pojedynczą dawką do podawania dożylnego. Dawkę dobiera się w zależności od masy ciała pacjenta. Aducanumab należy rozcieńczyć 100 ml 0,9% roztworu chlorku sodu we wstrzyknięciu przed podaniem w postaci infuzji⁹.

3.1. Mechanizm działania

Aducanumab wywiera swój mechanizm działania poprzez przekraczanie bariery krew-mózg oraz selektywne celowanie i wiązanie zagregowanych rozpuszczalnych oligomerów i nierozpuszczalnych włókienek blaszek A β w mózgu^{9,10}. Analizy biochemiczne i strukturalne wykazały, że Aducanumab wiąże się z linearnym epitopem utworzonym przez aminokwasy A β 3 do 7. W porównaniu z wcześniej badanymi przeciwciałami, BIIB037 wiąże się z N-końcem A β w rozszerzonej konformacji. W oparciu o słabe powinowactwo monowalentne, kinetykę szybkiego wiązania i silną awidność dla agregatów bogatych w epitopy, wykazano również, że rozróżnia on monomery A β od agregatów oligomerycznych lub fibrylarnych¹¹. Poprzez wiązanie się z wysokim powinowactwem do zagregowanego A β promuje jego usuwanie przez fagocytozę za pośrednictwem receptora Fc, wykazując jednocześnie znacznie mniejsze powinowactwo do monomerów¹².

3.2. Zatwierdzenie przed FDA

Zatwierdzenie przez Stany Zjednoczone Aducanumabu firmy Biogen jako „pierwszego w historii leku modyfikującego przebieg choroby Alzheimera” zostało przez wielu okrzyknięte dużym postępem. BIIB037 otrzymał przyspieszoną aprobatę FDA w 2021 r. na podstawie osobników z łagodnymi zaburzeniami funkcji poznawczych lub łagodnym otępieniem związanym z AD, wykazujących redukcję blaszek A β . Dalsze stosowanie i pełne zatwierdzenie Aducanumabu będzie wymagało dalszej weryfikacji jego korzyści klinicznych w badaniach po rejestracyjnych^{9,13}. Aducanumab został zatwierdzony zgodnie z przepisami ustawowymi i regulacyjnymi, które umożliwiają „przyspieszone zatwierdzanie” leków przeznaczonych do leczenia poważnych lub zagrażających życiu stanów, w których brakuje odpowiednich skutecznych terapii. Wymagania te zostały spełnione: choroba Alzheimera jest poważną, śmiertelną, postępującą chorobą na którą brak skutecznych sposobów leczenia. BIIB037 jest ukierunkowany na podstawową patofizjologię, w przeciwieństwie do dostępnych terapii¹⁴.

3.3. Badania nad skutecznością

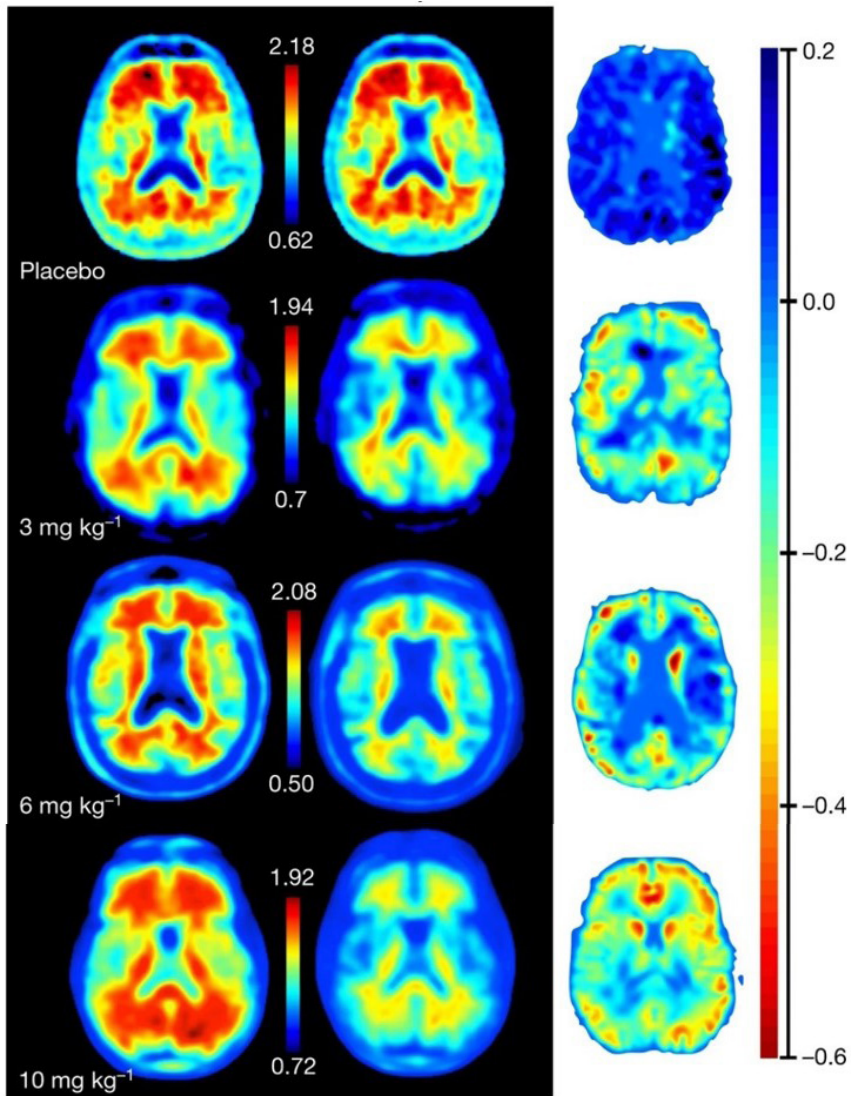
Pierwsze badania u ludzi nad skutecznością Aducanumabu przeprowadzono w 2016 roku¹⁵. W kolejnych latach cztery leki, które spełniły wszystkie określone kryteria selekcji, oparte o skuteczność i bezpieczeństwo do kolejnych badań to: Aducanumab, BAN2401, gantenerumab i ALZ-801, które mają wspólną cechę, a mianowicie wchodzi w interakcję z neurotoksycznymi rozpuszczalnymi oligomerami A β , co stwierdzono na podstawie opublikowanych badań MOA i powinowactwa wiązania. Przeciwciała wykazywały różne poziomy selektywności dla rozpuszczalnych oligomerów A β w porównaniu z nierozpuszczalnymi płytkami i włóknkami¹². Wzięły one udział w badaniach fazy III. W badaniu EMERGE BIIB037 osiągnął swój pierwotny wynik i miał korzystny wpływ na funkcje poznawcze, funkcjonalność i zachowanie. Korzyści zaobserwowano także u uczestników badania ENGAGE, którzy byli leczeni wysoką dawką przez dłuższy czas¹⁶. Najwyższa dawka 10 mg/kg co miesiąc wlewu dożylnego wykazała znaczący wpływ na pierwszorzędowy wynik końcowy, kognitywną i funkcjonalną złożoną miarę: Kliniczna Ocena Demencji(CDR-SB) oraz na poznawczy punkt końcowy: Skala Oceny Choroby Alzheimera — pod skala poznawcza (ADAS-kog). Pozytywna analiza końcowa w badaniu EMERGE została poparta znaczącym wpływem

Aducanumabu na zmniejszenie ilości biomarkera korelującego z pogarszaniem funkcji poznawczych jakim jest fosforylowane tau (p-tau) w płynie mózgowo-rdzeniowym i obrazowaniu tau pozytonową tomografią emisyjną (PET)^{17,18}. Oba badania wykazywały konsekwentną skuteczność w zależności od dawki. Rycina 1 ilustruje, że leczenie Aducanumabem zmniejszało blaszki amyloidu- β ludzkiego mózgu w sposób zależny od dawki, co mierzono za pomocą PET florbetapiriu. Rysunek przedstawia wizualny wygląd zmniejszenia wskaźnika standardowej wartości wychwyty (SUVR) w podkorowej istocie białej, jak również w obszarach korowych, chociaż statystycznie potwierdzone dowody na zależne od dawki zmniejszenie SUVR zostały wykazane tylko w obszarach korowych. Obrazki po lewej przedstawiają stan początkowy natomiast te po prawej stan po 54 tygodniach leczenia w zależności od dawki (rycina 1)¹⁹.

Skutki uboczne

Aducanumab i kilka innych przeciwciał monoklonalnych jest związanych z nieprawidłowościami obrazowania związanymi z amyloidem (ARIA), które polegają na wysięku przez barierę krew-mózg (ARIA-E) lub krwotoki (ARIA-H) związane z naruszeniem bariery krew-mózg. ARIA-E podobnie jak ARIA-H wystąpiła u 34% i 35,5% osób otrzymujących duże dawki BIIB037 odpowiednio w badaniu EMERGE i ENGAGE. Większość (80%) zdarzeń ARIA przebiega u pacjentów bezobjawowo. Gdy wystąpią objawy, obejmują one najczęściej: ból głowy, zawroty głowy, zaburzenia widzenia i nudności. ARIA jest jednak możliwym do opanowania efektem ubocznym leczenia i znacznie mniej poważnym niż powikłania wielu rutynowo stosowanych terapii przeciwnowotworowych¹⁶. Poza ARIA będącym głównym skutkiem ubocznym pacjenci zgłaszali również:

- ból głowy (21%)
- upadki (15%)
- biegunka (9%)
- splątanie/majaczenie/zmiany stanu psychicznego/dezorientacja (8%)
- nadwrażliwość (obrzęk naczynioruchowy, pokrzywka) (<1%)
- immunogenność czyli wytwarzanie przeciwciał przeciwko BIIB037 (<1%)⁹



Rycina 1. Przedstawia Obrazowanie PET pokazujące wpływ Aducanumabu na zmniejszenie blaszek amyloidu- β po roku w zależności od dawki¹⁹.

Kontrowersje

W celu zachowania obiektywizmu i bezstronności wskazać jednak należy również kontrowersje, minusy i inne możliwe perspektywy. Zatwierdzenie Aducanumabu było kontrowersyjne ze względu na istnienie dwóch stron: zwolenników przekonanych o skuteczności i mających swoje dowody jak

i krytyków stwierdzających że po pierwsze, komisja, która dokonała przeglądu leku, nie została poinformowana, że rozważana jest procedura przyspieszonej akceptacji. Po drugie, badanie potwierdzające po zatwierdzeniu nie zostanie zakończone do 2030 r. Po trzecie, pozostaje niejasne, czy A β jest prawidłowym substytutem w leczeniu AD i czy może być stosowany w rutynowej praktyce klinicznej, oraz czy istnieje związek między redukcją A β i usprawnieniem funkcji poznawczych. Ponadto wystąpił negatywny wpływ na opracowywanie leków i regulacje prawne, ponieważ firmy farmaceutyczne będą starały się o zatwierdzenie leków obniżających poziom A β lub innych biomarkerów, ale o niejasnych korzyściach klinicznych. Dodatkowo pacjenci z AD rezygnują z ważnych badań klinicznych, aby przyjmować Aducanumab. Co ważne, istnieje wysoki roczny koszt leku na pacjenta (56 000 USD), gdy korzyści zdrowotne wynikające z leku są wyceniane na 2500–8300 USD rocznie, a dopłata z własnej kieszeni wynosi do 20% całości roczny koszt leku²⁰.

4. Podsumowanie

Na chorobę Alzheimera od bardzo dawna szukano skutecznej metody leczenia, wydano na tworzenie, sprawdzanie i badanie leków na demencje związaną z AD ogromne ilości pieniędzy. Kosztowało to też mnóstwo czasu najwybitniejszych naukowców ze świata nauki i medycyny. Doprowadziło to w końcu 7 czerwca 2021 r. do zatwierdzenia przez FDA Aducanumabu – przeciwciała monoklonalnego anti-A β firmy Biogen²¹. Obok kontrowersji i dużych nakładów finansowych koniecznych do leczenia za pomocą BIIB037 warto dodać, że w 2021 roku koszt opieki nad pacjentami z AD wyniósł około 355 miliardów dolarów. W przypadku nieuleczalnej i śmiertelnej choroby każde rozwiązanie jest warte uwagi a nawet minimalna skuteczność jest sukcesem. Badania nad BIIB037 i innymi lekami będą trwały a leczenie będzie coraz bardziej skuteczne. Ze względu na ilość pozytywnych badań i poziom ich zaawansowania oraz nieznaczne skutki uboczne, patrząc z perspektywy czasu na metody leczenia AD sprzed kilkudziesięciu lat, mimo braku całkowitej możliwości wyleczenia tej choroby, możemy już mówić, że Aducanumab i inne skuteczne przeciwciała monoklonalne i nowoczesne metody leczenia są ogromnym przełomem i dowodem postępu w medycynie. Można mieć więc nadzieję, że dzięki postępowi technik neuroobrazowania i markerów biochemicznych oraz lepszemu zrozumieniu podstaw patologicznych powstawania chorób związanych z demencją, z czasem będą powstawać coraz bardziej skuteczne i pewne metody leczenia²². Informowanie o postępach i mówienie

o nich jest ważne, ponieważ daje nadzieję i motywuje do dalszej pracy i uświadamia ludzi na jakim etapie obecnie jesteśmy.

Referencje

1. Cummings JL, Tong G, Ballard C. Treatment Combinations for Alzheimer's Disease: Current and Future Pharmacotherapy Options. *J Alzheimers Dis.* 2019;67(3):779-794. doi:10.3233/JAD-180766
2. Hickman RA, Faustin A, Wisniewski T. Alzheimer Disease and Its Growing Epidemic: Risk Factors, Biomarkers, and the Urgent Need for Therapeutics. *Neurol Clin.* 2016;34(4):941-953. doi:10.1016/j.ncl.2016.06.009
3. Knapskog AB, Engedal K, Selbæk G, Øksengård AR. Alzheimers sykdom – diagnostikk og behandling [Alzheimer's disease – diagnosis and treatment]. *Tidsskr Nor Laegeforen.* 2021;141(7):10.4045/tidsskr.20.0919. Published 2021 Apr 29. doi:10.4045/tidsskr.20.0919
4. Jessen F. What are we trying to prevent in Alzheimer disease?. *Dialogues Clin Neurosci.* 2019;21(1):27-34. doi:10.31887/DCNS.2019.21.1/fjessen
5. Lashley T, Schott JM, Weston P, et al. Molecular biomarkers of Alzheimer's disease: progress and prospects. *Dis Model Mech.* 2018;11(5):dmm031781. Published 2018 May 8. doi:10.1242/dmm.031781
6. Lloret A, Esteve D, Lloret MA, et al. When Does Alzheimer's Disease Really Start? The Role of Biomarkers. *Int J Mol Sci.* 2019;20(22):5536. Published 2019 Nov 6. doi:10.3390/ijms20225536
7. Mantzavinos V, Alexiou A. Biomarkers for Alzheimer's Disease Diagnosis. *Curr Alzheimer Res.* 2017;14(11):1149-1154. doi:10.2174/1567205014666170203125942
8. Ferrero J, Williams L, Stella H, et al. First-in-human, double-blind, placebo-controlled, single-dose escalation study of aducanumab (BIIB037) in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (N Y).* 2016;2(3):169-176. Published 2016 Jun 20. doi:10.1016/j.trci.2016.06.002

9. Padda IS, Parmar M. Aducanumab. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; January 6, 2022.
10. Sevigny J, Chiao P, Bussière T, et al. The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature*. 2016;537(7618):50-56. doi:10.1038/nature19323
11. Arndt JW, Qian F, Smith BA, et al. Structural and kinetic basis for the selectivity of aducanumab for aggregated forms of amyloid- β . *Sci Rep*. 2018;8(1):6412. Published 2018 Apr 23. doi:10.1038/s41598-018-24501-0
12. Tolar M, Abushakra S, Hey JA, Porsteinsson A, Sabbagh M. Aducanumab, gantenerumab, BAN2401, and ALZ-801-the first wave of amyloid-targeting drugs for Alzheimer's disease with potential for near term approval. *Alzheimers Res Ther*. 2020;12(1):95. Published 2020 Aug 12. doi:10.1186/s13195-020-00663-w
13. Walsh S, Merrick R, Milne R, Brayne C. Aducanumab for Alzheimer's disease?. *BMJ*. 2021;374:n1682. Published 2021 Jul 5. doi:10.1136/bmj.n1682
14. Dunn B, Stein P, Temple R, Cavazzoni P. An Appropriate Use of Accelerated Approval - Aducanumab for Alzheimer's Disease. *N Engl J Med*. 2021;385(9):856-857. doi:10.1056/NEJMc2111960
15. Ferrero J, Williams L, Stella H, et al. First-in-human, double-blind, placebo-controlled, single-dose escalation study of aducanumab (BIIB037) in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (N Y)*. 2016;2(3):169-176. Published 2016 Jun 20. doi:10.1016/j.trci.2016.06.002
16. Cummings J, Aisen P, Lemere C, Atri A, Sabbagh M, Salloway S. Aducanumab produced a clinically meaningful benefit in association with amyloid lowering. *Alzheimers Res Ther*. 2021;13(1):98. Published 2021 May 10. doi:10.1186/s13195-021-00838-z
17. Salloway S, Chalkias S, Barkhof F, et al. Amyloid-Related Imaging Abnormalities in 2 Phase 3 Studies Evaluating Aducanumab in Patients With Early Alzheimer Disease. *JAMA Neurology*. Published online November 22, 2021. doi:10.1001/jamaneurol.2021.4161

18. Yang P, Sun F. Aducanumab: The first targeted Alzheimer's therapy. *Drug Discov Ther.* 2021;15(3):166-168. doi:10.5582/ddt.2021.01061
19. Sevigny J, Chiao P, Bussière T, et al. Addendum: The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature.* 2017;546(7659):564. doi:10.1038/nature22809
20. Tampi RR, Forester BP, Agronin M. Aducanumab: evidence from clinical trial data and controversies. *Drugs Context.* 2021;10:2021-7-3. Published 2021 Oct 4. doi:10.7573/dic.2021-7-3
21. McCleery J, Quinn TJ. Aducanumab and the certainty of evidence. *Age Ageing.* 2021;50(6):1899-1900. doi:10.1093/ageing/afab167
22. Briggs R, Kennelly SP, O'Neill D. Drug treatments in Alzheimer's disease. *Clin Med (Lond).* 2016;16(3):247-253. doi:10.7861/clinmedicine.16-3-247

INNOWACJE W LECZENIU MIGRENY

Emilia Słabońska, Dominika Majer, Krzysztof Krukowski

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

Abstrakt: Migrena jest przewlekłą, dziedziczną chorobą neurologiczną. Jej podstawowym objawem jest ból głowy. Nie jest to jednak jedyny symptom- jednocześnie mogą występować nudności, wymioty i światłowstręt. Według danych Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego na migrenę cierpi około 8 milionów osób w Polsce. Często pomijana, lekceważona lub uznawana za zwykły ból głowy choroba, jest uznawana za jedną z najczęstszych przyczyn niepełnosprawności- Światowa Organizacja Zdrowia ang. World Health Organization, przywołując wyniki Badania Globalnego Obciążenia Chorobami ang. Global Burden Disease Study, 2013, wymienia migrenę jako szóstą, co do istotności, przyczynę lat utraconych z powodu niepełnosprawności na świecie. Kobiety są znacznie bardziej podatne na migrenę niż mężczyźni- chorują one od 2 do 3 razy częściej niż mężczyźni. Szczególnie narażone na ataki migreny są nastolatki lub młode kobiety. Celem pracy jest analiza sposobów leczenia i przeciwdziałania oraz skutków zaniedbania symptomów migreny.

Słowa kluczowe: migrena, leczenie, objawy, przeciwdziałanie

Abstract: Migraine is chronic, hereditary, neurological disease. Its major symptom is headache. It is not the only one though- nausea, vomiting and photophobia can appear simultaneously. According to data collected by National Public Health Institute about 8 milion people in Poland suffer from migraine. Often overlooked, neglected or taken as just a headache, migraine is belived to be one of the most common cause of disability- World Healt Organization studies called Global Burden Disease Study, 2013, lists migarine as sixth most significant cause of years lost due to disability in the world. Women are more likely to suffer from this disease than man- about 2 to 3 times more. Yong women and teenagers are two age groups most prone to migraine. Main goal of this piece is to analyze methods of treatment, prevention and results of neglection of this disease.

Key words: migraine, treatment, symptoms, prevention

1. Wstęp

Migrena to powracający ból głowy, którego ataki mogą trwać od 4 do 72 godzin. Ból ma charakter pulsujący i jest lokalizowany najczęściej po jednej stronie głowy, w okolicy skroni lub za gałką oczną¹. Zgodnie z badaniami Global Burden of Disease przeprowadzonymi w 2019 roku, choroba ta była przyczyną trzecią najczęstszą przyczyną niepełnosprawności². Migrena występuje znacznie częściej u kobiet niż u mężczyzn – wyniki badań przeprowadzonych we włoskiej prowincji Pavia wskazują, że w ciągu roku na migrenę chorowało 87.7% badanych kobiet oraz 61.1% badanych mężczyzn^{3,4}. Etiologia tej choroby nie została jednoznacznie określona. Przypuszcza się, że migrena jest powodowana zaburzeniami gospodarki jonowej. Ich stężenia ulegają znacznym wahaniom, głównie ze względu na działanie estrogenów⁴. W przypadku kobiet, migrena występuje w okresach szczególnie związanych z hormonami płciowymi, czyli podczas miesiączki, ciąży, laktacji czy menopauzy⁴. Należy także zaznaczyć, że do momentu dojrzewania płciowego, choroba ta występuje jednakowo często u obu płci. Jednakże, po menarche migrena występuje częściej u kobiet niż u mężczyzn⁴. Czynniki wywołującymi ataki migreny mogą być również; stres, zmiany rytmu snu, zmiany pogody, światło bądź niektóre alkohole, takie jak wino czerwone i vermut.

2. Rodzaje migren

Choroba ta występuje w kilku postaciach w zależności od towarzyszących jej objawów. Według International Headache Society wyróżnia się między innymi: migrenę bez aury, migrenę z aurą, migrenę typu podstawnego, rodzinną migrenę połowiczoporażną oraz migrenę siatkówkową.

Pierwszym i najczęściej spotykanym typem migreny jest migrena bez aury. Jej symptomami poza bólem głowy trwającym od 4 do 72 godzin są nudności, wymioty, fotofobia i fonofobia⁵.

Kolejnym rodzajem migreny jest migrena z aurą. Aurą nazywane są symptomy poprzedzające ból głowy. Mogą to być zaburzenia mowy, widzenia lub motoryki. Aura jest różnorodna w każdym indywidualnym przypadku⁵. Między aurą, a wystąpieniem bólu głowy mija około dwóch godzin⁶.

Migrena typu podstawnego to rodzaj migreny szczególnie rzadko spotykany u mężczyzn. Objawy wskazują na zaburzenia w układzie tętniczym. Bóle o charakterze pulsującym są lokalizowane w okolicy potylicznej, a rozpoznanie tego konkretnego rodzaju migreny wymaga obecności symptomów takich

jak: dyzartia, afazja, osłabienie słuchu czy dwojenie obrazu⁶. Występują też zaburzenia motoryczne, ataksja, obustronne parestezje i zaburzenia czucia⁶.

Rodzinna migrena połowiczoporażna cechuje się występowaniem tej choroby u co najmniej jednego krewnego pierwszego lub drugiego stopnia. Aura w tym przypadku jest zawsze jednostronna– obserwuje się drętwienie i mrowienie kończyn⁶. Choroba jest uwarunkowana genetycznie – w loci 1 i 19 chromosomu⁶.

Migrena siatkówkowa jest wynikiem niedokrwienia siatkówki. Jej cechą charakterystyczną są odwracalne zaburzenia widzenia, np. mroczki, migotania lub nawet ślepotą⁶.

- 1.1. Migrena bez aury
- 1.2. Migrena z aurą
 - 1.2.1. Typowa aura z migrenowym bólem głowy
 - 1.2.2. Typowa aura z niemigrenowym bólem głowy
 - 1.2.3. Typowa aura bez bólu głowy
 - 1.2.4. Rodzinna migrena połowiczoporażna
 - 1.2.5. Sporadyczna migrena połowiczoporażna
 - 1.2.6. Migrena typu podstawnego
- 1.3. Dziecięce zespoły okresowe, często poprzedzające migrenę
 - 1.3.1. Cykliczne wymioty
 - 1.3.2. Migrena brzuszna
 - 1.3.3. Łagodne napadowe zawroty głowy wieku dziecięcego
- 1.4. Migrena siatkówkowa
- 1.5. Powikłania migreny
 - 1.5.1. Migrena przewlekła
 - 1.5.2. Stan migrenowy
 - 1.5.3. Uporczywa aura bez zawału mózgu
 - 1.5.4. Migrenowy zawał mózgu
 - 1.5.5. Napady padaczkowe wywołane przez migrenę
- 1.6. Migrena prawdopodobna
 - 1.6.1. Migrena prawdopodobna bez aury
 - 1.6.2. Migrena prawdopodobna z aurą
 - 1.6.3. Prawdopodobna migrena przewlekła

Tab 1. Postacie migreny według International Headache Society⁵

3. Etiologia migreny

Etiologia migreny nie jest jednoznacznie zdefiniowana. Hipotezy dotyczące czynników powodujących migrenę oscylują jednak wokół hormonów

i równowagi jonowej. Hormony mogące spowodować migrenowy ból głowy są zarówno hormony płciowe, jak i kortyzol.

3.1. Hormony płciowe

3.1.1 Estrogeny

Estrogeny modulują pobudliwość nerwową i wykazują powiązanie między neuroprzekaznikami, m.in. serotoniną. Ten neurotransmitter jest odpowiedzialny za obniżenie progu bólu. Jeśli w synapsie nastąpi niedobór serotoniny, nastąpi migrena przewlekła oporna na leczenie⁷. Estrogeny mogą też stymulować śródbłonkową syntazę tlenu azotu. W fazie lutealnej występuje najwyższe stężenie tlenu azotu, odpowiadające za migreny menstruacyjne⁸.

Zarówno niskie jak i wysokie stężenie estrogenów jest odpowiedzialne za wywołanie migreny. W przypadku zbyt niskiego poziomu estrogenów powstaje migrena bez aury. W odwrotnej sytuacji, gdy stężenie estrogenów w osoczu jest bardzo wysokie, występuje migrena z aurą⁹.

Migrena bez aury jest częstą chorobą w przypadku kobiet stosujących dostępną antykoncepcję. Szczególną grupą ryzyka, są kobiety przyjmujące antykoncepcję, u których migrena występowała jeszcze przed terapią hormonalną¹⁰.

Migrenogenne działanie estrogenów powstaje przez receptory estrogenowe alfa i beta w zwoju trójdzielnym i istocie szarej okołowodociągowej. W czasie menstruacji zwiększone stężenie estrogenów stymuluje receptory estrogenowe, aktywując kinazę regulowaną sygnałem. Dodatkowo, estrogen zwiększa ilość nocyceptorów, będącymi receptorami bólowymi¹¹.

3.1.2 Prolaktyna

Prolaktyna jest hormonem peptydowym, wydzielanym przez przedni płat przysadki. Jej główną rolą jest pobudzanie laktacji u kobiet karmiących piersią.

Receptory prolaktyny ulokowane są m.in. w zwoju trójdzielnym i oponowych włóknach nerwów doprowadzających. Te właśnie receptory pełnią funkcję nocyceptorów i są odpowiedzialne za patogenezę bólów migrenowych¹². Wysokie stężenia prolaktyny mogą prowadzić do podatności płciowej na migrenę przez uwrażliwienie nerwów czuciowych na bodźce bólowe. To zaś, jest to możliwe dzięki stymulacji przez prolaktynę syntezy peptydu związanego z genem kalcytoniny ang. *calcitonin gene-related peptide (CGRP)*^{12,13}.

Mechanizm migreny z udziałem prolaktyny jest uważany za podstawowe wyjaśnienie dymorfizmu płciowego w przypadku tej choroby, gdzie znacznie większą zachorowalnością odznaczają się kobiety¹⁴.

3.2 Kortyzol

Kortyzol to hormon steroidowy, produkowany w warstwie pasmowatej kory nadnerczy. Potocznie nazywany jest hormonem stresu, ze względu na wzrost jego wydzielania w sytuacjach stresowych. Wpływ kortyzolu na ryzyko pojawienia się migreny nie jest bezpośredni. Szczególnie istotna jest jedna z funkcji tego hormonu, mianowicie stymulacja produkcji ceruloplazminy– białka transportującego miedź– oraz transferyny– białka transportującego żelazo¹⁵. Skutkuje to zwiększeniem stężenia żelaza i miedzi w osoczu jako wolnych pierwiastków. Oba pierwiastki mają wysoki potencjał redukcyjno– oksydacyjny, zatem generują wolne rodniki, które mogą wywołać liczne uszkodzenia w obrębie komórek¹⁵.

4. Leczenie farmakologiczne migreny i migrenowych bólów głowy

Leki przyjmowane przez pacjentów chorujących na migrenę mają nie tylko zniwelować ból i inne dolegliwości związane ze schorzeniem, ale także są zorientowane na działanie zapobiegawcze, zmniejszające ryzyko ponownego wystąpienia choroby.

Środkami najczęściej przyjmowanymi w celu złagodzenia bólu są preparaty bez recepty, zawierające paracetamol, kofeinę lub aspirynę¹⁶. W przypadku leków zawierających kofeinę, należy szczególnie zwracać uwagę na częstość przyjmowania i dawkowanie, gdyż w przypadku tego leku istnieje duże ryzyko nadużywania preparatu¹⁷. Leki przeciwbólowe niwelują dolegliwości przy najłagodniejszych objawach.

W atakach o łagodnym oraz średnim natężeniu stosuje się niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ). W jednym z badań przeprowadzonych przez John T. Meredith, Scott Wait i Kori L Brewer potwierdzono, że jednorazowo podana dawka 400 mg ibuprofenu złagodziła ból, a także światłowstręt i fonofobię^{18,19}. Na oddziałach ratunkowych stosuje się dojelitowe podawanie NLPZ, które niwelują ból głowy już w godzinę od zaaplikowania¹⁹.

Jeśli terapia lekami przeciwbólowymi i NLPZ nie przynosi odpowiednich skutków, stosuje się tryptany. Są to leki stosowane typowo w leczeniu migreny – wiążą się z receptorami serotoninerгіcznymi^{20,21}.

Jednym z najczęściej stosowanych tryptanów jest ryzotryptan^{22,24}. Jest to podawany doustnie agonistą receptora serotoninowego 5-HT₁, który silnie i selektywnie wiąże się z podtypami 5-HT_{1B}/1D. Podawany w dawce 10mg wykazuje większą skuteczność w zwalczaniu dolegliwości bólowych i pozostałych objawów migreny niż zolmitryptan w dawce 2,5mg lub naratryptan w dawce 2,5mg²⁴. Efekty działania ryzotryptanu obserwuje się już godzinę po podaniu substancji. Dodatkową zaletą tego leku są rzadkie i łagodne niepożądane objawy, którymi są zmęczenie, zawroty głowy i senność^{24,25}.

Sumatryptan jest substancją o późniejszym początku działania niż ryzotryptan¹⁹. W połączeniu z naproksenem sodu, należącym do grupy NLPZ jest stosowany najczęściej w leczeniu ostrych migren u dzieci powyżej 12 roku życia, młodzieży i dorosłych^{26,27}. Efekt działania leku obserwuje się już po około 2 godzinach i utrzymuje się on do około 24 godzin²⁷. Po zastosowaniu preparatu zawierającego sumatryptan rzadko występują efekty uboczne, zróżnicowane w zależności od grupy wiekowej pacjentów. Wśród nich znajdują się zapalenie nosogardzieli, uderzenia gorąca i napięcie mięśniowe u młodzieży oraz zawroty głowy, uczucie ucisku, senność, parestezje i niestrawność u dorosłych²⁷. Sumatryptan oddziałuje na receptory 5-HT_{1B} i 5-HT_{1D}, a naproksen hamuje enzymy COX-1 i COX-2^{28,29,30}. Sumatryptan ma działanie zwężające naczynia krwionośne, a także wpływa na zapalenie neurogenne poprzez zmniejszenie uwalniania substancji P i genu kalcytoniny. Naproksen wpływa na prostaglandyny i inne mediatory zapalne.

Kolejnym tryptanem stosowanym w leczeniu ostrych migren zarówno z aurą jak i bez aury jest almotryptan. Jest to pierwszy związek z grupy tryptanów dopuszczony do spożycia przez Food and Drug Administration (FDA)³¹. Przyjmowanie almotryptanu jest skutecznie w zwalczaniu migren u pacjentów pediatrycznych i dorosłych³². Związek ten działa przez zwężanie naczyń krwionośnych w mózgu, co zatrzymuje przekazywanie bodźców bólowych³³. W porównaniu z sumatryptanem, czas biodostępności jest dłuższy i czas półtrwania w osoczu almotryptanu jest krótszy³². Przyjmowany jest w formie tabletek, w których znajduje się 12,5mg substancji. Nie zalecane jest stosowanie powyżej 25mg almotryptanu w ciągu doby³⁴. Częstymi działaniami niepożądanymi almotryptanu są senność, zawroty głowy, ból głowy, nudności, wymioty, ból w klatce piersiowej i zmęczenie³⁵.

Kwas walproinowy jest stosowany nie tylko w profilaktyce migreny, ale także w leczeniu depresji, epilepsji, zaburzeniach dwubiegunowych i lękowych³⁶. Związek ten to krótkołańcuchowy, rozgałęziony kwas tłuszczowy. Substancja działa poprzez nasilenie działania inhibitora przekaźnika kwasu gamma-aminomasłowego (GABA) poprzez zapobieganie degradacji GABA, tłumienie działania transaminacji GABA i promowanie syntezy GABA³⁷. Dawka przyjmowana przez pacjentów początkowo wynosi od 250 do 500mg dziennie, jednak gdy jest to konieczne, można ją zwiększyć do 1500mg na dobę. Maksymalna dawka dzienna kwasu walproinowego to 60 mg/kg/dzień³⁸. Najczęstszymi efektami ubocznymi są nudności, wymioty i zaburzenia żołądkowo-jelitowe oraz łysienie, drżenie i hiperamonemia³⁸.

Lidokaina jest związkiem używanym przezskórnie jako miejscowy środek znieczulający oraz dożylnie w leczeniu bólu towarzyszącemu wielu schorzeniom przewlekłym, w tym migreny jako lek pierwszego rzutu. Wlewy dożylnie trwają zazwyczaj od 2 do 15 dni, średnio jest to 8,5 dnia³⁹. Mechanizm działania lidokainy w leczeniu bólu głowy nie jest do końca poznany, przypuszcza się, że przerywa ona szlak nocycyptywny przez oddziaływanie na receptory N-metylo-D-asparaginowe i kanały sodowe^{40,41}. Możliwe jest także podawanie lidokainy w formie zastrzyku do nerwu potylicznego większego. Jest to forma leczenia bólu stosowana w przypadkach opornych na leczenie bólów głowy u dzieci⁴². W badaniach prowadzonych przez F. Puledda, P.J. Goadsby i P. Prabhakar odnotowano, że u 16% badanych pacjentów pediatrycznych ból głowy nie występował przez 3 tygodnie po wykonaniu zabiegu iniekcji⁴². Najczęściej przejawiającym się w tym badaniu efektem ubocznym był spotęgowany ból, który utrzymywał się do 5 tygodni⁴².

Do zapobiegania występowania migreny stosowana jest terapia toksyną botulinową typu A. Ta metoda jest stosowana jako terapia drugiego rzutu dla pacjentów, u których choroba nie ustąpiła po zastosowaniu leków dostępnych^{43,44}. Iniekcje mogą być wykonywane w 31 miejscach na głowie oraz 7 miejscach na szyi. Leczenie należy powtarzać co 3 miesiące. Toksyna botulinowa jest wstrzykiwana w obszary unerwione przez nerw trójdzielny. Hamuje to uwalnianie peptydu pochodnego od genu kalcytoniny z obwodowych neuronów nocycyptywnych i zakłóca działanie kanałów TRP, zmniejszając w ten sposób nadpobudliwość neuronalną oraz obwodową i ośrodkową wrażliwość⁴⁵. Przeciwdziała to oddziaływaniu bodźców nocycyptywnych z wysoce uczulonych neuronów nerwu trójdzielnego na neurony drugiego rzędu pnia mózgu, zapobiegając w ten sposób uczuleniu ośrodkowemu, co jest mechanizmem powstawania migreny⁴⁵. Europejska Federacja Bólu Głowy podaje,

że toksyna botulinowa typu A jest zalecany do leczenia pacjentów cierpiących na migrenę i jest uważany za skuteczne i dobrze tolerowane leczenie^{46,47}. Leczenie toksyną botulinową ma jednak głównie dwie wady. Pierwszą z nich są wysokie koszty leczenia, a drugą– ból i dyskomfort podczas podawania leku. Trudności mogą też sprawiać konieczne wizyty co 3 miesiące.

W październiku 2019 roku FDA zatwierdziło do użytku substancję o nazwie 2,4,6-trifluoro-N-[6-(1-metylopiperydyno-4-karbonylo)pirydyn-2-ylo]benzamid- jest to związek wchodzący w skład leku lasmiditan⁴⁸. Lasmiditan jest agonistą receptorów 5-HT z ponad 440 razy silniejszym powinowactwem do receptorów 5-HT1F niż 5-HT1B i 5-HT1D⁴⁹. Silnie hamuje markery stymulacji elektrycznej w zwoju nerwu trójdzielnego, co blokuje uwalnianie neuropeptydów i neuroprzekazników, takich jak CGRP i glutaminian. Hamuje tym samym ich aktywność lokalną i szlaki bólu napadowego migreny⁵⁰. W przeciwieństwie do tryptanów lasmiditan nie wykazuje właściwości naczynioskurczających, dzięki czemu jest bezpieczny dla osób z chorobami układu krążenia⁵¹. Lek ten jest przyjmowany doustnie i występuje w dwóch wariantach– 50 mg i 100 mg, a maksymalne stężenie w osoczu osiąga 1,8 godziny po spożyciu⁵¹. Jego farmkokinetyka nie zależy od wieku, płci, rasy i masy ciała⁵². Nie zaleca się przyjmowania więcej niż jednej dawki dziennie lub prowadzenia pojazdów do 8 h po zażyciu leku. Najczęstsze działania niepożądane to zawroty głowy, zmęczenie, parestezje i sedacja^{53,54,55,56}.

Topiramate został wprowadzony w 2014 roku przez FDA jako lek mający zapobiegać nawrotom migreny w populacji między 12 a 17 rokiem życia^{57,58}. Jest to także jedyny lek zatwierdzony do stosowania u pacjentów z migreną w wieku 12 lat i starszych⁵⁹. Topiramate występuje w dwóch formach preparatów doustnych, o natychmiastowym uwalnianiu, przyjmowany dwa razy dziennie, i o przedłużonym uwalnianiu, przyjmowany raz dziennie⁶⁰. Pacjenci nie powinni kruszyć tabletek ze względu na gorzki smak⁶⁰. Istnieje preparat w postaci kapsułki z posypką, którą pacjent może dodać do niewielkiej ilości miękkiego pokarmu; podawanie topiramatu może odbywać się niezależnie od posiłków. Należy unikać alkoholu 6 godzin przed i po podaniu topiramatu⁶¹. W celu zmniejszenia częstości działań niepożądanych preferowany jest plan powolnego zwiększania dawki w dawce od 25 do 50 mg/dobę tygodniowo⁶². Topiramate jest lekiem stosunkowo bezpiecznym, ponieważ lista bezwzględnych przeciwwskazań jest minimalna. Topiramate, jako inhibitor anhidrazy węglanowej, może przyspieszać rozwój kwasicy metabolicznej i dlatego jest przeciwwskazany u osób obecnie z (lub podatnych na wystąpienie) kwasicy metabolicznej. Inne przeciwwskazania obejmują osoby z historią

udowodnionej alergii na topiramát⁶³. Topiramát zmniejsza częstość bólów głowy i jest dwukrotnie bardziej prawdopodobny, aby zmniejszyć częstość bólów głowy o 50% lub więcej w porównaniu z placebo⁶⁴.

Eptinezumab, fremanezumab i galkanezumab są przeciwciałami monoklonalnymi przeciwko CGRP⁶⁵. Są stosowane w profilaktyce migreny.

Eptinezumab to w 95% humanizowane przeciwciało klasy IgG1⁶⁶. Stosowany jest jako wlew dożylny, trwający 30 minut⁶⁷. Zalecana dawka to 100 mg we wlewie co 3 miesiące, ale u niektórych pacjentów pomocne może być 300 mg co 3 miesiące. Eptinezumab jest pakowany po 100 µg na 1 µl i przed podaniem należy go rozpuścić w 100 µm 0,9% chlorku sodu⁶⁷. Podczas migreny nerw trójdzielny za pośrednictwem CGRP przewodzi sygnał bólu do pnia mózgu i obszarów mózgu wyższego rzędu. Dlatego przypuszcza się, że eptinezumab zapobiega migrenom poprzez wiązanie i blokowanie cząsteczek CGRP. Może specyficznie i szybko wiązać się zarówno z ligandami α -, jak i β -CGRP, blokując wiązanie się z receptorami CGRP, jednak wolno się dysocjuje, co może wyjaśniać jego szybki początek i dłuższy czas działania⁶⁸. Najczęstszym efektem ubocznym stosowania eptinezumabu jest zapalenie nosogardzieli⁶⁸.

Fremanezumab jest w pełni humanizowanym przeciwciałem klasy IgG2 Δ a, którego mechanizm działania jest identyczny jak w przypadku eptinezumabu – wiąże się z CGRP, blokując w ten sposób jego wiązanie z receptorem⁶⁹. We wrześniu 2018 roku został zatwierdzony przez amerykańską FDA do profilaktycznego leczenia migreny u dorosłych⁷⁰. Zalecana dawka to 225 mg raz na miesiąc lub 675 mg raz na 3 miesiące, podawane w trzech kolejnych wstrzyknięciach po 225 mg. W przeciwieństwie do eptinezumabu fremanezumab podawany jest podskórnie w zastrzyku⁶⁹. Efekty uboczne stosowania tego leku to ból, stwardnienie lub świąd w miejscu wprowadzenia zastrzyku⁷⁰.

Galkanezumab to przeciwciało monoklonalne humanizowane klasy IgG4⁷¹. Selektywnie wiąże się i neutralizuje peptyd związany z genem kalcytoniny⁷². Jest dostępny we wstrzyknięciu 120 mg/ml do podania podskórnego i jest przeznaczony do samodzielnego podawania przez pacjenta⁷³. Zalecany schemat to 240 mg, podawane w dwóch kolejnych wstrzyknięciach po 120 mg – raz jako dawka nasycająca, a następnie dawka 120 mg raz w miesiącu⁷³. Lokalizacja miejsca wstrzyknięcia nie ma istotnego wpływu na wchłanianie⁷⁴. Na farmakokinetykę galkanezumabu nie ma wpływu wiek, płeć, rasa ani podtyp migreny, czy to epizodyczny czy przewlekły⁷⁴. Masa ciała nie miała wpływu na farmakokinetykę galkanezumabu w stopniu klinicznie istotnym⁷⁴. Mechanizm działania leku również opiera się o blokowanie wiązania CGRP

z receptorem. Najczęściej występujące po zażyciu efekty uboczne to ból w miejscu wstrzyknięcia, infekcje górnych dróg oddechowych, zapalenie nosogardzieli, bolesne miesiączkowanie i nudności. Większość miała nasilenie łagodne do umiarkowanego⁷⁵.

5. Niefarmakologiczne terapie dla pacjentów cierpiących na migrenę

5.1. Nutraceutyki

Nutraceutyki to żywność lub suplementy diety, które zapewniają korzyści lecznicze lub zdrowotne. U pacjentów z migreną zastosowanie tego rodzaju terapii niefarmakologicznej rośnie i jest prawdopodobnie powszechnie niedoceniane⁷⁶. Najczęściej stosowanymi nutraceutykami, które wykazały pewne dowody w zapobieganiu migrenie, są ryboflawina (witamina B2), koenzym Q10 (CoQ10), magnez, ekstrakt z korzenia lepieźnika (*Petasites hybridus*) i złocień maruna (*Tanacetum parthenium*).

Ryboflawina jest prekursorem mononukleotydu flawiny i dinukleotydu flawinoadeninowego. Te koenzymy są wymagane do kilku związanych z energią funkcji komórkowych i transportu elektronów w cyklu Krebsa, a zatem odgrywają ważną rolę w produkcji energii wewnątrz mitochondrium. Uzasadnienie zastosowania ryboflawiny w migrenie pochodziło z badań spektroskopii rezonansu magnetycznego^{77,78}. Sugerowały one, że w mózgu migrującym mogą występować dysfunkcje mitochondriów. Pierwsze badania nad skutecznością ryboflawiny w leczeniu migreny miały miejsce w Belgii⁷⁹. W tym badaniu wpływ dawki 400 mg na dobę był testowany u 55 epizodycznych dorosłych migreny, z aurą i bez aury. Ryboflawina wykazała znaczący wpływ na zmniejszenie liczby dni bólu głowy i częstotliwości ataków, z jedynie niewielkimi i rzadkimi skutkami ubocznymi w porównaniu z placebo. Jednak randomizowane badanie kontrolne z udziałem 48 dzieci z epizodyczną migreną nie wykazało żadnej różnicy między 50% niższą dawką 200 mg ryboflawiny i placebo w skróceniu liczby dni bólu głowy, czasu ich trwania lub nasilenia napadów migreny i związanych z nimi objawów^{79,80}.

Koenzym Q odgrywa zasadniczą rolę w mitochondrialnym łańcuchu transportu elektronów i metabolizmie energetycznym. W migrenie wykazano skuteczność w jednym randomizowanym, kontrolowanym badaniu, w którym 42 pacjentów z migreną otrzymywało placebo lub 300 mg dziennie CoQ10⁸¹. Grupa leczona wykazała bardziej wyraźne zmniejszenie częstości

ataków od wartości wyjściowej do 4 miesiąca w porównaniu z placebo, a produkt był ogólnie dobrze tolerowany. W innym RCT z udziałem 50 dzieci i młodzieży z migreną CoQ10 podawano w dawce 100 mg na dobę i porównywano z placebo, nie wykazując różnicy między obiema grupami⁸².

Chociaż magnez nie ma bezpośredniego działania antynocycyptywnego, hamuje wnikanie jonów wapnia do komórek poprzez blokowanie receptorów NMDA, co skutkuje działaniem przeciwbólowym⁸³. Ten efekt przeciwbólowy związany jest z zapobieganiem uczuleniu ośrodkowemu spowodowanemu uszkodzeniem tkanek obwodowych. Magnez pozakomórkowy blokuje receptory NMDA w sposób zależny od napięcia⁸⁴. W związku z tym może zapobiegać rozwojowi uczulenia centralnego i znosić utrwaloną nadwrażliwość. Inni kompetyjni lub niekonkurencyjni antagoniści receptora NMDA, tacy jak D-CPP i MK801, również zapobiegają i odwracają nadpobudliwość neuronów wytwarzaną przez bodźce aferentne nocycyptywne⁸⁵. Ponieważ magnez jest naturalnym antagonistą wapnia, antynocycyptywne uzbrojenie magnezu powinno obejmować blokadę kanału wapniowego⁸³.

Ekstrakt ziołowy z lepiężnika różowego jest również stosowany jako niefarmakologiczne forma zwalczania migreny⁸⁶. Ekstrakt z korzenia lepiężnika, który jest używany w postaci tabletek, nazywa się Petadolex i jest produkowany w Niemczech. W ostatnich latach pojawiły się pewne obawy dotyczące bezpieczeństwa związane z możliwą toksycznością wątroby przy stosowaniu lepiężnika⁸⁶. Obawy związane z bezpieczeństwem oznaczają, że obecnie nie może być zalecany jako leczenie zapobiegawcze⁸⁷.

5.2. Akupunktura

Akupunktura to forma tradycyjnej medycyny chińskiej, która wykorzystuje igły umieszczane w określonych punktach akupunkturowych na skórze w celu wygojenia i przywrócenia równowagi w ludzkim ciele. Chociaż jest stosowany w leczeniu różnych zaburzeń, jednym z najczęstszych zastosowań jest leczenie bólu przewlekłego, zwłaszcza bólu głowy i bólu migrenowego⁸⁸. Badania funkcjonalnego rezonansu magnetycznego dostarczają danych potwierdzających bezpośredni związek między punktami akupunktury a specyficzną aktywnością mózgu. W jednym z badań celowanie w akupunkt tradycyjnie związany z widzeniem spowodowało aktywację tego samego obszaru płata potylicznego, o którym wiadomo, że jest aktywowany przez świecenie światła w oko⁸⁹.

Akupunktura jest w dużej mierze dobrze tolerowana i bezpieczna dla pacjentów, jeśli osoba odpowiedzialna za zabieg jest odpowiednio przeszkolona⁹⁰. W licznych badaniach naukowych analizowano wpływ akupunktury na migrenę i różne stany chorobowe, w tym infekcje dróg moczowych, depresję, spastyczną hemiplegię poudarową, bóle mięśniowo-szkieletowe i neuropatię obwodową^{91,92,93}. Obecnie akupunkturę uważa się za bezpieczną, pomocną i dostępną alternatywę dla pacjentów, którzy nie zareagowali lub nie zastosowali się do konwencjonalnej farmakoterapii; warto też wspomnieć, że badań dotyczących akupunktury jest znacznie więcej w populacji osób dorosłych niż w populacji pediatrycznej⁹⁴. Terapia akupunkturą jest skuteczna dopiero po określonej liczbie sesji (minimum 6–8), ale najbardziej efektywny czas, np. częstotliwość wizyt, kiedy rozpocząć akupunkturę nie został jeszcze określony⁹⁵.

5.3. Terapia z wykorzystaniem konopi indyjskich

W terapii migreny stosuje się także medyczną marihuanę, w której znajduje się związek o nazwie delta-9-hydrokannabinol⁹⁶. Badanie przeprowadzone przez LA Pini, S. Guerzoni, MM Cainazzo, A. Ferrari, P. Sarchielli, I Tiraferri, M Ciccasrese, M Zappaterra na pacjentach ambulatoryjnych z bólami głowy spowodowanymi nadużywaniem leków wykazało, że nabilon (syntetyczny kannabinoid) był skuteczniejszy niż ibuprofen w zmniejszaniu intensywności bólu, zmniejszaniu przyjmowania innych leków przeciwbólowych i poprawianiu jakości życia⁹⁷. Tetrahydrokannabinol działa podobnie do anandamidu endokannabinoidowego, który hamuje rozszerzenie naczyń krwionośnych opony twardej i zmniejsza uwalnianie peptydu związanego z genem kalcytoniny z neuronów trójdzielných. Pacjenci z przewlekłą migreną mają niedobór anandamidu, co dodatkowo sugeruje, że słabo reagujący układ endokannabinoidowy przyczynia się do podatności na migrenę⁹⁸. Kobiety wykazują większą wrażliwość antynocycyptywną na kannabinoidy w porównaniu z mężczyznami⁹⁹. Konopie stosowane są przez inhalację. W przypadku zdecydowanej większości sesji używania konopi indyjskich pacjenci zgłaszali zmniejszenie bólu głowy i nasilenia migreny. Wdychane konopie indyjskie zmniejszają odczuwane nasilenie bólu głowy i migreny o prawie 50%⁹⁶. Wyszuszony kwiat konopi może być skutecznym lekiem w leczeniu bólu związanego z migreną i bólem głowy, ale skuteczność różni się w zależności od właściwości rośliny konopi, sposobu przyjmowania oraz wieku i płci pacjenta¹⁰⁰. Oprócz inhalacji, możliwe jest spożywanie konopi w formie jadalnej,

jak np. Olej lub nalewki¹⁰¹. Dobranie idealnej dawki stanowi problem, ze względu na skuteczność zależną od wielu czynników. W badaniach przeprowadzonych przez Baron EP, Lucas P, Eades J, Hogue O wykazano, że mieszanka tetrahydrokannabinolu i kannabinolu w dawce 200 mg miało 40,4% poprawę w stosunku do stosowania amitryptyliny¹⁰². Efekty uboczne po krótkotrwałym przyjmowaniu medycznej marihuany to upośledzenie pamięci krótkoterminowej, upośledzenie uwagi i oceny sytuacji, upośledzenie koordynacji ruchowej i równowagi, przyspieszenie pracy serca, niepokój, a rzadziej psychoza¹⁰³.

6. Podsumowanie

Migrena jest chorobą przewlekłą, której nie można lekceważyć. Migrenowe bóle głowy nie tylko uniemożliwiają pracę, ale również normalne funkcjonowanie. Na szczęście istnieje duży wachlarz leków i terapii, które pomagają w walce nie tylko z objawami ale i zapobiegają występowaniu migreny w przyszłości. Co najważniejsze, zarówno medykamenty jak i terapia są dostępne nie tylko dla dorosłych. Również dzieci mogą korzystać z dobrodziejstw medycyny, pozwalającym na zniwelowanie dolegliwości.

Referencje

1. Young D. ClinicalKey. Clinicalkey.com. Published 2020. Accessed August 2, 2022. <https://www.clinicalkey.com/#>
2. Steiner TJ, Stovner LJ, Vos T. GBD 2015: migraine is the third cause of disability in under 50s. *The Journal of Headache and Pain*. 2016;17(1). doi:10.1186/s10194-016-0699-5
3. Allena M, Steiner TJ, Sances G, et al. Impact of headache disorders in Italy and the public-health and policy implications: a population-based study within the Eurolight Project. *The Journal of Headache and Pain*. 2015;16(1). doi:10.1186/s10194-015-0584-7
4. SinghDhillon K, Singh Lyall J, Singh J. A new horizon into the pathobiology, etiology and treatment of migraine. *Medical Hypotheses*. 2011;77(1):147-151. doi:10.1016/j.mehy.2011.03.050
5. Linde M. Migraine: a review and future directions for treatment. *Acta Neurologica Scandinavica*. 2006;114(2):71-83. doi:10.1111/j.1600-0404.2006.00670.x

6. Kozubski W. Sesja 7. Migrena I Bóle Głowy Rzadkie I Nietypowe Postacie Migreny Bóle Głowy Zależne Od Indometacyny Aktualne Opcje Terapeutyczne W Migrenie I Pokrewnych Bólach Głowy Kontrowersje W Diagnostyce I Leczeniu Bólów Głowy. Accessed August 2, 2022. https://journals.viamedica.pl/polski_przeglad_neurologiczny/article/viewFile/19901/15604
7. Allais G, Chiarle G, Sinigaglia S, Airola G, Schiapparelli P, Benedetto C. Estrogen, migraine, and vascular risk. *Neurological Sciences*. 2018;39(S1):11-20. doi:10.1007/s10072-018-3333-2
8. Chen Z, Yuhanna IS, Galcheva-Gargova Z, Karas RH, Mendelsohn ME, Shaul PW. Estrogen receptor α mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *Journal of Clinical Investigation*. 1999;103(3):401-406. doi:10.1172/jci5347
9. Anne MacGregor E. Oestrogen and attacks of migraine with and without aura. *The Lancet Neurology*. 2004;3(6):354-361. doi:10.1016/s1474-4422(04)00768-9
10. Granella F, Sances G, Pucci E, Nappi R, Ghiotto N, Nappi G. Migraine with aura and reproductive life events: a case control study. *Cephalalgia*. 2000;20(8):701-707. doi:10.1046/j.1468-2982.2000.00112.x
11. VanderHorst VGJM, Gustafsson JÅ, Ulfhake B. Estrogen receptor- α and - β immunoreactive neurons in the brainstem and spinal cord of male and female mice: Relationships to monoaminergic, cholinergic, and spinal projection systems. *The Journal of Comparative Neurology*. 2005;488(2):152-179. doi:10.1002/cne.20569
12. Gazerani P. A link between migraine and prolactin: the way forward. *Future Science OA*. 2021;7(9). doi:10.2144/fsoa-2021-0047
13. Lemprière S. Crosstalk between prolactin and CGRP signalling contributes to migraine in females. *Nature Reviews Neurology*. 2021;17(5):261-261. doi:10.1038/s41582-021-00491-y
14. Ikegami D, Navratilova E, Yue X, et al. A prolactin-dependent sexually dimorphic mechanism of migraine chronification. *Cephalalgia*. 2021;42(3):197-208. doi:10.1177/03331024211039813

15. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry*. 2006;97(6):1634-1658. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x
16. Becker WJ. Acute Migraine Treatment. *Continuum (Minneapolis, Minn)*. 2015;21(4 Headache):953-972. doi:10.1212/CON.0000000000000192
17. Thorlund K, Sun-Edelstein C, Druyts E, et al. Risk of medication overuse headache across classes of treatments for acute migraine. *J Headache Pain*. 2016;17(1):107. doi:10.1186/s10194-016-0696-8
18. Gilmore B, Michael M. Treatment of Acute Migraine Headache. *American Family Physician*. 2011;83(3):271-280. Accessed August 6, 2022. <https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2011/0201/p271.html>
19. Meredith JT, Wait S, Brewer KL. A prospective double-blind study of nasal sumatriptan versus IV ketorolac in migraine. *The American Journal of Emergency Medicine*. 2003;21(3):173-175. doi:10.1016/s0735-6757(02)42256-5
20. Mathew NT, Landy S, Stark S, et al. Fixed-Dose Sumatriptan and Naproxen in Poor Responders to Triptans With a Short Half-Life. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*. 2009;49(7):971-982. doi:10.1111/j.1526-4610.2009.01458.x
21. Dib M, Massiou H, Weber M, Henry P, Garcia-Acosta S, Bousser MG. Efficacy of oral ketoprofen in acute migraine: A double-blind randomized clinical trial. *Neurology*. 2002;58(11):1660-1665. doi:10.1212/wnl.58.11.1660
22. Ong JY, De Felice M. Migraine Treatment: Current Acute Medications and Their Potential Mechanisms of Action. *Neurotherapeutics*. 2017;15(2):274-290. doi:10.1007/s13311-017-0592-1
23. Cameron C, Kelly S, Hsieh SC, et al. Triptans in the Acute Treatment of Migraine: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*. 2015;55:221-235. doi:10.1111/head.12601
24. Wellington K, Plosker GL. Rizatriptan. *Drugs*. 2002;62(10):1539-1574. doi:10.2165/00003495-200262100-00007

25. Rizatriptan. PubMed. Published 2006. Accessed August 6, 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK501462/>
26. Marmura MJ, Silberstein SD, Schwedt TJ. The Acute Treatment of Migraine in Adults: The American Headache Society Evidence Assessment of Migraine Pharmacotherapies. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*. 2015;55(1):3-20. doi:10.1111/head.12499
27. Syed YY. Sumatriptan/Naproxen Sodium: A Review in Migraine. *Drugs*. 2015;76(1):111-121. doi:10.1007/s40265-015-0521-8
28. Tfelt-Hansen P. Naratriptan is as effective as sumatriptan for the treatment of migraine attacks when used properly. A mini-review. *Cephalalgia*. Published online July 18, 2021:033310242110289. doi:10.1177/03331024211028959
29. Blumenfeld A, Gennings C, Cady R. Pharmacological Synergy: The Next Frontier on Therapeutic Advancement for Migraine. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*. 2012;52(4):636-647. doi:10.1111/j.1526-4610.2011.02058.x
30. Duggan KC, Walters MJ, Musee J, et al. Molecular Basis for Cyclooxygenase Inhibition by the Non-steroidal Anti-inflammatory Drug Naproxen. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(45):34950-34959. doi:10.1074/jbc.m110.162982
31. Eiland LS, Hunt MO. The Use of Triptans for Pediatric Migraines. *Pediatric Drugs*. 2010;12(6):379-389. doi:10.2165/11532860-000000000-00000
32. Patniyot IR, Gelfand AA. Acute Treatment Therapies for Pediatric Migraine: A Qualitative Systematic Review. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*. 2016;56(1):49-70. doi:10.1111/head.12746
33. Ahmed Kassem A. Formulation Approaches of Triptans for Management of Migraine. *Current Drug Delivery*. 2016;13(6):882-898. doi:10.2174/1567201813666160425112600
34. McEnroe JD, Fleishaker JC. Clinical Pharmacokinetics of Almotriptan, a Serotonin 5-HT_{1B/1D} Receptor Agonist for the Treatment of Migraine. *Clinical Pharmacokinetics*. 2005;44(3):237-246. doi:10.2165/00003088-200544030-00002

35. Thorlund K, Toor K, Wu P, et al. Comparative tolerability of treatments for acute migraine: A network meta-analysis. *Cephalalgia*. 2016;37(10):965-978. doi:10.1177/0333102416660552
36. Rahman M, Nguyen H. Valproic Acid (Divalproex Sodium). PubMed. Published 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559112/>
37. Silva MFB, Aires CCP, Luis PBM, et al. Valproic acid metabolism and its effects on mitochondrial fatty acid oxidation: A review. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2008;31(2):205-216. doi:10.1007/s10545-008-0841-x
38. Kanthimathinathan S, Ranganathan LN, Ramamurthy G. Preventive Oral Treatment of Episodic Migraine: An Overview. *Neurology India*. 2021;69(7):51-58. doi:10.4103/0028-3886.315985
39. Marmura M, Rosen N, Abbas M, Silberstein S. Intravenous Lidocaine in the Treatment of Refractory Headache: A Retrospective Case Series. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*. 2009;49(2):286-291. doi:10.1111/j.1526-4610.2008.01281.x
40. Chaplan SR, Bach FW, Shafer SL, Yaksh TL. Prolonged Alleviation of Tactile Allodynia by Intravenous Lidocaine in Neuropathic Rats. *Anesthesiology*. 1995;83(4):775-785. doi:10.1097/00000542-199510000-00017
41. Kaube H, Hoskin KL, Goadsby PJ. Lignocaine and headache: An electrophysiological study in the cat with supporting clinical observations in man. *Journal of Neurology*. 1994;241(7):415-420. doi:10.1007/bf00900958
42. Puledda F, Goadsby PJ, Prabhakar P. Treatment of disabling headache with greater occipital nerve injections in a large population of childhood and adolescent patients: a service evaluation. *The Journal of Headache and Pain*. 2018;19(1). doi:10.1186/s10194-018-0835-5
43. Agostoni EC, Barbanti P, Calabresi P, et al. Current and emerging evidence-based treatment options in chronic migraine: a narrative review. *The Journal of Headache and Pain*. 2019;20(1). doi:10.1186/s10194-019-1038-4

44. Tassorelli C, Tedeschi G, Sarchielli P, et al. Optimizing the long-term management of chronic migraine with onabotulinumtoxinA in real life. *Expert Review of Neurotherapeutics*. 2017;18(2):167-176. doi:10.1080/14737175.2018.1419867
45. Aurora SK, Brin MF. Chronic Migraine: An Update on Physiology, Imaging, and the Mechanism of Action of Two Available Pharmacologic Therapies. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*. 2016;57(1):109-125. doi:10.1111/head.12999
46. Bendtsen L, Sacco S, Ashina M, et al. Guideline on the use of onabotulinumtoxinA in chronic migraine: a consensus statement from the European Headache Federation. *The Journal of Headache and Pain*. 2018;19(1). doi:10.1186/s10194-018-0921-8
47. Frank F, Ulmer H, Sidoroff V, Broessner G. CGRP-antibodies, topiramate and botulinum toxin type A in episodic and chronic migraine: A systematic review and meta-analysis. *Cephalalgia*. 2021;41(11-12):1222-1239. doi:10.1177/03331024211018137
48. Lamb YN. Lasmiditan: First Approval. *Drugs*. Published online November 20, 2019. doi:10.1007/s40265-019-01225-7
49. Diener HC, Tassorelli C, Dodick DW, et al. Guidelines of the International Headache Society for controlled trials of acute treatment of migraine attacks in adults: Fourth edition. *Cephalalgia*. 2019;39(6):687-710. doi:10.1177/0333102419828967
50. Clemow DB, Johnson KW, Hochstetler HM, Ossipov MH, Hake AM, Blumenfeld AM. Lasmiditan mechanism of action – review of a selective 5-HT_{1F} agonist. *The Journal of Headache and Pain*. 2020;21(1). doi:10.1186/s10194-020-01132-3
51. Tsai M, Case M, Ardayfio P, Hochstetler H, Wilbraham D. Effects of Lasmiditan on Cardiovascular Parameters and Pharmacokinetics in Healthy Subjects Receiving Oral Doses of Propranolol. *Clinical Pharmacology in Drug Development*. 2020;9(5):629-638. doi:10.1002/cpdd.768
52. HIGHLIGHTS of PRESCRIBING INFORMATION. Accessed August 9, 2022. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/211280s000lbl.pdf

53. Absorption, Metabolism and Excretion of [14C]-Lasmiditan - Single Oral Dose Administration - Study Results - ClinicalTrials.gov. [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT03040362?term=lasmiditan&draw=3&view=results). Accessed August 8, 2022. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT03040362?term=lasmiditan&draw=3&view=results>
54. Eli Lilly and Company. A Study to Investigate the Cardiovascular Effects of Lasmiditan in Healthy Elderly Subjects. [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03406260). Published November 8, 2019. Accessed August 8, 2022. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03406260>
55. Kuca B, Silberstein SD, Wietecha L, Berg PH, Dozier G, Lipton RB. Lasmiditan is an effective acute treatment for migraine. *Neurology*. 2018;91(24):e2222-e2232. doi:10.1212/wnl.0000000000006641
56. Loo LS, Ailani J, Schim J, et al. Efficacy and safety of lasmiditan in patients using concomitant migraine preventive medications: findings from SAMURAI and SPARTAN, two randomized phase 3 trials. *The Journal of Headache and Pain*. 2019;20(1):84. doi:10.1186/s10194-019-1032-x
57. Rothrock JF, Adams AM, Lipton RB, et al. FORWARD Study: Evaluating the Comparative Effectiveness of OnabotulinumtoxinA and Topiramate for Headache Prevention in Adults With Chronic Migraine. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*. 2019;59(10):1700-1713. doi:10.1111/head.13653
58. Le K, Yu D, Wang J, Ali AI, Guo Y. Is topiramate effective for migraine prevention in patients less than 18 years of age? A meta-analysis of randomized controlled trials. *The Journal of Headache and Pain*. 2017;18(1). doi:10.1186/s10194-017-0776-4
59. FDA approves Topamax for migraine prevention in adolescents. *Journal of Pain & Palliative Care Pharmacotherapy*. 2014;28(2):191. Accessed August 9, 2022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25011147/>
60. Fariba KA, Saadabadi A. Topiramate. *PubMed*. Published 2022. Accessed August 9, 2022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32119417/>

61. Khalil NY, AlRabiah HK, AL Rashoud SS, Bari A, Wani TA. Topiramate. Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology. Published online 2019:333-378. doi:10.1016/bs.podrm.2018.11.005
62. Alfaris N, Minnick AM, Hopkins CM, Berkowitz RI, Wadden TA. Combination phentermine and topiramate extended release in the management of obesity. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2015;16(8):1263-1274. doi:10.1517/14656566.2015.1041505
63. Silberstein SD. Topiramate in Migraine Prevention: A 2016 Perspective. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*. 2016;57(1):165-178. doi:10.1111/head.12997
64. Linde M, Mulleners WM, Chronicle EP, McCrory DC. Topiramate for the prophylaxis of episodic migraine in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Published online June 24, 2013. doi:10.1002/14651858.cd010610
65. Wang X, Chen Y, Song J, You C. Efficacy and Safety of Monoclonal Antibody Against Calcitonin Gene-Related Peptide or Its Receptor for Migraine: A Systematic Review and Network Meta-analysis. *Frontiers in Pharmacology*. 2021;12. doi:10.3389/fphar.2021.649143
66. Morgan KW, Joyner KR. Eptinezumab: A calcitonin gene-related peptide monoclonal antibody infusion for migraine prevention. *SAGE Open Medicine*. 2021;9:205031212110501. doi:10.1177/20503121211050186
67. McAllister P, Kudrow D, Cady R, Hirman J, Ettrup A. Reduction in migraine-associated burden after eptinezumab treatment in patients with chronic migraine. *Cephalalgia*. Published online March 25, 2022:033310242210895. doi:10.1177/03331024221089567
68. Dhillon S. Eptinezumab: First Approval. *Drugs*. 2020;80(7):733-739. doi:10.1007/s40265-020-01300-4
69. Hussar DA, Moyer MR. Baloxavir marboxil, Fremanezumab-vfrm, Galcanezumab-gnlm, and Lofexidine hydrochloride. *Journal of the American Pharmacists Association*. 2019;59(1):141-144. doi:10.1016/j.japh.2018.12.002

70. Winner PK, Spierings ELH, Yeung PP, et al. Early Onset of Efficacy With Fremanezumab for the Preventive Treatment of Chronic Migraine. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*. 2019;59(10):1743-1752. doi:10.1111/head.13654
71. ANEKSICHARAKTERYSTYKAPRODUKTULECZNICZEGO. Accessed August 9, 2022. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/emgality-epar-product-information_pl.pdf
72. Benschop RJ, Collins EC, Darling RJ, et al. Development of a novel antibody to calcitonin gene-related peptide for the treatment of osteoarthritis-related pain. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2014;22(4):578-585. doi:10.1016/j.joca.2014.01.009
73. HIGHLIGHTS of PRESCRIBING INFORMATION. Accessed August 9, 2022. <https://pi.lilly.com/us/emgality-uspi.pdf>
74. Lamb YN. Galcanezumab: First Global Approval. *Drugs*. 2018;78(16):1769-1775. doi:10.1007/s40265-018-1002-7
75. Skljarevski V, Oakes TM, Zhang Q, et al. Effect of Different Doses of Galcanezumab vs Placebo for Episodic Migraine Prevention. *JAMA Neurology*. 2018;75(2):187. doi:10.1001/jamaneurol.2017.3859
76. Wells RE, Bertisch SM, Buettner C, Phillips RS, McCarthy EP. Complementary and Alternative Medicine Use Among Adults With Migraines/Severe Headaches. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*. 2011;51(7):1087-1097. doi:10.1111/j.1526-4610.2011.01917.x
77. Barbiroli B, Montagna P, Cortelli P, et al. Abnormal brain and muscle energy metabolism shown by ³¹P magnetic resonance spectroscopy in patients affected by migraine with aura. *Neurology*. 1992;42(6):1209-1209. doi:10.1212/wnl.42.6.1209
78. Watanabe H, Kuwabara T, Ohkubo M, Tsuji S, Yuasa T. Elevation of cerebral lactate detected by localized sup 1 H-magnetic resonance spectroscopy in migraine during the interictal period. *Neurology*. 1996;47(4):1093-1095. doi:10.1212/wnl.47.4.1093
79. Schoenen J, Jacquy J, Lenaerts M. Effectiveness of high-dose riboflavin in migraine prophylaxis A randomized controlled trial. *Neurology*. 1998;50(2):466-470. doi:10.1212/wnl.50.2.466

80. Puledda F, Shields K. Non-Pharmacological Approaches for Migraine. *Neurotherapeutics*. 2018;15(2):336-345. doi:10.1007/s13311-018-0623-6
81. Sándor PS, Di Clemente L, Coppola G, et al. Efficacy of coenzyme Q10 in migraine prophylaxis: a randomized controlled trial. *Neurology*. 2005;64(4):713-715. doi:10.1212/01.WNL.0000151975.03598.ED
82. Slater SK, Nelson TD, Kabbouche MA, et al. A randomized, double-blinded, placebo-controlled, crossover, add-on study of CoEnzyme Q10 in the prevention of pediatric and adolescent migraine. *Cephalalgia: An International Journal of Headache*. 2011;31(8):897-905. doi:10.1177/0333102411406755
83. Woolf CJ, Thompson SWN. The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-d-aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states. *Pain*. 1991;44(3):293-299. doi:10.1016/0304-3959(91)90100-c
84. Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB. Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature*. 1984;309(5965):261-263. doi:10.1038/309261a0
85. Ma QP, Woolf CJ. Noxious stimuli induce an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent hypersensitivity of the flexion withdrawal reflex to touch: implications for the treatment of mechanical allodynia. *Pain*. 1995;61(3):383-390. doi:10.1016/0304-3959(94)00195-k
86. Rajapakse T, Pringsheim T. Nutraceuticals in Migraine: A Summary of Existing Guidelines for Use. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*. 2016;56(4):808-816. doi:10.1111/head.12789
87. Diener HC, Rahlfs VW, Danesch U. The first placebo-controlled trial of a special butterbur root extract for the prevention of migraine: reanalysis of efficacy criteria. *European Neurology*. 2004;51(2):89-97. doi:10.1159/000076535
88. Kelly RB, Willis J. Acupuncture for Pain. *American Family Physician*. 2019;100(2):89-96. Accessed August 9, 2022. <https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2019/0715/p89.html>

89. Cho ZH, Chung SC, Jones JP, et al. New findings of the correlation between acupoints and corresponding brain cortices using functional MRI. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(5):2670-2673. doi:10.1073/pnas.95.5.2670
90. Kaptchuk TJ. Acupuncture: Theory, Efficacy, and Practice. *Annals of Internal Medicine*. 2002;136(5):374. doi:10.7326/0003-4819-136-5-200203050-00010
91. Dimitrova A, Murchison C, Oken B. Acupuncture for the Treatment of Peripheral Neuropathy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 2017;23(3):164-179. doi:10.1089/acm.2016.0155
92. Li M, Niu J, Yan P, et al. The effectiveness and safety of acupuncture for depression: An overview of meta-analyses. *Complementary Therapies in Medicine*. 2020;50:102202. doi:10.1016/j.ctim.2019.102202
93. Qin X, Coyle M, Yang L, et al. Acupuncture for recurrent urinary tract infection in women: a systematic review and meta-analysis. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 2020;127(12):1459-1468. doi:10.1111/1471-0528.16315
94. Doll E, Threlkeld B, Graff D, et al. Acupuncture in Adult and Pediatric Headache: A Narrative Review. *Neuropediatrics*. Published online August 29, 2019. doi:10.1055/s-0039-1695785
95. Patel P, Minen MT. Complementary and Integrative Health Treatments for Migraine. *Journal of neuro-ophthalmology : the official journal of the North American Neuro-Ophthalmology Society*. 2019;39(3):360-369. doi:10.1097/WNO.0000000000000841
96. Cuttler C, Spradlin A, Cleveland MJ, Craft RM. Short- and Long-Term Effects of Cannabis on Headache and Migraine. *The Journal of Pain*. Published online November 2019. doi:10.1016/j.jpain.2019.11.001
97. Pini LA, Guerzoni S, Cainazzo MM, et al. Nabilone for the treatment of medication overuse headache: results of a preliminary double-blind, active-controlled, randomized trial. *The Journal of Headache and Pain*. 2012;13(8):677-684. doi:10.1007/s10194-012-0490-1

98. Greco R, Demartini C, Zanaboni AM, Piomelli D, Tassorelli C. Endocannabinoid System and Migraine Pain: An Update. *Frontiers in Neuroscience*. 2018;12. doi:10.3389/fnins.2018.00172
99. Cooper ZD, Craft RM. Sex-Dependent Effects of Cannabis and Cannabinoids: A Translational Perspective. *Neuropsychopharmacology*. 2017;43(1):34-51. doi:10.1038/npp.2017.140
100. Stith SS, Diviant JP, Brockelman F, et al. Alleviative effects of Cannabis flower on migraine and headache. *Journal of Integrative Medicine*. Published online July 2020. doi:10.1016/j.joim.2020.07.004
101. Boehnke KF, Scott JR, Litinas E, et al. Cannabis Use Preferences and Decision-making Among a Cross-sectional Cohort of Medical Cannabis Patients with Chronic Pain. *The Journal of Pain*. Published online May 2019. doi:10.1016/j.jpain.2019.05.009
102. Baron EP, Lucas P, Eades J, Hogue O. Patterns of medicinal cannabis use, strain analysis, and substitution effect among patients with migraine, headache, arthritis, and chronic pain in a medicinal cannabis cohort. *The Journal of Headache and Pain*. 2018;19(1). doi:10.1186/s10194-018-0862-2
103. Klimkiewicz A, Jasińska A. Zdrowotne następstwa rekreacyjnego używania kannabinoidów. *Via Medica*. 2018;15(1732-9841):1-5.

ZASTOSOWANIE KOMÓREK MACIERZYSTYCH W LECZENIU ZABURZEŃ NEUROLOGICZNYCH

Aleksandra Kaluża, Julia Kaczmarczyk, Krzysztof Gładkowski, Rafał Górka

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

Abstrakt: Komórki macierzyste znajdują zastosowanie w wielu gałęziach medycyny. Ze względu na wzrost występowania chorób neurologicznych w populacji, w wyniku większego narażenia na czynniki stresowe oraz dożywania późnego wieku, znaleziono dla nich zastosowanie w leczeniu również tych schorzeń. Prowadzone obecnie badania wykazują wysoki potencjał komórek macierzystych do zastosowania ich w leczeniu chorób układu nerwowego, jak na przykład urazy mózgu czy udary. Współczesna medycyna regeneracyjna w zakresie neurologii odchodzi od stosowania komórek pochodzenia embrionalnego i płodowego a skupia się na wykorzystaniu indukowanych pluripotencjalnych oraz mezenchymalnych komórek macierzystych. W związku z niedawnym rozwojem tych technik leczenia część badań skoncentrowana jest na udowodnieniu bezpieczeństwa, wykonalności i skuteczności ich zastosowania.

Słowa kluczowe: komórki macierzyste, udar niedokrwienny, urazowe uszkodzenie mózgu

Abstract: Stem cells are used in many branches of medicine. Recent discoveries show that those cells could help in the treatment of increasing in the occurrences neurological diseases caused by greater exposure to stress factors and living into old age. Currently conducted research shows a high potential of stem cells usage in the treatment of diseases of the nervous system, such as brain injuries and strokes. Modern regenerative medicine in the field of neurology departs from the use of cells of embryonic and fetal origin and focuses on the use of induced pluripotent and mesenchymal stem cells. Due to the recent development of stem cell treatment techniques, some research is focused on proving the safety, feasibility and effectiveness of their use.

Keywords: stem cells, ischemic stroke, traumatic brain injury

1. Wstęp

Ilość osób chorujących na schorzenia układu nerwowego na świecie wzrasta. Coraz częściej wspomina się o nich jako o głównych przyczynach zgonów i niepełnosprawności. W skali globalnej obciążenie zaburzeniami neurologicznymi, mierzone wskaźnikiem DALY, stale rośnie^{1,2}. Z pomocą przychodzi w tym obszarze rozwój terapii komórkowych. Obecnie medycyna regeneracyjna w zakresie neurologii korzysta głównie z indukowanych pluripotencjalnych oraz mezenchymalnych komórek macierzystych w leczeniu chorób neurologicznych. Celem niniejszego rozdziału jest przedstawienie zastosowania komórek macierzystych w leczeniu wybranych schorzeń neurologicznych.

2. Regeneracja ośrodkowego układu nerwowego

Przez wiele lat panowało przekonanie, że komórki ośrodkowego układu nerwowego (OUN) nie podlegają regeneracji a neurogeneza nie zachodzi w mózgu osoby dorosłej. Odkąd w 1962 roku podważono tę koncepcję³, pojawiają się coraz nowsze badania dowodzące tworzenia się nowych neuronów w dorosłych mózgach⁴. W dojrzałym mózgu istnieją dwa regiony neurogenne: strefa okołokomorowa komór bocznych (SVZ) oraz strefa podziarnista zakrętu zębatego hipokampa. Znajdujące się tam neuronalne komórki macierzyste różnicują się do trzech typów komórek: neuronów, astrocytów oraz oligodendrocytów⁵. Jak dowodzą najnowsze badania, również komórki macierzyste mogą wpływać na proces regeneracji struktur układu nerwowego, wykazując zaangażowanie bezpośrednio w odbudowę tkanki, integrując się z pozostałymi komórkami lub pośrednio wydzielając czynniki przeciwdziałające apoptozie komórek. Niestety, pierwszy z wymienionych sposobów nie przynosi zadowalających efektów, w efekcie to właśnie ich parakrynną rolę jest głównym celem optymalizacji użycia komórek macierzystych w neurologii⁶.

3. Komórki macierzyste

Komórki macierzyste są niezróżnicowane i charakteryzują się możliwością samoodnowy. Ze względu na ich potencjał klasyfikujemy je w 5 grup: toti-, pluri-, multi-, oligo- oraz unipotencjalne. Z każdym kolejnym etapem ilość typów komórek, do których mogą się różnicować, zmniejsza się. Komórka unipotencjalna będzie mogła dojrzeć tylko do jednego rodzaju komórek w odróżnieniu od totipotencjalnej, która może różnicować się do wszystkich

tkanek organizmu oraz struktur pozazarodkowych⁷. Na potrzeby tego rozdziału omówione zostaną jedynie komórki pluripotencjalne oraz multipotencjalne. Pluripotencja wyraża się w możliwości wytworzenia komórek trzech listów zarodkowych: ektodermy, mezodermy i endodermy. Po raz pierwszy pozyskane zostały z wężła zarodkowego blastocysty. Z powodu kontrowersji wynikających ze źródła pochodzenia embrionalnych komórek macierzystych (ESCs) konieczne było znalezienie innego sposobu ich pozyskiwania⁸. Możliwe rozwiązanie pojawiło się wraz z wynikiem przełomowych badań, jakich dokonał zespół kierowany przez prof. Shinya Yamanakę, w których uzyskano indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (iPSCs – induced pluripotent stem cells)^{9,10}. Otrzymuje się je z genetycznie przeprogramowanych dorosłych komórek somatycznych¹¹. Mogą zostać przekształcone poprzez retrowirusową infekcję, powodującą przejściową ekspresję czterech genów: Oct-3/4, Sox2, c-Myc oraz Klf4¹². Wykorzystywanie iPSCs pozwala na osiągnięcie poziomu pluripotencji porównywalnego do komórek embrionalnych, jednocześnie nie powodując problemów natury etycznej, występujących przy ingerencji w ludzki zarodek w przypadku ESCs¹³.

Komórki macierzyste znajdujące się w większości tkanek i wykazujące multipotencję mogą różnicować się do komórek jednego lista zarodkowego – mezodermy. Mezenchymalne komórki macierzyste (MSCs) są przykładem komórek multipotentnych. Pozyskać można je m.in. ze szpiku kostnego, tkanki tłuszczowej, galarety Whartona sznura pępowinowego lub krwi pępowinowej¹⁰. Wykorzystanie ich do naprawy tkanki neuronalej odbyło się na zasadzie transdycerencji, komórki pochodzenia mezenchymalnego zostały zróżnicowane w tkankę pochodzenia ektodermalnego⁸. Mają zdolność migracji do uszkodzonej tkanki w celu pobudzenia jej naprawy, redukują apoptozę komórek biorcy oraz indukują angiogenezę¹⁴.

Wymienione rodzaje komórek macierzystych znalazły potencjalne zastosowanie w leczeniu nabytych urazów mózgu. Badania przedkliniczne dały obiecujące wyniki, które zostaną zrewidowane w trwających badaniach klinicznych.

4. Urazowe uszkodzenie mózgu

Urazowe uszkodzenie mózgu (TBI – traumatic brain injury), powstające na skutek zadziałania zewnętrznej siły mechanicznej, jest przyczyną dużej ilości zgonów oraz wielu przypadków nabytej niepełnosprawności intelektualnej wśród młodych ludzi w krajach rozwiniętych¹⁵. Uraz powoduje pęknięcie

bariery krew-mózg, masywne zapalenie tkanki nerwowej oraz śmierć neuronów. Kolejną fazą jest drugi uraz pojawiający się po 1-3 dni po urazie pierwotnym. Trwa on tygodniami lub miesiącami. Postępujące uszkodzenia są związane z brakiem równowagi jonowej i dysfunkcją mitochondriów, powodując neurodegenerację^{16,17}. W przypadku urazu przedstawione wcześniej neuronalne komórki macierzyste pochodzące z SVZ oraz hipokampa otrzymują sygnały stymulujące do rozpoczęcia neurogenezy¹⁸.

4.1. Mezenchymalne komórki macierzyste w TBI

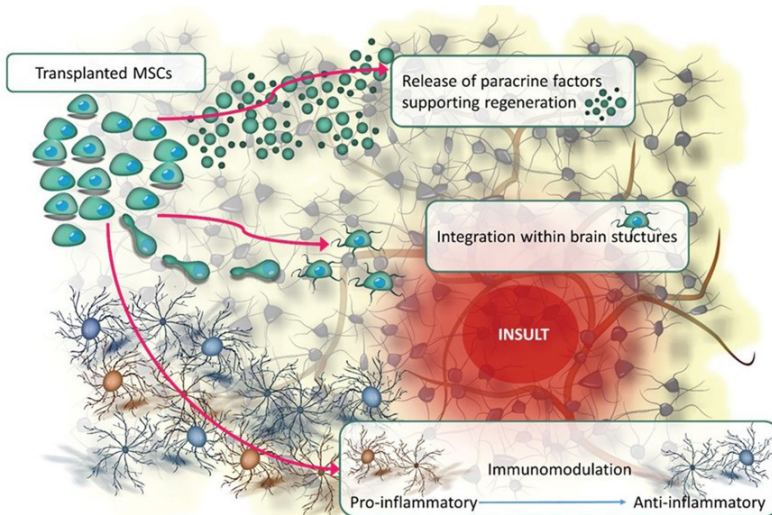
Dotychczasowe prace badawcze przeprowadzane były głównie na zwierzętach, ze względu na ograniczenia w możliwościach obserwacji i kontroli badań u ludzi oraz zbyt duże ryzyko ciężące na eksperymentach obejmujących ludzki ośrodkowy układ nerwowy. W mózгах szczurów przeszczep MSCs obniża poziom genów prozapalnych, a zwiększa poziom przeciwzapalnych. Stymulują one naturalnie występujące mechanizmy naprawcze¹⁹. Badania przedkliniczne dostarczyły informacji o zdolności neuronalnych oraz mezenchymalnych komórek macierzystych do regeneracji uszkodzonej tkanki nerwowej^{15,20}. Wzrastająca liczba badań klinicznych z udziałem ludzi wydaje się być dowodem na duży potencjał komórek macierzystych w leczeniu urazów mózgu i rozwój medycyny regeneracyjnej mogącej coraz skuteczniej unikać ograniczeń.

W badaniu przeprowadzonym przez S. Wanga i in. wśród grupy 40 pacjentów zdiagnozowanych z następstwami TBI, dysfunkcją OUN, u których nie wykonano żadnego zabiegu w ciągu 3 miesięcy od rozpoczęcia badania, który mógłby zakłócić ocenę jego skutków. Spośród wyselekcjonowanej grupy 20 pacjentów stanowiło grupę kontrolną, natomiast 20 zostało poddanych czterem przeszczepom komórek macierzystych poprzez punkcje lędźwiowe. Odpowiednio przygotowane MSCs, pobrane z pępowiny (UC-MSCs – umbilical cord MSCs), zostały wprowadzone przez nakłucie w miejscowo znieczulone przestrzenie międzykręgowe 3-4 lub 4-5 kręgów lędźwiowych. Do przestrzeni podpajęczynówkowej wstrzyknięto 2 ml zawiesiny komórek macierzystych. Procedurę powtórzono 4 razy w ciągu 5-7 dni. Obserwowana poprawa funkcji neurologicznych, obserwowana po 6 miesiącach od przeszczepu, pozwala wnioskować, że przeszczep UC-MSCs może być skuteczną metodą poprawy jakości życia osób po przebytych urazie mózgu i jego następstwach²¹.

Kolejnym rodzajem komórek macierzystych wykorzystanych w badaniach nad terapią komórkową w urazowym uszkodzeniu mózgu są MSCs

pochodzenia szpikowego (BM-MSCs – bone marrow MSCs). Wśród 97 pacjentów po przebytych urazach mózgu (w tym 24 w stanie wegetatywnym oraz 73 z zaburzeniami funkcji motorycznych) przeprowadzono, podobnie jak we wcześniej przywołanym badaniu, przeszczep komórek do przestrzeni podpajęczynówkowej za pomocą punkcji lędźwiowej. Z tą różnicą, że wprowadzane komórki, pobrane ze szpiku kostnego, pochodziły od autologicznego dawcy. Po 14 dniach od terapii 37% poddanych jej pacjentów wykazało poprawę funkcji neurologicznych. Badanie to uwidocznilo również, że młodszy ludzie efektywniej reagują na terapię niż starsi. Kluczowy jest także czas rozpoczęcia terapii – im szybciej zostanie wdrożona, tym lepsze efekty zostaną zaobserwowane²². U osób starszych konieczne może być użycie dodatkowych metod terapii, takich jak hipotermia oraz elektryczna stymulacja, jednocześnie z przeszczepem komórek macierzystych, a u osób młodszych, w wyniku ich większej podatności na terapię komórkową, mogą nie być one niezbędne do pobudzenia regeneracji neuronów²³.

Jak już wcześniej wspomniano, głównym mechanizmem wpływającym na naprawę tkanki nie jest samo zastępowanie uszkodzonych komórek, lecz parakryne wydzielanie czynników troficznych oraz immunomodulujących [rycina 1]^{19,21,24}.



Rycina 1. Wpływ przeszczepionych mezenchymalnych komórek macierzystych na regenerację w chorobach neurologicznych¹⁹

4.2. Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste w TBI

Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste wciąż są poddawane badaniom przedklinicznym w modelach mysich oraz szczurzych urazowego uszkodzenia mózgu. Pierwszym przykładem może być opublikowane przez H. Tang i in. badanie polegające na wprowadzeniu iPSCs do uszkodzonej tkanki mózgowej szczurów. Do pozyskania iPSCs wyizolowano fibroblasty ludzkie ze skóry głowy podczas operacji nagłego urazu, następnie przy udziale opisanych wcześniej retrowirusowych czynników transkrypcyjnych uzyskano pluripotencję. Kolejnym etapem było wstępne zróżnicowanie otrzymanych komórek do neuronalnych komórek macierzystych (NSCs – neural stem cells) i wprowadzenie przez bezpośrednią iniekcję do kory mózgu zwierzęcia. Późniejsze kontrole wykazały migrację i implantację NSCs w miejscu uszkodzenia tkanki. Badania immunohistochemiczne wykazały natomiast różnicowanie się NSCs do funkcjonalnych neuronów²⁵. Podobnie fibroblasty pobrane z mysich zarodków (MEFs – mouse embryonic fibroblasts) indukowane do iPSCs i przeszczepione do uszkodzonej tkanki mózgowej szczurów wykazały różnicowanie do oligodendrocytów²⁶. Badania Wei i in.²⁷ oraz Dunkersona²⁸ i in. wykazały wpływ iPSCs na regulację czynników regeneracyjnych oraz hamowanie wytwarzania cytokin prozapalnych.

Ocena skali objawów neurologicznych oraz testy motoryczne dostarczyły dowodów na wartość terapeutyczną iPSCs w urazowym uszkodzeniu mózgu u szczurów. Zwiększa to szanse na coraz bardziej zaawansowane badania, również kliniczne, a w przyszłości wykorzystanie ich w leczeniu ludzi po przebytym urazowym uszkodzeniu mózgu.^{25,26,27}

5. Udar niedokrwienny

Udar niedokrwienny, w wyniku okluzji naczynia tętniczego mózgu, prowadzi do niedotlenienia tkanki, narastania obrzęku wewnątrzkomórkowego i ostatecznie do śmierci neuronów na drodze apoptozy²⁹. Wyzwanie przed naukowcami stawia fakt, że w następstwie udaru, destrukcja obejmuje różne typy komórek, wspólnie z komórkami nerwowymi apoptozie ulegają astrocyty i komórki mikrogleju, ale także komórki śródbłonka i perycyty³⁰. W rezultacie konieczne może być wprowadzenie w różnych lokalizacjach kilku typów komórek lub jednej multipotencjalnej linii komórkowej, zdolnej do różnicowania w więcej niż jedną linię komórkową³¹.

5.1. Mezenchymalne komórki macierzyste w udarze niedokrwiennym

W przypadku udaru, podobnie jak przy urazie mechanicznym, badania przedkliniczne wykazały, że przeszczepienie MSCs we wczesnym stadium wpływa na zmianę stosunku fenotypów mikrogleju na korzyść komórek przeciwwzapalnych³². Istnieje coraz więcej dowodów na to, że MSCs sprzyjają regeneracji funkcjonalnej w modelach zwierzęcych^{31,33}.

W badaniu przeprowadzonym przez K. Lui i in. mezenchymalne komórki macierzyste zostały uzyskane ze szpiku kostnego szczurów. Po 24 godzinach od przeprowadzenia operacji zamknięcia tętnicy środkowej mózgu i jej późniejszej reperfuzji wstrzyknięto dotętniczo, po odpowiednim przygotowaniu, otrzymane uprzednio MSCs. W ciągu kolejnych dni gryzonie oceniane były pod względem funkcji motorycznych i behawioralnych, ale także rozmiar obszaru mózgu objętego procesami degeneracyjnymi podlegał analizie. Przeszczep komórek macierzystych spowodował redukcję rozmiaru zawału w porównaniu z tym występującym u grupy kontrolnej niepoddanej iniekcji. Pod względem motorycznym i behawioralnym gryzonie także wykazywały poprawę tych funkcji³⁴. To i wiele innych przedklinicznych badań^{35,36,34} dowodzą korzyści terapii komórkami macierzystymi w modelach zwierzęcych udaru niedokrwiennego mózgu.

Kolejnym etapem weryfikacji skuteczności tej terapii były badania kliniczne I fazy z udziałem pacjentów. W tym zakresie można posłużyć się przykładem artykułu opublikowanego na łamach "Annals of Neurology". Prof. Bang i in. w ramach oceny wykonalności, skuteczności i bezpieczeństwa przeszczepu autologicznych MSCs w leczeniu udaru mózgu grupę 30 pacjentów z zawałami mózgu w obrębie tętnicy środkowej mózgu i z ciężkimi deficytami neurologicznymi, podzielono na dwie podgrupy. Jedną z nich poddano przeszczepowi, druga stanowiła próbę kontrolną. Szpik kostny pobrano w znieczuleniu miejscowym z tylnego grzebienia biodrowego pacjentów z grupy pierwszej. Po odpowiednim przygotowaniu i koniecznej kontroli uzyskane MSCs zostały podane wlewem dożylnym pacjentom w dwóch dawkach tj. 4-5 oraz 7-9 tygodni po zaobserwowaniu objawów uszkodzenia tkanki mózgowej. Kontrolne badania nie wykazały zgonów, nawrotów udaru lub poważnych zdarzeń niepożądanych związanych z terapią. Potrzebne są dodatkowe badania dotyczące czasu przeszczepu jednak powinien on uwzględniać naturalny przebieg powrotu do zdrowia po udarze. Diagnostyka obrazowa wskazała wysoką żywotność przeszczepionych komórek³³. Brak możliwości przeanalizowania mechanizmów naprawczych tkanki jest powodem trudności

w dokładnym opracowaniu terapii³¹. Sugeruje się jednak, że za naprawę odpowiada zwiększanie endogennych mechanizmów regeneracji związanych z produkcją czynników troficznych przez MSCs³³. Przytoczone badanie wraz z kilkoma innymi^{32,33,37} dowodzi, że dożylna wstrzyknięcie autologicznych komórek MSC jest bezpieczną i wykonalną metodą leczenia udaru niedokrwiennego, chociaż jej skuteczność nadal wymaga optymalizacji

5.2. Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste w udarze niedokrwiennym mózgu

Drugim rodzajem komórek, które przejawiają zadowalające efekty w terapii udaru w modelach zwierzęcych są indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste. Zespół J. Wang i in. porównywał na grupie 24 szczurów (8 osobników na każdą podgrupę) skuteczność przeszczepu iPSCs, ESCs oraz wlewu buforowanej fosforanem soli fizjologicznej 3 dni po uprzednio indukowanej okluzji tętnicy środkowej mózgu z reperfuzją po 90 minutach. ESCs oraz iPSCs otrzymane zgodnie z protokołem opracowanym przez wspomnianego już Yamanakę i in.¹³ oraz znakowane fludeoksyglukozą (18F) wszczepione zostały bezpośrednio do lewej komory bocznej mózgu gryzoni. Przez 4 tygodnie poddawane były analizie funkcji motorycznych przy pomocy pozytonowej tomografii emisyjnej (PET - positron emission tomography) oraz odpowiednich testów neurologicznych. Zwiększoną akumulację znacznika w okolicy zawału zaobserwowano w przypadku obu rodzajów komórek macierzystych. Prowadzi to do wniosku o migracji komórek do miejsca uszkodzenia oraz wzroście metabolizmu glukozy w miejscu urazu po przeszczepie. Optymistyczny jest również fakt braku rozwoju potworkiaka lub guza. Jako mechanizm wpływający na regenerację sugeruje się różnicowanie iPSCs do neuronalnych linii komórkowych, zmianę mikrośrodowiska, wydzielanie czynników troficznych, neuroprotektynnych oraz wspieranie angiogenezy. Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste wydają się być zachęcającym elementem do badań nad skutecznością terapii komórkowej w udarze niedokrwiennym mózgu³⁸.

6. Podsumowanie

Terapia komórkami macierzystymi jest intensywnie rozwijającą się dziedziną medycyny regeneracyjnej. Potencjał do naprawy uszkodzonej tkanki nerwowej wykazują komórki pochodzenia embrionalnego, płodowego, mezenchymalnego oraz, niedawno uzyskane w wyniku przełomowych badań,

indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste. W badaniach przedklinicznych wykazały swoją skuteczność w terapii urazowego uszkodzenia mózgu oraz udaru niedokrwienne. Wykorzystanie embrionalnych i płodowych komórek niesie za sobą dylematy etyczne. Z kolei indukowane pluripotencjalne mają ogromny potencjał, niezbędne natomiast będzie udoskonalenie metodologii ich uzyskiwania oraz dalsza ocena bezpieczeństwa i skuteczności. Komórki pochodzenia mezenchymalnego są obecnie najchętniej poddawany obserwacjom rodzajem komórek, mogących znaleźć zastosowanie w terapii komórkowej. Jeszcze wiele badań musi zostać przeprowadzonych w celu określenia pochodzenia komórek o najwyższej skuteczności i bezpieczeństwie, ustalenia dawki i drogi ich dostarczenia, jednak już dziś wiemy, że leczenie komórkami macierzystymi chorób neurologicznych jest obiecującym kierunkiem ku optymalizacji leczenia tych zaburzeń.

Referencje

1. Feigin VL, Nichols E, Alam T, et al. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*. 2019;18(5):459-480. doi:10.1016/s1474-4422(18)30499-x
2. Carroll WM. The global burden of neurological disorders. *Lancet Neurol*. 2019;18(5):418-419. doi:10.1016/S1474-4422(19)30029-8
3. Altman J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals?. *Science*. 1962;135(3509):1127-1128. doi:10.1126/science.135.3509.1127
4. Wiltrout C, Lang B, Yan Y, Dempsey RJ, Vemuganti R. Repairing brain after stroke: a review on post-ischemic neurogenesis. *Neurochem Int*. 2007;50(7-8):1028-1041. doi:10.1016/j.neuint.2007.04.011
5. Szablowska-Gadomska I, Bużańska L, Małecki M. Stem cell properties, current legal status and medical application. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. 2017;71(0). doi:10.5604/01.3001.0010.7733
6. Sarnowska A, Habich A, Maksymowicz W, Domańska-Janik K. Terapia komórkowa w neurologii — obawy i nadzieje. *Polski Przegląd Neurologiczny*. 2014;10(1):1-14.

7. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):68. Published 2019 Feb 26. doi:10.1186/s13287-019-1165-5
8. Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration.* 2013;85(1):3-10. doi:10.1159/000345615
9. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126(4):663-676. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024
10. Szablowska-Gadomska I, Bużańska L, Małecki M. Stem cell properties, current legal status and medical application. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej.* 2017;71(0). doi:10.5604/01.3001.0010.7733
11. Batista CE, Mariano ED, Marie SK, et al. Stem cells in neurology--current perspectives. *Arq Neuropsiquiatr.* 2014;72(6):457-465. doi:10.1590/0004-282x20140045
12. Yamanaka S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2007;1(1):39-49. doi:10.1016/j.stem.2007.05.012
13. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126(4):663-676. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024
14. Hernández AE, García E. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Alzheimer's Disease. *Stem Cells Int.* 2021;2021:7834421. Published 2021 Sep 1. doi:10.1155/2021/7834421
15. Schepici G, Silvestro S, Bramanti P, Mazzon E. Traumatic Brain Injury and Stem Cells: An Overview of Clinical Trials, the Current Treatments and Future Therapeutic Approaches. *Medicina (Kaunas).* 2020;56(3):137. Published 2020 Mar 19. doi:10.3390/medicina56030137
16. Zhao L, Liu JW, Shi HY, Ma YM. Neural stem cell therapy for brain disease. *World J Stem Cells.* 2021;13(9):1278-1292. doi:10.4252/wjsc.v13.i9.1278
17. Dekmak A, Mantash S, Shaito A, et al. Stem cells and combination therapy for the treatment of traumatic brain injury. *Behav Brain Res.* 2018;340:49-62. doi:10.1016/j.bbr.2016.12.039

18. Weston NM, Sun D. The Potential of Stem Cells in Treatment of Traumatic Brain Injury. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2018;18(1):1. Published 2018 Jan 25. doi:10.1007/s11910-018-0812-z
19. Andrzejewska A, Dabrowska S, Lukomska B, Janowski M. Mesenchymal Stem Cells for Neurological Disorders. *Adv Sci (Weinb).* 2021;8(7):2002944. Published 2021 Feb 24. doi:10.1002/adv.202002944
20. Mashkouri S, Crowley MG, Liska MG, Corey S, Borlongan CV. Utilizing pharmacotherapy and mesenchymal stem cell therapy to reduce inflammation following traumatic brain injury. *Neural Regen Res.* 2016;11(9):1379-1384. doi:10.4103/1673-5374.191197
21. Wang S, Cheng H, Dai G, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation significantly improves neurological function in patients with sequelae of traumatic brain injury. *Brain Res.* 2013;1532:76-84. doi:10.1016/j.brainres.2013.08.001
22. Tian C, Wang X, Wang X, et al. Autologous bone marrow mesenchymal stem cell therapy in the subacute stage of traumatic brain injury by lumbar puncture. *Exp Clin Transplant.* 2013;11(2):176-181. doi:10.6002/ect.2012.0053
23. Cozene B, Sadanandan N, Farooq J, et al. Mesenchymal Stem Cell-Induced Anti-Neuroinflammation Against Traumatic Brain Injury. *Cell Transplant.* 2021;30:9636897211035715. doi:10.1177/09636897211035715
24. Chen Y, Li J, Ma B, et al. MSC-derived exosomes promote recovery from traumatic brain injury via microglia/macrophages in rat [published online ahead of print, 2020 Sep 23]. *Aging (Albany NY).* 2020;12(18):18274-18296. doi:10.18632/aging.103692
25. Tang H, Sha H, Sun H, et al. Tracking induced pluripotent stem cells-derived neural stem cells in the central nervous system of rats and monkeys. *Cell Reprogram.* 2013;15(5):435-442. doi:10.1089/cell.2012.0081
26. Lyu Q, Zhang ZB, Fu SJ, Xiong LL, Liu J, Wang TH. Microarray Expression Profile of lncRNAs and mRNAs in Rats with Traumatic Brain Injury after A2B5+ Cell Transplantation. *Cell Transplant.* 2017;26(10):1622-1635. doi:10.1177/0963689717723014

27. Wei ZZ, Lee JH, Zhang Y, et al. Intracranial Transplantation of Hypoxia-Preconditioned iPSC-Derived Neural Progenitor Cells Alleviates Neuropsychiatric Defects After Traumatic Brain Injury in Juvenile Rats. *Cell Transplant.* 2016;25(5):797-809. doi:10.3727/096368916X690403
28. Dunkerson J, Moritz KE, Young J, et al. Combining enriched environment and induced pluripotent stem cell therapy results in improved cognitive and motor function following traumatic brain injury. *Restor Neurol Neurosci.* 2014;32(5):675-687. doi:10.3233/RNN-140408
29. Sveinsson OA, Kjartansson O, Valdimarsson EM. Heilablöðþurrð/heiladrep: Faraldsfræði, orsakir og einkenni [Cerebral ischemial infarction - epidemiology, causes and symptoms. *Laeknabladid.* 2014;100(5):271-279. doi:10.17992/lbl.2014.05.543
30. Hess DC, Borlongan CV. Stem cells and neurological diseases. *Cell Prolif.* 2008;41 Suppl 1(Suppl 1):94-114. doi:10.1111/j.1365-2184.2008.00486.x
31. Vora N, Jovin T, Kondziolka D. Cell transplantation for ischemic stroke. *Neurodegener Dis.* 2006;3(1-2):101-105. doi:10.1159/000092100
32. Zhang S, Lachance BB, Moiz B, Jia X. Optimizing Stem Cell Therapy after Ischemic Brain Injury. *J Stroke.* 2020;22(3):286-305. doi:10.5853/jos.2019.03048
33. Bang OY, Lee JS, Lee PH, Lee G. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann Neurol.* 2005;57(6):874-882. doi:10.1002/ana.20501
34. Liu K, Guo L, Zhou Z, Pan M, Yan C. Mesenchymal stem cells transfer mitochondria into cerebral microvasculature and promote recovery from ischemic stroke. *Microvasc Res.* 2019;123:74-80. doi:10.1016/j.mvr.2019.01.001
35. Geranmayeh MH, Nourazarian A, Avci ÇB, Rahbarghazi R, Farhudi M. Stem Cells as a Promising Tool for the Restoration of Brain Neurovascular Unit and Angiogenic Orientation. *Mol Neurobiol.* 2017;54(10):7689-7705. doi:10.1007/s12035-016-0286-4

36. Sheikh AM, Yano S, Mitaki S, Haque MA, Yamaguchi S, Nagai A. A Mesenchymal stem cell line (B10) increases angiogenesis in a rat MCAO model. *Exp Neurol.* 2019;311:182-193. doi:10.1016/j.expneurol.2018.10.001
37. Bhasin A, Kumaran SS, Bhatia R, Mohanty S, Srivastava MVP. Safety and Feasibility of Autologous Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Chronic Stroke in Indian patients. A four-year follow up. *J Stem Cells Regen Med.* 2017;13(1):14-19. Published 2017 May 30. doi:10.46582/jsrm.1301003
38. Wang J, Chao F, Han F, et al. PET demonstrates functional recovery after transplantation of induced pluripotent stem cells in a rat model of cerebral ischemic injury. *J Nucl Med.* 2013;54(5):785-792. doi:10.2967/jnumed.112.111112

ZASTOSOWANIE NOŻA GAMMA W LECZENIU NERWOBÓLU NERWU TRÓJDZIELNEGO ORAZ CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA POWODZENIE TERAPII

MARTA LEIDGENS, ANGELIKA GARBACIK

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

Abstrakt: Neuralgia nerwu trójdzielnego charakteryzuje się nawracającymi, jednostronnymi, krótkimi bólami, o nagłym początku i zakończeniu, podobnymi w odczuciu do porażenia prądem. Zaburzenie to może dotyczyć jednej lub więcej gałęzi n. V, a czynnikiem wywołującym ból są bodźce nieszkodliwe. Dodatkowo możliwe jest występowanie stałego bólu o umiarkowanym nasileniu. Ze względu na uciążliwy charakter schorzenia, utrudniający codzienne funkcjonowanie, niezbędna jest odpowiednia terapia. Dostępne metody obejmują leczenie farmakologiczne i/lub chirurgiczne, w tym radiochirurgię Gamma Knife, która jest od dawna z powodzeniem stosowana w tym przypadku, nadal ciesząc się opinią metody innowacyjnej. Dzięki jej rutynowemu stosowaniu w leczeniu nerwobólu n. V wysunięto wnioski dotyczące czynników anatomicznych i radiochirurgicznych oraz ich ewentualnym wpływie na powodzenie terapii, co ma kluczowe znaczenie dla dalszego udoskonalania tej rewolucyjnej metody.

Słowa kluczowe: Gamma Knife, neuralgia, nerw trójdzielny, radiochirurgia.

Abstract: Trigeminal neuralgia is characterized by recurrent, one-sided, short pains of sudden onset and ending, similar in sensation to an electric shock. The disorder may affect one or more branches of the fifth cranial nerve, and the pain is caused by harmless stimuli. Additionally, it is possible to experience moderate pain that is constant. Due to the troublesome nature of the disease, which hinders everyday functioning, appropriate therapy is required. The available methods include pharmacological and/or surgical treatment - also the Gamma Knife radiosurgery, which has been successfully used in this case for a long time. This method is still considered to be innovative. Due to its routine use in the treatment of neuralgia of CN V conclusions have been drawn regarding the anatomical and radiosurgical factors and their possible impact on the success of therapy, which is of key importance for the further improvement of this revolutionary method.

Keywords: Gamma Knife, neuralgia, trigeminal nerve, radiosurgery.

1. Wstęp

Nerw trójdzielny jest największym nerwem czaszkowym i ma charakter mieszany czuciowo-ruchowy. W jego skład wchodzi nerw oczny, nerw szczękowy oraz nerw żuchwowy. Schorzenia tego nerwu, ze względu na dwoistość unerwienia, mogą obejmować zarówno część ruchową n. V, jak i jego część czuciową. Na podstawie wyników badań obrazowych została stworzona klasyfikacja pierwotnej neuralgii nerwu trójdzielnego, która dzieli ją na idiopatyczną oraz klasyczną. Postać klasyczna jest opisywana jako TN1 natomiast postać idiopatyczna jako TN2¹. Neuralgia nerwu V jest najczęstszą postacią neuropatii występujących w populacji - co roku stwierdza się od 4 do 13 zachorowań/ 100 000 osób². Częściej występuje u osób starszych, powyżej 60. roku życia. Jest ona opisywana jako jeden z najcięższych i najbardziej dokuczliwych rodzajów bólu, o charakterystyce porównywalnej do porażenia prądem elektrycznym^{3,4}. Napad nerwobólu nie jest poprzedzony okresem prodromalnym, jest jednostronny i może być wywołany przez nawet najdelikatniejsze czynniki takie jak golenie twarzy, dotyk czy mocniejszy powiew wiatru. Często towarzyszy mu skurcz w tej samej części twarzy. Objawowy okres trwania napadu szacuje się na kilka sekund do kilku minut, lecz może pojawiać się u pacjenta nawet kilkanaście razy w ciągu dnia. Warto podkreślić, że jest to typ bólu, który nie zakłóca snu^{3,5}.

Ze względu na uciążliwy charakter, choroba ta u wielu pacjentów może doprowadzić do ciężkiej nerwicy czy zaburzeń odżywiania spowodowanych chęcią unikania spożywania pokarmów, które wywołują napad co w dalszej kolejności prowadzi do wyniszczenia³. Badanie oparte na szpitalnej skali lęku i depresji przeprowadzone w Wielkiej Brytanii wykazało, że wśród chorych występuje duża częstotliwość lęku - u ponad 50% respondentów oraz depresji - u 36%¹.

Istnieje wiele metod leczenia i prowadzenia terapii neuralgii, które podzielić można na metody farmakologiczne i chirurgiczne. Wśród metod zachowawczych zastosowanie znajdują leki przeciwbólowe, leki przeciwpadaczkowe oraz witaminy z grupy B. Złożona terapia wieloma środkami wiąże się jednak występowaniem licznych działań niepożądanych. Lekami pierwszego rzutu są karbamazepina oraz okskarbazepina, a jeśli są one nieskuteczne można rozważyć dołączenie bądź włączenie w monoterapii gabapentyny, baklofenu czy fenytoiny. Dodatkową praktyką znajdującą zastosowanie w wielu przypadkach jest blokada lignokainowa podawana w okolice ujść obwodowych gałązek nerwu trójdzielnego^{2,5}.

Jedną z nowszych metod jest ostrzykiwanie gałązek nerwu trójdzielnego toksyną botulinową typu A, lecz dokładna ocena skuteczności tej terapii wymaga jeszcze potwierdzenia w badaniach klinicznych¹. Starszą metodą jest alkoholizacja 96% jałowym alkoholem etylowym z lignokainą. Niestety metody nieinwazyjne stosowane w leczeniu nerwobólu n. V nie wykazują zadowalającej skuteczności, a ich stosowanie powiązane jest z ogromną liczbą mniej lub bardziej dotkliwych powikłań, spośród których wspomnienia wymagają przypadki martwicy nerwu trójdzielnego, otaczających go tkanek miękkich, a także kości. Z tego względu lekarze coraz częściej skłaniają się ku stosowaniu metod chirurgicznych w łagodzeniu i znoszeniu dolegliwości spowodowanych neuralgią nerwu V, jednakże brak jest jednoznacznych dowodów przemawiających za skutecznością bardzo wczesnego zastosowania neurochirurgicznych metod radzenia sobie z dolegliwościami u pacjentów⁵

Europejskie Towarzystwo Neurologiczne zaleca podjęcie próby zastosowania leczenia farmakologicznego oraz monitorowanie pacjenta przez pewien, niestety nieokreślony jednoznacznie czas, przed wykonaniem zabiegu chirurgicznego¹.

Według najnowszych wytycznych postępowania inwazyjnego w leczeniu neuralgii n. V, pierwszym wyborem w przypadku neuralgii klasycznej jest zastosowanie dekompresji mikronaczyniowej. Wykorzystuje się również procedury ablacyjne - jako monoterapię, bądź w połączeniu z wyżej omawianą metodą. Coraz większe znaczenie zyskuje zastosowanie radiochirurgii Gamma Knife².

2. Gamma Knife

Począwszy od 1968 r. nóż gamma odgrywa istotną rolę w radiochirurgii⁶. Zasadą działania owego urządzenia jest wysoce dokładna koncentracja w izocentrum wielu małośrednicowych wiązek promieniowania gamma wytwarzanego z kobaltu-60, formowanych przez kolimatory o średnicy 4 mm, 8 mm i 16 mm⁷⁻⁹. Rozpad ⁶⁰Co do Ni prowadzi do emisji 1 elektronu, który jest absorbowany jeszcze przed dotarciem do pacjenta i 2 kwantów promieniowania γ , które odpowiada za wywołanie uszkodzeń komórek w miejscu docelowym^{7,10}. Doskonałe wyniki kliniczne gwarantuje dokładność radiologiczna wynosząca 0,50 mm¹¹.

Christer Lindquist wyjaśnił, że chirurgia Gamma Knife (ang. *Gamma Knife Surgery*, GKS) jest skomplikowaną procedurą, na którą składają się cztery etapy¹⁰. Postępowanie obejmuje nałożenie ramy stereotaktycznej na głowę

pacjenta w znieczuleniu miejscowym, akwizycję obrazu stereotaktycznego, planowanie leczenia (oparte o badania obrazowe i wsparte odpowiednim systemem - Leksell Gamma Plan) oraz samą radioterapię^{9,10}.

Warto zaznaczyć, że nóż gamma znajduje szerokie zastosowanie w leczeniu szeregu schorzeń tj. guzy przerzutowe do mózgu, oponiaki podstawy czaszki, glejaki nerwu wzrokowego, przyzwojaki, nerwiaki nerwów czaszkowych (np. nerwu trójdzielnego), czaszkogardlaki, guzy przysadki czy gałki ocznej, hamartoma, naczyniaki, drżenie w chorobie Parkinsona, padaczka, a także neuralgie^{9,10} - w tym neuralgia nerwu trójdzielnego^{7,10}.

3. GKS w terapii neuralgii nerwu trójdzielnego

Radiochirurgia Gamma Knife jest jedyną dostępną metodą leczenia neuralgii nerwu trójdzielnego, która łączy w sobie charakter destrukcyjny zabiegów ablacyjnych oraz nieinwazyjność^{1,12,13}. Terapia ma na celu doprowadzenie do możliwie najskuteczniejszej i najbardziej długotrwałej kontroli bólu, przy jednoczesnej maksymalnej redukcji ryzyka hipostezji w obrębie twarzy¹⁴, będącej najczęstszym działaniem niepożądanym¹⁵.

3.1. Wskazania

Z racji, że radiochirurgia nerwobólu trójdzielnego jest stosunkowo bezpieczną metodą terapeutyczną, jest ona dobrym wyborem dla pacjentów cierpiących na liczne choroby współistniejące lub opornych na leczenie metodami farmakologicznymi czy pozostałymi metodami chirurgicznymi, szczególnie jeśli w badaniach obrazowych nie jest widoczny konflikt nerwowo-naczyniowy^{13,16}. Kandydatami do leczenia tą metodą są także pacjenci, u których operacja otwarta nie wydaje się być najlepszym rozwiązaniem, osoby w podeszłym wieku oraz każdy chory wyrażający wyraźną preferencję względem tej metody terapii¹⁶. Pojawiają się również sugestie, jakoby radiochirurgia stereotaktyczna miała być metodą z wyboru leczenia pacjentów z nawrotem klasycznej odmiany neuralgii trójdzielnej^{4,17}.

3.2. Przebieg leczenia

W trakcie zabiegu do korzenia nerwu trójdzielnego dostarczana jest dawka promieniowania w zakresie 70-90 Gy^{4,14,16,19,20}, gdyż wartości te wydają się być najbardziej efektywne^{19,21}. Zwiększenie dawki powyżej 90 Gy może

prowadzić do zwiększonej ilości powikłań, nie wnosząc jednocześnie istotnego wzrostu skuteczności leczenia^{16,18}. Target, w który kierowane są wiązki promieniowania γ nie jest przypadkowy - ustalany jest na podstawie precyzyjnego mapowania i sekwencjonowania MRI, wykonywanego po założeniu ramy stereotaktycznej^{4,19}. Jest to lokalizacja uciskana przez naczynia krwionośne, a w razie braku takiego ucisku - miejsce wyjścia nerwu V z mostu lub inna wcześniej wybrana okolica⁴. Zabieg wykonywany jest w znieczuleniu miejscowym, a dodatkowo stosowana jest łagodna sedacja doustna lub dożylna^{9,15,19}.

Reasumując, przeprowadzenie pełnego leczenia jest możliwe dzięki wdrożeniu ściśle określonej procedury w oparciu o trzy zmienne: położenie izocentrum, przepisana dawkę promieniowania gamma oraz histogram dawka-objętość (ang. *dose-volume histogram*, DVH) pnia mózgu¹. Warto podkreślić, że niepodważalnymi zaletami GKS są precyzja, minimalizacja dawki promieniowania dostarczanej poza obszar docelowy oraz czas trwania leczenia, który ogranicza się do jednego dnia^{9,19}.

4. Skuteczność terapii

W wytycznych Europejskiej Akademii Neurologii dotyczących neuralgii nerwu trójdzielnego z 2019 r. porównano dekompresję mikronaczyniową (ang. *microvascular decompression*, MVD) i chirurgię noża gamma celem odpowiedzi na pytanie: "która technika chirurgiczna zapewnia najdłuższy okres bezbolesny przy najmniejszej liczbie powikłań?". Pod uwagę wzięte zostały 4 nierandomizowane badania prospektywne (sumarycznie 561 pacjentów) i ta sama ilość nierandomizowanych badań retrospektywnych (łącznie 957 pacjentów). W wyniku całej analizy wysunięto wnioszek o wyższości MVD nad GKS, pomimo niskiej jakości posiadanych badań²². Na podstawie zarysu całokształtu sytuacji w sposób przejrzysty widoczna jest ułomność techniki jaką jest chirurgia noża gamma, jednakże pomimo tego metoda ta jest niezaprzeczalnie użyteczna i stosowana w określonych sytuacjach klinicznych, a zastanawiając się nad jej skutecznością, warto pochylić się nad wynikami różnorodnych badań naukowych.

Przegląd systematyczny autorstwa C. Tuleasca et al. objął m.in. 45 badań dotyczących GKS (5687 pacjentów), dowodząc jej średnio 84,8-procentowej skuteczności w łagodzeniu bólu z lekami lub bez i uściślając, że skuteczność ta bez zastosowania leków wynosiła ok. 53,1%. Uśredniony czas do złagodzenia bólu wyniósł 15-78 dni. Odnotowano również, że mediana dla prawdopodobieństwa wystąpienia pozabiegowej hipoestezji to 19%, a średni czas do jej

ewentualnego wystąpienia wynosił od 6 do 36 miesięcy. W opisywanym opracowaniu podkreślone zostało, iż prawdopodobieństwo wystąpienia nawrotu dolegliwości bólowych wyniosło średnio 24,6%, przy stosunkowo szerokim zakresie wynoszącym od 0 do 52,2%²³. Chcąc ocenić długotrwałą kontrolę bólu, autorzy przeglądu przytoczyli dwa badania, które potwierdzały 10-letnią skuteczność leczenia – pierwsze, autorstwa Kondziolka D. et al., wskazujące na 30-procentową jego skuteczność^{23,24} oraz drugie, przeprowadzone przez Régis J. et al., mówiące o 45,3% powodzeń^{23,25}.

5. Czynniki wpływające na skuteczność terapii

Decydując się na zastosowanie jakiegokolwiek rodzaju leczenia inwazyjnego u pacjentów z neuralgią nerwu trójdzielnego, należy początkowo rozważyć kryteria takie jak wiek, istniejące obciążenia zdrowotne i potencjalne korzyści z zastosowania wybranej metody w przyszłości⁴. Radiochirurgia Gamma Knife staje się coraz szerzej rozpowszechnioną metodą terapii, choćby ze względu na jej wysoki początkowy wskaźnik powodzenia sięgający 80-90%²⁶. Kwalifikując chorego do zastosowania tej konkretnej metody leczenia trzeba wziąć pod uwagę kilka czynników, które mogą istotnie wpływać na długotrwałe rezultaty terapii. Należą do nich zarówno czynniki radiochirurgiczne, jak i anatomiczne warunki pacjenta czy też obecność chorób towarzyszących - głównie stwardnienia rozsianego (ang. *sclerosis multiplex*, SM). W analizach wykazano bowiem, że obecność u pacjenta dodatkowego schorzenia w postaci SM jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym w długotrwałym łagodzeniu bólu spowodowanego neuralgią²⁷.

Chociaż określenie idealnej lokalizacji docelowej jest kluczowe, niestety brak jest konsensusu co do najlepszego celu radiochirurgicznego dla pacjentów z neuralgią nerwu trójdzielnego. Dotychczas nie wykazano istotnego związku między dokładną lokalizacją nerwobólu a miejscem zastosowania wiązki promieniowania, które w lepszy sposób wpłynie na długotrwałą kontrolę bólu^{26,28}.

Z wielomiesięcznych obserwacji grup pacjentów po zabiegu radiochirurgicznego leczenia neuralgii nerwu V wynika, iż istnieje szereg czynników wpływających na skuteczność i powodzenie terapii. Jedną z zasadniczych składowych jest wysokość dawki promieniowania użytego podczas zabiegu - mediana stosowanych wartości wynosi 70-90 Gy. Z wielu analiz wynika, że zastosowanie dawki promieniowania γ poniżej 80 Gy istotnie zmniejsza długotrwałe działanie związane z łagodzeniem bólu. Istotnym odkryciem jest fakt, że zwiększenie dawki powyżej 90 Gy zasadniczo nie wpływa na skrócenie

okresu łagodzenia dolegliwości bólowych, lecz wiąże się ze znacznym zwiększeniem częstości występowania powikłań. Z przeprowadzonego na 85 pacjentach randomizowanego badania klinicznego wynika, że zastosowanie dawki 75 Gy w dwóch izocentrach powodowało zwiększenie komplikacji takich jak np. niedoczulica. Kolejnym czynnikiem, który jest bezpośrednio związany ze słabym kontrolowaniem długotrwałego bólu jest dawka kalibracyjna $< 2,5 \text{ Gy/min}$ ^{26,29}.

W przypadkach ponownego zastosowania GKS w leczeniu powracającej neuralgii n. V wykazano szereg aspektów wpływających na lepsze rokowanie u pacjentów kwalifikowanych do powtórnego leczenia. Pozytywne czynniki rokownicze to: całkowite uśmierzenie bólu w początkowej fazie, zmniejszenie topograficzne odczuwanych dolegliwości po pierwszej próbie GKS oraz wyższe dawki promieniowania, niż te które były pierwotnie zastosowane w danym przypadku²⁸. Ponadto zauważono, że ponowne napromienianie i obecność stwardnienia rozsianego były niezależnymi predyktorami wystąpienia drętwienia jako powikłania po terapii Gamma Knife²⁷. W kwestii ponownego leczenia, nie wykryto związku między długością odstępów czasowych pomiędzy kolejnymi użyciami Gamma Knife oraz dawkami addytywnymi^{26,28}.

Oдноśnie uwarunkowań anatomicznych pacjenta - niestety nie zostało przyjęte wspólne stanowisko wśród badaczy, a ich zdania są wciąż podzielone. Niektóre źródła podają, że długość odcinka trójdzielnego oraz kąt mostowo-mózdzkowy nie mają wpływu na krótkoczasowe, jak i długotrwałe zmniejszenie dolegliwości bólowych²⁶, jednakże elementy te mogą mieć związek z wystąpieniem hipostezji u chorego po zabiegu z zastosowaniem GKS. U leczonych, u których wystąpiła ciężka hipostezja, średni kąt wynosił bowiem $29^\circ \pm 4.4^\circ$, a więc był on węższy niż u osób bez dysfunkcji nerwu trójdzielnego²⁶.

Dotychczas nie wykazano korelacji kryteriów takich jak wiek, płeć czy strona twarzy, po której jest obecny nerwoból, ze skutecznością terapii - zarówno długotrwałą, jak i krótkotrwałą^{26,28}.

6. Podsumowanie

Obecnie przyjęty podział neuralgii nerwu trójdzielnego wyróżnia dwie główne postacie: idiopatyczną oraz klasyczną i pozostaje on w zgodzie z najnowszą wiedzą z zakresu patofizjologii owej choroby. W związku z poczynionymi postępami naukowymi, miniona dekada była czasem oceny dostępnych metod leczenia i poszukiwania zadowalającego algorytmu postępowania chirurgicznego zgodnego z zasadami EBM (ang. *evidence-based medicine*,

medycyna oparta na faktach). Swoisty renesans przeżyła radiochirurgia z użyciem urządzenia Gamma Knife - jedyna dostępna metoda leczenia neuralgii n. V, która łączy w sobie charakter destrukcyjny zabiegów ablacyjnych oraz niezwykle pożądaną przez chorych i ich lekarzy nieinwazyjność. GKS okazała się doskonałym wyborem dla pacjentów cierpiących na liczne choroby współistniejące, opornych na leczenie metodami farmakologicznymi czy innymi metodami chirurgicznymi (szczególnie jeśli w badaniach obrazowych nie jest widoczny konflikt nerwowo-naczyniowy), a także dla chorych z wszelkimi przeciwwskazaniami do operacji otwartej czy dla osób wyrażających wyraźną chęć poddania się właśnie temu typowi leczenia.

W obliczu powyższego studium niepodważalnym faktem stają się zalety użycia noża gamma takie jak precyzja, minimalizacja dawki promieniowania dostarczanej poza obszar docelowy oraz krótki czas trwania leczenia wynoszący 1 dzień. Jak zauważono, owa metoda cieszy się ok. 84,8-procentową skutecznością w łagodzeniu bólu (z farmakoterapią lub bez) oraz 53,1-procentową skutecznością bez dodatkowego stosowania leków, a średni czas do złagodzenia bólu wynosił 15-78 dni, jednakże niestety nie jest to metoda idealna, czemu dowodzą różne badania naukowe. Autorzy pracy zwracają uwagę również na przykładowe mankamenty GKS jakimi są długotrwała skuteczność, która zależnie od źródła wynosi zaledwie 30 czy 45,3% czy zależność skuteczności leczenia od wielu czynników radiochirurgicznych, obecności chorób towarzyszących - głównie stwardnienia rozsianego, a domniemanie nawet od uwarunkowań anatomicznych pacjenta.

Nie ulega wątpliwości, iż nowy nurt w leczeniu neuralgii nerwu trójdzielnego został już odkryty. Stosowane w XXI wieku leczenie chirurgiczne zdecydowanie zasługuje na miano nowatorskiego, a sama radiochirurgia z zastosowaniem urządzenia Gamma Knife jest realnie innowacyjną, lecz niestety obarczoną wadami metodą. Ponieważ powszechnie wiadomo, że nowoczesna medycyna wymaga stałych ulepszeń dla dobra pacjentów, nadal istnieje potrzeba opracowania skuteczniejszych metod terapii neuralgii nerwu trójdzielnego.

Referencje

1. Bendtsen L, Zakrzewska JM, Heinskou TB, et al. Advances in diagnosis, classification, pathophysiology, and management of trigeminal neuralgia. *The Lancet Neurology*. 2020;19(9):784-796. doi:10.1016/s1474-4422(20)30233-7

2. Gambeta E, Chichorro JG, Zamponi GW. Trigeminal neuralgia: An overview from pathophysiology to pharmacological treatments. *Molecular Pain*. 2020;16:174480692090189. doi:10.1177/1744806920901890
3. International Headache Society. Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS) The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition. *Cephalalgia*. 2018;38(1):1-211. doi:10.1177/0333102417738202
4. Maarbjerg S, Benoliel R. The changing face of trigeminal neuralgia - A narrative review. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*. 2021;61(6):817-837. doi:10.1111/head.14144
5. Balcerzak J, Leszek Kryst, Wydawnictwo Lekarskie Pzwl. Chirurgia Szczękowo-Twarzowa. Wydawnictwo Lekarskie Pzwl; 2021.
6. Wu A. Physics and Dosimetry of the Gamma Knife. *Neurosurgery Clinics of North America*. 1992;3(1):35-50. doi:10.1016/s1042-3680(18)30681-8
7. Narożna M, Kancelaria Senatu RP, Senat RP, Polska Akademia Nauk. Komitet Nauk Klinicznych, Instytut Fizjologii i Patologii Słuchu. Światowe Centrum Słuchu, Rada Główna Instytutów Badawczych. Nowoczesne technologie medyczne i ich wpływ na codzienną praktykę kliniczną w polskiej służbie zdrowia: materiały z konferencji zorganizowanej przez Marszałka Senatu Stanisława Karczewskiego i Henryka Skarżyńskiego, 7 czerwca 2016 r. Kancelaria Senatu; 2016.
8. Wu A, Lindner G, Maitz AH, i in. Physics of gamma knife approach on convergent beams in stereotactic radiosurgery. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*Physics*. 1990;18(4):941-949. doi:10.1016/0360-3016(90)90421-f
9. Mitek A, Antończyk-Szewczyk K. Jak dobrze zaplanować terapię w urządzeniu Gamma Knife. *Inżynier i Fizyk Medyczny*. 2018; Vol. 7(nr 4). Dostęp 13.03.2022 r. <https://yadda.icm.edu.pl/baztech/element/bwmeta1.element.baztech-8cb5371c-3db8-4210-831d-1acb1cf731da>

10. Lindquist C. Gamma knife radiosurgery. *Seminars in Radiation Oncology*. 1995;5(3):197-202. doi:10.1016/s1053-4296(05)80017-7
11. Leksell Gamma Knife® Perfexion™ | Radiosurgery | Elekta. www.elekta.com. Opublikowano 15.07.2021 r. Dostęp 26.02.2022 r. <https://www.elekta.com/products/stereotactic-radiosurgery/leksell-gamma-knife-perfexion/>
12. Jawahar A, Wadhwa R, Berk C, et al. Assessment of pain control, quality of life, and predictors of success after gamma knife surgery for the treatment of trigeminal neuralgia. *Neurosurgical Focus*. 2005;18(5):1-7. doi:10.3171/foc.2005.18.5.9
13. Gamma Knife Trigeminal Neuralgia Treatment | Neurological Surgery | University of Pittsburgh. www.neurosurgery.pitt.edu. Dostęp 13.03.2022 r. <https://www.neurosurgery.pitt.edu/centers/image-guided-neurosurgery/trigeminal-neuralgia>
14. Barzaghi LR, Albano L, Scudieri C, et al. Gamma Knife Radiosurgery for Trigeminal Neuralgia: Role of Trigeminal Length and Pontotrigeminal Angle on Target Definition and on Clinical Effects. *World Neurosurgery*. 2020;142:e140-e150. doi:10.1016/j.wneu.2020.06.147
15. Barzaghi LR, Albano L, Scudieri C, Gigliotti CR, del Vecchio A, Mortini P. Factors affecting long-lasting pain relief after Gamma Knife radiosurgery for trigeminal neuralgia: a single institutional analysis and literature review. *Neurosurgical Review*. 2021;44(5):2797-2808. doi:10.1007/s10143-021-01474-9
16. Marchetti M, Pinzi V, De Martin E, Ghielmetti F, Fariselli L. Radiosurgery for trigeminal neuralgia: the state of art. *Neurological Sciences*. 2019;40(S1):153-157. doi:10.1007/s10072-019-03814-6
17. Sanchez-Mejia RO, Limbo M, Cheng JS, Camara J, Ward MM, Barbaro NM. Recurrent or refractory trigeminal neuralgia after microvascular decompression, radiofrequency ablation, or radiosurgery. *Neurosurgical Focus*. 2005;18(5):1-6. doi:10.3171/foc.2005.18.5.13

18. Longhi M, Rizzo P, Nicolato A, Foroni R, Reggio M, Gerosa M. GAMMA KNIFE RADIOSURGERY FOR TRIGEMINAL NEURALGIA. *Neurosurgery*. 2007;61(6):1254-1261. doi:10.1227/01.neu.0000306104.68635.d4
19. Kondziolka D, Perez B, Flickinger JC, Habeck M, Lunsford LD. Gamma Knife Radiosurgery for Trigeminal Neuralgia: Results and Expectations. *Archives of Neurology*. 1998;55(12):1524-1529. doi:10.1001/archneur.55.12.1524
20. Young RF, Vermulen S, Posewitz A. Gamma Knife Radiosurgery for the Treatment of Trigeminal Neuralgia. *Stereotactic and Functional Neurosurgery*. 1998;70(1):192-199. doi:10.1159/000056422
21. Kondziolka D, Lunsford LD, Flickinger JC, et al. Stereotactic radiosurgery for trigeminal neuralgia: a multiinstitutional study using the gamma unit. *Journal of Neurosurgery*. 1996;84(6):940-945. doi:10.3171/jns.1996.84.6.0940
22. Bendtsen L, Zakrzewska JM, Abbott J, et al. European Academy of Neurology guideline on trigeminal neuralgia. *European Journal of Neurology*. 2019;26(6):831-849. doi:10.1111/ene.13950
23. Tuleasca C, Régis J, Sahgal A, et al. Stereotactic radiosurgery for trigeminal neuralgia: a systematic review: International Stereotactic Radiosurgery Society practice guidelines. *Journal of Neurosurgery*. 2018;130(3):733-757. doi:10.3171/2017.9.JNS17545
24. Kondziolka D, Zorro O, Lobato-Polo J, et al. Gamma Knife stereotactic radiosurgery for idiopathic trigeminal neuralgia. *Journal of Neurosurgery*. 2010;112(4):758-765. doi:10.3171/2009.7.jns09694
25. Régis J, Tuleasca C, Resseguier N, et al. Long-term safety and efficacy of Gamma Knife surgery in classical trigeminal neuralgia: a 497-patient historical cohort study. *Journal of Neurosurgery*. 2016;124(4):1079-1087. doi:10.3171/2015.2.jns142144
26. Barzaghi LR, Albano L, Scudieri C, Gigliotti CR, del Vecchio A, Mortini P. Factors affecting long-lasting pain relief after Gamma Knife radiosurgery for trigeminal neuralgia: a single institutional analysis and literature review. *Neurosurgical Review*. 2021;44(5):2797-2808. doi:10.1007/s10143-021-01474-9

27. Conti A, Acker G, Pontoriero A, et al. Factors affecting outcome in frameless non-isocentric stereotactic radiosurgery for trigeminal neuralgia: a multicentric cohort study. *Radiation Oncology*. 2020;15(1). doi:10.1186/s13014-020-01535-1
28. Tuleasca C, Carron R, Resseguier N, et al. Repeat Gamma Knife surgery for recurrent trigeminal neuralgia: long-term outcomes and systematic review. *Journal of Neurosurgery*. 2014;121 Suppl:210-221. doi:10.3171/2014.8.GKS141487
29. Xu R, Xie ME, Jackson CM. Trigeminal Neuralgia: Current Approaches and Emerging Interventions. *Journal of Pain Research*. 2021;14:3437-3463. doi:10.2147/JPR.S331036

NOWOCZESNE METODY ABLACJI GUZA FAŁAMI O CZĘSTOTLIWOŚCI RADIOWEJ (RFA) ORAZ FAŁAMI O SPEKTRUM MIKROFAL (MWA) – NOWA NADZIEJA W LECZENIU NOWOTWORÓW

Anna Kozub, Eliza Barczyk, Joanna Bączyk, Wojciech Dobczyński, Zofia Graca, Martyna Żurek

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

Abstrakt: W ostatnich latach zauważalny jest duży postęp w obszarze projektowania sposobów walki z postępującymi nowotworami. Metody ablacji, znajdujące się w opozycji do tradycyjnych zabiegów chirurgicznych, przystosowywane są do leczenia kolejnych typów nowotworów. Wyjątkowo dynamicznie rozwija się metoda ablacji guza falami o częstotliwości radiowej (RFA) oraz jeszcze nowszy sposób – ablacja falami o spektrum mikrofal (MWA), które pozwalają wyleczyć nowotwory m.in. płuc, tarczycy, nerek, nadnerczy, trzustki, wątroby, dróg żółciowych i kości. W artykule przedstawiono i porównano wyniki wielu badań klinicznych z całego świata, które podjęły tematykę skuteczności i bezpieczeństwa w praktyce klinicznej wspomnianych metod leczenia. Obiecujące perspektywy na przyszłość pozwalają mieć nadzieję, iż kolejne modyfikacje oraz zastosowania ablacji w leczeniu chorób onkologicznych staną się szansą na przeżycie coraz większej liczby pacjentów.

Słowa kluczowe: ablacja RFA, ablacja MWA, nowotwory narządów, rezultaty terapeutyczne, onkologia

Abstract: The huge progress in the sphere of planning the approaches of conquering the tumour has been noticeable over the recent years. The methods of ablation, which seem to be in contraposition to traditional surgery, are adapted to treating another types of malignancies. The radiofrequency ablation, that has been evolving very dynamically, and the microwave ablation, which is a newer way, allow to cure the neoplasms of the lungs, the thyroid gland, the kidneys, the adrenal glands, the pancreas, the liver, the bile ducts and the bones. The outcomes of the clinical trials concerning RFA and MWA from all over the world, that describe the subject area of effectiveness and safety in the clinical practice, are presented and compared in this article. The promising outlook enables us to hope that subsequent modifications and deployments of ablation in treating the oncological diseases will become the chance of outliving of greater amount of the patients.

Keywords: radiofrequency ablation, microwave ablation, tumors of organs, therapeutic outcomes, oncology

1. Wprowadzenie

Wraz z rozwojem medycyny oraz nauk jej pokrewnych zaobserwować można opracowywanie nowych terapii, a także ulepszanie stosowanych dotychczas metod leczenia. Do grona takich gałęzi medycyny, których szybki rozwój - zwłaszcza w ostatnich latach - pozwolił na skuteczną eliminację wielu chorób, zalicza się onkologia. Z perspektywy właśnie tej dziedziny kluczowe jest wykorzystanie takich technik, które nie dopuszczą w wielu przypadkach do ekspansji nowotworu na następne tkanki. Klasyczne sposoby, takie jak interwencja chirurgiczna, stosowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych czy aplikowana pacjentowi chemioterapia nie zawsze wystarczają, aby w pełni przezwyciężyć zagrożenie.

Metodą pozwalającą na leczenie wielu rodzajów nowotworów, która zarazem jest prężnie rozwijana w wielu medycznych ośrodkach na świecie, jest ablacja guza. Jest to zabieg polegający na podaniu określonych substancji chemicznych czy wytworzeniu temperatury o określonej wartości bezpośrednio na obszarze zajęтым przez nowotwór¹. Ekstremalnie dla organizmu wartości temperatury, zaaplikowane w odpowiednim miejscu, są w stanie precyzyjnie zniszczyć daną tkankę. Różne sposoby leczenia techniką ablacji wykorzystują także: laser, zimno, etanol, fale elektromagnetyczne o częstotliwości radiowej (ang. *radiofrequency ablation – RFA*) czy najnowsze osiągnięcie – fale o spektrum mikrofal (ang. *microwave ablation – MWA*)¹. Warto dodać, że pierwsze próby ablacji zmian o charakterze onkologicznym miały miejsce ponad 130 lat temu². W przeszłości najczęściej wykorzystywane były do leczenia zaburzeń pracy serca, natomiast w dzisiejszych czasach leczenie ablacją stosowane jest w przypadku wielu typów nowotworów – wątroby, tarczycy, płuc, trzustki i innych. RFA została opracowana w latach dwudziestych XX w. przez Harveya Cushinga – pioniera neurochirurgii oraz Williama T. Bovie³. Najwięcej ośrodków, które od lat oferują leczenie za pomocą RFA, znajduje się głównie w Azji – w Japonii czy Korei Południowej. W Europie ten sposób leczenia jest szczególnie popularny we Włoszech⁴. Metoda ablacji umożliwia działanie zarówno na guzy pierwotne, jak i przerzuty.

Leczenie nowotworów metodą przezskórnej termicznej ablacji RFA posiada wiele zalet – to m. in. niższe ceny leczenia, mniejsza zachorowalność i śmiertelność, możliwość obrazowania w czasie rzeczywistym, brak przeciwwskazań do łączenia z innymi metodami⁵. Natomiast pokrewna metoda MWA, która od RFA odróżnia się głównie częstotliwością wykorzystywanych fal – co najmniej 900MHz – umożliwia krótszy czas ablacji czy wytworzenie

wyższej temperatury na obszarze guza¹. MWA zmniejsza straty ciepła w porównaniu do RFA, pozwala także na większą objętość ablacji⁶. W przypadku obydwu metod, wartości temperatury przewyższające 60°C prowadzą do szybkiej, niemal natychmiastowej śmierci komórek guza, natomiast przedział temperatur 50°C - 60°C spowoduje koagulację i śmierć komórek po kilku minutach, zależnie od prowadzenia wcześniejszej terapii⁷.

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie – dzięki odwołaniu się do przeprowadzonych w ostatnich latach wielu badań klinicznych - możliwości, jakie w leczeniu nowotworów wybranych narządów dają nowoczesne techniki ablacji – RFA i MWA.

2. Wątroba i drogi żółciowe

RFA i MWA wykorzystywane są najczęściej w leczeniu nowotworów wątroby – np. raka wątrobowokomórkowego (ang. *hepatocellular carcinoma* – *HCC*), a także w przypadku przerzutów do wątroby raka jelita grubego⁸. W przypadku HCC, który jest najczęstszym pierwotnym nowotworem wątroby, już podczas jego rozpoznania często jest za późno na tradycyjne, operacyjne leczenie (np. hepatektomia), dlatego jest ono przeprowadzane za pomocą ablacji⁹. Lekarze z Osaki przeprowadzili badanie, w którym porównywano bezpieczeństwo i skuteczność RFA i MWA w leczeniu chorych na HCC w latach 2014 – 2020 – obydwie metody uzyskały zbliżone wyniki¹⁰. Badacze z Fuzhou prowadzili w latach 2014 – 2018 badanie, w którym porównali zastosowanie RFA i MWA wśród pacjentów z HCC w okolicy podtorebkowej – i w tym przypadku dobrze sprawdzają się obie metody¹¹. Przyjmuje się jednak, że MWA jest preferowaną metodą, jeżeli średnica nowotworu jest większa bądź równa 3cm lub w przypadku jego lokalizacji blisko dużych naczyń krwionośnych – m. in. ze względu na krótszy czas trwania ablacji¹². Zabieg z wykorzystaniem RFA można przeprowadzić na 3 sposoby – metodą przezskórną, laparoskopową i poprzez tradycyjne metody chirurgiczne. Metoda laparoskopowa RFA i chirurgiczna RFA pozwalają osiągać najlepsze wyniki leczenia⁸. Przeprowadzane są także eksperymenty, mające na celu porównywanie skuteczności różnych odmian RFA poprzez wdrażanie technicznych modyfikacji – np. badanie porównujące bezpieczeństwo, skuteczność i osiągane wyniki w leczeniu HCC przez dwuprzelączeniową monopolarną RFA (ang. *dual-switching monopolar RFA* – *DSM-RFA*) oraz tradycyjną, jednoprzelączeniową monopolarną RFA (ang. *single-switching RFA* – *SSM-RFA*). Osiągnięto jednak podobne wyniki w badanych obszarach¹³.

Przeprowadzano także eksperyment, w którym dociekano, czy bezpieczne jest przeprowadzenie RFA u pacjentów z HCC, którzy poddawani są leczeniu przeciwwzakrzepowemu. Okazało się, że nawet po czasowym przerwaniu tego rodzaju leczenia zastosowanie RFA nie wiąże się z dodatkowym ryzykiem powikłań typu zakrzepowego¹⁴. W innym badaniu, prowadzonym przez lekarzy z wielu ośrodków we Włoszech, Hiszpanii i Francji, porównywano skuteczność leczenia pacjentów z HCC (spełniających kryteria mediolańskie kwalifikacji do przeszczepienia wątroby) powyżej 70 roku życia za pomocą RFA i metody chirurgicznej resekcji wątroby. Porównując statystyki dotyczące przeżycia pacjentów po leczeniu okazało się, że rok później wskaźnik ten wyniósł dla pacjentów leczonych RFA 97%, a dla pacjentów leczonych chirurgicznie – 91%. Natomiast w przeciągu 3 i 5 lat od zabiegu, grupa pacjentów leczonych RFA osiągnęła już niższy wynik – odpowiednio 67% i 41%, podczas gdy pacjenci leczeni odmiennym sposobem osiągnęli wyniki 80% i 76%¹⁵. Można więc stwierdzić, że to jednak chirurgiczna metoda leczenia HCC jest w dłuższej perspektywie czasu lepszym wyborem. Do podobnych spostrzeżeń doszli też naukowcy z Guangzhou, którzy przeprowadzili metaanalizę na ten temat. Brak jest jednak znaczącej różnicy w wynikach leczenia obiema metodami, jeżeli średnica HCC jest mniejsza niż 3cm. Dodano także, że wielką zaletą RFA jest mniejsza liczba powikłań pozabiegowych zaliczanych jako poważne¹⁶. Jednak lekarze z Pekinu opisali przypadek 72-letniego mężczyzny, u którego po RFA doszło do krwotoku śródwątrobowego oraz przetoki tętniczo-wrotnej - rzadkich, lecz opisywanych w literaturze powikłań¹⁷.

Obiecujące wyniki daje także połączona metoda – chemoembolizacji przętętnicznej (ang. *trans-arterial chemoembolisation – TACE*) z RFA lub MWA, jednak niezbędne jest przeprowadzenie kolejnych badań klinicznych, aby potwierdzić jej skuteczność podczas długotrwałych obserwacji¹⁸. W Pekinie przeprowadzono badanie, w którym porównywano skuteczność i powikłania po leczeniu nowotworu za pomocą RFA i chemoembolizacji pacjentów z HCC umiejscowionym blisko żyły wrotnej oraz w innej lokalizacji. Okazało się, że efekty leczenia u pacjentów z HCC umiejscowionym w sąsiedztwie żyły wrotnej są gorsze niż u pacjentów z drugiej grupy, odnotowano wyższe ryzyko progresji guza i jego nawrotu¹⁹.

Badacze z Missouri w Stanach Zjednoczonych zaproponowali, aby połączyć w leczeniu HCC wykorzystanie sunitynibu (inhibitora kinazy białkowej) razem z RFA, w celu wytworzenia i wzmocnienia odpowiedzi immunologicznej w organizmie pacjenta wobec HCC. Doświadczenie przeprowadzone na myszach pokazało, iż ta metoda leczenia powoduje wzrost ilości komórek

dendrytycznych, limfocytów T CD8+ i limfocytów T pamięci CD8+, natomiast zmniejszyła się częstotliwość występowania limfocytów T regulatorowych, co jest korzystne dla odpowiedzi immunologicznej przeciwnowotworowej. Zmniejszył się także stopień wzrostu nowotworu²⁰. Wydłużenie życia pacjenta z HCC po zastosowaniu RFA oraz immunoterapii świadczy o sukcesie terapii łączonej²¹.

W Korei przeprowadzano także badanie porównujące nową generację MWA – Emprint do RFA wśród pacjentów z HCC. W metodzie Emprint, wykorzystującej termosferę, wyeliminowano pewne niedociągnięcia standardowej MWA – wykazano stałe, bardzo dobre wyniki ablacji niezależnie od lokalizacji nowotworu czy rodzaju tkanki. Wyniki eksperymentu wskazują, iż metoda Emprint zalecana jest szczególnie dla HCC o średnicy większej niż 2,5 – 3 cm²². W Japonii metoda Emprint została dopuszczona do stosowania w lipcu 2017r. Tak jak w przypadku badań koreańskich, określono, że pozwala ona na krótsze i bezpieczniejsze leczenie pacjentów z HCC. Odsetek powikłań dla standardowej RFA wyniósł 8%, natomiast dla metody Emprint – tylko 3%. Badanie to zostało przeprowadzone na 513 chorych na HCC, spośród których 339 było leczonych nowym sposobem²³.

RFA jest także często wykorzystywaną metodą leczenia dla chorych z naczyniakami wątrobowymi. Badacze z Chin przeanalizowali łącznie przypadki 44 pacjentów, u których zastosowano tę metodę (sposób laparoskopowy) w latach 2012 – 2015. Wyniki eksperymentu wskazały, iż choć występują powikłania po zabiegu (łącznie u 17 chorych), to są one łagodne. 86% wszystkich pacjentów zostało po zabiegu całkowicie wyleczonych²⁴.

Rozważając problem złośliwych zmian nowotworowych w drogach żółciowych, należy zaznaczyć, iż podobnie jak w przypadku nowotworów wątroby, często już przy rozpoznaniu okazuje się, że znajdują się w stadium nieoperacyjnym. Co więcej, interwencja chirurgiczna nie jest wskazana dla starszych pacjentów, zwłaszcza z chorobami współistniejącymi²⁵. Badacze z Seulu określili, że wewnątrzprzewodowa RFA razem z ECPW, czyli endoskopową cholangiopankreatografią wsteczną (ang. *endoscopic retrograde cholangiopancreatography - ERCP*), pozwala na zniwelowanie większej ilości skutków ubocznych oraz wymaga mniejszych kosztów niż inne metody. Często jest to także metoda wspomagająca inne rodzaje leczenia²⁶.

3. Tarczycza

Bardzo często występującą grupą nowotworów są duże, łagodne guzki tarczycy, które mogą prowadzić do: dysfagii, problemów z oddychaniem – poprzez ucisk na tchawicę, poczucia ciała obcego, nadczynności tarczycy, a także być przyczyną kosmetycznych problemów²⁷. Obydwie metody – zarówno RFA, jak i MWA znajdują w tym przypadku zastosowanie²⁸. W latach 2018 – 2019 przeprowadzono w południowych Chinach badanie, które porównywało efekty leczenia takich nowotworów, wykorzystując obie metody. Pacjenci, podzieleni odpowiednio na grupy, wypełniali ankiety w 1., 3., 6., 12. i 18. miesiącu po zabiegu. Okazało się, że obydwie techniki - RFA i MWA – bardzo dobrze sprawdzają się w leczeniu tego typu nowotworu, osiągają zbliżone efekty pod kątem skuteczności i bezpieczeństwa²⁸. Podobne wyniki uzyskano w badaniu przeprowadzonym w Stambule, gdzie u pacjentów po przejściu RFA lub MWA oceniano ból, dysfagię, uczucie obecności ciała obcego, a także zmiany w objętości i wielkości guzków²⁷. Natomiast wyniki badania z Szanghaju z 2019r., także porównującego skuteczność RFA i MWA w leczeniu łagodnych guzków tarczycy, pokazały, że wyższe wartości wskaźnika zmniejszenia objętości guza (ang. *volume reduction rate* – VRR) zaobserwowano po 6 oraz po 12 miesiącach od czasu terapii wśród pacjentów leczonych RFA²⁹.

W celu zbadania skuteczności RFA z wykorzystaniem ultrasonografii, w Turynie przeprowadzono badanie na chorych z identycznym typem nowotworu, jak opisany powyżej³⁰. Jednym z podstawowych celów badania było znalezienie korelacji pomiędzy cechami guzków przed rozpoczęciem leczenia, a VRR $\geq 75\%$ w okresie roku od RFA i podczas trwania obserwacji (ang. *follow-up period*). Zaobserwowano, że uzyskuje się szczególnie dobre efekty długoterminowego leczenia w przypadku makrotorbielowatych guzków tarczycy o objętości mniejszej niż 22,4 ml³⁰. W podobnym - austriackim badaniu, także opierającym się na badaniu bezpieczeństwa i skuteczności metody RFA, dowiedziono także, że u pacjentów z nadczynnością tarczycy po leczeniu doszło do unormowania pracy tego narządu, natomiast u pacjentów, u których jeszcze przed terapią stwierdzono prawidłową pracę gruczołu, nie trzeba było podawać dodatkowych leków³¹. Na podstawie wyników badań pacjentów leczonych RFA z powodu łagodnych guzków tarczycy w latach 2008 – 2013 w Seulu badano ewentualne właściwości rakotwórcze RFA czy też pojawienie się w prawidłowej tkance tarczycy uszkodzeń po takiej ablacji. Nie stwierdzono, iż RFA miałyby wpływać na zdrowe części narządu w opisany sposób³².

Warto jednak wspomnieć, że w Guangzhou przeprowadzono retrospektywne badanie, obejmujące 35 pacjentów z łagodnymi guzkami tarczycy, leczonych w latach 2015 – 2016 metodą RFA. Celem badaczy było zbadać skuteczność leczenia krwawienia, które może być powikłaniem po RFA łagodnych guzków tego gruczołu³³. Oceniano w nim skuteczność techniki, krwawienie, a także inne powikłania występujące u pacjentów. Zareportowano tylko jeden przypadek wystąpienia krwiaka śródguzkowego i dwa przypadki zmiany barwy głosu³³.

Metody ablacji zaczęły być stosowane także w leczeniu innego typu nowotworu – raka brodawkowatego tarczycy. W latach 2014 – 2018 w jednym ze szpitali w Pekinie 47 osób, u których zdiagnozowano obustronnego brodawkowatego mikroraka tarczycy (ang. *bilateral papillary thyroid microcarcinoma* - PTMC), leczonych było za pomocą RFA³⁴. W badaniu założono, iż określenie „obustronny PTMC” odnosi się do co najmniej jednego guza zlokalizowanego dodatkowo po przeciwnej stronie omawianego narządu. Średnie VRR wyniosło $99,94 \pm 0,28\%$, a wskaźnik całkowitego zniknięcia nowotworu - $92,00\%$. Nie odnotowano żadnych zagrożeń dla życia pacjentów³⁴. Badacze z Paryża wskazują natomiast, że potrzeba jeszcze większej ilości badań nad RFA wśród pacjentów z PTMC, ze względu na krótki czas od rozpoczęcia wprowadzenia tej metody³⁵. Co więcej, w 2021r. w Chinach opracowano model ilościowy, który pozwala na przewidywanie krótkoterminowej skuteczności RFA w leczeniu PTMC. Bardzo ważne znaczenie w oszacowaniu skuteczności leczenia mają m. in. wiek i płeć chorego³⁶. Jest to krok w stronę lepszej komunikacji lekarz – pacjent i zrozumienia przez pacjenta obranej wobec choroby strategii leczenia. Porównywano także jakość życia uwarunkowaną stanem zdrowia (ang. *health-related quality of life* – HRQoL) u pacjentów z PTMC leczonych RFA i leczonych tradycyjnie – wykorzystując metody chirurgiczne. Okazało się, że grupa pacjentów, którym zalecono RFA, osiągnęła w badaniu lepsze wyniki – rzadziej uskarżano się na problemy w sferach emocjonalnej oraz fizycznej, dotyczące życia codziennego³⁷.

Na podstawie powyższej analizy badań można stwierdzić, że obydwie metody – RFA i MWA wydają się być właściwe w leczeniu różnych nowotworów tarczycy. Powikłania występują stosunkowo rzadko, u zdecydowanej większości pacjentów dochodzi do znacznej poprawy lub całkowitego wyleczenia. Duże znaczenie ma jednak wielkość guzków czy ich poszczególne cechy, dlatego należy szczegółowo kwalifikować pacjentów do danego typu terapii³⁵. Nie należy jednak zapominać o możliwych powikłaniach – ważne jest,

aby być zaznajomionym z odpowiednimi procedurami, tak aby zminimalizować zagrożenie dla pacjenta.

4. Płuca

Współcześnie zwraca się dużą uwagę na szybkie wykrywanie nowotworów powiązanych z układem oddechowym. Wg danych statystycznych z samych Chin, zapadalność oraz śmiertelność właśnie z powodu nowotworu płuca jest największa³⁸. Warto tu zaznaczyć, że nie każdy wykryty guzek oznacza złośliwą zmianę, którą należy albo można pilnie usunąć (ok. 30% chorych jest kwalifikowanych do leczenia operacyjnego)³⁸. Już od lat dziewięćdziesiątych XXw. wykorzystuje się do takich badań niskodawkową tomografię komputerową, która pozwala na rozróżnienie różnych typów guzków – np. litych, częściowo litych czy guzków o typie mlecznej szyby (ang. *ground-glass nodules* – *GGN*)³⁹. W latach 2016 – 2021 lekarze z Pekinu przeprowadzili na 24 pacjentach z łącznie 28 guzkami typu GGN badanie, w którym poddano ich zabiegowi RFA⁴⁰. Średni rozmiar guzka wyniósł $1,30 \pm 0,56$ cm, natomiast średni czas trwania zabiegu – $15,00 \pm 8,68$ min. Wskaźniki przeżywalności – zarówno po roku i po dwóch latach po zabiegu – wynosiły 95,8% - tylko jeden pacjent zmarł 2 miesiące po operacji z powodów kardiologicznych⁴⁰.

Szybka reakcja na wykrycie nowotworu jest jeszcze bardziej istotna w przypadku niedrobnokomórkowego raka płuca (ang. *non-small cell lung cancer* – *NSCLC*), który charakteryzuje się dużą śmiertelnością⁴¹. Badacze z Huzhou opisali przypadek 74-letniego pacjenta z usuniętym wcześniej płucem lewym, u którego wykryto guz w prawym dolnym płacie płuca prawego. Zmiana ta została po biopsji określona jako rak płaskonabłonkowy płuca. Zdecydowano się na terapię RFA, a po upływie 10 miesięcy od zabiegu stwierdzono pełną remisję nowotworu⁴¹. Poprawę przeżywalności pacjentów z NSCLC leczonych RFA potwierdziło też duże, retrospektywne badanie przeprowadzone w Szanghaju⁴².

Lekarze z Huzhou opisali także przypadek wykorzystania RFA do leczenia drobnokomórkowego raka płuca (ang. *small cell lung cancer* – *SCLC*). Uzyskane u 85-letniego pacjenta wyniki wskazują na odpowiedź częściową⁴¹.

Istotnym zagadnieniem jest także leczenie przerzutów nowotworów do płuc. Lekarze z ośrodków we Francji i w Stanach Zjednoczonych określili dzięki retrospektywnemu badaniu na łącznie 204 pacjentach, iż zastosowanie RFA znacząco skraca długość pobytu chorego w szpitalu⁴³. Natomiast wielkość guza ponad 2 cm powodowała wyższy wskaźnik progresji choroby

w tej grupie. Wskaźniki przeżycia całkowitego (ang. *overall survival – OS*) oraz przeżycia wolnego od progresji (ang. *progression-free survival – PFS*) były podobne w przypadku grupy pacjentów leczonej chirurgicznie oraz RFA⁴³. W kolejnym badaniu przeprowadzonym w Chinach (lata 2014 – 2018), zajmowano się skutecznością i bezpieczeństwem RFA wykorzystywanej przy leczeniu 40 przerzutów HCC przylegających do śródpiersia u 32 chorych⁴⁴. W eksperymencie stosowano dodatkowo technikę sztucznej odmy opłucnowej. Wskaźniki OS po roku, dwóch i trzech latach wyniosły odpowiednio: 100%, 100% i 87,5%, a wskaźniki przeżycia wolnego od miejscowej progresji nowotworu (ang. *local tumor progression free survival – LTPFS*) w tych samych ramach czasowych - 90,6%, 81,2% i 71,8%⁴⁴. Wyniki wskazują więc, że RFA połączona ze sztuczną odmą opłucnową jest dobrym wyborem w terapii takich przerzutów nowotworu. Opisano także przypadek 74-letniego mężczyzny z Japonii ze stwierdzonym kostniakomięsakiem, którego – mimo wcześniejszej amputacji części kończyny – mnogie przerzuty znaleziono po roku w płucach. Mimo ich ilości (18 przerzutów) i chorób współistniejących zdecydowano się na RFA (razem 8 zabiegów) – badacze wskazują, że po 5,5 roku od zabiegu pacjent jest w dobrej kondycji. Wskazano jednak na powikłania po 4 zabiegach RFA – odmę opłucnową⁴⁵. Także w Japonii badano na przestrzeni lat 2014 – 2020 hybrydowy sposób leczenia wielu przerzutów do płuc takich nowotworów, jak: rak jelita grubego, rak endometrium macicy, kostniakomięsak, rak nerki, rak głośni i HCC. Hybrydowa terapia, składająca się z zabiegu operacyjnego oraz RFA, przyniosła pozytywne wyniki⁴⁶.

Warto zaznaczyć, że na podstawie wyników wielu badań klinicznych powstają opracowania pomagające lekarzom zdecydować o wykorzystaniu RFA do leczenia poszczególnych rodzajów nowotworów płuc lub przerzutów do płuc. Wskazują one na korzyści, zagrożenia, trwanie zabiegu i rekonwalescencji pacjenta oraz możliwości dalszego łączenia z innymi metodami⁴⁶. Można też zauważyć, że w obszarze nowotworów płuc zdecydowanie dominuje metoda RFA. Istnieją jednak w literaturze przypadki wykorzystania techniki MWA, której wyniki są porównywalne do RFA⁴⁷.

5. Trzustka

U coraz większej liczby chorych diagnozuje się w ostatnich latach nieresekcyjnego raka trzustki. Leczenie rozpoczyna się najczęściej za pomocą chemioterapii, niestety nie stosuje się jeszcze wystandaryzowanych protokołów i zaleceń w sprawie czasu włączania RFA u takich pacjentów⁴⁸. W latach

2013 – 2018 w Wuhan przeprowadzono badanie, w którym oceniano skuteczność wielokrotnej RFA u 11 pacjentów, u których stwierdzono wspomnianego guza. Wyniki badania wskazały, że jest to bezpieczna metoda, a procedura leczenia przebiegała zgodnie z planem. W literaturze znaleźć można jednak przypadki powikłań, takich jak: ostre zapalenie trzustki, zakażenia tkanki czy krwawienie po zastosowanym leczeniu. Ryzyko powikłań, nawrotów rośnie przy większej średnicy nowotworu trzustki⁴⁹. Niemniej niektórzy autorzy opisują ostre powikłania, jakie mogą wystąpić po zastosowaniu już na początku leczenia RFA, doradzając zastosowanie wcześniej cyklu chemioterapii⁵⁰. Natomiast badacze z Werony, opisując efekty leczenia przeprowadzanego w latach 2016 – 2017, określili RFA jako w pełni bezpieczną, nieprowadzącą do powikłań, pozwalającą na dotarcie do zajętej nowotworem tkanki⁵¹. Po raz kolejny podniesiona została kwestia potrzeby przeprowadzenia dalszych badań nad tą techniką.

Kolejnym problemem dla lekarzy w zakresie nowotworów trzustki jest miejscowo zaawansowany rak trzustki (ang. *locally advanced pancreatic cancer - LAPC*). W przybliżeniu 80% ze zdiagnozowanym LAPC przyjmuje chemioterapię, a tylko u 10% z nich przeprowadzana jest resekcja guza⁵². W latach 2015 – 2017 w Guangzhou przeprowadzono badanie, w którym porównywano dwie metody leczenia wspomnianego nowotworu – za pomocą RFA lub nieodwracalnej elektroporacji (ang. *irreversible electroporation - IRE*). Okazało się, że wśród pacjentów po terapii IRE wskaźniki OS oraz PFS były wyższe. Mimo to, rozpatrując guzy większe niż 4 cm, obydwie metody osiągają podobne wyniki⁵³. Warto też dodać, że Holenderska Grupa Raka Trzustki (ang. *The Dutch Pancreatic Cancer Group - DPCG*) rozpoczęła tzw. próbę PELICAN (ang. *Pancreatic Locally Advanced Unresectable Cancer Ablation*), której celem jest zbadanie, czy połączona chemioterapia z RFA pozwoli wydłużyć całkowite przeżycie chorych na LAPC bez progresji, w porównaniu z osobami leczonymi tylko standardową chemioterapią⁵².

6. Nerki i nadnercza

Tak jak w przypadku omówionych powyżej narządów, także w obszarze nowotworów nerek oraz nadnerczy wykorzystuje się coraz częściej metodę ablacji. W przypadku nadnerczy RFA jest metodą stosowaną wtedy, kiedy pacjentowi nie można usunąć tych organów w procesie adrenalectomii – np. ze względu na wysokie prawdopodobieństwo śmiertelności pooperacyjnej. Metoda ta sprawdza się także u osób ze stwierdzonymi takimi chorobami, jak np. zespół von Hippela – Lindaua, w której u chorych występują nawracające

guzy chromochłonne nadnerczy, a także u pacjentów z kilkoma nowotworami gruczołów⁵⁴. Zwraca się jednak uwagę na to, iż gorączka oraz zaburzenia krzepnięcia krwi są przeciwwskazaniami do wykonania RFA. Co więcej, chory nie powinien przyjmować niesteroidowych leków przeciwzapalnych lub leków przeciwzakrzepowych na tydzień przed RFA⁵⁴. Dowiedziono natomiast, że MWA sprawdza się w leczeniu przerzutów do nadnerczy czy endokrynopatii nadnerczy wynikającej z obecności w nich łagodnych gruczołaków⁵⁵.

W przypadku nowotworów nerek, RFA znalazła zastosowanie przy leczeniu raka drobnokomórkowego. W tym przypadku nerka może dalej pracować. Wyliczono, że średni spadek współczynnika przesączania kłębuszkowego nerki po zabiegu RFA (7,9%) jest niższy niż w przypadku pacjentów po nefrektomii (29%), co wskazuje na mniejszy stopień uszkodzenia tego narządu po ablacji⁵⁶.

Naukowcy z chińskiego Harbin przeprowadzili badanie, w którym porównywali za pomocą różnych wskaźników wykorzystywanie przy leczeniu raka nerki o wielkości ≤ 2 cm lub między 2 do 4 cm następujących metod: RFA, krioablacji oraz częściowej nefrektomii⁵⁷. Po analizie danych dowiedli, iż najlepsze wyniki wskaźników OS oraz PFS osiągnęli leczeni poprzez częściową nefrektomię. Jednak w przypadku CSS, jego wynik był podobny dla wszystkich metod⁵⁷. Natomiast badacze w Japonii przeprowadzili badanie, w którym oceniali skuteczność leczenia techniką RFA raka nerki u 6 pacjentów z zespołem Birt – Hogg – Dubé. W trakcie 54 miesięcy obserwacji nie zaobserwowano u żadnego z nich miejscowej progresji nowotworu ani przerzutów. Żaden z chorych nie wymagał przeszczepu narządu ani dializy⁵⁸.

Uczni współpracujący w ramach *European Society for Medical Oncology (ESMO)* stworzyli listę kryteriów, których spełnienie przez chorego skłania do wyboru ablacji termicznej jako preferowanego sposobu leczenia. W przypadku raka nerki są to np.: wielkość guza (≤ 3 cm), niska masa ciała, duże ryzyko powikłań operacyjnych, posiadanie tylko jednej nerki czy wiele guzów na obu nerkach⁵⁶.

7. Kości

Wykorzystanie RFA w dziedzinie leczenia nowotworów kości zostało po raz pierwszy przedstawione w 1992r.⁵⁹. Wśród nowotworów kości można wyróżnić m. in. takie, które mimo bycia łagodną zmianą onkologiczną, mogą znacznie utrudniać chorym życie. Do takich właśnie przypadków, występujących często wśród mężczyzn w wieku nawet poniżej 30 lat, należy kostniak kostnawy, będący przyczyną silnego, stałego bólu nasilającego się w godzinach

nocnych⁶⁰. Odpowiada on za 12% wszystkich łagodnych nowotworów kości⁶. Diagnoza tego nowotworu może być trudna, ze względu na jego rozmiar (< 1,5 cm) i lokalizację - pojawia się on często w nietypowych miejscach, np. śródstawowo³. Technika RFA stała się w ostatnich latach dobrym sposobem leczenia tego rodzaju guza, gdyż skraca czas hospitalizacji pacjenta oraz odnotowuje się mniejszą liczbę powikłań po zabiegu w porównaniu do klasycznej metody chirurgicznej⁶⁰. Do wad dawnej metody zaliczyć można było także możliwość nawrotu guza czy zagrożenie pozostawienia fragmentu nowotworu pomimo operacji³.

Przeprowadzone badanie na 102 pacjentach z kostniakiem kostnym w szpitalu w Neapolu (w latach 2014 – 2019) pokazało, że pierwotna lokalizacja nowotworu w częstszych miejscach – np. w kości udowej – zmniejsza prawdopodobieństwo nawrotu choroby, w przeciwieństwie do takich kości, jak żebra czy kość skokowa⁶¹. Po terapii RFA nie odnotowano żadnych poważnych powikłań, sprawdza się ona do leczenia nowotworów występujących zarówno w typowych, jak i nietypowych lokalizacjach. Podobne wyniki uzyskano w przypadku leczenia RFA 27 chorych w szpitalu w Stambule w latach 2013 – 2016, u których kostniaki kostne były umiejscowione w takich lokalizacjach, jak: grzebień kości biodrowej, kość udowa, kość strzałkowa, kość piszczelowa, kość skokowa, kość ramienna, kość promieniowa, kości śródreżca. Po roku od terapii RFA nie stwierdzono nawrotu choroby u żadnego pacjenta, nikt nie uskarżał się na dolegliwości bólowe⁶². W latach 2013 – 2016 przeprowadzono w Rzymie podobne badanie, w którym zastosowano RFA, wykorzystując zatwierdzone przez instytut znieczulenie w sali nieoperacyjnej (ang. *non-operating room anaesthesia – N.O.R.A.*). Po sześciu miesiącach od terapii 60 z 61 pacjentów uznano za w pełni wyleczonych, nie zgłaszali też żadnych powikłań⁶³. Co więcej, można zauważyć w literaturze mniejszą ilość opracowanych badań z zakresu wykorzystywania MWA do leczenia kostniaka kostnego. Jednak dostępne materiały wskazują na duże bezpieczeństwo i dobre efekty także tej wersji ablacji (przeprowadzanej na guzach znajdujących się na kości udowej oraz kości piszczelowej)⁶.

Przezskórna RFA jest też efektywną metodą leczenia w przypadku pacjentów z nowotworami nieresekcyjnymi - kostniakomięsakami, struniakami, przerzutowymi guzami kości czy guzami olbrzymiokomórkowymi - jak wykazało badanie przeprowadzane na 43 chorych w Busan (lata 2007 - 2017)⁵⁹. Warto zaznaczyć, iż zdecydowana większość tych pacjentów wskazywała na szybkie ustąpienie bólu wkrótce po zabiegu RFA.

Przeprowadzono także badanie, w którym oceniano dokładnie zmianę w odczuwaniu bólu po przejściu terapii RFA przez 100 chorych poddanych paliatywnemu leczeniu bolesnych przerzutów do kości (w miednicy, kości krzyżowej lub w odcinkach piersiowym i lędźwiowym kręgosłupa), korzystając z kwestionariuszy oceny bólu – *Brief Pain Index* oraz *European Quality of Life*. Wyniki pokazały szybką poprawę (w trakcie 3 dni) z polepszeniem jakości życia i zmniejszeniem odczuwania bólu nawet po 6 miesiącach od zabiegu. Wszystkie zabiegi RFA przeprowadzono zgodnie z planem, zaistniałe zgony w trakcie trwania obserwacji po terapii przypisano nowotworom pierwotnym⁶⁴.

8. Podsumowanie

Podsumowując omówione powyżej przykłady można zauważyć, że rozwój RFA i MWA prowadzi do leczenia coraz większej liczby chorób nowotworowych. Mnogość i zróżnicowanie przeprowadzanych w ostatnim czasie badań klinicznych wskazują, że lekarze z ośrodków naukowych na całym świecie dostrzegli potencjał w wykorzystaniu metod ablacji wśród licznych grup pacjentów. Różne sposoby przeprowadzania ablacji pozwalają na stosowanie jej u chorych w wielu stadiach choroby. Poprzez ciągłe ulepszanie opisywanej metody, możliwa jest aplikacja leczenia dokładnie w samo ognisko choroby, natomiast zdrowe tkanki nie są poddawane działaniu fal. Porównanie RFA i MWA wskazuje obecnie na zdecydowanie częstsze wykorzystanie pierwszej z nich. W większości przedstawionych przypadków RFA jest metodą preferowaną, wykorzystywaną zamiast tradycyjnych sposobów leczenia, które charakteryzują się większą liczbą skutków ubocznych oraz krótszym czasem przeżycia pacjenta. Co więcej, krótszy czas pobytu pacjenta w szpitalu po ablacji pozwala na szybszą rotację pacjentów, czyli umożliwia niesienie skutecznej pomocy większej liczbie chorych. Badania kliniczne nad stosowaniem MWA przeprowadzane są głównie w Japonii, Korei Południowej oraz w Chinach – krajach bogatych, w których dużą wagę przykładają do rozwoju medycyny. Metody obrazowania, będące niezbędnym elementem podczas trwania zabiegu ablacji, umożliwiają precyzyjne ruchy, a co za tym idzie – zwiększają prawdopodobieństwo odniesienia sukcesu w trakcie terapii.

Referencje

1. Pyra K, Światłowski Ł, Roman T, Sobstyl J, Karska K, Kuczyńska M, et al. Ablacja guzów wątroby, płuc, nerek i kości falami elektromagnetycznymi o spektrum mikrofal (MWA) i o częstotliwości radiowej (RFA). *Post N Med.* 2017; XXX(04): 229-232. http://www.pnmedycznych.pl/wp-content/uploads/2017/04/pnm_2017_229-232.pdf Dostęp: 11.02.2022r.
2. Halsted WS. I. The Results of Operations for the Cure of Cancer of the Breast Performed at the Johns Hopkins Hospital from June, 1889, to January, 1894. *Ann Surg.* 1894;20(5):497-555. doi:10.1097/00000658-189407000-00075.
3. Kumar Duwal Shrestha S, Jung Rayamajhi A, Rawal P, Thapa R, Karki U, Chapagain S. Radiofrequency Ablation of Osteoid Osteoma of Neck of Femur: A Case Report. *JNMA J Nepal Med Assoc.* 2021;59(237):513-517. Published 2021 May 25. doi:10.31729/jnma.5804.
4. Dobnig H, Amrein K. Monopolar Radiofrequency Ablation of Thyroid Nodules: A Prospective Austrian Single-Center Study. *Thyroid.* 2018;28(4):472-480. doi:10.1089/thy.2017.0547.
5. Goldberg SN, Gazelle GS, Mueller PR. Thermal Ablation Therapy for Focal Malignancy. *American Journal of Roentgenology.* 2000;174(2):323-331. doi:10.2214/ajr.174.2.1740323.
6. Westlake B, Mazzi J, Tedesco N. Osteoid Osteoma Treatment with Microwave Ablation: A Report of Two Cases. *Medicina (Kaunas).* 2021;57(5):470. Published 2021 May 11. doi:10.3390/medicina57050470.
7. Brace CL. Radiofrequency and microwave ablation of the liver, lung, kidney, and bone: what are the differences?. *Curr Probl Diagn Radiol.* 2009;38(3):135-143. doi:10.1067/j.cpradiol.2007.10.001.
8. Clemmesen TBR, Achiam MP, Pedersen CR, Larsen PN. *Ugeskr Laeger.* 2019;181(36):V12180868.
9. Xu Z, Xie H, Zhou L, Chen X, Zheng S. The Combination Strategy of Transarterial Chemoembolization and Radiofrequency Ablation or Microwave Ablation against Hepatocellular Carcinoma. *Anal*

- Cell Pathol (Amst)*. 2019;2019:8619096. Published 2019 Aug 26. doi:10.1155/2019/8619096.
10. Suwa K, Seki T, Aoi K, et al. Efficacy of microwave ablation versus radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: a propensity score analysis. *Abdom Radiol (NY)*. 2021;46(8):3790-3797. doi:10.1007/s00261-021-03008-9.
 11. Wei F, Huang Q, Zhou Y, Luo L, Zeng Y. Radiofrequency ablation versus repeat hepatectomy in the treatment of recurrent hepatocellular carcinoma in subcapsular location: a retrospective cohort study. *World J Surg Oncol*. 2021;19(1):175. Published 2021 Jun 14. doi:10.1186/s12957-021-02277-4.
 12. Izzo F, Granata V, Grassi R, et al. Radiofrequency Ablation and Microwave Ablation in Liver Tumors: An Update. *Oncologist*. 2019;24(10):e990-e1005. doi:10.1634/theoncologist.2018-0337.
 13. Choi JW, Lee JM, Lee DH, et al. Radiofrequency Ablation Using a Separable Clustered Electrode for the Treatment of Hepatocellular Carcinomas: A Randomized Controlled Trial of a Dual-Switching Monopolar Mode Versus a Single-Switching Monopolar Mode. *Korean J Radiol*. 2021;22(2):179-188. doi:10.3348/kjr.2020.0134.
 14. Elfatairy K. Radiofrequency Ablation of Liver Tumors in Patients Receiving Antithrombotic Therapy, Is It Safe?. *Radiol Imaging Cancer*. 2021;3(5):e219019. doi:10.1148/rycan.2021219019.
 15. Conticchio M, Inchingolo R, Delvecchio A, et al. Radiofrequency ablation vs surgical resection in elderly patients with hepatocellular carcinoma in Milan criteria. *World J Gastroenterol*. 2021;27(18):2205-2218. doi:10.3748/wjg.v27.i18.2205.
 16. Yang D, Zhuang B, Wang Y, Xie X, Xie X. Radiofrequency ablation versus hepatic resection for recurrent hepatocellular carcinoma: an updated meta-analysis. *BMC Gastroenterol*. 2020;20(1):402. Published 2020 Nov 27. doi:10.1186/s12876-020-01544-0.
 17. Xu L, Ke S, Gao J, Sun WB. Intrahepatic hemorrhage and recurrence caused by arteriportal fistula after radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: A thought-provoking ablation-related complication. *Asian J Surg*. 2021;44(7):996-999. doi:10.1016/j.asjsur.2021.04.030.

18. Xu Z, Xie H, Zhou L, Chen X, Zheng S. The Combination Strategy of Transarterial Chemoembolization and Radiofrequency Ablation or Microwave Ablation against Hepatocellular Carcinoma. *Anal Cell Pathol (Amst)*. 2019;2019:8619096. Published 2019 Aug 26. doi:10.1155/2019/8619096.
19. Cao S, Lyu T, Fan Z, et al. Long-term outcome of percutaneous radiofrequency ablation for periportal hepatocellular carcinoma: tumor recurrence or progression, survival and clinical significance. *Cancer Imaging*. 2022;22(1):2. Published 2022 Jan 4. doi:10.1186/s40644-021-00442-2.
20. Qi X, Yang M, Ma L, et al. Synergizing sunitinib and radiofrequency ablation to treat hepatocellular cancer by triggering the antitumor immune response. *J Immunother Cancer*. 2020;8(2):e001038. doi:10.1136/jitc-2020-001038.
21. da Costa AC, Sodergren M, Jayant K, et al. Radiofrequency combined with immunomodulation for hepatocellular carcinoma: State of the art and innovations. *World J Gastroenterol*. 2020;26(17):2040-2048. doi:10.3748/wjg.v26.i17.2040.
22. Kim MD. Microwave thermosphere versus radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: Are we approaching the time to end the debate?. *Clin Mol Hepatol*. 2021;27(4):560-561. doi:10.3350/cmh.2021.0279.
23. Tamai H, Okamura J. New next-generation microwave thermosphere ablation for small hepatocellular carcinoma. *Clin Mol Hepatol*. 2021;27(4):564-574. doi:10.3350/cmh.2021.0136.
24. Wen SQ, Wan M, Len KM, et al. Safety and Efficacy of Laparoscopic Radiofrequency Ablation for Hepatic Hemangiomas: A Multicenter Retrospective Study. *Ann Hepatol*. 2018;17(2):268-273. doi:10.5604/01.3001.0010.8653.
25. Mansilla-Vivar R, Argüello-Viúdez L, Sánchez-Montes C, Alonso-Lázaro N, Pons-Beltrán V. Endoluminal radiofrequency ablation with SpyGlass™ in the management of cholangiocarcinoma. *Rev Esp Enferm Dig*. 2019;111(10):803-805. doi:10.17235/reed.2019.6230/2019.

26. Cho JH, Jang SI, Do MY, Lee DK. *Korean J Gastroenterol.* 2021;78(4):205-212. doi:10.4166/kjg.2021.121.
27. Javadov M, Karatay E, Ugurlu MU. Clinical and functional results of radiofrequency ablation and microwave ablation in patients with benign thyroid nodules. *Saudi Med J.* 2021;42(8):838-846. doi:10.15537/smj.2021.42.8.20210307.
28. Jin H, Fan J, Lu L, Cui M. A Propensity Score Matching Study Between Microwave Ablation and Radiofrequency Ablation in Terms of Safety and Efficacy for Benign Thyroid Nodules Treatment. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021;12:584972. Published 2021 Mar 9. doi:10.3389/fendo.2021.584972.
29. Hu K, Wu J, Dong Y, Yan Z, Lu Z, Liu L. Comparison between ultrasound-guided percutaneous radiofrequency and microwave ablation in benign thyroid nodules. *J Cancer Res Ther.* 2019;15(7):1535-1540. doi:10.4103/jcrt.JCRT_322_19.
30. Bisceglia A, Rossetto R, Garberoglio S, et al. Predictor Analysis in Radiofrequency Ablation of Benign Thyroid Nodules: A Single Center Experience. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021;12:638880. Published 2021 May 17. doi:10.3389/fendo.2021.638880.
31. Dobnig H, Amrein K. Monopolar Radiofrequency Ablation of Thyroid Nodules: A Prospective Austrian Single-Center Study. *Thyroid.* 2018;28(4):472-480. doi:10.1089/thy.2017.0547.
32. Ha SM, Shin JY, Baek JH, et al. Does Radiofrequency Ablation Induce Neoplastic Changes in Benign Thyroid Nodules: A Preliminary Study. *Endocrinol Metab (Seoul).* 2019;34(2):169-178. doi:10.3803/EnM.2019.34.2.169.
33. Hu K, Lian Y, Wang J, et al. Management of bleeding associated with radiofrequency ablation of benign thyroid nodules. *J Int Med Res.* 2020;48(8):300060520937526. doi:10.1177/0300060520937526.
34. Yan L, Zhang M, Song Q, Xiao J, Zhang Y, Luo Y. The Efficacy and Safety of Radiofrequency Ablation for Bilateral Papillary Thyroid Microcarcinoma. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021;12:663636. Published 2021 Jun 11. doi:10.3389/fendo.2021.663636.

35. Monpeyssen H, Alamri A, Ben Hamou A. Long-Term Results of Ultrasound-Guided Radiofrequency Ablation of Benign Thyroid Nodules: State of the Art and Future Perspectives-A Systematic Review. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:622996. Published 2021 May 26. doi:10.3389/fendo.2021.622996.
36. He HY, Luo YK, Zhang Y, et al. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*. 2021;43(3):322-327. doi:10.3881/j.issn.1000-503X.13813.
37. Lan Y, Luo Y, Zhang M, et al. Quality of Life in Papillary Thyroid Microcarcinoma Patients Undergoing Radiofrequency Ablation or Surgery: A Comparative Study. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:249. Published 2020 May 15. doi:10.3389/fendo.2020.00249.
38. Liu BD, Ye X, Fan WJ, et al. Expert consensus on image-guided radiofrequency ablation of pulmonary tumors: 2018 edition. *Thorac Cancer*. 2018;9(9):1194-1208. doi:10.1111/1759-7714.12817.
39. Świątokrzyskie Centrum Onkologii: Ogólnopolski Program Wczesnego Wykrywania Raka Płuca (WWRP) za Pomocą Niskodawkowej Tomografii Komputerowej (NDTK) – połączenie prewencji wtórnej z pierwotną w celu poprawy świadomości dotyczącej raka płuca wśród społeczeństwa i personelu ochrony zdrowia (Załącznik nr 17) https://www.onkol.kielce.pl/sites/default/files/zalaczniki/04_zalacznik_nr_3_opwwrp.pdf Dostęp: 14.02.2022r.
40. Tan X, Liu B. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*. 2021;24(10):677-682. doi:10.3779/j.issn.1009-3419.2021.101.35.
41. Song GQ, Li GG, Chen F, et al. Radiofrequency ablation for lung squamous cell carcinoma in a single-lung patient: A case report and literature review. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(23):e15805. doi:10.1097/MD.0000000000015805.
42. Li M, Qin Y, Mei A, Wang C, Fan L. Effectiveness of radiofrequency ablation therapy for patients with unresected Stage IA non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Ther*. 2020;16(5):1007-1013. doi:10.4103/jcrt.JCRT_1040_19.
43. Tselikas L, Garzelli L, Mercier O, et al. Radiofrequency ablation versus surgical resection for the treatment of oligometastatic lung

- disease. *Diagn Interv Imaging*. 2021;102(1):19-26. doi:10.1016/j.diii.2020.09.006.
44. Zuo T, Lin W, Liu F, Xu J. Artificial pneumothorax improves radiofrequency ablation of pulmonary metastases of hepatocellular carcinoma close to mediastinum. *BMC Cancer*. 2021;21(1):505. Published 2021 May 6. doi:10.1186/s12885-021-08223-7.
45. Futani H, Takaki H, Sawai T, et al. Long-term survival following radiofrequency ablation of lung metastases in an elderly patient with calcaneal osteosarcoma: A case report and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 2021;100(34):e26681. doi:10.1097/MD.00000000000026681.
46. Hasegawa T, Kuroda H, Sakakura N, et al. Novel strategy to treat lung metastases: Hybrid therapy involving surgery and radiofrequency ablation. *Thorac Cancer*. 2021;12(14):2085-2092. doi:10.1111/1759-7714.14041.
47. Sun YD, Zhang H, Liu JZ, et al. Efficacy of radiofrequency ablation and microwave ablation in the treatment of thoracic cancer: A systematic review and meta-analysis. *Thorac Cancer*. 2019;10(3):543-550. doi:10.1111/1759-7714.12973.
48. Bibok A, Kim DW, Malafa M, Kis B. Minimally invasive image-guided therapy of primary and metastatic pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 2021;27(27):4322-4341. doi:10.3748/wjg.v27.i27.4322.
49. Wang J, Wang Y, Zhao Y, et al. Endoscopic ultrasound-guided radiofrequency ablation of unresectable pancreatic cancer with low ablation power and multiple applications: a preliminary study of 11 patients. *Ann Palliat Med*. 2021;10(2):1842-1850. doi:10.21037/apm-20-1468.
50. Granata V, Grassi R, Fusco R, et al. Local ablation of pancreatic tumors: State of the art and future perspectives. *World J Gastroenterol*. 2021;27(23):3413-3428. doi:10.3748/wjg.v27.i23.3413.
51. Crinò SF, D'Onofrio M, Bernardoni L, et al. EUS-guided Radiofrequency Ablation (EUS-RFA) of Solid Pancreatic Neoplasm Using an 18-gauge Needle Electrode: Feasibility, Safety, and Technical

- Success. *J Gastrointestin Liver Dis.* 2018;27(1):67-72. doi:10.15403/jgld.2014.1121.271.eus.
52. Walma MS, Rombouts SJ, Brada LJH, et al. Radiofrequency ablation and chemotherapy versus chemotherapy alone for locally advanced pancreatic cancer (PELICAN): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials.* 2021;22(1):313. Published 2021 Apr 29. doi:10.1186/s13063-021-05248-y.
53. He C, Wang J, Zhang Y, Cai Z, Lin X, Li S. Comparison of combination therapies in the management of locally advanced pancreatic cancer: Induction chemotherapy followed by irreversible electroporation vs radiofrequency ablation. *Cancer Med.* 2020;9(13):4699-4710. doi:10.1002/cam4.3119.
54. Park BK. Percutaneous Adrenal Radiofrequency Ablation: A Short Review for Endocrinologists. *Endocrinol Metab (Seoul).* 2020;35(4):750-755. doi:10.3803/EnM.2020.880.
55. Donlon P, Denny MC. Thermal ablation in adrenal disorders: a discussion of the technology, the clinical evidence and the future. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2021;28(3):291-302. doi:10.1097/MED.0000000000000627.
56. Zhong J, Wah TM. Renal ablation: current management strategies and controversies. *Chin Clin Oncol.* 2019;8(6):63. doi:10.21037/cco.2019.12.08.
57. Yan S, Yang W, Zhu CM, Yan PM, Wang ZC. Comparison among cryoablation, radiofrequency ablation, and partial nephrectomy for renal cell carcinomas sized smaller than 2cm or sized 2-4cm: A population-based study. *Medicine (Baltimore).* 2019;98(21):e15610. doi:10.1097/MD.00000000000015610.
58. Matsui Y, Hiraki T, Gobara H, et al. Percutaneous thermal ablation for renal cell carcinoma in patients with Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Diagn Interv Imaging.* 2019;100(11):671-677. doi:10.1016/j.diii.2019.06.009.
59. Koo JS, Chung SH. The Efficacy of Radiofrequency Ablation for Bone Tumors Unsuitable for Radical Excision. *Clin Orthop Surg.* 2021;13(2):278-285. doi:10.4055/cios19179.

60. De Filippo M, Russo U, Papapietro VR, et al. Radiofrequency ablation of osteoid osteoma. *Acta Biomed.* 2018;89(1-S):175-185. Published 2018 Jan 19. doi:10.23750/abm.v89i1-S.7021.
61. Somma F, Stoia V, D'Angelo R, Fiore F. Imaging-guided radiofrequency ablation of osteoid osteoma in typical and atypical sites: Long term follow up. *PLoS One.* 2021;16(3):e0248589. Published 2021 Mar 18. doi:10.1371/journal.pone.0248589.
62. Tanrıverdi B, Erbahçeci Salık A, Çetingök H, et al. Multidisciplinary approach in the treatment of osteoid osteoma with radiofrequency ablation. *Jt Dis Relat Surg.* 2020;31(2):255-259. doi:10.5606/ehc.2020.71413.
63. Paladini A, Lucatelli P, Cappelli F, et al. Osteoid osteoma treated with radiofrequency ablation in non-operating room anesthesia. A different way of approaching ablative therapy on osteoid osteoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2018;22(17):5438-5446. doi:10.26355/eurrev_201809_15803.
64. Levy J, Hopkins T, Morris J, et al. Radiofrequency Ablation for the Palliative Treatment of Bone Metastases: Outcomes from the Multicenter OsteoCool Tumor Ablation Post-Market Study (OPuS One Study) in 100 Patients. *J Vasc Interv Radiol.* 2020;31(11):1745-1752. doi:10.1016/j.jvir.2020.07.014.

POTENCJAŁ TECHNOLOGII SZCZEPIONEK MRNA W TERAPII CHOROÓB NOWOTWOROWYCH

Julia Kaczmarczyk, Karolina Gancarczyk, Rafał Górka, Aleksandra Kaluża

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

Abstrakt: Szczepionki wykazują zastosowanie nie tylko w profilaktyce chorób zakaźnych, ale również w terapii chorób nowotworowych. Pierwsze takie szczepionki oparte na celowym wykorzystaniu komórek układu odpornościowego zostały dopuszczone do użytku już w 2010 roku i zastosowane w terapii nowotworu prostaty. Efektem dalszego rozwoju badań było zaprojektowanie szczepionek z mRNA wstrzykiwanym w sposób *ex vivo* do komórek dendrytycznych lub *śródkórn*ie umożliwiając pobudzenie komórek limfocytów T doprowadzających do zmniejszenia guza. W badaniach przedklinicznych na mysich modelach nowotworów, a także u pacjentów z zaawansowaną chorobą nowotworową w dalszych fazach badań klinicznych zaobserwowano wystąpienie odpowiedzi przeciwnowotworowych po zastosowaniu szczepionek z mRNA. Okazuje się, że wstrzyknięcie mRNA w sposób *dowężłowy* daje wysoce przeciwnowotworowe odpowiedzi terapeutyczne limfocytów T. Daje to naukowcom duże nadzieje na powszechne stosowanie szczepionek mRNA w leczeniu nowotworów.

Słowa kluczowe: szczepionka, mRNA, nowotwory, leczenie

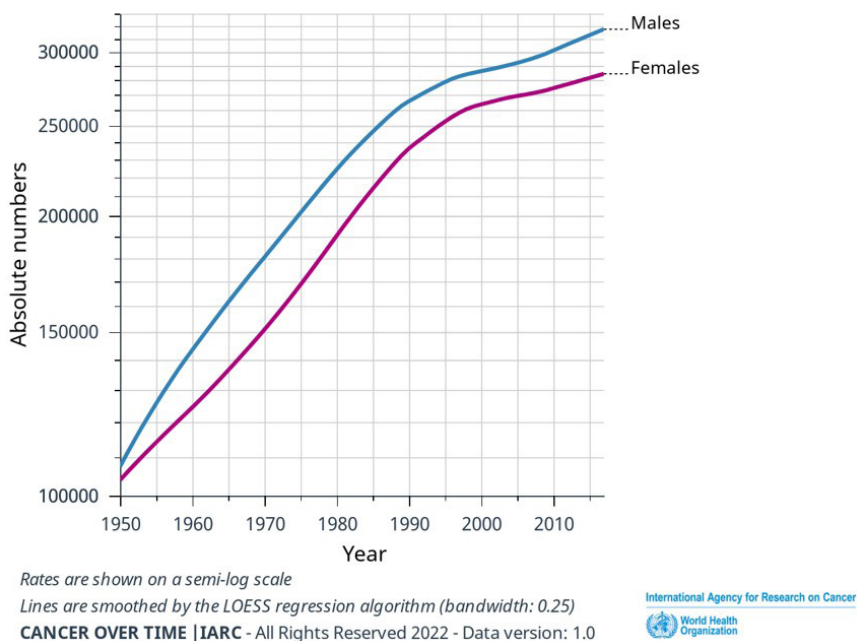
Abstract: Vaccines are used not only in the prevention of infectious diseases, but also in the treatment of cancer. The first such vaccines based on the targeted use of immune cells were approved for use as early as 2010 and used in the treatment of prostate cancer. The result of further development of the research was the design of vaccines with mRNA injected *ex vivo* into dendritic cells or intradermally, enabling the stimulation of T lymphocytes leading to tumor shrinkage. In preclinical studies in mouse tumor models, as well as in patients with advanced cancer, the development of anti-tumor responses with mRNA vaccines was observed in further phases of clinical trials. It turns out that the injection of mRNA into the lymph node produces highly anti-tumor therapeutic responses of T lymphocytes. This gives scientists high hopes for the widespread use of mRNA vaccines in the treatment of cancer.

Keywords: vaccine, mRNA, cancer, treatment

1. Wprowadzenie

W ostatnich dekadach zanotowano gwałtowny wzrost zarówno przypadków występowania nowotworów w populacji jak i śmiertelności z ich powodu. Przykładowo na przestrzeni ośmiu lat, między 2012 i 2020 rokiem liczba nowych przypadków wzrosła o 5,2 miliona. Na podstawie danych zebranych przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) nowotwory uznano za jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie (zaraz po chorobach sercowo-naczyniowych). Przyczyniły się do tego coraz częściej występujące czynniki ryzyka, obejmujące między innymi palenie wyrobów tytoniowych, czy też brak odpowiedniej aktywności fizycznej, ale także zjawiska demograficzne takie jak starzenie się społeczeństwa i wzrost populacji^{1,2,3,4}.

W ostatnich latach do najczęstszych terapii nowotworowych zalicza się chemioterapię, radioterapię oraz zabiegi chirurgiczne. Niestety te metody, co pokazują statystyki, nie są zbyt zadowalające, tym bardziej, że nie są wolne od wielu skutków ubocznych, działają na organizm w sposób ogólny i wywierają niszczący efekt nie tylko na tkanki i komórki zmienione chorobowo, ale także na te zdrowe. W związku z tym w ostatnich latach nasiliły się poszukiwania nowych, bardziej precyzyjnych rozwiązań, które działałyby w sposób wybiórczy i mniej destrukcyjny na organizm chorego. Ciągły rozwój medycyny i poszerzanie wiedzy o mechanizmach nowotworzenia oraz o innych okołomedycznych dziedzinach, takich jak immunologia czy nanotechnologia coraz bardziej przybliżają nas do nowych, lepszych rozwiązań. Jedną z najbardziej obiecujących metod są szczepionki mRNA, którym został poświęcony ten rozdział^{5,6}.



Rycina 1. Wykres przedstawia śmiertelność kobiet i mężczyzn z powodu chorób nowotworowych z wyłączeniem nieczerniakowego nowotworu skóry w latach 1950-2017 w USA⁷

2 Proces nowotworzenia i jego powiązanie z układem immunologicznym

Punkt wyjścia do stworzenia konkretnej terapii przeciwnowotworowej, a w tym przypadku leczenia z wykorzystaniem szczepionek mRNA, omawianego w dalszej części rozdziału, stanowi mechanizm transformacji nowotworowej, a także występujące zależności pomiędzy tym mechanizmem, a układem odpornościowym.

2.1. Proces nowotworzenia

Kancerogeneza, jest złożonym, wieloetapowym procesem, na którego poziomie molekularnym wyróżniamy; inicjację, promocję i progresję.

Na inicjację składają się pojedyncze mutacje i uszkodzenia materiału genetycznego. Mogą one powstać przykładowo w wyniku błędu podczas replikacji DNA, a następnie nie zostać wykryte i wyeliminowane przez systemy naprawcze. W fazie inicjacji dochodzi również do przekształcenia protoonkogenów (geny, które potencjalnie są w stanie zapoczątkować proces nowotworzenia) w onkogeny, które bezpośrednio prowadzą do transformacji nowotworowej komórki. Jednocześnie, dochodzi do inaktywacji onkogenów

supresorowych, to znaczy hamujących proliferację komórek, należy do nich między innymi gen kodujący białko p53 (zwany strażnikiem genomu, ze względu na jego rolę w aktywacji mechanizmów naprawczych DNA, bądź też kierowanie uszkodzonych komórek do apoptozy), a także BRCA1 i BRCA2, których inaktywacja zwiększa predyspozycje do zachorowania na nowotwór piersi i jajnika.

Kolejnym etapem nowotworzenia jest promocja, w której dochodzi do zwiększenia uszkodzenia DNA, powstania nowych mutacji oraz stymulacji proliferacji komórek w sposób niekontrolowany.

Ostatnim etapem jest progresja, rosnąca zmiana nowotworowa wytwarza substancje prowadzące do angiogenezy, czyli wytworzenia naczyń, które dostarcza substancji odżywczych, tlenu i czynników wzrostu potrzebnych do dalszego rozwoju nowotworu. Część komórek nowotworowych za pomocą tych nowo powstałych naczyń krwionośnych może przedostać się do innych tkanek organizmu, prowadząc do powstania kolejnej zmiany, tak zwanego przerzutu.⁸⁻¹²

2.2. Powiązanie transformacji nowotworowej z układem immunologicznym

Zmiany nowotworowe zbudowane są z macierzy zewnątrzkomórkowej oraz kilku rodzajów komórek, na które składają się między innymi komórki nowotworowe i dodatkowe, do których należą komórki śródbłonna, a także naciekające zmianę - komórki układu odpornościowego. To właśnie zależność pomiędzy nimi stymuluje wzrost nowotworu, prowadząc do przewlekłego stanu zapalnego. Wykazano, że powstały stan zapalny przyczynia się do niestabilności genomu, proliferacji komórek nowotworowych i wzmocnienia szlaków antyapoptotycznych - poprzez zachwianie równowagi pomiędzy tymi dwoma procesami, pobudzenia angiogenezy i powstania przerzutów, które stanowią jedno z największych wyzwań w leczeniu większości nowotworów.

Komórki nowotworowe ze względu na znaczną liczbę mutacji, traktowane są jako obce dla organizmu, a zatem takie, które prowadzą do reakcji i odpowiedzi immunologicznej. Mają również zdolność do wytwarzania chemokin i cytokin, przyciągających leukocyty, wśród których można wyróżnić neutrofile, makrofagi, eozynofile, komórki dendrytyczne, komórki tuczne i limfocyty. Wiele z wyżej wymienionych komórek układu odpornościowego ma działanie protekcyjne dla organizmu w przypadku wystąpienia nowotworu, prowadząc do bezpośredniego unicestwienia komórek nowotworowych

na przykład przez komórki NK (z ang. *natural killer* - naturalny zabójca), makrofagi czy też działanie limfocytów T CD8+ (limfocytów T cytotoksycznych - Tc). Jednakże makrofagi związane z guzem (TAM - z ang. *tumour associated macrophages*) mają dualistyczne znaczenie w procesie nowotworzenia. Z jednej strony po stymulacji przez interleukinę 2 czy 12 oraz interferon mogą zabijać komórki zmienione nowotworowo, a z drugiej mają zdolność wytwarzania angiogennych czynników wzrostu, wzmagających proces angiogenezy, hamują także odpowiedź limfocytów Tc, poprzez produkcję interleukiny 10, a co za tym idzie wspomagają proces progresji i promocji nowotworu. Neutrofile, eozynofile i komórki tuczne, również wykazują podobne znaczenie, uwalniając czynniki angiogenne, proteazy, reaktywne formy tlenu, czy też środki perforujące błonę. Kolejne z grupy, komórki dendrytyczne (DC - z ang. *dendritic cell*) to jedne z najbardziej wyspecjalizowanych komórek prezentujących antygen (APC - z ang. *antigen presenting cell*). Ulegają aktywacji przez antygeny nowotworowe, internalizują, przetwarzają i ostatecznie prezentują ich epitopy limfocytom Tc, tym samym prowadząc do rozwinięcia odpowiedzi immunologicznej o charakterze przeciwnowotworowym. Wykazano jednak, że DC, znajdujące się w naciekach nowotworowych, z reguły są niedojrzałe, a zdolność do stymulacji limfocytów Tc jest wadliwa.

Same komórki nowotworowe z kolei wykształciły szereg mechanizmów broniących je przed szkodliwym dla nich działaniem komórek układu immunologicznego, mogą nie zostać odebrane przez organizm jako obce, a własne i doprowadzić zamiast do produkcji limfocytów efektorowych Tc, to do produkcji limfocytów T regulatorowych (Treg), które mają chronić przed potencjalną autoagresją, a zatem działają supresyjnie i chronią komórki nowotworowe przed zniszczeniem, prowadząc do dalszego ich rozwoju.

Takie szczegółowe zapoznanie i studiowanie zależności pomiędzy układem immunologicznym a transformacją nowotworową, otworzyło świat nauki na wiele różnych możliwości i poszukiwanie nowych dróg leczenia nowotworów, które mogą być zorientowane zarówno na hamowanie mechanizmów szkodliwych, wzmagających transformację nowotworową, jak i na stymulowanie i naprawę procesów korzystnych, przeciwnowotworowych, co jest kluczowe w tworzeniu terapii bardziej specyficznych dla danego rodzaju nowotworu, ale też dla chorób nowotworowych ogółem. ¹³⁻²¹

3. Szczepionki jako nowa innowacyjna metoda leczenia nowotworów

Pierwsze próby szczepionek sięgają kilka stuleci wstecz, stąd do czasów współczesnych dokonał się w tej dziedzinie ogromny postęp, a ich zastosowanie znacznie się powiększyło. Obecnie szczepionki mogą służyć już nie tylko ochronnie w przypadku chorób zakaźnych, ale nawet predykcyjnie, bądź też terapeutycznie w przypadku chorób nowotworowych.²²

3.1. Szczepionki chroniące przed wystąpieniem nowotworu

Amerykańska instytucja rządowa - Agencja Żywności i Leków (FDA z ang. *Food and Drug Administration*) w 1986 roku dopuściła stosowanie szczepionki przeciw wirusowemu zapaleniu wątroby typu B (WZW B). Obecnie uznaje się, że wirus HBV, wywołujący tę chorobę, jest jednym z największych czynników ryzyka zachorowania na nowotwór wątrobowokomórkowy. Omawiana szczepionka chroni zatem nie tylko przed zachorowaniem na WZW B, ale zapobiega również wystąpieniu nowotworu wątrobowokomórkowego, będącego jego konsekwencją.^{23, 24}

Podobna sytuacja kształtuje się w przypadku szczepionki przeciw HPV (z ang. *Human Papillomavirus*) - wirusowi brodawczaka ludzkiego, która została dopuszczona przez FDA w 2006 roku. Wykazano, że ponad 70% wszystkich przypadków wystąpienia raka szyjki macicy spowodowane jest wcześniejszą infekcją spowodowaną przez HPV. Szczepionki przeciw HPV są aktualnie szeroko dostępne i bardzo ważne w profilaktyce przeciwnowotworowej.

Niestety, zarówno w przypadku szczepionki przeciw WZW B, jak i szczepionki przeciw HPV, są to tylko metody profilaktyczne i prewencyjne w zapobieganiu wystąpienia nowotworu. Jednakże nie są w stanie wyleczyć bądź cofnąć powstałych już zmian nowotworowych. Stąd na przestrzeni ostatnich lat trwały intensywne poszukiwania terapii z wykorzystaniem technologii szczepionek, które miałyby na celu także leczenie nowotworów.^{25, 26, 27}

3.2. Szczepionki o działaniu terapeutycznym

Dokładne poznanie procesu nowotworzenia, a także mechanizmów prowadzących do unikania odpowiedzi układu immunologicznego przez komórki nowotworowe, zaowocowało stworzeniem kilku technik szczepionek przeciwnowotworowych. Zaliczamy do nich szczepionki komórkowe, szczepionki

białkowe oraz szczepionki oparte na DNA lub RNA, którym poświęcone będą dalsze rozważania.²⁸

3.2.1. Szczepionki RNA

Zarówno szczepionki DNA jak i RNA mają wiele zalet. Są niedrogie, stabilnie syntezowane i mogą aktywować jednocześnie odporność na wiele epitopów. Mają zdolność do indukowania odpowiedzi komórek T CD4+ oraz CD8+. I chociaż szczepionki DNA, jak na przykład VGX3100 - przeciw rakowi szyjki macicy są bardzo obiecujące, to okazuje się, że szczepionki RNA mają więcej pożądanych cech. Nie muszą wchodzić do jądra komórkowego, mogą działać już w cytoplazmie, dzięki czemu znacznie maleje prawdopodobieństwo wystąpienia skutków ubocznych. Nie są również włączane do genomu, co zapobiega możliwej rakotwórczości. Aktualnie prowadzone są badania nad szczepionkami mRNA między innymi w leczeniu raka prostaty, raka nerki oraz czerniaka.^{28, 29}

3.2.2. Szczepionka mRNA w leczeniu raka prostaty

Pierwszą na świecie szczepionką przeciwnowotworową była szczepionka przeciw rakowi prostaty - Sipuleucel-T. Została zatwierdzona przez FDA w 2010 roku do leczenia przerzutowego raka prostaty opornego na kastrację. Jest to autologiczna szczepionka komórkowa, której mechanizm polega na pobraniu krwi obwodowej chorego, oczyszczeniu z komórek innych niż komórki prekursorowe DC, inkubowaniu ich z rekombinowanym białkiem fuzyjnym PA2024, składającym się z kwaśnej fosfatazy sterczowej (PAP - z ang. *prostatic acid phosphatase*) - specyficznym enzymem prostaty, który w połączeniu z DC indukuje limfocyty Tc, a te z kolei są zdolne do zabijania komórek prostaty zmienionych nowotworowo, oraz z czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF - z ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*). Takie połączenie powoduje silniejszą odpowiedź immunologiczną specyficzną dla antygeny. Po tym procesie, krew ponownie wstrzykiwana jest pacjentowi. Wykazano, że Sipuleucel-T wydłuża medianę przeżycia całkowitego o 4 miesiące, jednak nie wydłuża czasu przeżycia wolnego od progresji. Nie jest to także terapia wolna od skutków ubocznych. Stąd znalezienie nowych metod w leczeniu raka prostaty jest wciąż obszarem badań, a Sipuleucel-T stał się punktem wyjścia dla kolejnych prób, w tym stworzeniu szczepionki z wykorzystaniem mRNA.^{30, 31, 32}

Naturalnie występujące cząsteczki mRNA są niestabilne, a zatem skuteczność szczepienia z jego wykorzystaniem byłaby mało skuteczna, co można uznać za jedno z głównych ograniczeń takiej metody. Jednakże firma CureVac, pracująca nad wyprodukowaniem szczepionki przeciw nowotworowi prostaty (CV9103/CV9104), stworzyła platformę technologiczną RNActive®, gdzie mRNA zostaje poddawane pewnym modyfikacjom przy wykorzystaniu naturalnych nukleotydów. Cały proces prowadzi do wzrostu aktywności oraz zwiększenia ekspresji całkowitej białka. Sam mRNA jednak nie zapewnia wystarczającej immunostymulacji, stąd mRNA łączone jest z protaminą, co pozwala na wywołanie odpowiedzi immunologicznej limfocytów T, również z udziałem receptorów toll-podobnych (TLR7 i TLR8, z ang. Toll-like-receptors). Wykazano, że udział TLR7 jest kluczowe dla działania szczepionki, zauważając, że u myszy pozbawionej TLR7, nie występowało pożądane działanie immunostymulujące. W fazie badań przedklinicznych, nowopowstającej szczepionki CV9104 zaczęto od wytworzenia związków kodujących owoalbuminę oraz antygen błonowy swoisty dla prostaty (PSMA - z ang. *prostate specific membrane antigen*) - należący do antygenów związanych z nowotworem (TAA - *tumour associated antigens*). Do badania użyto mysich modeli, zaszczepionych profilaktycznie szczepionką kodującą owoalbuminę, a następnie poddanych działaniu komórek nowotworowych. Drugim wariantem były również mysie modele, ale najpierw potraktowane komórkami nowotworowymi, a dopiero później, po wykształceniu zmiany, immunizowane szczepionką owoalbuminy. W modelu ze szczepieniem profilaktycznym zauważono opóźnienie wzrostu guza o około 3 tygodnie, natomiast w modelu drugim, z terapeutycznym wykorzystaniem szczepionki wykazano zahamowanie wzrostu guza przez okres jednego tygodnia. Ponadto, u zaszczepionych myszy stwierdzono zwiększoną liczbę i trwałość limfocytów Tc, nawet już po dwóch szczepieniach.

Szczepionka CV-9104 oraz jej prekursor CV-9103 oparte są na antygenach specyficznych dla prostaty TAA, do których zaliczamy: PSA - antygen swoisty dla prostaty (z ang. *prostate specific antigen*), PSMA, PSCA - antygen komórek macierzystych prostaty (z ang. *prostate stem cell antigen*) i STEAP - sześć transbłonowych antygenów nabłonkowych prostaty (z ang. *six transmembrane epithelial antigen of the prostate*), a każdy z nich jest celem dla immunoterapii, połączonej z wytwarzaniem specyficznych Tc względem nich. W pierwszej i drugiej fazie badania klinicznego podawano pacjentom CV9103 śródskórnym w pięciu dawkach, ponadto grupę badanych podzielono na 3 części, tak, aby każda z nich przyjmowała preparat z inną zawartością

mRNA, odpowiednio były to: 256 µg, 640 µg i 1280 µg. Badanie wykazało, że śródskórna droga podania CV9103 jest skuteczna w pobudzaniu APC, w tym DC, a u 80% pacjentów wykryto komórki T swoiste dla antygenów związanych z rakiem prostaty. Zanotowano także wzrost występowania limfocytów B oraz aktywności komórek NK. Pomimo wystąpienia kilku skutków ubocznych, takich jak objawy grypopodobne, czy też zatrzymanie moczu u pacjentów, którzy przyjęli największą dawkę, szczepionka została uznana za bezpieczną. Po wstępnej ocenie, zmieniono skład szczepionki, dodając do niej cząsteczki mRNA kodujące PAP i glikoproteinę Mucin 1 (MUC1) i zmieniając nazwę na CV9104. Preparat ten jest poddawany testom klinicznym w randomizowanych, kontrolowanych badaniach z udziałem pacjentów z opornym na kastrację rakiem prostaty z przerzutami, po chirurgicznej lub hormonalnej kastracji oraz dotyczących pacjentów z rakiem prostaty wysokiego ryzyka, ale bez przerzutów, zakwalifikowanych do prostatektomii. Celem trwających badań jest ustalenie czy szczepienie preparatem CV9104 może doprowadzić do zmian w tkance guza i w odpowiedzi immunologicznej, a także zidentyfikowanie czynników z mikrośrodowiska guza, które mogą hamować korzystne działanie preparatu na nowotwór.³³⁻³⁸

3.2.3. Szczepionka mRNA w leczeniu raka nerki

Rak nerkowokomórkowy (RCC - z ang. *renal cell cancer*) jest nowotworem występującym stosunkowo rzadko, jednak nie rokującym zbyt dobrze, jeśli nie zostanie zdiagnozowany we wczesnym stadium. Szacuje się, że u około 30% chorych dochodzi do powstania przerzutów, co prowadzi do pięcioletniej przeżywalności mniejszej niż 10%. Stąd terapia dla pacjentów z zaawansowaną postacią RCC wciąż stanowi wyzwanie dla współczesnej medycyny. Dzięki rozwojowi immunologii nowotworowej w ostatnich latach, zidentyfikowane zostało kilka TAA, ulegających ekspresji w RCC, które są rozpoznawane przez limfocyty Tc. Ta wiedza posłużyła w dalszych badaniach i próbach stworzenia szczepionki przeciwnowotworowej. Początkowo, na mysich modelach wykazano, że bezpośrednie śródskórne podanie nagiego mRNA skutecznie indukuje wytwarzanie odpowiedzi limfocytów T, specyficznych dla antygenów nowotworowych. Następnie w pierwszej i drugiej fazie badań, u pacjentów z zaawansowanym RCC, sprawdzano bezpieczeństwo i zdolność do wywołania odpowiedzi immunologicznej na szczepienie zawierające mRNA, kodujące TAA oraz adiuwant GM-CSF. Chorym biorącym udział w badaniu wstrzykiwano śródskórnie mRNA, kodujące MUC1, CEA (antygen rakowo-

płodowy, z ang. *carcinoembryonic antigen*), Her2/neu (receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu 2), telomerazę, surwiwinę i MAGE-1 (antygen związany z czerniakiem 1). U pacjentów nastąpiła indukcja odpowiedzi limfocytów CD4+ i CD8+ dla kilku TAA. Szczepienia były dobrze tolerowane, nie występowały ciężkie skutki uboczne, jedynie ból, zaczerwienienie w miejscu wkłucia, gorączka nie wyższa niż 38°C. Średnia mediana przeżycia wynosiła 24-29 miesięcy, w zależności od kohorty, a 27% chorych przeżyło ponad 5 lat. Zanotowano również zależność pomiędzy indukcją odpowiedzi immunologicznej a korzyścią kliniczną. Biorąc pod uwagę tę korelację mediana przeżycia u chorych z odpowiedzią immunologiczną osiągnęła 89 miesięcy, a u pacjentów, u których nie doszło do wytworzenia odpowiedzi immunologicznej zaledwie 14 miesięcy. Pacjenci biorący udział w badaniu byli pod obserwacją przez 10 lat, co dowiodło bezpieczeństwa i dobrej tolerancji tej metody.^{39, 40}

Obecnie, szczepionki mRNA mające na celu leczenie raka nerki, stały się ponownie tematem dyskusji i nowych badań. Między innymi kształtuje się obecnie badanie nad szczepionką przeciw jasnokomórkowemu rakowi nerki (TCGA-KIRC), co stanowi nieco zawężone pole poszukiwań. Zakwalifikowano cztery neoantygeny, jako potencjalnych kandydatów do wykorzystania w terapii: topoizomeraza DNA II alfa (TOP2A), czynnik cytozolowy neutrofilii (NCF4), białko podobne do forminy 1 (FMNL1) i białko dokujące 3 (DOK 3). Wszystkie wymienione antygeny są powiązane z komórkami prezentującymi antygen w TCGA-KIRC, co nie pozostaje bez znaczenia dla indukcji odpowiedzi immunologicznej, co wynika z wcześniejszej części rozdziału. Stąd, wyżej wymienione antygeny mogą okazać się potencjalnie skuteczne w leczeniu TCGA-KIRC.⁴¹

3.2.4. Szczepionka mRNA w leczeniu czerniaka

Czerniak jest jednym z najgroźniejszych nowotworów skóry, o niskim wskaźniku przeżywalności, ze względu na jego zdolność do szybkiego tworzenia przerzutów. Najnowocześniejszą metodą leczenia czerniaka jest immunoterapia, która ciągle się rozwija. Jedną z cech czerniaka, sprzyjającą takiej metodyce, jest duża częstość występowania mutacji, czyniąca go wysoce immunogennym. To sprawia, że dostarczane jest wiele antygenów, które potencjalnie mogą zostać wybrane przy formułowaniu szczepionki mRNA. Do antygenów związanych z czerniakiem zaliczamy między innymi antygeny różnicowania melanocytów, takie jak: białka związane z tyrozynazą (TRP-1 i TRP-2), antygen melanocytów (MELAN-A/MART-1), glikoproteinę 75

(gp75) i glikoproteinę 100 (gp100). Ich odkrycie znacznie przyczyniło się do powstania nowych metod w immunoterapii czerniaka, wybór konkretnych antygenów jest kluczowy w opracowaniu szczepionki przeciwnowotworowej. W ostatnich latach na szczególną uwagę zasługują badania zajmujące się opracowywaniem szczepionki mRNA opartej na DC. DC to komórki najsilniej prezentujące antygen, stąd stanowią główny cel immunoterapii. W 2012 roku przeprowadzono badanie, w którym podawano pacjentom z zaawansowaną postacią czerniaka, w sposób dowęzłowy szczepionkę składającą się z DC pochodzących z monocytów (MDDC - z ang. *monocyte-derived dendritic cells*) oraz mRNA kodującego gp100 i tyrozinazę. Wykazano wyraźną odpowiedź limfocytów CD4+ i CD8+, specyficznych dla antygenów czerniaka oraz kliniczne korzyści. Jednakże produkcja tego typu szczepionki okazała się być bardzo droga i pracochłonna, ze względu na to, że DC stanowią ok. 0,1% jednojądrzastych komórek krwi obwodowej, a zatem ich pozyskanie jest trudne. Stąd poszukiwania nad lepszymi metodami trwały dalej. W kolejnym badaniu testowano szczepionkę in vivo mRNA, kodującą neoepitop, również ukierunkowaną na DC i podawaną dowęzłowo. Wykazano, że taki sposób podania jest bardziej efektywny, ponieważ powoduje taki sam poziom immunogenności jak przy innych drogach podania, jednak przy niższych dawkach szczepionki. Odkryto również, że nie tylko szczepionki ukierunkowane na antygen, ale także kodujące immunostymulanty mogą stymulować APC i odpowiedź immunologiczną zależną od limfocytów T, a także prowadzą do modyfikacji mikrośrodowiska nowotworu. Jedną z takich szczepionek jest TriMix, zawierająca mRNA kodujące CD70 - w celu aktywacji CD8+, CD40L - do stymulacji CD4+, a także TLR4 - odpowiadający za promocję prezentacji antygeny przez DC. Udowodniono, że jest to preparat dobrze tolerowany i immunogeny. W 2017 roku rozpoczęło się badanie nad szczepionką, która łączy TriMix i mRNA kodujące TAA dla czerniaka. Szczepionka widnieje pod nazwą ECI006 i również jest podawana dowęzłowo i jest dobrze tolerowana. Badanie wciąż znajduje się w pierwszej fazie, ale aktualne dane mogą już zostać uznane za obiecujące. W badaniu udokumentowano, że po okresie jednego roku 71% pacjentów poddanych terapii było wolnych od choroby (w próbie kontrolnej 35%).⁴²⁻⁵⁰

4. Podsumowanie

Poszukiwania terapii dla leczenia nowotworów trwają od wielu lat i stanowią jedno z największych wyzwań medycyny. Jednakże na przestrzeni

ostatnich lat, wraz z rozwojem immunologii oraz technik molekularnych, powstało wiele badań klinicznych, zajmujących się właśnie tematem immunoterapii nowotworów, a jej rozwój nabrał znacznie szybszego tempa. Jedną z metod, której szczególnie poświęcono wiele rozważań jest szczepionka z wykorzystaniem mRNA o działaniu terapeutycznym. Prezentowane wyniki dają nadzieję na poprawienie stanu zdrowia oraz komfortu życia pacjentów z chorobą nowotworową. Warto zatem śledzić w najbliższym czasie dalsze fazy kliniczne rozpoczętych badań, ponieważ dokonuje się ogromny przełom w tej dziedzinie.

Referencje

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2015;65(2):87-108. doi:10.3322/caac.21262
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660
3. Cancer Over Time. gco.iarc.fr. <https://gco.iarc.fr/overtime/en>
4. Mattiuzzi C, Lippi G. Current Cancer Epidemiology. *J Epidemiol Glob Health*. 2019;9(4):217-222. doi:10.2991/jegh.k.191008.001
5. Chmielewska S, Zambrzycka A, Czyżewska U, et al. NOWOCZESNE TERAPIE CELOWANE W LECZENIU NOWOTWORÓW JAKO ALTERNATYWA DLA KONWENCJONALNEJ CHEMIOTERAPII. *Pbkom.eu*.
6. Gerber DE. Targeted Therapies: A New Generation of Cancer Treatments. *American Family Physician*. 2014;77(3):311-319. <https://www.aafp.org/afp/2008/0201/p311.html>
7. Cancer Over Time. gco.iarc.fr. Accessed March 15, 2022. https://gco.iarc.fr/overtime/en/dataviz/trends?multiple_populations=0&cancers=0&sexes=1_2&populations=84000&key=total&mode=cancer&multiple_cancers=1&years=1950_2017&hide_tab_age_specific_numbers=0&cohort=period&age_start=0&types=1

8. Siedlecki J. *Biologia molekularna nowotworów*. In: *Podstawy Onkologii Klinicznej*. Warszawa; 2011:41-46.
9. Olszewski W. *Podstawy patologii nowotworów*. In: *Podstawy Onkologii Klinicznej*. Warszawa; 2011:29-40
10. Farnebo M, Bykov VJN, Wiman KG. The p53 tumor suppressor: A master regulator of diverse cellular processes and therapeutic target in cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010;396(1):85-89. doi:10.1016/j.bbrc.2010.02.152
11. Welch PL. BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Human Molecular Genetics*. 2001;10(7):705-713. doi:10.1093/hmg/10.7.705
12. Budhram-Mahadeo V, Ndisang D, Ward T, Weber BL, Latchman DS. The Brn-3b POU family transcription factor represses expression of the BRCA-1 anti-oncogene in breast cancer cells. *Oncogene*. 1999;18(48):6684-6691. doi:10.1038/sj.onc.1203072
13. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*. 2013;39(1):1-10. doi:10.1016/j.immuni.2013.07.012
14. Zhang Y, Zhang Z. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. *Cell Mol Immunol*. 2020;17(8):807-821. doi:10.1038/s41423-020-0488-6
15. Janssen LME, Ramsay EE, Logsdon CD, Overwijk WW. The immune system in cancer metastasis: friend or foe?. *J Immunother Cancer*. 2017;5(1):79. Published 2017 Oct 17. doi:10.1186/s40425-017-0283-9
16. Prieto LI, Baker DJ. Cellular Senescence and the Immune System in Cancer. *Gerontology*. 2019;65(5):505-512. doi:10.1159/000500683
17. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420(6917):860-867. doi:10.1038/nature01322
18. Gonzalez H, Hagerling C, Werb Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes Dev*. 2018;32(19-20):1267-1284. doi:10.1101/gad.314617.118

19. de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(1):24-37. doi:10.1038/nrc1782
20. Wang T, Shen Y, Luyten S, Yang Y, Jiang X. Tissue-resident memory CD8+ T cells in cancer immunology and immunotherapy. *Pharmacol Res*. 2020;159:104876. doi:10.1016/j.phrs.2020.104876
21. Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity*. 2014 Jul 17;41(1):49-61. doi:10.1016/j.immuni.2014.06.010. Erratum in: *Immunity*. 2014 Nov 20;41(5):866. PMID: 25035953; PMCID: PMC4137410.
22. Plotkin SA. *History of Vaccine Development*. Springer Science & Business Media; 2011. Accessed March 20, 2022
23. Das S, Ramakrishnan K, Behera SK, Ganesapandian M, Xavier AS, Selvarajan S. Hepatitis B Vaccine and Immunoglobulin: Key Concepts. *J Clin Transl Hepatol*. 2019;7(2):165-171. doi:10.14218/JCTH.2018.00037
24. McGlynn KA, Petrick JL, El-Serag HB. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*. 2021;73 Suppl 1(Suppl 1):4-13. doi:10.1002/hep.31288
25. Wysocki J, Jackowska T, Małecka I, Stryczyńska-Kazubska J, Połęba R, Chybicka A. Szczepienia przeciw wirusowi brodawczaka ludzkiego (HPV) u dzieci i młodzieży jako element profilaktyki raka szyjki macicy. *Pediatrics Polska*. 2012;87(6):637-644. doi:10.1016/j.papo.2012.11.001
26. Cheng MA, Farmer E, Huang C, Lin J, Hung CF, Wu TC. Therapeutic DNA Vaccines for Human Papillomavirus and Associated Diseases. *Hum Gene Ther*. 2018;29(9):971-996. doi:10.1089/hum.2017.197
27. HPV vaccination: From FDA approval to school mandates - ProQuest. www.proquest.com. Accessed March 20, 2022.
28. Igarashi Y, Sasada T. Cancer Vaccines: Toward the Next Breakthrough in Cancer Immunotherapy. *J Immunol Res*. 2020;2020:5825401. Published 2020 Nov 17. doi:10.1155/2020/5825401

29. Tagliamonte M, Petrizzo A, Tornesello ML, Buonaguro FM, Buonaguro L. Antigen-specific vaccines for cancer treatment. *Hum Vaccin Immunother.* 2014;10(11):3332-3346. doi:10.4161/21645515.2014.973317
30. Handy CE, Antonarakis ES. Sipuleucel-T for the treatment of prostate cancer: novel insights and future directions. *Future Oncol.* 2018;14(10):907-917. doi:10.2217/fon-2017-0531
31. Sutherland SIM, Ju X, Horvath LG, Clark GJ. Moving on From Sipuleucel-T: New Dendritic Cell Vaccine Strategies for Prostate Cancer. *Front Immunol.* 2021;12:641307. Published 2021 Mar 29. doi:10.3389/fimmu.2021.641307
32. Dendreon. A Randomized, Double Blind, Placebo Controlled Phase 3 Trial of Immunotherapy With Autologous Antigen Presenting Cells Loading With PA2024 (Provenge(R), APC8015) in Men With Metastatic Androgen Independent Prostatic Adenocarcinoma. *clinicaltrials.gov.* Published September 2, 2010. Accessed March 10, 2022.
33. Rausch S, Schwentner C, Stenzl A, Bedke J. mRNA vaccine CV9103 and CV9104 for the treatment of prostate cancer. *Hum Vaccin Immunother.* 2014;10(11):3146-3152. doi:10.4161/hv.29553
34. Kallen KJ, Heidenreich R, Schnee M, et al. A novel, disruptive vaccination technology: self-adjuvanted RNActive(®) vaccines. *Hum Vaccin Immunother.* 2013;9(10):2263-2276. doi:10.4161/hv.25181
35. University of Florida, CureVac AG. Phase I/IIa Study of RNActive®-Derived Therapeutic Vaccine in Advanced or Metastatic Hormone Refractory Prostate Cancer. *clinicaltrials.gov.* Published March 29, 2012. Accessed March 27, 2022.
36. CureVac AG. An Open Label Randomised Phase II Trial of RNActive® Cancer Vaccine (CV9104) in High Risk and Intermediate Risk Patients With Prostate Cancer. *clinicaltrials.gov.* Published June 10, 2016. Accessed March 10, 2022.
37. Adamaki M, Zoumpourlis V. Immunotherapy as a Precision Medicine Tool for the Treatment of Prostate Cancer. *Cancers (Basel).* 2021;13(2):173. Published 2021 Jan 6. doi:10.3390/cancers13020173

38. Kübler H, Maurer T, Stenzl A, et al. Final analysis of a phase I/IIa study with CV9103, an intradermally administered prostate cancer immunotherapy based on self-adjuvanted mRNA. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29(15_suppl):4535-4535. doi:10.1200/jco.2011.29.15_suppl.4535
39. Rittig SM, Haentschel M, Weimer KJ, et al. Intradermal vaccinations with RNA coding for TAA generate CD8+ and CD4+ immune responses and induce clinical benefit in vaccinated patients. *Mol Ther*. 2011;19(5):990-999. doi:10.1038/mt.2010.289
40. Rittig SM, Haentschel M, Weimer KJ, et al. Long-term survival correlates with immunological responses in renal cell carcinoma patients treated with mRNA-based immunotherapy. *Oncoimmunology*. 2015;5(5):e1108511. Published 2015 Oct 29. doi:10.1080/2162402X.2015.1108511
41. Xu H, Zheng X, Zhang S, et al. Tumor antigens and immune subtypes guided mRNA vaccine development for kidney renal clear cell carcinoma. *Molecular Cancer*. 2021;20(1). doi:10.1186/s12943-021-01465-w
42. Bidram M, Zhao Y, Shebardina NG, et al. mRNA-Based Cancer Vaccines: A Therapeutic Strategy for the Treatment of Melanoma Patients. *Vaccines*. 2021;9(10):1060. doi:10.3390/vaccines9101060
43. Payandeh Z, Yarahmadi M, Nariman-Saleh-Fam Z, et al. Immune therapy of melanoma: Overview of therapeutic vaccines. *Journal of Cellular Physiology*. 2019;234(9):14612-14621. doi:10.1002/jcp.28181
44. Jansen Y, Kruse V, Corthals J, et al. A randomized controlled phase II clinical trial on mRNA electroporated autologous monocyte-derived dendritic cells (TriMixDC-MEL) as adjuvant treatment for stage III/IV melanoma patients who are disease-free following the resection of macrometastases. *Cancer Immunol Immunother*. 2020;69(12):2589-2598. doi:10.1007/s00262-020-02618-4
45. Boudewijns S, Bloemendal M, de Haas N, et al. Autologous monocyte-derived DC vaccination combined with cisplatin in stage III and IV melanoma patients: a prospective, randomized phase 2 trial. *Cancer Immunol Immunother*. 2020;69(3):477-488. doi:10.1007/s00262-019-02466-x

46. Baldin AV, Savvateeva LV, Bazhin AV, Zamyatnin AA Jr. Dendritic Cells in Anticancer Vaccination: Rationale for Ex Vivo Loading or In Vivo Targeting. *Cancers (Basel)*. 2020;12(3):590. Published 2020 Mar 5. doi:10.3390/cancers12030590
47. Schuurhuis DH, Verdijk P, Schreiber G, et al. In situ Expression of Tumor Antigens by Messenger RNA–Electroporated Dendritic Cells in Lymph Nodes of Melanoma Patients. *Cancer Research*. 2009;69(7):2927-2934. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3920
48. Wang Y, Zhang L, Xu Z, Miao L, Huang L. mRNA Vaccine with Antigen-Specific Checkpoint Blockade Induces an Enhanced Immune Response against Established Melanoma. *Molecular Therapy*. 2018;26(2):420-434. doi:10.1016/j.ymthe.2017.11.009
49. eTheRNA immunotherapies. Study to Assess the Safety and Tolerability of ECI-006 mRNA Immunotherapy by Intranodal Administration in Melanoma: (1) Following Surgical Resection, and (2) in Patients With Stable Disease After Standard of Care Immunotherapy Treatment. *clinicaltrials.gov*. Published June 16, 2021. Accessed March 11, 2022.
50. University Hospital Tuebingen. Induction of Specific Immune Responses Against Melanoma-Associated Antigens in Vivo by Intradermal Vaccination With Stabilized Tumor mRNA - a Clinical Phase I/II Trial. *clinicaltrials.gov*. Published April 18, 2007. Accessed March 11, 2022.

URAZY RDZENIA KRĘGOWEGO – METODY NAPRAWCZE I PERSPEKTYWY LECZENIA

Marcin Borzęcki, Julia Wnuk, Hanna Porwolnik

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

Abstrakt: Rdzeń kręgowy zapewnia łączność nerwową między mózgiem a całym organizmem. Jego uszkodzenia skutkują niezwykle poważnymi ograniczeniami funkcjonalnymi, a mogą nawet prowadzić do śmierci. Osoby dotknięte uszkodzeniem rdzenia kręgowego zostają poddane ogromnemu cierpieniu, ponadto wymagają one dodatkowej opieki. Prowadzone są wielokierunkowe badania mające na celu przywrócenie funkcji tkanki nerwowej. Jednak brakuje badań na ludziach, co niestety poddaje w wątpliwość rezultaty leczenia w przypadku modeli zwierzęcych. Patofizjologia tkanki nerwowej wciąż nie jest całkowicie poznana, a to spowalnia rozwój innowacyjnych terapii, w związku z czym nie istnieje uniwersalna strategia naprawcza uszkodzonego rdzenia kręgowego.

Słowa kluczowe: uraz rdzenia kręgowego, komórki macierzyste, biomateriały

Abstract: The spinal cord provides nerve connectivity between the brain and the rest of the body. Its damage results in extremely serious functional limitations and even leads to death. Those affected by spinal cord injury experience enormous suffering and also become a burden on society. Multidirectional research is being carried out to restore the function of the nervous tissue, but there is a lack of human studies, which unfortunately calls into question the results of treatment in animal models. The pathophysiology of the nervous tissue is still not fully understood, and this slows down the development of innovative therapies, and therefore there is no universal strategy for repairing an injured spinal cord.

Keywords: spinal cord injury, stem cells, biomaterials, cell transplants

1. Wstęp

Rdzeń kręgowy jest głównym przekaźnikiem sygnałów między mózgiem a ciałem. Prawidłowe funkcjonowanie OUN wymaga interakcji wielu typów komórek, w tym nerwowych i nienerwowych^{1, 2, 3}. Uraz rdzenia kręgowego (ang. *spinal cord injury* – SCI) zwykle powoduje trwałe kalectwo, a co najmniej pozbawia kontroli autonomicznego układu nerwowego poniżej poziomu przerwania. Większość urazów rdzenia kręgowego dotyczy segmentów szyjnych, pozostawiając pacjenta w stanie para- lub tetraplegii w zależności od stopnia urazu. Najczęstszą przyczyną jest uraz wysokoenergetyczny, na przykład w wyniku wypadku sportowego lub drogowego, a większość pacjentów na chwili urazu ma 10–40 lat. Roczna zapadalność wynosi 15–40 przypadków na milion, a Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) szacuje, że co roku od 250 000 do 500 000 osób cierpi na SCI. Szacunkowe koszty związane z urazem rdzenia kręgowego w ciągu całego życia wahają się od 1 do 5 mln USD na osobę, w zależności od umiejscowienia urazu wzdłuż rdzenia kręgowego i jego ciężkości^{4, 5, 6}. Ponieważ długoterminowe przeżycie jest dobre w krajach rozwiniętych, istnieje duża liczba osób, które są chronicznie niepełnosprawne z powodu urazu rdzenia kręgowego. Uszkodzenie rdzenia kręgowego skutkuje ogromnym cierpieniem dla poszkodowanego i jego najbliższych, a dodatkowo generuje znaczne koszty dla społeczeństwa ze względu na chroniczną niepełnosprawność chorego⁴. Rozwój w postępowaniu klinicznym poprawił stan chorych, ale żadne randomizowane badanie kliniczne nie wykazało skuteczności strategii naprawczej w poprawie powrotu do zdrowia po SCI. Samoistne wyzdrowienie jest ograniczone i nadal nie ma leczenia dla samego uszkodzonego rdzenia kręgowego^{5, 7}. Jednakże ostatnio dokonały się postępy w strategiach biologicznych i inżynierskich mających na celu zwiększenie neuroplastyczności oraz regeneracji funkcjonalnej w zwierzęcych modelach SCI, co daje nadzieję na translację do praktyki klinicznej u ludzi. Regeneracja funkcji autonomicznych i seksualnych jest jednym z głównych priorytetów osób po SCI^{2, 4}.

2. Budowa i funkcje rdzenia kręgowego

Budowa i funkcje rdzenia kręgowego są niezwykle złożone, jednak ich poznanie jest kluczem do skutecznego zrozumienia trudności jego naprawy oraz optymalnego opracowania skutecznych metod leczenia. Bramkowane napięciem kanały jonowe są rozmieszczone w błonie aksonalnej zależnie od

występowania osłonki mielinowej, z kanałami sodowymi skupionymi na krótkich odcinkach segmentu aksonu pomiędzy dwiema sąsiednimi osłonkami mielinowymi (węzły Ranviera) i kanałami potasowymi w obszarze parawęzłowym. Środkowe segmenty szyjne kontrolują oddychanie (motoneurony, które obsługują nerwy przeponowe znajdują się w segmentach C3–C5), dlatego całkowite zmiany powyżej tego poziomu są śmiertelne. Uszkodzenie jest silnym sygnałem dla rzadko dzielących się komórek wyściółki w zdrowym rdzeniu do niezwykle intensywnej proliferacji. Część komórek potomnych pozostaje w warstwie wyściółki, a reszta migruje dalej. Asymetryczny podział komórek może skutkować zróżnicowanym rozkładem determinantów losu w dwóch komórkach potomnych, pozwalając jednej na zachowanie cech komórek macierzystych, natomiast drugiej na różnicowanie. Co ciekawe, znakowanie komórek proliferujących w nieuszkodzonym rdzeniu kręgowym (głównie mięszszowych komórek progenitorowych) wykazało, że ta populacja jest częściowo zubożona, kiedy wystąpi uszkodzenie, a komórki Schwanna z korzeni nerwowych mogą migrować do miejsca urazu i częściowo uczestniczyć w procesie remielinizacji^{1, 8, 9}. Podczas rozwoju neurony OUN wykazują silny wzrost aksonów, który jest niemożliwy bez czynników środowiskowych, które przyciągają je i wspierają ich wzrost. Neurony OUN tracą swoją wewnętrzną zdolność do wzrostu aksonów w miarę dojrzewania i wykazują słabą reaktywację wewnętrznych programów wzrostu aksonów po uszkodzeniu. Sygnalizacja poprzez ścieżki PTEN, mTOR, STAT3 i SOCS3 wewnętrznie reguluje zdolność regeneracji aksonów dojrzałych neuronów siatkówki i rdzenia kręgowego. Opracowanie wiarygodnych strategii naprawczych będzie wymagało zrozumienia, w jaki sposób potencjalne interwencje wpływają na biologię komórkową różnych przedziałów uszkodzeń SCI^{2, 10, 11}.

3. Patofizjologia uszkodzenia

Obecność uszkodzenia diametralnie zmienia funkcjonowanie komórek rdzenia kręgowego. Oprócz przecięcia aksonów, uszkodzenie rdzenia kręgowego powoduje śmierć wielu typów komórek w miejscu uszkodzenia lub w jego pobliżu. Za brak regeneracji nerwowej i minimalną regenerację czynnościową, obserwowaną na ogół po urazie rdzenia kręgowego, odpowiada kombinacja czynników. Uszkodzenie zrywa aksony - dystalna część aksonu ulega degeneracji, ale proksymalny segment aksonu zazwyczaj przeżywa, jednak nie odrasta i nie unerwia swoich celów. Brak potencjału wzrostu aksonów jest przyczyną braku ich regeneracji, natomiast dużo większą rolę

w zahamowaniu odgrywa obecność inhibitorów wzrostu aksonów w ośrodkowym układzie nerwowym. Również białka związane z mieliną i blizna glejowa, która tworzy się w miejscu uszkodzenia oraz w odnerwionych drogach aksonów, hamują wzrost aksonów. Rola blizny glejowej jest złożona i dyskusyjna od dawna. Pogląd uznający bliznę glejową jako główny negatywny czynnik po uszkodzeniu rdzenia kręgowego pochodzi z identyfikacji proteoglikanów siarczanu chondroityny (ang. *chondroitin sulfate proteoglycans* - CSPG) jako cząsteczek hamujących wzrost aksonów, wydzielanych przez reaktywne astrocyty. Tworzenie blizn glejowych może być korzystne bezpośrednio po urazie, ponieważ może zminimalizować uszkodzenia zapalne i pomóc ustabilizować otaczającą nienaruszoną tkankę. Jednak astrocyty z bliznami w miejscu urazu mogą wydelać cząsteczki hamujące, które częściowo przyczyniają się do niepowodzenia regeneracji, a białka hamujące wzrost związane z resztkami mieliny mogą znosić ruchliwość wypustek aksonów i hamować wydłużanie się komórek nerwowych. Nawet jeśli synteza niektórych białek związanych ze wzrostem aksonów może być zwiększona w miejscu uszkodzenia, a wzrost aksonów pozostaje możliwy, procesy regeneracji są ograniczone barierami nałożonymi przez blizny glejowe i cząsteczki hamujące. Większość śmierci komórek jest spowodowana mechanizmami wtórnymi, często wywoływanymi przez niedokrwienie, takimi jak peroksydacja lipidów, obrzęk oraz wzrost wolnych rodników i cytotoksycznych poziomów przekaźników. Jednak prawdopodobnie bardziej zwodnicza niż śmierć neuronów jest utrata oligodendrocytów i niedostateczna ekspresja genów związanych z mieliną. Bez osłonek mielinowych aksony wolniej przewodzą impulsy elektryczne. Dodatkowo, demielinizacja powoduje przegrupowanie kanałów jonowych, co również utrudnia propagację potencjałów czynnościowych, ponadto chronicznie demielinizowane aksony są podatne na degenerację. SCI można podzielić na całkowity i niecałkowity. Anatomicznie kompletne zmiany obejmują całą szerokość rdzenia kręgowego, eliminując w ten sposób wszelką komunikację nerwową w miejscu przecięcia. Ich naprawa wymaga przywrócenia łączności neuronowej na dużych obszarach tkanki nerwowej, co wymaga inwazyjnego podejścia. Anatomicznie niekompletny SCI jest wywołany przez mniejsze lub nieciągłe zmiany, które oszczędzają wystarczającą ilość tkanki nerwowej, aby wspierać komunikację w obrębie urazu. Takie przypadki są często związane z częściowym wyzdrowieniem, które może odnieść korzyści ze strategii wzmocnienia spontanicznej reorganizacji obwodów oraz poprawy przewodnictwa i funkcji resztkowych połączeń nerwowych, w tym metod nieinwazyjnych^{4, 12, 13}. U człowieka SCI są najczęściej niekompletne, pozostawiając

tkankę łączącą rdzeń kręgowy powyżej i poniżej uszkodzenia, ale funkcja pozostałych aksonów jest często upośledzona z powodu demielinizacji. Skutki przecięcia aksonów, śmierci neuronów i demielinizacji na ogólną transmisję sygnału są spotęgowane przez inne reakcje tkanek na uszkodzenie, w tym reakcje zapalne i immunologiczne, tworzenie torbieli i zmiany naczyniowe^{1, 14, 15}. Istotnymi objawami współistniejącymi z SCI są krwotok i uszkodzenie niedokrwienne. Po anatomicznie całkowitym lub niecałkowitym SCI utrata synaps jest widoczna w oszczędzonej, ale wciąż reaktywnej tkance nerwowej. Prowadzi ona do spontanicznego tworzenia nowych połączeń, które mogą pochodzić z różnych źródeł, w tym z lokalnych przetrwałych aksonów lub wzrostu z bardziej odległych komórek nerwowych. Analiza leżących u podstaw tego procesu mechanizmów komórkowych i molekularnych oraz uczenie się, jak korzystnie modulować spontaniczną adaptacyjną lub nieadaptacyjną reorganizacją obwodów, są ważnymi celami badań nad SCI. Coraz więcej dowodów wskazuje na to, że wzrost aksonów i naprawa obwodów są regulowane w dużym stopniu przez mechanizmy autonomiczne komórek neuronowych, dostęp do podstawowych czynników sprzyjających wzrostowi i inne mechanizmy regulacyjne². Uszkodzone neurony zwiększają ekspresję cząsteczek związanych ze wzrostem, a obszar uszkodzenia jest wypełniany przez napływ promujących wzrost komórek Schwanna, makrofagów i fibroblastów. Dystalny kikut nerwu zapewnia sprzyjające środowisko dla odrastania aksonów ze względu na szybką fagocytozę degenerującej się mieliny oraz zwiększoną syntezę czynników neurotroficznycy i cząsteczek substratu poprzez proliferację komórek Schwanna w cewkach śródnerwowych, które kierują regenerujące się aksony z powrotem do ich odnerwionych miejsc docelowych. Z biegiem czasu te procesy biochemiczne dzielą dojrzałą zmianę na trzy odrębne przedziały: bliznę zwłóknieniową, tkankę otaczającą granicę blizny astrocytowej oraz oszczędną, ale reaktywną tkankę nerwową. Każdy z tych trzech przedziałów składa się z różnych typów komórek. W konsekwencji, każdy kompartment wymaga zróżnicowanego podejścia eksperymentalnego ukierunkowanego na te odmienne typy komórek, aby uzyskać naprawę. Największym wyzwaniem jest blizna włóknista - składa się z zespołu proliferujących fibroblastów, które wydzielają fibronektyny, kolageny i lamininy. Blizna jest jednak pozbawiona wspierających cząsteczek neurotropowych. Następstwem tego nieprzyjaznego środowiska komórkowego jest całkowity brak spontanicznego wzrostu aksonów do blizny i przez nią. Osiągnięcie odrostu przez włóknistą bliznę wymaga zatem utworzenia mostu wspierającego wzrost. Podczas gdy takie mostki tworzą się spontanicznie u wielu niższych kręgowców,

dorośli rdzeń kręgowy ssaków nie potrafi opracować tej konstrukcji. Dlatego interwencje terapeutyczne muszą stworzyć ten most. Natomiast granica bliźny astrocytowej otacza bliźnę włóknistą i składa się głównie z nowo proliferujących i reaktywnych astrocytów, które uszczelniają bliźnę włóknistą i zapobiegają późniejszemu naciekaniu komórek zapalnych. Kiedyś uważano, że CSPG wytwarzane na granicy bliźny astrocytów stanowią dominującą barierę chemiczną dla ponownego wzrostu. Jednak genetycznie ukierunkowane osłabienie lub ablacja astrocytów tworzących granicę bliźny nie zmniejsza liczby CSPG, eliminując możliwość, że to wyłącznie CSPG pochodzące z astrocytów są odpowiedzialne za niepowodzenie regeneracji aksonów. Ostatnim, trzecim przedziałem znajdującym się w sąsiedztwie granicy bliźny astrocytowej jest oszczędzona, ale reaktywna tkanka nerwowa, która po urazie ulega znacznej przebudowie. Ta otaczająca tkanka zawiera wszystkie typy komórek wymagane do tworzenia funkcjonalnych obwodów neuronalnych, czyli neurony, astrocyty, oligodendrocyty, mikroglej i komórki naczyniowe. Dlatego strategię mającą na celu naprawę rdzenia kręgowego muszą obejmować podejścia eksperymentalne, które nie tylko kierują aksonami w reaktywnej tkance nerwowej, ale także promują tworzenie i stabilizację nowych synaps^{10, 11, 16}. Powrót do zdrowia jest znacznie gorszy po urazach, które prowadzą do przedłużonego odnerwienia dystalnego odcinka nerwu i mięśnia docelowego, w tym urazów proksymalnych i urazów, w których długie opóźnienia poprzedzają naprawę. Chociaż w wyjątkowych opisach przypadków klinicznych udokumentowano skuteczną regenerację funkcjonalną, gdy uszkodzone nerwy obwodowe są chirurgicznie naprawiane lata po urazie, na ogół szanse na powrót do zdrowia stopniowo się zmniejszają, szczególnie jeśli opóźnienie przekracza 6 miesięcy^{8, 17, 18}. Fakt, że efektywna lokomocja może wynikać z zachowania zaledwie 10% aksonów w obrębie obrzeża uszkodzonego rdzenia kręgowego dostarcza uzasadnienia dla rozszerzenia wysiłków na rzecz identyfikacji nowych związków neuroochronnych, co poprawi skuteczność w utrzymaniu funkcji neurologicznej po urazie rdzenia^{12, 14}.

4. Leczenie

Obecnie nie ma skutecznej i uniwersalnej terapii leczniczej, a opieka w ostrej fazie ogranicza się do leczenia wysokimi dawkami kortykosteroidów w celu zmniejszenia stanu zapalnego oraz stabilizacji i dekompresji chirurgicznej w celu zmniejszenia dalszych uszkodzeń. W fazie podostrej do przewlekłej leczenie koncentruje się na fizjoterapii oraz łagodzeniu objawów,

np. bólowych. Co więcej, badania na zmutowanych myszach pozbawionych genów kodujących pośrednie białka filamentów – glejowe fibrylarne białko kwasowe i wimentynę, silnie ekspresjonowane przez reaktywne astrocyty, wykazały upośledzenie tworzenie blizn, któremu towarzyszył nasilony wzrost aksonów i lepsza regeneracja czynnościowa. Jednak inne badania wykazały korzystną rolę blizny glejowej w ostrej fazie (1–2 tygodnie) po urazie rdzenia kręgowego. Eliminacja reaktywnych astrocytów lub zapobieganie ich migracji i tworzenie blizn po urazie skutkowało niepowodzeniem naprawy bariery krew-mózg, której towarzyszył masywny naciek komórek zapalnych oraz zwiększona utrata neuronów i oligodendrocytów z gorszym wynikiem funkcjonalnym. Ostra odpowiedź astrocytów wydaje się ważna dla ograniczenia i osłabienia odpowiedzi zapalnej, ale może to odbywać się kosztem zmniejszonego odrastania aksonów. Blizna glejowa zmniejsza możliwość migracji i integracji przeszczepionych komórek. W związku z tym większość badań dotyczyła wpływu przeszczepiania komórek 1–2 tygodnie po uszkodzeniu. Jest mało prawdopodobne, aby jakakolwiek pojedyncza strategia doprowadziła do bardzo radykalnej poprawy funkcjonalnej. Jednak nawet pozornie niewielka poprawa funkcji może mieć duży wpływ na życie pacjenta. Na przykład umiejętność chwytania przedmiotów może mieć wpływ na zdolność do niezależnego życia. Przywrócenie funkcji ramion i dłoni ma najwyższy priorytet dla osób z tetraplegią, a odzyskanie funkcji seksualnych ma najwyższy priorytet dla pacjentów z paraplegią^{1, 11}. Od dawna zakładano, że powrót do zdrowia po SCI będzie wymagał precyzyjnej rekonstrukcji łączności neuronowej istniejącej przed uszkodzeniem. Jednak okazało się, że w mózgu utrata jednego zestawu wejść synaptycznych spontanicznie prowadzi do powstania nowych synaps pochodzących z niezakłóconych połączeń aferentnych. Neurony projekcyjne spontanicznie tworzą połączenia obwodowe, które przekazują informacje ponadrdzeniowe do obwodów rdzeniowych poniżej urazu. Taka reorganizacja obwodów może przekierować specyficzne dla zadania polecenia korowe do ośrodków wykonawczych w odcinku lędźwiowym, nawet gdy wszystkie bezpośrednie połączenia nadrdzeniowe zostaną przerwane. Te obserwacje mają ważne implikacje dla naprawy rdzenia kręgowego, ponieważ sugerują, że wewnątrzrdzeniowe neurony przekąźnikowe, nawet nowowyprowadzone z przeszczepionych komórek, mogą być wystarczające do pośredniczenia w znaczącej regeneracji. Obecnie uznaje się, że rdzeń kręgowy działa jako inteligentny interfejs przetwarzania informacji, który przekłada specyficzne dla zadania informacje sensoryczne i sygnały nadrdzeniowe na wzorce aktywacji mięśni, które stale spełniają cele behawioralne. Przekazanie ograniczonej ilości informacji do rdzenia kręgowego poniżej urazu może

wystarczyć do przywrócenia znaczącej kontroli motorycznej po SCI. Koncepcje automatyzmu rdzenia kręgowego, plastyczności aksonów i reorganizacji obwodów po SCI ustanowiły ramy, które sterują pojawiającymi się strategiami biologicznymi i technologicznymi naprawy i regeneracji rdzenia kręgowego^{2,4}. Znaczne stopnie samoistnego wyzdrowienia, które nie są związane z leczeniem, mogą wystąpić z przyczyn nie do końca znanych lub niemożliwych do kontrolowania. Z pewnością wiele z tego spontanicznego powrotu do zdrowia można przypisać ustąpieniu takich procesów, jak obrzęk, stan zapalny, zmniejszona perfuzja, wstrząs i przemijające kanałopatie. Jest to prawdopodobnie spowodowane stopniową redundancją połączeń i odhamowaniem pewnych wewnątrzrdzeniowych ruchów odruchowych (tzw. generatory wzorców lokomocji). Co ciekawe, wykorzystanie komórek macierzystych — w połączeniu z innymi podejściami — może pośredniczyć w wielu z tych działań terapeutycznych, dzięki nieodłącznym właściwościom biologicznym takich komórek^{19,20}.

4.1. Modulatoryjna reorganizacja obwodu po niepełnym SCI

Po niecałkowitych urazach neurony projekcji wewnątrzrdzeniowej tworzą nowe połączenia obwodowe, które przekazują informacje nadrdzeniowe z góry do dołu uszkodzenia. Wszystkie zstępujące układy z resztkowymi aksonami, które były badane na modelach zwierzęcych, wykazują wyraźną reorganizację po SCI. Na przykład, po uszkodzeniu bocznej hemisekcji u naczelników innych niż człowiek, oszczędzone aksony korowo-rdzeniowe schodzące w przeciwną stronę białej rozciągają się obok aksonów w poprzek linii środkowej rdzenia kręgowego i rozwijają się do funkcjonalnych obszarów rdzenia kręgowego poniżej urazu. Dowody pośrednie sugerują, że podobna reorganizacja i rozwój szlaków zstępujących ma miejsce u ludzi. Plastyczność w obrębie rdzenia kręgowego prowadzi do ponownego mapowania wyjścia kory ruchowej do obwodów rdzeniowych. Ta gęsta sieć wstępujących i zstępujących połączeń w rdzeniu kręgowym może być szczególnie odpowiednim celem dla naprawy SCI. Podczas gdy SCI pozbawia obwody rdzeniowe wszystkich lub niektórych sygnałów ponadrdzeniowych, rdzeń kręgowy poniżej urazu nadal odbiera i interpretuje informacje czuciowe. Sygnały wejściowe z aferentnych neuronów czuciowych, które pozostają nienaruszone poniżej zmian chorobowych, stają się istotnym źródłem kontroli w wytwarzaniu zachowań motorycznych po SCI. Informacje sensoryczne sterują wieloma korzystnymi, ale także szkodliwymi zmianami zachodzącymi poniżej zmiany. Wyczerpywanie się synaps ze ścieżek zstępujących wyzwała nieprawidłowy wzrost neuronów

zuciowych aferentnych na dostępne cele synaptyczne. Ze względu na brak sygnałów kierujących tą homeostatyczną plastycznością, zmiany te często prowadzą do degradacji funkcji neuronalnych poniżej SCI, co odnotowano u ludzi. Modyfikacja funkcji synaps i zwiększenie plastyczności synaps stanowią obiecujące podejście do wzmocnienia korzystnych efektów rehabilitacji i manipulacji biochemicznych. Przejściowa ekspozycja szczurów na obniżony poziom tlenu aktywuje neurony serotonergiczne śródmózgowia, będące głównym źródłem serotoniny w rdzeniu kręgowym, i wyzwala syntezę neurotrofin pochodzenia mózgowego (ang. *brain-derived neurotrophic factor - BDNF*) w rdzeniu kręgowym, które razem indukują serotoninozależną plastyczność. Sugeruje to, że połączenie rehabilitacji i powtarzającej się okresowej hipoksji może poprawić chodzenie u ludzi z niepełnym SCI. Nowe badania ujawniają również komórkowe mechanizmy plastyczności synaps. Udowodniono, że klasyczne sygnały dopełniacza C1q, C3 i C3R regulują modulowanie mikrogleju, podczas gdy cząsteczki, takie jak trombospondyny, glikany, wydzielane białka kwaśne i bogate w cysteinę (ang. *secreted acidic and cysteine-rich proteins - SPARC*) są częściowo odpowiedzialne za tworzenie synaps. CSPG i tenascyny wytwarzane przez neurony i astrocyty tworzą sieci okołonerwowe, które ograniczają tę plastyczność synaptyczną i związaną z nią reorganizację obwodów. Cząsteczki kierujące aksonami, takie jak odpychające receptory Wnt, są również silnymi inhibitorami wzrostu aksonów. W szczurzych modelach niecałkowitego SCI zastosowanie przeciwciał przeciwko tym receptorom prowadziło do wyraźnego wzrostu z proksymalnych segmentów aksonów przewodu korowo-rdzeniowego, co przyspieszało powrót do funkcji. Potrzebne są dalsze prace, aby zidentyfikować strategie zdolne do modulowania plastyczności synaps i reorganizacji obwodów po SCI^{2,4}.

4.2. Przywracanie łączności w całkowitym SCI

Podejścia biologiczne do przywracania łączności po takich urazach koncentrują się obecnie na stymulowaniu endogennego odrastania aksonów przez uszkodzenia lub przeszczepianiu nowych neuronów do uszkodzeń w celu przywrócenia komunikacji poprzez nowe obwody przekaźnikowe. Wiele mechanizmów reguluje odrost aksonów po SCI. Chociaż spontaniczna reaktywacja wewnętrznych programów wzrostu po urazie jest ograniczona, stale rosnąca ilość dowodów pokazuje, że manipulowanie wewnętrzną sygnalizacją neuronalną za pomocą wielu szlaków regulatorów transkrypcji w modelach zwierzęcych *in vivo* może stymulować zdolność do ponownego wzrostu aksonów

różnych fenotypów neuronów. Te szlaki obejmują w szczególności homolog fosfatazy i tensyny, mechanistyczny cel rapamycyny, przetwornik sygnału i aktywator transkrypcji 3, supresor sygnalizacji cytokin 3, czynniki typu Kruppel, c-Myc, cAMP, MAP3K13 i inne. Zdolność do wzrostu aksonów może być silnie aktywowana, gdy tkanka wokół komórek nerwowych jest stymulowana mediatorami zapalnymi, takimi jak onkomodulina, zymosan i agoniści receptora Toll-podobnego 2 i rodziny 7 domen lektynowych typu C, lub poprzez stymulację czynnikami wzrostu, takimi jak insulinopodobny czynnik wzrostu 1, osteopontyna i rzęskowy czynnik neurotroficzny. Wzrost aksonów w OUN jest również regulowany przez obecność lub brak chemoatrakcyjnych lub chemorepelentnych czynników wzrostu lub substratów, które wspierają lub hamują wzrost. W trakcie rozwoju organizmu wzrost aksonów istotnie zależy od dostępności chemoatrakcyjnych czynników wzrostu, takich jak BDNF i neurotrofina-3, oraz od substratów pomocniczych, takich jak lamininy, syndekany. Chociaż cząsteczki hamujące wzrost, takie jak cząsteczki związane z mieliną i CSPG, mogą wpływać na odrost aksonów *in vitro* i mogą modyfikować przebudowę synaps po SCI, obecnie nie ma przekonujących dowodów na to, że odgrywają one główną rolę w regulacji odrostu aksonów. Przeszczepy komórek fibroblastów wspierają silną regenerację aksonów po SCI tylko wtedy, gdy wytwarzają specyficzne czynniki, które są chemoatrakcyjne dla aksonów. Ostatnie badania nad genetyczną utratą funkcji rdzenia kręgowego u myszy kwestionują pogląd, jakoby blizny utworzone przez astrocyty wzdłuż granic uszkodzeń są główną przyczyną niepowodzenia regeneracji aksonów w OUN. Ani zapobieganie powstawaniu, ani usuwanie granic blizny po astrocytach w zmianach SCI nie powodowało odrostu zstępujących aksonów motorycznych, wstępujących czuciowych lub serotoninowych. Co więcej, zarówno u myszy, jak i szczurów, aktywowane i chemoatraktowane aksony czuciowe silnie odrastały pomimo obecności granic blizn po astrocytach, a zapobieganie lub usuwanie tych granic ograniczało stymulowany odrost, co sugeruje, że granice astrocytów mogą raczej wspierać niż zapobiegać wzrostowi aksonów. Biorąc pod uwagę wiele mechanizmów zależnych od czasu, które wpływają na odrost aksonów w obrębie zmian chorobowych, racjonalne strategie terapii po SCI prawdopodobnie będą wymagały jednoczesnego ukierunkowania na zróżnicowane strategie naprawcze z wieloma oknami czasowymi. Istnieją istotne dowody wskazujące na to, że zastosowanie kombinacji wielu strategii terapeutycznych zwiększa wzrost aksonów. Niedawne badania wzmocnienia i utraty funkcji na mysich i szczurzych modelach anatomicznie kompletnego SCI wykazały, że aktywacja neuronalna, wsparcie substratu i chemoatrakcja

były wymagane do regeneracji. Osiągnięcie silnego wzrostu endogennych aksonów w rdzeniach uszkodzeń będzie prawdopodobnie wymagało spełnienia trzech warunków: aktywacji wewnętrznych programów wzrostu neuronów, dostępności substratu wzrostu wspierającego akson i zapewnieniu czynników wzrostu które są chemoatrakcyjne dla aksonów. Inne podejście do promowania tworzenia obwodów przekąźnikowych polega na przeszczepianiu źródeł nowych neuronów wewnątrzrdzeniowych. W obecności czynników wzrostu i macierzy wspierających, kaudalizowane przeszczepy neuronalne progenitorowe nie tylko przeżywają w nieprzyjnym środowisku nienerwowym, ale także różnicują się w różne neurony i gleje, które ponownie zasiedlają rdzeń uszkodzenia i wysyłają rozległe projekcje aksonalne do tkanki gospodarza. Neuronowy regulator wzrostu cząsteczki adhezji komórek pozwala mielinie stymulować wzrost aksonów z przeszczepionych komórek. Pomimo tego, powrót do funkcji pozostaje ograniczony. Wyniki te dostarczają zatem ważnych informacji potwierdzających słuszność koncepcji, ale konieczne są dodatkowe badania, aby zrozumieć jak kierować, kontrolować i funkcjonalnie integrować przeszczepione neurony z macierzą komunikacji i obwodem motorycznym gospodarza w celu przywrócenia znaczącej funkcji^{2, 3, 4, 6}.

4.3. Przeszczep komórek

Przeszczep komórek pojawił się jako potencjalna strategia promowania naprawy po SCI. Zakończono kilka badań klinicznych wczesnej fazy, które wykazały, że przeszczepienie komórek jest generalnie wykonalne, ale skuteczność i długoterminowe bezpieczeństwo pozostają nieudowodnione. Chociaż transplantacja komórek jest nadal intensywnie badana, zaskakująco niewiele wiadomo na temat mechanizmów, dzięki którym przeszczepione komórki promują naprawę i pośredniczą w poprawie czynności. W przeciwieństwie do leków lub wszczepionych biomateriałów, przeszczepione komórki są w stanie reagować na sygnały dostarczane przez uszkodzone mikrośrodowisko i zmieniać ich interakcje środowiskowe. Przeszczepione komórki wykazują wiele mechanizmów działania. Jednym z proponowanych mechanizmów leżących u podstaw usprawnień funkcjonalnych po przeszczepieniu komórek jest neuroprotekcja, czyli łagodzenie wtórnego uszkodzenia w celu ochrony tkanki. Transplantacja prawdopodobnie promuje neuroprotekcję poprzez inne mechanizmy niż te, które klasycznie przypisuje się ochronie, takie jak terapie zapobiegające ekscytotoksyczności. Klasyczne środki neuroprotektyjne, o których wiadomo, że zmniejszają wtórne uszkodzenia, są skuteczne

tylko w ciągu pierwszych godzin po urazie, natomiast przeszczep komórek jest często wykonywany 1-2 tygodnie po urazie, aby poprawić przeżywalność przeszczepu. Kolejnym mechanizmem neuroprotekcji, w której pośredniczą przeszczepione komórki, jest wydzielanie cząsteczek bioaktywnych, takich jak czynniki troficzne i cytokiny. Wiele typów komórek ma zdolność wydzielania czynników troficznych i cytokin *in vitro* lub zwiększania obecności tych czynników po przeszczepie. Czynniki te mogą potencjalnie zwiększać przeżycie komórek gospodarza, regulować głąz, modulować stan zapalny i/lub poprawiać regenerację naczyń krwionośnych. To ostatnie jest szczególnie istotne, gdyż, jak napisano powyżej, po SCI dochodzi do rozległej utraty naczyń krwionośnych, co wywołuje miejscowe niedotlenienie w obrębie miejsca urazu i w jego sąsiedztwie. Proliferacja komórek śródbłónka lub angiogeneza występuje już 3 dnia i zatrzymuje się 10 dnia po SCI, ale dopiero po 14 dniu perfuzja naczyń powraca do poziomu wyjściowego. Jednakże fundamentalną przyczyną trwałej dysfunkcji po SCI jest przerwanie połączeń funkcjonalnych w OUN, z tego powodu głównym celem jest promowanie regeneracji i plastyczności aksonów. Zdolność aksonów do wzrostu na mostkach koreluje z ich wewnętrzną zdolnością do wzrostu, a istotny z punktu prowadzenia leczenia jest fakt, że można ją uwydatnić przez zastosowanie terapii zwiększających potencjał wzrostu. Należy jednak zdawać sobie sprawę, iż wzrost aksonów nie zawsze jest korzystny funkcjonalnie. Nadekspresja Sox11 w neuronach korowo-rdzeniowych sprzyja regeneracji aksonów, ale upośledza funkcję kończyn przednich, co powoduje u niektórych szczurów zwiększoną częstotliwość występowania kroków podeszwowych. Rzeczywiście, niewiele wiadomo o tym, jak regenerację aksonów można ukierunkować na tworzenie funkcjonalnych synaps z neuronami docelowymi, biorąc pod uwagę, że silna regeneracja aksonów pozostaje ogromnym wyzwaniem. Alternatywnym podejściem do ponownego łączenia segmentów po SCI jest tworzenie przekaźników neuronalnych. Kiedy przeszczepione komórki są zdolne do różnicowania się neuronów, przeżycia, wzrostu aksonów i tworzenia synaps z neuronami gospodarza, może powstać obwód przekaźnikowy między zstępującymi aksonami a nowo zróżnicowanymi przeszczepionymi neuronami. Ludzkie neuroblasty wszczepione do uszkodzonego prądkowia dorosłego człowieka mogą rozciągać aksony wzdłuż zmielinizowanych włókien na odległość do 20 mm. Gdy przeszczep został wprowadzony 2 tygodnie po całkowitym przecięciu, aksony gospodarza zsynchronizowały się z nowo zróżnicowanymi neuronami, co wydłużyło wiele aksonów na duże odległości rostralnie lub ogonowo względem uszkodzenia. Podejście to spowodowało znaczną poprawę czynności

tylnej kończyny, a szczury wykazywały ruchy wokół każdego stawu tylnej kończyny, w przeciwieństwie do minimalnego lub zerowego ruchu w grupie kontrolnej. Jeżeli chodzi o otoczkę mielinową – korzyści z jej posiadania dla przewodnictwa nerwowego jak i skutki jej utracenia zostały opisane powyżej. Równoległe z utratą mieliny u gryzoni, naczelnych innych niż człowiek i ludzi, przez tydzień po urazowym SCI występuje apoptoza oligodendrocytów. Regeneracja mieliny, proces, w którym przeszczepione komórki wytwarzają mielinę wokół aksonów, które utraciły osłonki mielinowe, została uznana za mechanizm wzmacniający powrót do zdrowia po SCI^{5, 8, 13, 21}. W innym badaniu uzyskano zachęcające wyniki w przypadku przeszczepu tkanki rdzenia kręgowego płodu, które doprowadziły do badań mających na celu ustalenie, czy te przeszczepy przetrwają w miejscu uszkodzenia i czy neurony, które były uszkodzone przez kilka tygodni lub miesięcy, zachowały zdolność do regeneracji swoich aksonów. Większość przeszczepów rosła i ustanowiła granicę z rdzeniem kręgowym oraz zawierała serotonergiczne aksony opuszkowordzeniowe biorcy oraz immunoreaktywne pierwotne aferentne aksony związane z genem kalcytoniny. Wyniki badania potwierdziły, że tkanka rdzenia kręgowego płodu nie tylko zmniejszyła ciągłość ustalonej blizny glejowej, ale także ograniczyła jej odbudowę. Oba te działania zapewniłyby utrzymywanie się obszarów możliwych interakcji między przeszczepem a rdzeniem kręgowym gospodarza. Terapie skojarzone, które obejmują przeszczepy, uratowały neurony po aksotomii u przewlekle uszkodzonych rdzeni zwierząt i promowały regenerację aksonów. Pozostaje do wykazania, czy porównywalne wyniki zostaną osiągnięte w leczeniu przewlekłego uszkodzenia rdzenia kręgowego u ludzi. Wykazano, że przeszczepy śródrzeniowe są wykonalne u pacjentów z przewlekłymi urazami cierpiących na poszerzenie jam torbielowatych oraz przynoszą wymierne korzyści^{7, 12, 17, 22}.

4.4. Farmakologiczne metody leczenia SCI

Nie ustalono złotego standardu leczenia SCI, chociaż badania kliniczne z metyloprednizolonem i gangliozydem GM-1 wykazały niewielkie, choć potencjalnie ważne korzyści terapeutyczne. Wiele obiecujących terapii farmakologicznych jest obecnie przedmiotem badań dotyczących zdolności neuroprotekcyjnych w zwierzęcych modelach SCI. Ostatecznie, ze względu na wieloczynnikową patofizjologię urazowego SCI, skuteczne terapie będą wymagały połączonych metod. Najintensywniej zbadaną interwencją farmakologiczną w przypadku SCI jest wykorzystanie bursztynianu sodowego nizolonu

(MPSS). Pomimo korzystnych efektów terapeutycznych wykazanych w leczeniu MPSS, wyniki badania nie zostały powszechnie zaakceptowane, ze względu na małą populację próby dla grup wykazujących korzystne efekty, wykonanie protokołów w sposób niestandardowy oraz nieokreślenie funkcjonalnych miar wyników w celu oceny skuteczności. Gangliozydy to grupa glikosfingolipidów zawierających kwas sialowy, zlokalizowanych w dużych stężeniach w zewnętrznych błonach tkanki nerwowej. Co więcej, w przeciwieństwie do schematu dawkowania MPSS, który wydaje się być skuteczny, gdy leczenie rozpoczyna się w ciągu pierwszych 8 godzin po SCI, GM-1 wykazywał działanie neuroprotektyjne po rozpoczęciu leczenia 48 godzin po SCI. Pierwotną ocenę skuteczności przypisaną do tego badania nazwano „znacznym wyzdrowieniem”, zdefiniowanym jako odsetek pacjentów wykazujących dwustopniową poprawę w porównaniu z badaniem wyjściowym. W odpowiedzi na urazowe SCI uwalnianie endogennego peptydu opioidowego, dynorfiny A, jest zwiększone. Podskórne podawanie TRH u szczurów wykazało poprawę funkcji neurologicznej w sposób zależny od dawki. Klasa antagonistów receptora glutaminianu łatwo przekracza barierę krew-rdzeń kręgowy po podaniu ogólnoustrojowym, jednak biorąc pod uwagę fakt, że glutaminian jest kluczowym neuroprzekaźnikiem posiadającym różnorodne funkcje fizjologiczne, blokada transmisji synaptycznej glutaminianu prawdopodobnie powoduje niepożądane efekty psychomimetyczne. Ponadto, potencjał terapeutyczny antagonistów receptora glutaminianowego nie został jeszcze odkryty w badaniach klinicznych dotyczących ludzkiej choroby neurodegeneracyjnej, prawdopodobnie z powodu działań niepożądanych związanych z dużymi dawkami wymaganymi do zapewnienia neuroprotekcji. Obecnie naukowcy skupiają się także na badaniach roli jonów wapnia. Uważa się, że napływ tych jonów jest ważnym mediatorem ekscytotoksycznego uszkodzenia wewnątrzkomórkowego i niedokrwienia wywołanego skurczem naczyń. W szczurzym modelu silnego ucisku rdzenia kręgowego nimodypina doprowadziła do ogólnoustrojowego niedociśnienia spowodowanego rozszerzeniem naczyń. Jednak połączenie nimodypiny z dekstranem pozwoliło na poprawę funkcji aksonów w drogach ruchowych i somatosensorycznych rdzenia. Po SCI występuje szkodliwe nagromadzenie sodu. Ponadto depolaryzacja błony związana z komórkową niezdolnością do usuwania sodu sprzyja dalszemu napływowi tych jonów przez nieinaktywujące kanały sodowe. Wykazano, że to z kolei powoduje odwrócenie funkcji przez wymienniki sodowo - wapniowe, umożliwiając pompowanie jonów wapnia do komórek, podczas gdy sód jest pompowany do środowiska pozakomórkowego. Zatem alternatywnym

podejściem jest wykorzystanie blokerów kanału sodowo - wapniowego. Wykazano, że antagonizm kanałów sodowych bramkowanych napięciem zapobiega degeneracji aksonów i zachowuje funkcję uszkodzonych dróg istoty białej rdzenia kręgowego oraz zmniejsza uszkodzenia mieliny. Prowadzone były także badania nad zastosowaniem riluzolu jako terapii po urazie rdzenia. Taka metoda terapii jest potencjalnie wykonalna, co zostało już zatwierdzone przez Agencję ds. Żywności i Leków do leczenia stwardnienia zanikowego bocznego bez stwierdzenia silnych działań niepożądanych neurotoksycznych i kardiotoxycznych. Natomiast, pomimo obecnych dowodów *in vivo* na poparcie riluzolu jako związku terapeutycznego w przypadku SCI, nie podjęto żadnych wysiłków, aby kontynuować badania kliniczne tego leku. Po SCI oligodendrocyty są szczególnie podatne na apoptotyczną śmierć zależną od kaspazy-3. Opracowano szereg inhibitorów kaspazy, które potencjalnie zapobiegają apoptozie. Badając mechanizmy regeneracji OUN, naukowcy zidentyfikowali białko związane z mielina, Nogo-A, jako inhibitor wzrostu neuronów. Dodatkowe badania wykazały, że aktywacja makrofagów i limfocytów T po urazowym uszkodzeniu OUN jest odpowiedzią fizjologiczną, generowaną w celu ułatwienia ochrony, naprawy i regeneracji. Pomimo sukcesu szczepień terapeutycznych w zwierzęcych modelach SCI, konieczne są dalsze badania, zanim to podejście zostanie przełożone na ludzi. Inne badania skupiają się na minocyklinie, która jest wysoce lipofilową, półsyntetyczną pochodną tetracykliny i jest zdolna do przekraczania bariery krew-mózg. Może ona hamować ekscytotoksyczność, stres oksydacyjny, zależne od kaspazy i niezależne od kaspazy szlaki śmierci neuronów, a także prozapalne mediatory uwalniane przez aktywowany mikroglej. Erytropoetyna jest kolejnym obiektem zainteresowania badaczy. Wiąże się ona ze swoim receptorem w celu wytworzenia sygnałów promujących przeżycie, różnicowanie i proliferację erytroidalnych komórek progenitorowych. Inicjuje również reakcje ochronne na niedotlenienie poprzez utrzymywanie odpowiedniego natlenienia tkanek dzięki regulacji krążącej masy krwinek czerwonych za pomocą hormonalnego systemu kontroli zwrotnej obejmującego nerki i szpik kostny. Erytropoetyna działa neuroprotekcynnie dzięki zdolności przekraczania bariery krew – mózg⁶. Kolejną ze zmian, która może służyć jako cel terapeutyczny, jest regulacja w górę receptorów neuroprzekazników, które inicjują lub modulują lokomocję. Podawany kotom z uszkodzeniem kręgosłupa, które już odzyskały zdolność chodzenia na bieżni, agonista alfa - 2 noradrenergiczny, klonidyna, wydłuża cykl kroku, a quipazyna, szeroko działający agonista serotoninergetyczny, wywiera dodatkowe pobudzające działanie na aktywność ruchową kończyn tylnych

szczurów. Ponieważ zwiększona ekspresja miejscowych neuroprzekazników hamujących, w tym glicyny i kwasu gamma-aminomasłowego (GABA), może przyczyniać się do niewydolności skutecznej aktywacji obwodów lędźwiowych po urazie rdzenia kręgowego, drugą potencjalną strategią jest podawanie środków blokujących działanie przekazników hamujących. Przewidujemy, że terapie oparte na dodatkowej synergii między technikami transplantacyjnymi, farmakologicznymi i rehabilitacyjnymi ostatecznie poprawią powrót do zdrowia po przewlekłym uszkodzeniu rdzenia kręgowego. W modelach zwierzęcych SCI kombinacje interwencji były znacznie skuteczniejsze niż każda pojedyncza, co sugeruje synergiczne działanie między wysiłkiem fizycznym a przeszczepem^{12,17}.

4.5. Aktywowane makrofagi autologiczne

Po urazie rdzenia kręgowego rozpoczyna się sekwencyjna kaskada zapalna. Neutrofile są rekrutowane z krążenia, a glej OUN (astrocyty i mikroglej) są aktywowane w ciągu pierwszych 24 godzin po SCI. Wkrótce potem (2–3 dni po urazie) monocyty krwi migrują do miejsca urazu. Niezależnie od przyczyny SCI, zarówno w podstawowych obserwacjach naukowych, jak i klinicznych, makrofagi utrzymują się w miejscu urazu przez czas nieokreślony. Badania wykazały zdolność makrofagów obwodowych do syntezy czynnika wzrostu nerwów, co sugeruje praktyczność stosowania makrofagów pochodzenia obwodowego do uszkodzonego rdzenia kręgowego w celu promowania odpowiednio neuroprotekcji i neuroregeneracji. Względną niechęć OUN do regeneracji można w dużej mierze przypisać niewystarczającej rekrutacji i aktywacji makrofagów w obrębie uszkodzonego OUN. Makrofagi koinkubowane z nerwem kulszowym lub skórą wstrzyknięte do uszkodzonego rdzenia kręgowego szczurów spowodowały zwiększoną syntezę ochronnych czynników troficznych przy jednoczesnym zmniejszeniu syntezy neurotoksycznego TNF- α , promując w ten sposób właściwości neuroprotektoryjne i neuroregeneracyjne w uszkodzonym rdzeniu kręgowym, co wykazało znaczne przywrócenie funkcji motorycznych i zmniejszenie powstawania torbieli kręgosłupa. Jest mało prawdopodobne, aby aktywacja pojedynczego fenotypu makrofagów mogła ułatwić prawidłowe gojenie ran po SCI. Skuteczna synchronizacja naprawy tkanek za pośrednictwem makrofagów wymaga precyzyjnego dostrojenia różnych fenotypów makrofagów w celu ułatwienia harmonijnego przejścia między różnymi fazami gojenia ran. Wspólną aktywację makrofagów można osiągnąć poprzez manipulacje transkrypcyjne, ale proces wtórnego uszkodzenia,

w tym tworzenie reaktywnych form tlenu i peroksydacja lipidów, grozi dysonansem. Ustalenie, które fenotypy powinniśmy wzmocnić, a które osłabić, aby ułatwić prawidłowe gojenie, wymaga dalszych badań i prawdopodobnie będzie zależec od mikrośrodowiska tkanki specyficznego dla urazu i pożądanej fazy naprawy^{14, 18, 23, 24}.

4.6. Komórki macierzyste

Wiele badań wskazuje, że przeszczepienie kilku różnych typów komórek macierzystych sprzyja regeneracji funkcjonalnej w zwierzęcych modelach uszkodzenia rdzenia kręgowego. Konceptyjnie odmiennym podejściem do wykorzystania komórek macierzystych w terapiach regeneracyjnych może być rekrutacja endogennych nerwowych komórek macierzystych znajdujących się w rdzeniu kręgowym osoby dorosłej. Transplantacja tkanki autologicznej lub płodowej jest często niepraktyczna w przypadku zastosowania klinicznego na dużą skalę. Komórki macierzyste stanowią atrakcyjną alternatywę ze względu na ich potencjalną nieograniczoną podaż, co może pozwolić na opracowanie łatwiejszych terapii. W wielu badaniach oceniano wpływ przeszczepiania różnych komórek macierzystych lub komórek pochodzących z komórek macierzystych w modelach SCI, głównie u gryzoni. Co ciekawe, wiele badań z zastosowaniem różnych strategii wykazało korzystne efekty terapeutyczne. Bezpośrednie porównywanie badań jest trudne ze względu na różny stopień scharakteryzowania przeszczepionych komórek, różne modele uszkodzenia i przeszczep w różnych punktach czasowych po uszkodzeniu. Najprostszym sposobem wyjaśnienia, w jaki sposób przeszczepione komórki mogą sprzyjać regeneracji, jest zastępowanie utraconych komórek. Jest to prawdopodobnie ważny czynnik w kilku strategiach, głównie tam, gdzie utracone oligodendrocyty są zastępowane i wykazano remielinizację przez komórki pochodzące z przeszczepu. Jednak w innych sytuacjach odnotowano korzyści funkcjonalne bez wyraźnej wymiany komórek nerwowych. Jest to najbardziej uderzające w przypadkach użycia komórek nienerwowych, takich jak komórki mezenchymalne lub makrofagi, w których nie powstały żadne neurony ani komórki glejowe. Wydaje się, że mechanizm w tym przypadku jest pośredni, taki jak zapewnienie wsparcia troficznego, modulowanie odpowiedzi zapalnej lub zapewnienie substratu dla wzrostu aksonów. Pluripotencja i możliwość praktycznie nieograniczonej ekspansji embrionalnych komórek macierzystych (ang. *embryonic stem cells* - *ESC*) czynią je atrakcyjnymi w celu wykorzystania do przeszczepu w przypadku SCI. Komórki progenitorowe oligodendrocytów

mogą być wydajnie uzyskiwane z mysich oraz ludzkich ESC i dają początek dojrzałym mielinującym oligodendrocytom po przeszczepieniu do OUN. Naukowcy najpierw ocenili potencjał neuralizowanych mysich ESC w promowaniu regeneracji po uszkodzeniu rdzenia kręgowego i wykazali różnicowanie oligodendrocytów *in situ* oraz poprawę czynnościową. Niedawno udowodniono, że ludzkie komórki progenitorowe oligodendrocytów pochodzące z ESC przeszczepione szczurowi w podobny sposób powodują różnicowanie oligodendrocytów, remielinizację i poprawę lokomotoryczną po ostrym, ale nie przewlekłym przeszczepie. ESC są dobrze przystosowane do wytwarzania neuronalnego potomstwa, ale zastrzeżenia związane z wykorzystaniem komórek allogenicznych podsyły zainteresowanie badaniem neuroregeneracyjnego potencjału dorosłych somatycznych komórek macierzystych. Istnieje wiele badań opisujących przeszczepianie komórek o różnym stopniu scharakteryzowania cech komórek macierzystych, na przykład szpiku kostnego, pępowiny, krwi, skóry tudzież uszkodzonego rdzenia kręgowego. Wstępne uzasadnienie przeszczepienia komórek pochodzących ze szpiku kostnego do uszkodzonego rdzenia kręgowego opierało się na kilku doniesieniach wskazujących, że zarówno hematopoetyczne komórki macierzyste, jak i komórki mezenchymalne mają potencjał do różnicowania w neurony i komórki glejowe. Jednak wiele kolejnych badań nie odtworzyło tamtych wyników lub dostarczyło alternatywnych wyjaśnień co do ekspresji markerów neuronalnych przez komórki pochodzące ze szpiku kostnego. Przeszczepione nerwowe komórki macierzyste zazwyczaj dają początek głównie astrocytom i bardziej ograniczonej liczbie neuronów lub oligodendrocytów. Astrocyty wytwarzają kilka czynników neurotroficznych, a jednym prawdopodobnym mechanizmem, dzięki któremu przeszczepione nerwowe komórki macierzyste mogą sprzyjać regeneracji, jest podtrzymywanie przeżycia komórek gospodarza i potencjalne wspomaganie niektórych lokalnych procesów wzrostu aksonów. Remielinizacja i związana z nią reorganizacja aksonalnych kanałów jonowych prawdopodobnie przyczyniają się do przywrócenia niektórych funkcji po przeszczepieniu nerwowych komórek macierzystych. Promowanie wytwarzania oligodendrocytów kosztem astrocytów przez przeszczepione nerwowe komórki macierzyste dodatkowo ułatwia regenerację czuciową i ruchową. Kusząca perspektywa polega na tym, aby *in situ*, bez jakiegokolwiek hodowli komórek lub przeszczepu, odtworzyć efekt wywołany ekspansją i przeszczepem endogennych nerwowych komórek macierzystych w celu przyspieszenia regeneracji. Dałoby to nieinwazyjną terapię autologiczną, która mogłaby obejść wiele ograniczeń i zagrożeń związanych ze strategiami przeszczepiania. Trudno jednak dziś przewidzieć,

czy jest to realistyczny scenariusz. Dowody na istnienie multipotencjalnych nerwowych komórek macierzystych w dorosłym rdzeniu kręgowym opierają się w dużej mierze na badaniach *in vitro*. Komórki o trwałej zdolności do samoodnowy i możliwości różnicowania się w neurony, astrocyty i oligodendrocyty mogą być namnażane *in vitro*. Takie komórki o właściwościach neuronalnych komórek macierzystych *in vitro* są obecne w całej osi rostro-ogonowej dorosłego rdzenia kręgowego. Nerwowe komórki macierzyste rozmnażane z dorosłego rdzenia kręgowego różnią się w pewnym stopniu od lepiej zbadanych nerwowych komórek macierzystych przedomózgowia, w których neurogeneza jest utrzymywana przez całe życie organizmu. Aby móc opracować racjonalne strategie modulowania endogennych nerwowych komórek macierzystych w rdzeniu kręgowym, konieczne jest zidentyfikowanie dorosłych komórek macierzystych i progenitorowych rdzenia kręgowego oraz uzyskanie szczegółowej wiedzy na temat ich funkcji i reakcji na uraz, a także ich regulacji molekularnej. Po wystąpieniu urazu z czasem liczba oligodendrocytów wzrasta, wiele aksonów ulega remielinizacji, a liczba astrocytów wzrasta wraz z formowaniem się blizny gлевой. Istniejące wcześniej oligodendrocyty nie dzielą się, a proliferacja astrocytów wydaje się ograniczona, co wskazuje, że oligodendrocyty i astrocyty, przynajmniej częściowo, są po uszkodzeniu rdzenia kręgowego regenerowane z komórek macierzystych lub progenitorowych. Proliferacja komórek jest raczej ograniczona w nienaruszonym rdzeniu kręgowym i uważa się, że służy to niewielkiemu obrotowi komórek gloyowych. Wytwarzanie oligodendrocytów przez endogenne komórki macierzyste/progenitorowe przyczynia się do remielinizacji i prawdopodobnie leży u podstaw pewnego przywrócenia funkcji. Wytwarzanie astrocytów przez endogenne komórki macierzyste i udział w tworzeniu blizn gloyowych może potencjalnie hamować odrost aksonów. Konieczne jest lepsze zrozumienie właściwości i funkcjonalnej roli komórek pochodzących z endogennych komórek macierzystych w celu rozważenia optymalnych strategii modulowania ich odpowiedzi. Najbardziej oczywistym celem modulowania endogennych komórek macierzystych może być promowanie różnicowania ich potomstwa do oligodendrocytów celem zwiększenia ich populacji. Kilka badań wykazało, że możliwe jest modulowanie odpowiedzi endogennych komórek macierzystych, przykładowo poprzez wlew do komór mózgowych FGF-2 z EGF. Spowodowało to znaczny wzrost proliferacji i ekspresji nestyny przez komórki wyjściółki. W większości badań nie udało się wykryć neurogenezy w rdzeniu kręgowym dorosłych gryzoni lub naczelných. Silny wpływ czynników promujących różnicowanie komórek gloyowych w dorosłym rdzeniu kręgowym jest

widoczny w nerwowych komórkach macierzystych zmodyfikowanych w celu ekktopowej ekspresji genu proneuralnego Neurogenina2; skutkuje to prawie całkowitym różnicowaniem neuronów *in vitro*, ale nie powoduje żadnego dużego wzrostu liczby neuronów po przeszczepieniu komórek do rdzenia kręgowego. Terapia farmakologiczna modulująca odpowiedź endogennych nerwowych komórek macierzystych w celu promowania regeneracji miałyby przewagę nad strategiami przeszczepu w postaci swojej nieinwazyjności. Transplantacja komórek allogenicznych również wymaga immunosupresji, z poważnymi skutkami ubocznymi. Niezgodność immunologiczna może również skutkować reakcjami odrzucenia, które mogą prowadzić nie tylko do utraty przeszczepionych komórek, ale także do reakcji zapalnych powodujących wtórne uszkodzenia. Pozostaje niejasne, czy możliwe jest modulowanie nerwowych komórek macierzystych *in situ* w celu osiągnięcia podobnej promocji regeneracji, jak widać po przeszczepieniu komórek. Co więcej, możliwe jest, że normalna odpowiedź na uraz i tworzenie blizn jest optymalna pod względem przywracania integralności tkanki, zapobiegania dalszym uszkodzeniom i zatrzymywania komórek zapalnych. Zatem modulowanie odpowiedzi endogennych nerwowych komórek macierzystych w celu wygenerowania większej liczby remielinizujących oligodendrocytów kosztem tworzących blizny astrocytów, może potencjalnie stwarzać ryzyko zmniejszenia odzyskiwania integralności tkanki. Jedną z wątpliwości związanych z podejściem do endogennej rekrutacji komórek macierzystych są ograniczone informacje z rdzenia kręgowego dorosłego człowieka. Komórki macierzyste wyizolowane z ludzkiego rdzenia kręgowego płodu odzwierciedlają wzór integracji, migracji i różnicowania dobrze zbadanych komórek macierzystych gryzoni po przeszczepieniu do uszkodzonego rdzenia kręgowego gryzoni. Główną zaletą nerwowych komórek macierzystych, w porównaniu z komórkami macierzystymi pochodzącymi z innych źródeł, wykorzystywanych do naprawy rdzenia kręgowego jest ich pierwotne ukierunkowanie w produkcję neuronów i komórek glejowych. Dorosłe nerwowe komórki macierzyste nie są tak łatwo rozmnażane w dużej liczbie, a terapie autologiczne niosą ze sobą ryzyko związane z pobieraniem komórek i dużą ilością pracy dla każdego pacjenta, co czyni je niepraktycznymi. Większość pacjentów po urazie rdzenia kręgowego cierpi na przewlekły ból neuropatyczny, który obniża jakość życia. Przeszczepienie dorosłych nerwowych komórek macierzystych rdzenia kręgowego sprzyja regeneracji funkcjonalnej, ale także zwiększa ból neuropatyczny u szczurów. Szczury wykazywały oznaki allodynii prawdopodobnie z powodu astrocytów pochodzących z komórek macierzystych, które sprzyjają

wzrostowi aksonów czuciowych. W ocenie potencjalnych badań klinicznych ważne jest, aby ocenić ryzyko bólu neuropatycznego. W ten sam sposób, w jaki te przeszczepione komórki mogą promować wzrost aksonów w celu tworzenia nowych obwodów czuciowych, trudno jest wykluczyć możliwość, że mogą również sprzyjać tworzeniu innych nieprawidłowych połączeń, które potencjalnie mogą powodować niepożądane skutki uboczne. Oczywiście korzyścią nienerwowych somatycznych komórek macierzystych jest ich stosunkowo łatwy dostęp do zastosowania autologicznego. Jednakże, jeśli wymagana jest hodowla lub selekcja *in vitro* trudniej jest wyobrazić sobie standaryzowaną terapię na dużą skalę. Kolejnym zastrzeżeniem przy rozważaniu zastosowania komórek pochodzących ze szpiku kostnego do naprawy rdzenia kręgowego jest ograniczony wgląd w to, w jaki sposób te komórki mogą wspierać regenerację, co utrudnia przewidzenie efektu. Mielinizujące komórki progenitorowe glejowe pochodzące z ESC można uzyskać z dość wysoką wydajnością oraz prawdopodobnie można je wytwarzać w standardowych warunkach w niemal nieograniczonych ilościach. Zastrzeżeniem związanym z używaniem ESC jest to, że nie są one autologiczne i wymagają immunosupresji. Potencjalną alternatywą dla ESC, pozwalającą uniknąć immunosupresji, mogą być indukowane przez pacjenta pluripotencjalne komórki macierzyste (ang. *induced pluripotent stem cells - iPSC*). Jednak wymagany czas na ustanowienie linii iPSC może ograniczyć ich wykorzystanie w sytuacji ostrej lub podostrej. Jednym z możliwych powikłań terapii komórkami macierzystymi jest duże ryzyko wystąpienia guzów nowotworowych, szczególnie gdy guz rośnie w ograniczonej przestrzeni, takiej jak kanał kręgowy. Zaobserwowano, że implantacja komórek macierzystych pochodzących z ludzkiej miazgi zęba (pochodna grzebienia nerwowego) do przeciętego rdzenia kręgowego szczura doprowadziła do poprawy czynnościowej poprzez zmniejszenie śmierci neuronów i gleju, zachowanie aksonów i osłonek mielinowych, promowanie regeneracji przeciętych aksonów przez osłabienie wielu inhibitorów wzrostu i pobudzenie różnicowania komórek macierzystych w komórki mielinizujące. Chociaż takie obserwacje nie są nowe w dziedzinie neuronalnych komórek macierzystych, atrakcyjność podejścia polega na wykorzystaniu źródła komórek macierzystych, które jest zarówno łatwo dostępne od żywego pacjenta, jak i immunologicznie dopasowane do potencjalnego biorcy, co wyklucza potrzebę stosowania leków immunosupresyjnych. Komórki pochodzące z ESC wydają się obecnie najbardziej obiecującym źródłem komórek do naprawy rdzenia kręgowego ze względu na możliwość zwiększenia produkcji komórek i skuteczności regeneracji^{1, 12, 19, 20}.

5. Biomateriały

Chociaż z natury komórki są zdolne do regeneracji, jednym z powodów, dla których neurony OUN tego nie robią, jest nadmiar sygnałów hamujących w obrębie uszkodzonego miejsca w rdzeniu kręgowym. Wiele grup badawczych zajmuje się tym problemem, wprowadzając aktywne cząsteczki do biomateriałów, aby przeciwdziałać tym sygnałom. Alternatywne podejście polega na wprowadzeniu do biomateriałów molekuł pobudzających wzrost. Podczas testowania dowolnego biomateriału do naprawy rdzenia kręgowego, rodzaj wybranego materiału powinien zależeć od konkretnych cech urazu. Materiał powinien być również biodegradowalny, najlepiej w taki sposób, aby powoli ulegał degradacji w miarę zastępowania go przez naturalnie regenerowane środowisko. Również czas między urazem a przeszczepem jest ważnym czynnikiem, który należy zoptymalizować, aby zmaksymalizować regenerację uszkodzonego rdzenia kręgowego^{3, 6, 25, 26}. Przetestowano wiele naturalnych i sztucznych materiałów pod kątem ich skuteczności w naprawie uszkodzonego rdzenia kręgowego. Zastosowanie niektórych z nich zaowocowało usprawnieniami funkcjonalnymi, wskazując na ich potencjał naprawczy, w związku z tym biomateriały dają duże nadzieje we wzmocnieniu leczenia SCI. Najbardziej istotnym klinicznie urazem u ludzi jest stłuczenie, które występuje u ponad 75% wszystkich przypadków SCI, w związku z tym materiały żelujące in situ do wstrzykiwania mają największy klinicznie istotny potencjał terapeutyczny. Resorbowalne hydrożele polipeptydowe mogą zapewnić tymczasowe depoty dla przedłużonego uwalniania czynników wzrostu, a metoda ich podania jest minimalnie inwazyjna. Hydrożele są zdolne do naśladowania cech mechanicznych i do pewnego stopnia architektury tkanki. Sieci hydrożelowo-kolagenowe można skonstruować w celu zapewnienia zorientowanych rusztowań, które ułatwiają ułożenie przeszczepionych komórek, a tym samym kierują odrostem aksonów. Bioinżynieryjne rusztowania z liniowymi kanałami prowadzącymi mają zdolność do kierowania odrastaniem aksonów wzdłuż uszkodzenia, co zapobiega powstawaniu splątanych szlaków regeneracji. Podejścia biomateriałowe do naprawy OUN rozwijają się powoli, ale systematycznie^{3, 4, 27, 28}. Większość biomateriałów przetestowanych pod kątem skuteczności w naprawie uszkodzonego rdzenia kręgowego to polimery, które mają liczne zastosowania ze względu na ich bardzo zróżnicowane właściwości. Nauka odkrywa coraz więcej teoretycznych i eksperymentalnych dowodów na zastosowanie polimerów do naprawy tkanek miękkich, w tym tkanki nerwowej. Można wytwarzać biomateriały, które ulegają degradacji w określonym

oknie czasowym, nie są cytotoksyczne i mają właściwości mechaniczne podobne do właściwości tkanki natywnej^{12, 15, 27, 29}.

5.1 Naturalne polimery na bazie macierzy zewnątrzkomórkowej ssaków

Naturalne biomateriały obecne głównie w macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *extracellular matrix* - *ECM*) zapewniają wsparcie strukturalne i wzrostowe aksonom nie tylko podczas rozwoju i dojrzałości, ale także po uszkodzeniu. Do tej grupy materiałów zalicza się kolagen, laminina, fibronektyna, witronektyna i proteoglikany, glikozaminoglikany oraz kwas hialuronowy (ang. *hyaluronic acid* – *HA*). Większość składników ECM sygnalizuje aksonalną promocję wzrostu. W interesujący sposób działa HA, który może zmniejszać zakres powstawania blizn poprzez hamowanie migracji, proliferacji i chemotaksji limfocytów, jednakże komórki nie przylegają łatwo do HA, co sugeruje, że modyfikacje jego właściwości powierzchniowych mogą poprawić skuteczność rusztowania, zatem ta metoda wymaga dalszych udoskonaleń. Zastosowanie kolagenu w naprawie rdzenia kręgowego wydaje się całkiem obiecujące, co wykazano w przeważająco pozytywnych wynikach takich strategii, jak włączanie czynników neurotroficznych, implantacja włókien kolagenowych i tworzenie samoorganizujących się nerwów kolagenowych za pośrednictwem integryny^{3, 6, 15}.

5.2. Naturalne polimery nie pochodzące od ssaków

Algi, skorupiaki, rośliny i bakterie również mogą być źródłem cennych polimerów służących do regeneracji tkanek nerwowych. Ważnym aspektem tych polimerów jest ich biokompatybilność, czyli sposób, w jaki organizm ssaka reaguje na ksenogeniczne materiały. Co ciekawe, zazwyczaj nie mają negatywnych oddziaływań z komórkami ssaków, a zatem świetnie sprawdzają się jako matryca wspierająca. Pożądane substancje to chitosan, alginat, ksyloglukan, agaroz, metyloceluloza oraz guma gellanowa. Niestety, nadal istnieją pewne obawy dotyczące niezawodnej sterylizacji polimerów naturalnych, podczas gdy dostępnych jest więcej technik bezpiecznej sterylizacji polimerów syntetycznych^{3, 6, 15}.

5.3. Polimery syntetyczne

Polimery syntetyczne znajdują się w centrum zainteresowania naukowców ze względu na zdolność tych materiałów do modyfikowania i projektowania z optymalnymi właściwościami, na przykład właściwości adhezyjne syntetycznych hydrożeli można łatwo zmieniać poprzez użycie dodatnio lub ujemnie naładowanych grup funkcyjnych. Są również łatwe do sterylizacji w przeciwieństwie do polimerów naturalnych. Przykłady tych substancji to PHPMA, PVA, PEG/PEO^{3, 6, 15}.

5.4. Materiały kompozytowe

Zarówno materiały naturalne, jak i syntetyczne mają niedociągnięcia, dlatego łączenie materiałów o różnych właściwościach może być metodą wytwarzania rusztowań kierujących odrostem nerwów o cechach biochemicznych i funkcjonalnych wymaganych do spełnienia określonego zastosowania inżynierii tkankowej. Opracowanie „gąbki złożonej” łączy w sobie korzystne właściwości kolagenu i polimerów syntetycznych, jednocześnie przewyższając niekorzystne właściwości każdego z nich. „Hybrydowa gąbka”, która składa się z włókien kolagenu i poliglikolidu, jest stosowana u pacjentów z uszkodzeniami nerwów obwodowych. Wbudowanie żywych komórek do rusztowań tkankowych daje wymierne korzyści, gdyż komórki te mogą wytwarzać bioaktywne cząsteczki, promować wzrost aksonów i ostatecznie promować mielinizację odrośniętych aksonów, co skutkuje lepszą regeneracją funkcjonalną. Ponadto, udało się już opracować hydrożele, które mają podobne właściwości mechaniczne do rdzenia kręgowego, potrafią tworzyć sieci i są wysoce kompatybilne z tkanką mózgową. W związku z tym istnieje wiele możliwości zastosowania biomateriałów kompozytowych w celu poprawy właściwości fizycznych i funkcjonalności bioinżyneryjnych rusztowań tkankowych do naprawy SCI^{15, 25-28}.

6. Kierunki na przyszłość

Uraz rdzenia kręgowego jest często wymieniany jako jeden z pierwszych możliwych nowych wskazań dla przyszłych terapii transplantacyjnych opartych na komórkach macierzystych. W rzeczywistości dość duża liczba pacjentów z uszkodzeniem rdzenia kręgowego otrzymała już przeszczepy komórek macierzystych i innych typów komórek. Jednak powstawanie guzów

nowotworowych stanowi poważne ryzyko, szczególnie w przypadkach, gdy komórki pochodzą ze stadium pluripotencjalnego. Pomimo wysiłków zmierzających do dopasowania modeli przedklinicznych do ludzkiego SCI, żadna ilość przedklinicznych badań na zwierzętach nie może zagwarantować bezpieczeństwa i powodzenia leczenia komórkami w badaniach na ludziach. Tylko badanie na ludziach, choć z natury eksperymentalne, może dostarczyć niezbędnych danych na temat skuteczności i bezpieczeństwa terapii. Mimo to naukowcy powinni zrobić wszystko, co jest możliwe, aby poprawić prawdopodobieństwo sukcesu^{1,5}. Neurotechnologie, jak interfejsy mózg – komputer, umożliwiają osobom z paralizem pisanie słów w szybkim tempie oraz operowanie wieloprzegubowymi protezami ramion w celu wykonywania codziennych czynności za pomocą sygnałów neuronowych rejestrowanych bezpośrednio z mózgu. Te technologie przechodzą badania w celu szybkiego przejścia od terapii substytucyjnych do terapii przywracających funkcje. Nawet stosunkowo niewielka poprawa funkcji ręki może przełożyć się na znaczący wzrost jakości życia. Niestety, praktyczne korzyści pozostają stosunkowo niewielkie w porównaniu z ich różnorodnymi wyzwaniem technicznymi i obciążeniami finansowymi dla społeczeństwa. Patrząc z innej perspektywy, niezwykle szybkie tempo postępu w identyfikacji inhibitorów wzrostu aksonów i ich receptorów w ośrodkowym układzie nerwowym dorosłych ssaków oraz wyjaśnienie ich mechanizmów działania również stanowią wielką obietnicę rozwoju strategii terapeutycznych. Ponadto, u ludzi odzyskanie łączności motorycznej w rdzeniu kręgowym musi być połączone z regeneracją wstępujących szlaków czuciowych kręgosłupa. W przeciwnym razie brak proprioceptywnej informacji zwrotnej może przyczynić się do poważnej niepełnosprawności narządu ruchu^{21,30}. Biomateriały były szeroko badane pod kątem ich zdolności do wspomaganie regeneracji rdzenia kręgowego. Wiedząc, że zarówno naturalne, jak i syntetyczne biomateriały mają swoje wady, pojawia się pomysł na wytwarzanie biomateriałów kompozytowych. Przyszłe trendy skoncentrują się również na rozwoju biomateriałów o właściwościach sprzyjających adhezji, migracji i różnicowaniu komórek, a także prowadzeniu odrastających aksonów przez miejsce uszkodzenia i poza reaktywną granicę poprzez ukierunkowane dostarczanie czynników neurotroficznych i komórek bioaktywnych. Obecnie dostępne techniki wytwarzania pozostają ograniczone w odniesieniu do włączenia żywych komórek i cząsteczek bioaktywnych o kontrolowanej dystrybucji. Gdy parametry zostaną zoptymalizowane pod kątem funkcjonalnej regeneracji rdzenia kręgowego, opracowanie metod wytwarzania wymaganych rusztowań, będzie nieco łatwiejsze, ale wciąż pozostanie wyzwaniem. Rozwój

informatyki, inżynierii mechanicznej i nauk matematycznych może odgrywać ważną rolę w dokładniejszym modelowaniu lub symulowaniu wpływu parametrów produkcyjnych na właściwości materiałowe rusztowań. Co więcej, po wszczęciu rusztowań w miejsce uszkodzenia, należy wziąć pod uwagę skutki zależnej od czasu degradacji rusztowania, obrzęku i rozwoju tkanki w obrębie mikrostruktury rusztowań; jest to również obecnie utrudnione przez ograniczenia dostępnych technik obrazowania *in vivo*. Kolejną kwestią jest zastosowanie nanotechnologii. Rusztowania z nanowłókna umożliwiające kontrolę interakcji na poziomie komórka-komórka i receptor-ligand w niektórych przypadkach okazały się skuteczne. Zapewniają lepsze środowisko do przyłączania, migracji, proliferacji i różnicowania komórek nerwowych niż tradycyjne rusztowania. Wytwarzanie dłuższych rusztowań o wystarczających właściwościach mechanicznych przy użyciu nanotechnologii może być przydatne w promowaniu regeneracji aksonów na długich odcinkach, dlatego dalsze prace nad tym rozwiązaniem są szczególnie istotne. Kolejną niezwykle intrygującą strategią jest ukierunkowane przywrócenie zdolności regeneracyjnej OUN za pomocą technologii wirusów lub edycji genów tak, aby poprowadzić każdą populację neuronów szlakiem rozwoju i przywrócenia funkcji^{11, 16}. Dalsze nakreślenie interakcji w skali molekularnej w rozwijającym się i dorosłym OUN, a także korzystnych skutków warunkowania zmian chorobowych w pobudzaniu wewnętrznej zdolności do wzrostu neuronów może również prowadzić do różnych innowacyjnych strategii terapeutycznych. Regenerację aksonów poza miejscem uszkodzenia zaobserwowano jedynie u osób, które otrzymały leczenie skojarzone, na przykład u osób które otrzymały rusztowania agarozowe z matrycą, zostały zaszczipione autologicznymi komórkami zrębu szpiku kostnego z ekspresją NT-3, wektorami wirusa lenti z ekspresją NT-3 poza miejsce uszkodzenia i uszkodzenia kondycjonujące ciała neuronów czuciowych w celu stymulacji endogenego stanu wzrostu uszkodzonego neuronu. Pomimo korzystnych rezultatów strategii łączonych, aksony docierające do dystalnej części rusztowania nadal nie są w stanie przeniknąć do miąższu rdzenia kręgowego gospodarza z powodu bliznowacenia glejowego. Liczne patologiczne mechanizmy, które każda obecna strategia terapeutyczna stara się rozwiązać, również powinny być lepiej zbadane. Oczywiście jest, że powrót do zdrowia po SCI będzie wymagał leczenia skojarzonego i jest to kluczowe zadanie na przyszłość. Niewiele wiadomo o synergistycznym łączeniu terapii, jak projektowania biomateriałów, optymalizacji właściwości rusztowania, włączania cząsteczek bioaktywnych lub żywych komórek, neutralizacji nieprzyjaznego środowiska i stosowania stymulacji elektrycznej dla uzyskania

korzystnego efektu. Najprawdopodobniej połączenie wszystkich wyżej wymienionych strategii doprowadzi do lepszej promocji odrastania aksonów i funkcjonalnej regeneracji rdzenia kręgowego. Co więcej, połączone stosowanie różnych strategii wymaga dobrze przemyślanego planowania, aby uniknąć negatywnych interakcji. Lepsze zrozumienie konkretnych ról odgrywanych przez poszczególne strategie na poziomie biochemicznym, komórkowym i ekspresji genów ułatwiłoby rozwój połączonych wysiłków. To ponownie ilustruje konieczność współpracy i komunikacji między badaczami w różnych obszarach, których wspólnym celem jest wyleczenie SCI^{15, 20}. Przy odpowiednio ukierunkowanych podejściach strategie biologiczne i inżynieryjne mogą wchodzić w interakcje, katalizując się nawzajem. Chociaż stoją przed nami wyzwania, tylko dzięki partnerstwu między biologami i inżynierami można opracować terapie, które umożliwią postęp i być może wygrają walkę z SCI⁴.

7. Podsumowanie

Na chwilę obecną nie istnieje uniwersalna strategia naprawcza, która przywróciłaby funkcje rdzenia kręgowego do stanu sprzed wystąpienia SCI. Największą barierą w opracowaniu innowacyjnych terapii zdaje się być niedostateczna wiedza na temat fizjologii nieuszkodzonej tkanki nerwowej oraz patofizjologii komórek po uszkodzeniu. Liczne modele zwierzęcego SCI i próby naprawcze napawają optymizmem, jednak bez przeprowadzenia eksperymentalnych badań na ludziach nie można mieć pewności co do skuteczności leczenia i jego długotrwałego bezpieczeństwa. Deficyty neurologiczne po SCI są bezpośrednim wynikiem zarówno pierwotnych, jak i wtórnych mechanizmów uszkodzenia. Konieczne wydaje się być także udoskonalenie metod obrazowania *in vivo* rdzenia kręgowego¹⁴. Literatura na temat SCI sugeruje, że kilka interwencji terapeutycznych może sprzyjać regeneracji uszkodzonych aksonów, jednak najprawdopodobniej synergistyczne działanie wielu strategii przyniesie oczekiwany rezultat³¹. Jednakże przeszkody stwarzane przez zmniejszoną zdolność regeneracji przewlekle uszkodzonych neuronów OUN były jak dotąd nie do pokonania. Obiecujące interwencje, które zwiększyły wzrost aksonów po ostrych urazach, pozostają do przetestowania w przypadku urazów przewlekłych. Obecnie dostępne terapie, zwłaszcza mające na celu regenerację, mają większe szanse na skuteczne zastosowanie u pacjentów ze świeżymi urazami^{17, 32}. Do tej pory trening funkcjonalny jest podstawową terapią kliniczną stosowaną w rehabilitacji osób po SCI. Inne terapie kliniczne, takie jak leki przeciwzapalne, pomagają zapobiegać wtórnym uszkodzeniom

oraz zmniejszają ból i obrzęk, ale nie sprzyjają naprawie tkanek. Dlatego też pilnie potrzebne są strategie terapeutyczne przywracające utraconą tkankę i przywracające łączność aksonalną po SCI. Inżynieria tkankowa poczyniła w ostatnich latach znaczne postępy, jednak terapia mająca na celu leczenie ludzkiego SCI nie została jeszcze osiągnięta. Biorąc jednak pod uwagę współczesne tempo rozwoju nauk wszelkich dziedzin mamy nadzieję, że ofiary cierpiące na wyniszczające SCI odniosą korzyści z ciągłego postępu w inżynierii tkankowej w najbliższej przyszłości^{7, 15}.

Referencje

1. P Barnabé-Heider F, Frisén J. Stem Cells for Spinal Cord Repair. *Cell Stem Cell*. 2008;3(1):16-24. doi:10.1016/j.stem.2008.06.011
2. O'Shea TM, Burda JE, Sofroniew MV. Cell biology of spinal cord injury and repair. *Journal of Clinical Investigation*. 2017;127(9):3259-3270. doi:10.1172/jci90608
3. Haggerty AE, Oudega M. Biomaterials for spinal cord repair. *Neurosci Bull*. 2013;29(4):445-459. doi:10.1007/s12264-013-1362-7
4. Courtine G, Sofroniew MV. Spinal cord repair: advances in biology and technology. *Nat Med*. 2019;25(6):898-908. doi:10.1038/s41591-019-0475-6
5. Assinck P, Duncan GJ, Hilton BJ, Plemel JR, Tetzlaff W. Cell transplantation therapy for spinal cord injury. *Nat Neurosci*. 2017;20(5):637-647. doi:10.1038/nn.4541
6. Nomura H, Tator CH, Shoichet MS. Bioengineered Strategies for Spinal Cord Repair. *Journal of Neurotrauma*. 2006;23(3-4):496-507. doi:10.1089/neu.2006.23.496
7. Bareyre FM. Neuronal repair and replacement in spinal cord injury. *Journal of the Neurological Sciences*. 2008;265(1-2):63-72. doi:10.1016/j.jns.2007.05.004
8. Song YH, Agrawal NK, Griffin JM, Schmidt CE. Recent advances in nanotherapeutic strategies for spinal cord injury repair. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2019;148:38-59. doi:10.1016/j.addr.2018.12.011

9. Oudenga M, Moon LDF, de Almeida Leme RJ. Schwann cells for spinal cord repair. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2005;38:825-835.
10. Oudega M, Xu XM. Schwann Cell Transplantation for Repair of the Adult Spinal Cord. *Journal of Neurotrauma*. 2006;23(3-4):453-467. doi:10.1089/neu.2006.23.453
11. Gaudet AD, Fonken LK. Glial Cells Shape Pathology and Repair After Spinal Cord Injury. *Neurotherapeutics*. 2018;15(3):554-577. doi:10.1007/s13311-018-0630-7
12. Ahuja CS, Nori S, Tetreault L, et al. Traumatic Spinal Cord Injury—Repair and Regeneration. *NEUROSURGERY*. 2017;80(3S):S-9-S22. doi:10.1093/neuros/nyw080
13. McKerracher L. Spinal Cord Repair: Strategies to Promote Axon Regeneration. *Neurobiology of Disease*. 2001;8(1):11-18. doi:10.1006/nbdi.2000.0359
14. Baptiste DC, Fehlings MG. Pharmacological Approaches To Repair the Injured Spinal Cord. *Journal of Neurotrauma*. 2006;23(3-4):318-334. doi:10.1089/neu.2006.23.318
15. Wang M, Zhai P, Chen X, Schreyer DJ, Sun X, Cui F. Bioengineered Scaffolds for Spinal Cord Repair. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2011;17(3):177-194. doi:10.1089/ten.teb.2010.0648
16. Squair JW, Gautier M, Sofroniew MV, Courtine G, Anderson MA. Engineering spinal cord repair. *Current Opinion in Biotechnology*. 2021;72:48-53. doi:10.1016/j.copbio.2021.10.006
17. Houle JD, Tessler A. Repair of chronic spinal cord injury. *Experimental Neurology*. 2003;182(2):247-260. doi:10.1016/s0014-4886(03)00029-3
18. Jones T, McDaniel E, Popovich P. Inflammatory-Mediated Injury and Repair in the Traumatically Injured Spinal Cord. *CPD*. 2005;11(10):1223-1236. doi:10.2174/1381612053507468
19. Snyder EY, Teng YD. Stem Cells and Spinal Cord Repair. *N Engl J Med*. 2012;366(20):1940-1942. doi:10.1056/nejmcibr1200138

20. Sandner B, Prang P, Rivera FJ, Aigner L, Blesch A, Weidner N. Neural stem cells for spinal cord repair. *Cell Tissue Res.* 2012;349(1):349-362. doi:10.1007/s00441-012-1363-2
21. Dietz V, Curt A. Neurological aspects of spinal-cord repair: promises and challenges. *The Lancet Neurology.* 2006;5(8):688-694. doi:10.1016/s1474-4422(06)70522-1
22. Enzmann GU, Benton RL, Talbott JF, Cao Q, Whittemore SR. Functional Considerations of Stem Cell Transplantation Therapy for Spinal Cord Repair. *Journal of Neurotrauma.* 2006;23(3-4):479-495. doi:10.1089/neu.2006.23.479
23. Gensel JC, Zhang B. Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury. *Brain Research.* 2015;1619:1-11. doi:10.1016/j.brainres.2014.12.045
24. Neirinckx V, Coste C, Franzen R, Gothot A, Rogister B, Wislet S. Neutrophil contribution to spinal cord injury and repair. *J Neuroinflammation.* 2014;11(1). doi:10.1186/s12974-014-0150-2
25. Friedman JA, Windebank AJ, Moore MJ, Spinner RJ, Currier BL, Yaszemski MJ. Biodegradable polymer grafts for surgical repair of the injured spinal cord. *Neurosurgery.* 2002;51:742-752. Doi:10.1227/01.NEU.0000023990.19545.B4
26. Stulik J. Biocompatible hydrogels in spinal cord injury repair. *Physiol.* 2008;57(3):121-132.
27. Perale G, Rossi F, Sundstrom E, et al. Hydrogels in Spinal Cord Injury Repair Strategies. *ACS Chem Neurosci.* 2011;2(7):336-345. doi:10.1021/cn200030w
28. Zhang Q, Shi B, Ding J, et al. Polymer scaffolds facilitate spinal cord injury repair. *Acta Biomaterialia.* 2019;88:57-77. doi:10.1016/j.actbio.2019.01.056
29. Koffler J, Zhu W, Qu X, et al. Biomimetic 3D-printed scaffolds for spinal cord injury repair. *Nat Med.* 2019;25(2):263-269. doi:10.1038/s41591-018-0296-z
30. David S, Lacroix S. MOLECULAR APPROACHES TO SPINAL CORD REPAIR. *Annu Rev Neurosci.* 2003;26(1):411-440. doi:10.1146/annurev.neuro.26.043002.094946

31. Bradbury EJ, McMahon SB. Spinal cord repair strategies: why do they work? *Nat Rev Neurosci.* 2006;7(8):644-653. doi:10.1038/nrn1964
32. Curt A, Van Hedel HJA, Klaus D, Dietz V. Recovery from a Spinal Cord Injury: Significance of Compensation, Neural Plasticity, and Repair. *Journal of Neurotrauma.* 2008;25(6):677-685. doi:10.1089/neu.2007.0468

WYKORZYSTANIE BIOMATERIAŁÓW W PROCESIE STEROWANEJ REGENERACJI KOŚCI

Tomasz Furgoł, Tola Kotkiewicz, Julia Gawron, Agnieszka Sawina,
Michalina Masternak, Agnieszka Nowotarska

1. Koło Naukowe im. Zbigniewa Religii przy Katedrze Biofizyki w Zabrze,
Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
2. Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Histologii i Patologii Komórki
w Zabrze, Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny
w Katowicach

Abstrakt: Szybki rozwój nanotechnologii oraz inżynierii zajmującej się regeneracją tkanki kostnej umożliwił wykorzystanie nowych biomateriałów w procesie sterowanej regeneracji kości. Dzięki unikatowym właściwościom chemicznym, fizycznym oraz mechanicznym nanomateriały mogą pobudzać komórki macierzyste zlokalizowane w tkance kostnej do podziałów, co przyspiesza proces regeneracji kości. Ponadto nowoczesne biomateriały zapewniają stworzenie odpowiedniego środowiska wewnątrz uszkodzonej kości, ułatwiając jej odbudowę. Nanomateriały mogą stanowić podporę dla tkanki kostnej, wpływać na procesy biochemiczne w niej zachodzące i w efekcie przyczyniać się do szybszej odbudowy struktury kości. Celem tego rozdziału jest opisanie procesu sterowanej regeneracji kości oraz prezentacja najnowszych biomateriałów wykorzystywanych w procesie odbudowy tkanki kostnej.

Słowa kluczowe: biomateriały, regeneracja kości, membrana

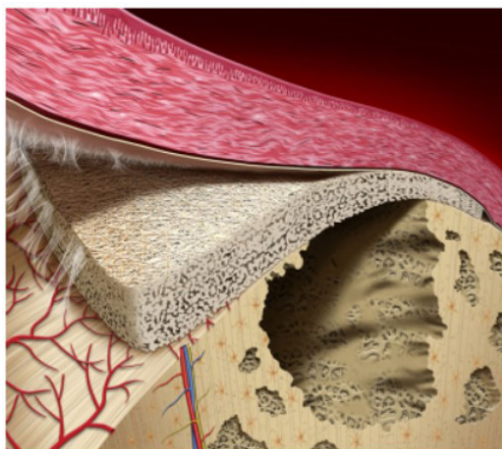
Abstract: A rapid development of nanotechnology and engineering in the process of bone regeneration has enabled the usage of new biomaterials in the process of Guided Bone Regeneration (GBR). Thanks to unique chemical, physical and mechanical properties nanomaterials can now stimulate stem cells located in bone tissue to divide which fastens the process of bone regeneration. Moreover, modern biomaterials ensure creating the appropriate environment within a damaged bone, facilitating its reconstruction. Nanomaterials can become a support system for bone tissue, impact biochemical processes within the tissue and as the outcome, contribute to fastening the process of bone reconstruction.

Keywords: biomaterials, bone regeneration, membrane

1. Wprowadzenie

Tkanka kostna ma zdolność do samoregeneracji, jednak istotne uszkodzenia tej tkanki mogą utrudniać odbudowę uszkodzonego miejsca i doprowadzić do nie zrastania się kości. Przeszczep autogeniczny oraz allogeniczny kości pozostaje złotym standardem leczenia ubytków kostnych. Niestety takie rozwiązanie niesie za sobą wiele powikłań, takich jak na przykład duże ryzyko infekcji czy odrzucenie przeszczepu. Istnieje ograniczona dostępność materiałów wykorzystywanych przy przeszczepach kości, dlatego sterowana regeneracja tkanki kostnej jest uznawana jako alternatywne rozwiązanie terapeutyczne^{1,2}.

Sterowana regeneracja tkanki kostnej (GBR – Guided Bone Regeneration) jest skuteczną techniką leczenia ubytków kości. Metoda ta polega na stworzeniu optymalnych warunków regeneracji tkanki kostnej poprzez wprowadzenie materiału, który pełnił będzie rolę separującej bariery między zniszczoną tkanką kostną a jej otoczeniem - tkanką łączną. Główną ideą sterowanej regeneracji kości jest wykorzystanie membrany rozdzielającej dwie tkanki: uszkodzoną tkankę kostną od otaczającej tkanki łącznej^{3,4}.



Rycina 1. Schematyczna ilustracja podstawowej zasady sterowanej regeneracji kości⁵

Koncept stworzenia oddzielnej anatomicznej przestrzeni zrodził się około 60 lat temu podczas odbudowy nerwów oraz ścięgien, gdzie zostały wtedy wykorzystane cząsteczki octanu celulozy⁶.

Biomateriały służące do budowy membran oddzielających tkanki muszą wykazywać odpowiednie cechy chemiczne, fizyczne oraz biologiczne takie jak:

biokompatybilność, integralność z tkanką docelową, wytrzymałość, oraz inne cechy, które zostaną omówione w dalszej części rozdziału⁷.

Obecna inżynieria tkanki kostnej skupia się na konstrukcji biomateriałów, które potrafią modyfikować procesy zachodzące w kościach. Odpowiedź immunologiczna, osteogeneza, osteoklastogeneza oraz infekcje i proces zapalny – regulacja tych procesów jest zależna od rodzaju biomateriału wykorzystanego do syntezy membrany^{8,9}.

2. Proces regeneracji kości

Zanim omówimy rodzaje oraz budowę membran wykorzystywanych w GBR, skupimy się na fundamentach fizjologicznej regeneracji kości.

Kość składa się z związków organicznych oraz nieorganicznych. Związki organiczne to głównie kolagen typu I, natomiast do związków nieorganicznych należy w dużej mierze hydroksyapatyt. Równowaga pomiędzy materią organiczną i nieorganiczną warunkuje stabilność i wytrzymałość kości. Małe włókna kolagenu tworzą osteoid. W procesie mineralizacji powstaje hydroksyapatyt, który jest odkładany między włóknami kolagenu. Stopień mineralizacji kości determinuje właściwości mechaniczne tkanki kostnej. Wraz ze wzrostem stężenia hydroksyapatytu, struktura kości jest bardziej sztywna, ale bardziej podatna na złamania i pęknięcia.

Dwa główne rodzaje tkanki kostnej to tkanka bełczkowata oraz korowa. Tkanka korowa, zwana także zbitą, wykazuje porowatość na poziomie 5-30% oraz ogólną wytrzymałość rzędu 100-230 MPa, podczas gdy tkanka bełczkowata wykazuje wyższy stopień porowatości pomiędzy 30% i 90%, ale jest mniej wytrzymała niż tkanka korowa: 2-12 MPa^{10,11}.

Komórki, które budują tkankę kostną to osteocyty, osteoblasty oraz osteoklasty¹². Osteoblasty odpowiadają za syntezę tkanki kostnej, podczas gdy rolą osteoklastów jest degradacja kości¹³.

Tkanka kostna wykazuje zdolności samoregeneracji w przypadku urazów. Fundamentalnym procesem formowania kości jest osteogeneza, która może przebiegać dwiema ścieżkami:

1. kostnienie na podłożu chrzęstnym,
2. kostnienie na podłożu łącznotkankowym¹⁴.

2.1. Przebudowa kości oraz czynniki wzrostu w GBR

Tkanka kostna stale ulega przebudowie. Ważną rolę w regulacji remodelingu kości odgrywają czynniki wzrostu, które są odpowiedzialne za proliferację i różnicowanie się komórek.

Za remodeling kości odpowiedzialne są struktury zwane podstawowymi wielokomórkowymi jednostkami (BMUs – basic multicellular units). W skład BMUs wchodzi cztery główne komórki kostne: osteocyty, osteoklasty, osteoblasty oraz komórki okładzinowe kości.

Powierzchnia kości jest pokryta jedną warstwą komórek okładzinowych. Osteocyty są najliczniejszą grupą komórek tkanki kostnej. Rolą osteocytów w procesie remodelingu kości jest inicjacja tego procesu. Osteoklasty to komórki, które zostały zróżnicowane z komórek jednojądrzastych przy pomocy dwóch różnych czynników wzrostu:

1. czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów (M-CSF - macrophage colony stimulating factor) ,
2. ligand aktywatora receptora jądrowego czynnika κ B (RANKL - receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand)¹⁵.

Osteoklasty wydzielają różne czynniki wzrostu, w tym białka morfogenetyczne kości (BMPs – bone morphogenic proteins), które wpływają na formowanie się nowej kości¹⁶.

Osteoblasty są odpowiedzialne za usunięcie włókien kolagenowych oraz hydroksyapatytu, a także za aktywację osteoklastów poprzez ekspresję RANKL i M-CSF.

Czynnikami wzrostu wykorzystywanymi w GBR są:

- Czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF - vascular endothelial growth factor), czyli białko regulujące proliferację komórek śródbłonna
- Czynniki wzrostu fibroblastów (FGFs - fibroblast growth factors), czyli białka odpowiedzialne za powstawanie naczyń, indukują proliferację komórek śródbłonna oraz osteoblastów. U ludzi występują 22 różne FGFs (FGF1-FGF23, z wyjątkiem FGF15). FGF2, FGF9 oraz FGF18 zostały uznane za najlepszych kandydatów do indukowania formowania kości z zewnątrz.

Białka morfogenetyczne kości^{12, 14, 15} - białka te wpływają na przekształcanie mezenchymatycznych komórek macierzystych w osteoblasty¹⁷.

2.2. Wykorzystanie biomateriałów w procesie regeneracji kości

Gdy ubytek kości osiąga krytyczną wartość 2,5cm lub defekt kości wynika z chorób ortopedycznych takich jak nowotwór czy zakażenie, proces samoregeneracji nie jest w stanie w pełni odbudować kości do stanu pierwotnego¹. Kość ulega niedokrwieniu, martwicy, nie zrasta się w pełni i dochodzi do ubytku masy kości. Aby zapobiec tym problemom, potrzebne są dodatkowe narzędzia stymulujące proces regeneracji tkanki kostnej. Rozwiązania te możemy podzielić na 4 grupy:

1. biomateriały,
2. biomolekuły,
3. komórki macierzyste,
4. zewnętrzna stymulacja⁵.

Metody te mogą być wykorzystywane osobno bądź w kombinacjach, w celu stworzenia membran przyspieszających proces gojenia kości.

W tym rozdziale omówione zostaną głównie biomateriały wykorzystywane w syntezie membran.

Fizjologiczny proces odbudowy kości może zostać usprawniony dzięki zaimplementowaniu do chorej tkanki kostnej membran stworzonych ze specjalnych biomateriałów¹⁸. Po wszczępieniu membrany, w organizmie człowieka natychmiast rozwija się reakcja na ciało obce¹⁹. Podczas implantacji biomateriałów, ludzki organizm prowokuje odpowiedź tkankową poprzez wytworzenie stanu zapalnego. Po wszczępieniu membrany rozpoczyna się gojenie rany. Zachodzą zmiany w przepływie krwi wokół rany - następuje wydzielanie płynów, komórek oraz białek z otaczających tkanek. Na powierzchni membrany tworzy się czop składający się z płytek krwi, fibryny oraz leukocytów. Ta kombinacja komórek i komponentów umożliwia wytworzenie przestrzeni bogatej w czynniki wzrostu, cytokiny i chemokiny. Chemokiny przyciągają do miejsca wszczępienia implantu komórki układu odpornościowego ze szpiku kostnego uszkodzonej kości. Dotarcie tych komórek do miejsca docelowego – czyli do miejsca wszczępienia implantu wokół rany, indukuje proces gojenia się rany.

Na początku na miejscu zjawiają się neutrofile, które inicjują ostrą reakcję zapalną. Neutrofile zaczynają usuwać martwą tkankę z rany, zabijają patogeny oraz wydzielają kolejne cytokiny i chemokiny. Gdy neutrofile wykonają swoją rolę, ulegają apoptozie.

Makrofagi usuwają zabite komórki neutrofilii w procesie fagocytozy. Następnie makrofagi różnicują się w makrofagi M1 lub makrofagi M2. Fenotypy te są odwracalne, makrofagi M1 mogą się przekształcać w makrofagi M2 i odwrotnie. Makrofagi M1 oraz M2 uwalniają odpowiednie cytokiny oraz czynniki wzrostu. Mediatory prozapalne będą wpływały na powstawanie fenotypu M1.

Fenotyp M1 odpowiada głównie za rolę obronną rany - przeprowadza fagocytozę patogenów oraz niekorzystnych metabolitów przemiany materii w chorej tkance, pełni również rolę prozapalną, wydziela czynnik martwicy nowotworu alfa (TNF- α - tumour necrosis factor-alpha), oraz interleukinę 6²⁰. Fenotyp M2 wykazuje funkcje naprawcze, pobudza syntezę macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM – extracellular matrix), odgrywa rolę przeciwzapalną poprzez wydzielanie interleukiny 10. Jest aktywowany poprzez interleukiny 4 i 13. Fenotyp M2 może być dalej dzielony na 4 kolejne typy: M2a, M2b, M2c oraz M2d.

Makrofagi, które lokalizują się wokół membrany, wpływają na proces waskularyzacji, na różnicowanie komórek tkanki kostnej oraz wzrost masy kostnej poprzez ekspresję VEGF^{20,21,22}.

Makrofagi wchodząc w interakcję z wszczepionym ciałem obcym mogą zlewać się w ogromne wielojądrzaste komórki w zależności od rodzaju wykorzystywanego biomateriału. Wraz ze wzrostem powierzchni wykorzystywanej membrany, więcej makrofagów zlewa się ze sobą i powstają coraz większe wielojądrzaste komórki. Obecność tych komórek wokół stosowanych membran indukuje waskularyzację oraz formowanie się kości^{22,23,24}.

3. Wytyczne sukcesu sterowanej regeneracji kości – zasady „PASS”

Sterowana regeneracja kości jest chirurgiczną techniką zwiększającą miejsce przygotowywane do przyjęcia implantu kości, służy również do zwiększenia objętości tkanki łącznej wokół wcześniej umiejscowionego wypełnienia tkanki kostnej. Wytyczne dotyczące sterowanej regeneracji kości są podobne do wytycznych sterowanej regeneracji tkanek²⁵. Skupiają się one przede wszystkim na usunięciu komórek martwych tak, aby w ich miejscu powstały nowe, sprzyjające regeneracji tkanki przylegającej, komórki. W sterowanej regeneracji kości, komórkami pożądanymi w otoczeniu implantu są osteoblasty, komórki kościotwórcze odpowiedzialne za przekształcanie nowej kości. Dzięki selektywnemu wykluczaniu nabłonka oraz tkanki łącznej celem zastąpienia

ich przeszczepem tkanki kostnej, możliwe jest uzyskanie prawidłowego umiejscowienia oraz objętości kości docelowej²⁶. Sukces i przewidywalność zabiegu chirurgicznego sterowanej regeneracji kości znacznie zwiększyły zastosowanie tej metody. Implanty wstawiane są nie tylko w przypadku braku kości, ale również w przypadku zmniejszonej objętości kości lub jej ubytku. Aby zapewnić przewidywalność zabiegu chirurgicznego, należy postępować zgodnie z wytycznymi klinicznymi wypracowanymi przez lata. Do reguł należą:

1. Zabezpieczenie i opatrzenie rany w odpowiedni sposób.
2. Umożliwienie regeneracji naczyń.
3. Prawidłowe przygotowanie miejsca wszczepienia implantu - wycięcie nadmiaru tkanki nabłonkowej i łącznej.
4. Utrzymanie i kontrola stabilności umiejscowionego przeszczepu tkanki kostnej.

Zabezpieczenie rany pooperacyjnej powinno w największym stopniu zależeć od tego, jak rana jest uformowana i w jaki sposób została zszyta. Istnieją dwie opcje zszywania rany, które należy rozważać osobno i od których należy uzależniać dalsze postępowanie z raną. Do pierwszej z nich należy sytuacja, w której brzegi rany są równe i których zszycie powoduje zbliżoną do stanu przed zabiegiem pozycję tkanek. Drugą opcją jest konieczność zszywania rany w sposób nieregularny, spowodowany szarpanymi bądź nierównymi krawędziami zszywanej tkanki, w ostateczności konieczność pozostawienia części rany niezszytej. W rzeczywistości, bardzo ciężko jest uzyskać efekt pierwszy, w którym tkanka wraca do stanu praktycznie sprzed zabiegu, więc w większości sytuacji plan procesu gojenia będzie oparty na zakresie zmian w obrębie miejsca zabiegu chirurgicznego. Kluczowym elementem procesu gojenia jest umożliwienie formowania kolagenu. Ważny jest również proces modelowania tkanki nabłonkowej. Musi on zostać przeprowadzony tak, aby uniknąć nadmiernego bliznowacenia^{27,28}.

Umożliwienie regeneracji przerwanych w trakcie cięcia chirurgicznego naczyń oraz uformowanie nowych naczyń krwionośnych wokół tworzącej się tkanki kostnej są niezbędne do prawidłowego odżywienia przeszczepionej tkanki i dostarczenia do niej białek morfotycznych wspomagających proces regeneracji. W pierwszych 24 godzinach po przeszczepie, w otoczeniu implantu i na membranie tworzy się skrzep, który jest usuwany w następnych dniach przez neutrofile i makrofagi. Następnym etapem jest formowanie w miejscu usuniętego skrzepu tkanki ziarninowej, która jest bogata w naczynia krwionośne i dzięki jej uformowaniu, możliwe jest połączenie naczyń

krwionośnych otaczających tkanek z naczyniami formującymi się w tkance przeszczepionej^{29,30}.

Oprócz utrzymania stabilności powstałego w miejscu rany skrzepu, niezbędne jest również ustabilizowanie oryginalnie wszczepionego implantu lub tkanki kostnej. Brak stabilizacji może doprowadzić do poluzowania miejsca przyczepu przeszczepu z tkankami okalającymi i membraną, co skutkować może narastaniem tkanki włóknistej wokół kości lub odczepieniem się kości od miejsca wszczepienia^{31,32}.

Aby uniknąć tych konsekwencji, stosowane są różne metody sprawdzania stabilności nowej kości, między innymi analiza częstotliwości fali magnetycznej oraz metody diagnostyki obrazowej³³.

Reguły "PASS" zapewniają pewną przewidywalność procesu sterowanej regeneracji kości, co umożliwi osiągnięcie pożądanych efektów podczas podejmowania decyzji o przeszczepie tkanki kostnej. Sukces terapii jest warunkowany wieloma czynnikami, które należy brać pod uwagę w procesie decyzyjnym. Aby rozważyć wszystkie aspekty podejmowanego zabiegu, reguły określane jako reguły "PASS" umożliwiają ewaluację etapów terapii krok po kroku i nieomijanie żadnego z etapów tak, aby umożliwić powodzenie przeszczepu. Powyższe omówienie stanowi pierwszy krok do skutecznego leczenia metodą sterowanej regeneracji kości.

4. Membrany

Jedną z właściwości tkanki kostnej jest możliwość regeneracji. Proces ten nie jest jednak możliwy, jeśli doszło do zbyt obszernego uszkodzenia w obrębie jednej kości i może on wymagać dodatkowej pomocy. Często również naturalny proces regeneracji tkanki kostnej musi zostać zainicjowany niezależnie od tkanki macierzystej, której należy pomóc w postaci przeszczepu dodatkowych komórek zwiększających objętość tkanki uszkodzonej. Aby wspomóc lub zastąpić naturalny proces regeneracji niezbędne jest, oprócz właściwej tkanki kostnej, odpowiednie przygotowanie miejsca transferu tkanki, które zostało opisane we wcześniejszych rozdziałach. Kolejnym problemem, z którym można się mierzyć u pacjentów wymagających przeszczepów tkanki kostnej jest ryzyko odrzucenia przeszczepionej tkanki, jej obumarcia oraz możliwość zakażenia drobnoustrojami chorobotwórczymi miejsca przeszczepu. Niezbędne do sukcesu terapii jest zminimalizowanie ryzyka, które wiąże się z wprowadzeniem odpowiedniego materiału przygotowującego organizm pod przeszczep i wspomagające jego utrzymanie i tym materiałem są membrany³⁴.

Pierwszym z etapów przygotowania do przyjęcia przez pacjenta przeszczepu tkanki kostnej jest utworzenie i uformowanie miejsca poprzez wycięcie nadmiaru tkanki nabłonkowej i łącznej. Obie tkanki, których miejsce ma zastąpić tkanka kostna, charakteryzują się szybką regeneracją oraz bliznowaceniem. Aby uniknąć nieprawidłowego narastania tkanki bliznowatej oraz przerastania tkanki łącznej wokół przeszczepionej tkanki kostnej, również konieczne jest użycie w miejscu przygotowanym pod przeszczep membrany.

Cechy, które muszą być brane pod uwagę w konstrukcji i wyborze prawidłowej i skutecznej membrany do sterowanej regeneracji kości to:

1. biokompatybilność,
2. zachowanie miejsca przygotowanego pod przeszczep tkanki kostnej,
3. funkcja okluzyjna,
4. łatwe przygotowanie membrany i jej umiejscowienie,
5. sprzyjanie bioaktywacji procesu regeneracji tkanki kostnej^{5,35, 36}.

1. Membrana do sterowanej regeneracji kości może być uznana za biokompatybilną, jeśli wchodząc w interakcję z komórkami przyjmującego przeszczep tkanki kostnej nie zaburza funkcji tkanek otaczających miejsce przeszczepu. Najważniejszą cechą jest niezakłócanie przez membranę procesu gojenia i regeneracji tkanki otaczającej oraz tkanki przeszczepionej, co jest niezbędne do utrzymania prawidłowego stanu przeszczepu. Należy przede wszystkim zwrócić uwagę na proces rozkładu membrany podczas wybierania, z jakiego materiału powinna być stworzona – preferowane są membrany, które w procesie gojenia integrują się z tkankami otaczającymi przeszczep poprzez rozpuszczenie lub wchłonięcie do tkanek otaczających^{37,38}.

2. Zachowanie prawidłowej struktury miejsca, do którego został wprowadzony przeszczepiony materiał, jest kluczowe dla możliwości zwiększania objętości przez przeszczepioną tkankę kostną. Aby tkanka kostna mogła się rozrastać w założonym kierunku, niezbędne jest, aby miejsce pod tę tkankę przygotowane nie uległo przerwaniu czy zapadnięciu, co umożliwia odpowiednio przygotowana w miejscu przeszczepu membrana^{38,39}.

3. Funkcja okluzyjna polega na wytworzeniu bariery między miejscem przeszczepu tkanki kostnej a tkanką otaczającą w taki sposób, aby nie zaburzyć transportu tlenu i składników odżywczych między komórkami tych tkanek, czyli bariera ta musi być półprzepuszczalna. Aby było to możliwe, niezbędne jest wybranie takiej membrany, której odpowiednia porowatość pozwoli na wyżej wymienione procesy^{39,40}.

4. Przygotowanie membrany do umiejscowienia podczas zabiegu chirurgicznego nie powinno być trudne – membrana powinna mieć takie cechy, aby w łatwy sposób można było nią manewrować i dopasować do miejsca, w które zostanie przyczepiona tkanka kostna. Należy unikać membran zbyt sztywnych lub zbyt miękkich, należy wziąć pod uwagę również grubość docelowej membrany tak, aby nie wypełniała ona większości miejsca przygotowanego pod nową strukturę kostną. Ważnym aspektem jest również waga membrany – musi ona być na tyle lekka, aby nie doprowadzić do ucisku okalających jej tkanek i tym samym, aby ucisk ten nie spowodował obumierania komórek oraz ucisku naczyń w tkankach okalających miejsce docelowego przeszczepu^{40,41}.

5. Sprzyjanie inicjacji i udział w procesie regeneracji bezpośrednio przez materiał tworzący membranę to cecha, która aktualnie jest rozwijana i ma coraz większe znaczenie w doborze materiałów tworzących membranę. Do pewnego czasu, wszczepianie membrany pod przeszczepianą tkankę kostną miało na celu jedynie stworzenie bariery i odseparowanie tkanki przeszczepionej tak, aby swobodnie mogła ona się rozrastać. Aktualnie dąży się do stosowania takich materiałów na membrany, które będą aktywnie wspomagać proces rozrastania tkanki kostnej poprzez aktywację czynników wzrostu^{42,43}.

4.1 Biomateriały tworzące membrany

Zastosowanie membrany podczas sterowanej regeneracji kości jest niezbędne, aby zabieg ten się powiódł. Do zbudowania membran stosuje się wiele materiałów i modyfikacji składu, ale wszystkie muszą spełniać pewne warunki, aby ich użycie miało pozytywny efekt na cały proces GBR. Do tych warunków należą:

1. biokompatybilność,
2. okluzja,
3. integracja z komórkami pacjenta,
4. łatwość manewrowania,
5. możliwość utrzymania formy w miejscu, w którym ma zostać wszczepiona tkanka kostna,
6. mechaniczne i fizyczne właściwości odpowiadające miejscu przeszczepu⁴⁵.

Pierwszą generację membran stanowiły membrany niewchłanialne, zbudowane z politetrafluoroetyleny (PTFE) i jego wzmocnionej wersji (e-PTFE).

Używanie ich wspomogło proces sterowanej regeneracji kości, niestety materiał ten miał pewne wady - użycie politetrafluoroetylenowej membrany wiązało się z koniecznością ponownego zabiegu chirurgicznego u pacjenta, co generuje możliwość zakażenia rany i zmniejsza szanse na całkowicie prawidłowe umiejscowienie tkanki przeszczepionej⁴⁶. Aktualnie rzadko korzysta się z membran pierwszej generacji, zostały one wyparte przez bardziej nowoczesne materiały, spełniające więcej kryteriów “materiału idealnego” oraz minimalizujące ryzyko podczas sterowanej regeneracji kości⁴⁷.

Membrany do GBR są zbudowane z czterech klas materiałów: polimerów syntetycznych, polimerów naturalnych, metali oraz mieszanek nieorganicznych. Podział materiałów, z których zbudowane są membrany przedstawia Tabela 1.

Membrane groups/materials	Main advantages	Main disadvantages
Synthetic polymers		
Polytetrafluoroethylene	Inert and stable polymer in the biological system	Non-resorbable
Aliphatic polyesters (e.g. PLA, PGA, and PCL)	Bioresorbability Good processability and manageability Drug-encapsulating ability	Lack of rigidity and stability
Natural polymers		
Collagen and extracellular matrices derived from bovine, porcine and human tissues	Bioresorbability Low immunogenicity Drug-encapsulating ability Incorporation of biological components	
Chitosan		
Alginate		
Metals		
Titanium and titanium alloy	High toughness and plasticity	Non-resorbable
Cobalt-chromium alloy		
Inorganic compounds		
Calcium sulfate	Bioresorbability	Low toughness and plasticity
Calcium phosphate (e.g. hydroxyapatite)	Osteoconductivity	

PCL, poly(*ε*-caprolactone); PGA, poly(glycolic acid); PLA, poly(lactic acid).

Tabela 1. Membrany używane do sterowanej regeneracji kości są kluczowym elementem leczenia. Używa się wielu różnych materiałów i modyfikacji tych materiałów, z których najczęściej używane zostały wymienione w tabeli⁵

Ważnym aspektem podczas wybierania materiału na membranę do GBR jest ocena jej właściwości i analiza odpowiedzi komórek organizmu na wybrany materiał. Najbardziej nowoczesne technologie skupiają się na strategii takiej modyfikacji składu membrany, aby użycie jej zapewniało konkretną, pożądaną odpowiedź organizmu. Do tych odpowiedzi zalicza się: przyspieszenie procesu regeneracji tkanki kostnej, stworzenie odpowiedniego podłoża do wykształcenia fizjologicznego biofilmu, zmniejszenie negatywnych skutków ingerencji w tkanki miękkie otaczające docelową, zregenerowaną kość. Aby uzyskać wszystkie te efekty, nie tylko materiał tworzący membranę musi być starannie dobrany, ale również należy precyzyjnie taką membranę umieścić, co nie zawsze będzie łatwym zadaniem dla osoby wykonującej zabieg⁴⁸.

4.1.1 Polimery syntetyczne

Membrany stworzone na bazie kolagenu są ważną częścią GBR. Obecnie naukowcy pracują nad poprawą jakości membran kolagenowych. Wadami tych tworzyw jest niska odporność na trawienie oraz problem w funkcjonalności jako bariera kości od tkanki łącznej. Poszukiwane są również alternatywy dla membran niewchłaniających, które najpierw zostają wszczepione do organizmu, lecz muszą zostać usunięte podczas kolejnego zabiegu, zwiększając szansę na wystąpienie powikłań.

Dwoma głównymi materiałami, z których produkuje się membrany do GBR z grupy polimerów syntetycznych są politetrafluoroetylen wspomniany wcześniej oraz poliestry alifatyczne, czyli łańcuchowe.

Najważniejszą cechą membrany zbudowanej z politetrafluoroetyleny jest fakt, że jest ona niewchłaniająca i stanowi to konieczność reoperacji, podczas której taka membrana musi zostać usunięta. Reoperacja stanowi ryzyko zakażenia rany oraz zmiany położenia rozrastającej się tkanki kostnej. Korzyścią płynącą z korzystania z membrany politetrafluoroetylenowej jest jej obojętność i stabilność w środowisku biologicznym, co uniemożliwia odrzucenie lub wywołanie reakcji przez membranę z tego materiału⁴⁹.

Drugim rodzajem polimerów syntetycznych do produkcji membran stanowią poliestry łańcuchowe, do których należy PLA – poliaktyd, PGA – poliglikolid oraz PCL – polikaprolakton, wszystkie należące do materiałów biodegradowalnych i obojętnych dla ludzkiego organizmu. Zaletą tych materiałów jest przede wszystkim fakt, że są one wchłaniające, łatwo nimi manipulować podczas zabiegu oraz można w ich strukturę wbudować leki wspomagające dalsze etapy leczenia po operacji. Największymi ich wadami są brak stabilności

i sztywności co oznacza, że wymagają one wyjątkowo dużej precyzji ze strony osoby wprowadzającej je w miejsce przeszczepu oraz ryzyko przerwania ich struktury na każdym etapie terapii⁵.

4.1.2. Polimery naturalne

Do tej grupy należą membrany zbudowane z chitozanu, alginianu (kwasu alginowego) oraz z kolagenu i jego pochodnych. Wszystkie te materiały stanowią idealną podstawę do budowy matrycy do GBR, do najważniejszych ich zalet należy wchłanianie, niska immunogenność, możliwość wbudowania w ich strukturę leków, możliwość wbudowania w ich strukturę innych materiałów pochodzenia biologicznego, np. koncentratu płytek krwi czy fibrynogenu oraz przede wszystkim, możliwość dopasowania ich właściwości mechanicznych do potrzeb pacjenta. Możliwość manewrowania takimi cechami, jak gęstość materiału, twardość, lepkość czy grubość to ogromny atut, który spowodował, że membrany z polimerów naturalnych przez wiele lat stanowiły podstawę w terapii GBR^{50,51, 52}.

Membrany kolagenowe są produkowane zarówno z tkanek ludzkich, jak i z tkanek zwierzęcych, głównie wołowych i świńskich (między innymi ze ścięgien, naskórka oraz jelit). Ich rozpad w organizmie człowieka zależy przede wszystkim od tego, skąd pochodzi i nie wszystkie membrany kolagenowe pochodzenia zwierzęcego będą optymalne w sterowanej regeneracji kości. Należy zwrócić uwagę głównie na ich wytrzymałość oraz szybkość degradacji, tak, aby ich obecność w miejscu przeszczepu nie była zbyt krótka w stosunku do powolnego tempa wzrostu przeszczepionej tkanki kostnej. Istnieje wiele metod optymalizacji ich czasu przetrwania i zwolnienia ich rozpadu w ciele człowieka⁵³.

Aktualnie najczęstszymi metodami na optymalizację czasu przetrwania membran kolagenowych jest wbudowanie w ich strukturę cząsteczek naturalnych, takich jak cząsteczki D-rybozy, uważane za nietoksyczne, nieimmunogenne i wzmacniające strukturę membrany cząsteczki zapewniające większą wytrzymałość mechaniczną i wolniejszą degradację membrany^{54, 55}.

Membrany kolagenowe pochodzące z tkanek ludzkich są pozyskiwane z komórek naskórka po wycięciu fragmentu skóry pacjenta. Najważniejsze składniki pozyskane z komórek naskórka to kolagen, elastyna oraz endogenne czynniki wzrostu, które zostają zachowane w procesie usuwania właściwych komórek naskórka, w którym uzyskiwany jest ADM (ADM - acellular dermal matrix), czyli bezkomórkowa macierz z naskórka. Membrana

stworzona z koncentratu ADM stanowi jedną z najlepszych membran do GBR, ze względu na zerową immunogenność i możliwość manipulacji jej cechami mechanicznymi^{56,57}.

Membrany chitozanowe są zbudowane z kopolimerów glukozaminy i N-acetylglukozaminy i są pozyskiwane w procesie deacetylacji chityny, polisacharydu stanowiącego szkielet zewnętrzny insektów i skorupiaków. Właścivściami tego materiału są biokompatybilność, biodegradowalność, niska immunogenność i efekt bakteriostatyczny. Degradacja chitozanowej membrany zależy od jej ciężaru cząsteczkowego oraz od sposobu, w jaki jest produkowana. Membrana chitozanowa może w swojej strukturze mieć wbudowane inne cząsteczki, modyfikujące jej strukturę, takie jak cukry czy glutaraldehyd⁵⁸. Ich zastosowanie jest rzadsze, niż membran kolagenowych, ale pozostaje opcją w związku z szerokimi możliwościami pozyskiwania materiałów do ich produkcji.

Membrany z kwasu alginowego są stosowane w sterowanej regeneracji kości ze względu na biokompatybilność, niską immunogenność oraz strukturę żelu, co znacznie ułatwia manewrowanie taką matrycą podczas zabiegu. Istnieje wiele dowodów na to, że membrany zbudowane z kwasu alginowego wspomagają proces regeneracji właściwej tkanki kostnej, stanowiąc rezerwuuar ważnych cząsteczek do ich rozrastania⁵⁹.

4.1.3. Metale

Bardzo popularne w przemyśle dentystycznym oraz w ortopedii są wszelkie materiały metalowe, w tym membrany tytanowe w GBR. Głównymi zaletami membran tytanowych są: biokompatybilność, wysoka wytrzymałość mechaniczna, odporność na wyginanie, sztywność, mała gęstość i niska waga, zachowanie struktury w wysokich temperaturach oraz odporność na korozję. Pomysł na zastosowanie tytanu do produkcji membran do GBR został zaproponowany po pomyślnym użyciu tego materiału w rekonstrukcjach kości twarzoczaszki^{60,61,62}.

4.1.4. Mieszanki nieorganiczne

Siarczan wapnia jest jedną z niewielu substancji nieorganicznych używanych w produkcji membran do GBR. Jest to materiał biokompatybilny, osteokondukcyjny i wchłaniaalny, popularnie występujący w środowisku naturalnym. Dzięki temu, że jest to materiał powszechnie dostępny, nie ma ryzyka,

że zabraknie źródeł do jego produkcji. Produkcja membran z siarczanu wapnia odbywa się na wiele sposobów, ale wszystkie opierają się na uwodnieniu proszku z odwodnionego CaS, czyli utworzeniu pasty, z której możliwe jest modelowanie takiej formy, jaką poszukujemy do wszczepienia podczas GBR⁶³.

Zastosowanie do produkcji membran do GBR znalazł również hydroksyapatyt, czyli fosforan wapnia stosowany w leczeniu ubytków kości i którego główną zaletą jest podobna struktura do tkanki kostnej. Chociaż hydroksyapatyt wydaje się materiałem stosunkowo kruchym okazuje się, że ma on odpowiednią wytrzymałość mechaniczną, aby nie ulec naciskowi tkanek miękkich organizmu i tym samym utrzymać utworzone pod rozrastającą się po przeszczepie tkankę kostną miejsce⁶⁴.

4.2. Cechy fizyczne membran do sterowanej regeneracji kości

Wybierając materiał, z którego ma być stworzona membrana, należy brać pod uwagę szereg czynników i właściwości, jakie ma dana membrana. Jeśli membrana będzie zbyt krucha lub giętka, albo dojdzie do przerwania jej struktury, zmniejszy się i zmieni miejsce przeznaczone na rozrastającą się tkankę kostną i tym samym, zmieni to bieg regeneracji miejsca przeszczepu. Idealna membrana musi wytrzymać nie tylko ciężar docelowej, zregenerowanej kości, ale również nacisk ze strony tkanek miękkich otaczających miejsce przeszczepu, dlatego tak ważne jest odpowiednie dobranie materiału.

Kolejną cechą, którą należy rozważyć wybierając membranę, jest porowatość. Ma ona znaczenie zarówno w przypadku membran wchłaniających, jak i niewchłaniających. Wielkość i ilość porów w membranie wpływają na stopień i szybkość regeneracji tkanki kostnej, umożliwiając albo blokując transport składników odżywczych, tlenu, płynów i czynników wzrostu z sąsiadujących tkanek miękkich. Zbyt duża średnica porów może niestety negatywnie wpłynąć na tkankę kostną, ponieważ może prowadzić do narastania tkanek miękkich w miejscu przeznaczonym dla tkanki kostnej i jej wypierania. Dodatkowo, zwiększenie powierzchni kontaktu z tkankami miękkimi może doprowadzić do zanieczyszczenia bakteryjnego. W celu uniknięcia zakażeń bakteryjnych, preferowane są membrany o dużej ilości porów o bardzo małej średnicy (0.2 μm). Obecność porów w membranie ułatwia również odbudowanie mikronaczyń w obrębie miejsca przeszczepu, co ma kluczowe znaczenie w zupełnym wyleczeniu kości⁶⁵.

Różne materiały do produkcji membran mają różne gęstości, masy właściwe i różne grubości. Cechy te zależą od sposobu produkcji danej matrycy,

jak również od docelowej objętości tkanki kostnej mającej zregenerować się w procesie GBR. Nie można w tym aspekcie mówić o idealnej membranie, ponieważ każde miejsce w ciele człowieka będzie wymagało innych warunków i należy je odpowiednio dopasować, wybierając z dostępnych na rynku membran⁶⁶.

4.3. Porównanie i zastosowania membran w sterowanej regeneracji kości

Obecnie wykorzystywane są zarówno membrany niewchłaniające jak i wchłaniające⁶⁷. Pierwsze skuteczne wykorzystanie membran wchłaniających w sterowanej regeneracji kości nastąpiło na początku lat 90-tych XX wieku^{68,69}. Membrany wchłaniające zostały po raz pierwszy użyte do wszczepienia implantów zębów trzonowych, a materiałem, z którego membrany były zbudowane był syntetyczny polimer. Następnie do tych samych zabiegów chirurgii szczękowej zaczęto wykorzystywać substancje naturalne, głównie kolagen do produkcji membran⁷⁰. Polimery wchłaniające zbudowane z polilaktydu i jego pochodnych mogą być wykorzystywane do rekonstrukcji dużych kości np. otwarcia kości piszczelowej lub obszernej utraty masy kostnej w trzonie kości w części przynasadowej⁷¹.

Największą wadą membran niewchłaniających jest wyższe ryzyko rozjęcia się rany po zabiegu^{72,73}. Prowadzi to do występowania większej liczby infekcji oraz niekorzystnych zdarzeń podczas gojenia się rany^{74,75,76}. Membrany niewchłaniające były szeroko stosowane w operacjach przeprowadzanych w obrębie jamy ustnej, między innymi w wypełnianiu ubytków kostnych szczęki lub żuchwy lub w przypadku konieczności zwiększenia odstępów między zębami. Aktualnie są one zastępowane membranami wchłaniającymi, ze względu na brak konieczności powtórnego zabiegu w celu usunięcia membrany⁷⁶. Słabość mechaniczna membran kolagenowych może skutkować utratą stabilności i w efekcie rozpadem membrany i uszkodzeniem kości. Z tego względu zaleca się stosowanie kombinacji membran kolagenowych z innymi elementami stabilizującymi, zwiększającymi odporność mechaniczną implantu^{77,78}. Możliwe jest zastosowanie wszczepu kostnego bądź dwóch warstw membrany, co wpływa korzystnie na stabilizację implantu⁷⁹. Mikro-ruchy membrany mogą zaburzać stabilność implantu dlatego większą stabilność może zapewnić przymocowanie membrany do kości wokół rany używając miniaturowych szpilek bądź śrub zbudowanych z polilaktydu, tytanu.

Pomocne może okazać się również założenie opatrunku wiążącego membranę z sąsiadującą jej tkanką łączną⁸⁰. Stabilizacja membrany warunkuje lepszy proces regeneracji tkanki kostnej.

Membrany kolagenowe wykazują przewagę nad innymi rodzajami membran w użyciu terapeutycznym. Kolagenowe implanty są wykorzystywane w medycynie oraz stomatologii dzięki ich wysokiej biokompatybilności oraz wspomaganiu procesu gojenia ran. Stanowią one podstawę praktyki klinicznej w sterowanej regeneracji kości. Membrany niewchłaniające są trudniejsze w użyciu również dlatego, że nie powinny być ekspozowane na środowisko zewnętrzne np. środowisko obecne w jamie ustnej, co kilkukrotnie zwiększyłoby ryzyko infekcji. Z tego powodu, membrany niewchłaniające są używane coraz rzadziej i tylko w nielicznych przypadkach, gdy nie ma dostępu do bardziej nowoczesnych membran^{81,82,83,84}.

Obecnie większość produkowanych membran składa się z kolagenu. Dostępne są również membrany wykorzystywane w codziennej praktyce klinicznej, zbudowane z innych materiałów, co przedstawia poniższa tabela 2.

Commercial Name	Produced By/For	Origin	Cross-Link	Barrier Effect (Weeks)
Biomend	Collagen Matrix Inc.	Bovine Tendon	Yes	8
Biomend Extend	Collagen Matrix Inc.	Bovine Tendon	Yes	18
Copios Extend	Collagen Matrix Inc.	Porcine Dermis	No	24–36
Osseoguard	Collagen Matrix Inc.	Bovine Tendon	Yes	26–38
Bio Gide	Geistlich Pharma Ag	Porcine Dermis	No	24
Mem-Lok RCM	Collagen Matrix Inc.	Bovine Tendon	Yes	26–38
Mem-Lok Pliable	Collagen Matrix Inc.	Porcine Peritoneum	Yes	12–16
Ossix Plus	Datum Dental Ltd.	Porcine Tendon	Yes	16–24
Creos Xenoprotect	Nobel Biocare	Porcine	No	12–16
Biocollagen	Bioteck S.P.A.	Equine Tendon Type I Collagen	No	4–6
Heart	Bioteck S.P.A.	Equine Pericardium	No	12–16
Cytoplast	Collagen Matrix Inc.	Bovine Tendon Type I	Yes	26–38
Collatape	Zimmer -Biomet	Bovine Collagen	No	1–2
Jason	MBP GmbH -Botiss Biomaterials	Porcine Pericardium	No	8–12
Collprotect	Botiss Biomaterials	Porcine Dermis	Yes	4–8
Dynamatrix	Keystone Dental	Porcine Submucosa	No	n.d.
Ez Cure	Biomatlante	Purified Porcine-Based Type I And III Collagen	Yes	12
Conform	Ace Surgical Supply Company	Bovine Type I Collagen	Yes	12–16

Tabela 2. Membrany stosowane w praktyce klinicznej oraz wykaz materiałów do ich produkcji⁸⁵

Podczas regeneracji tkanki kostnej ważnym aspektem jest również przeżywalność struktur odpowiadających za barierę ochronną komórek tej tkanki

i która może zostać zaburzona, gdy dojdzie do przerwania ciągłości membrany. Dzieje się tak głównie z powodów kompresji i ucisku ze strony tkanek sąsiadujących, ale wpływ na integralność strukturalną membrany ma również aktywność enzymatyczna, która ogranicza nam zakres materiałów, głównie tych bioresorbowalnych^{86,87}. Trwałość materiału tworzącego membranę wchłanianą zmniejsza się stale podczas procesu gojenia się miejsca pooperacyjnego i wpływ na to ma sposób, w jaki materiał został wyprodukowany.

Istnieje jeszcze jeden podział materiałów do produkcji membran i podział ten dotyczy usieciowania struktury membrany, co ma bezpośredni wpływ na barierę ochronną utworzoną przez regenerującą się tkankę kostną i od czego zależy może sukces terapii⁸⁸. Uważa się, że bardziej biokompatybilnymi materiałami, przychylnymi regeneracji tkanek oraz zmniejszające ryzyko powikłań pooperacyjnych są materiały nieusieciowane membran. Ich główną zaletą jest duża porowatość, co sprzyja regeneracji naczyniowej wokół regenerowanej tkanki oraz ułatwia transport substancji między tkankami. Membrany z materiałów nieusieciowanych są wykorzystywane głównie w autogenicznych przeszczepach kości, przeszczepach kości z użyciem materiałów alloplastycznych oraz w przeszczepach kości połączonych stawami⁸⁹⁻⁹⁵.

5. Koncentraty płytek krwi w sterowanej regeneracji kości

Koncentraty płytek krwi, w tym bogatopłytkowe osocze oraz bogatopłytkowy włóknik, są stosowane jako terapia wspomagająca regenerację kości. Koncentraty te są bogate w czynniki wzrostu z ziarnistości α płytek krwi, które mogą zarówno inicjować, jak i wspomagać osteogenezę. Ponadto, obecność mikrofibryny w koncentracie płytek krwi może stanowić ważny element w sklejanii i łączeniu się nowych komórek tkanki kostnej, co niezbędne jest do utrzymania prawidłowej formy wzrastającej kości⁹⁶. Koncentraty płytek krwi były oryginalnie wykorzystywane do pomostowania w sterowanej regeneracji kości oraz do innych zabiegów kostnych w chirurgii szczękowo-twarzowej. Aktualnie ich zastosowanie stało się nieodłącznym elementem w GBR^{97, 98}. Koncentraty płytek krwi są pozyskiwane z własnej krwi pacjenta. Pobrana od pacjenta krew ulega przefiltrowaniu tak, aby w koncentracie pozostały płytki krwi oraz leukocyty, czyli komórki mające zdolność uwalniania czynników wzrostu i cytokin, mających znaczny wpływ na przyspieszenie procesu gojenia po zabiegu⁹⁹. Włóknik pozyskany z koncentratu płytek krwi może również stanowić swoistą, bioaktywną membranę w procesie sterowanej

regeneracji kości, ale niewiele jest danych klinicznych obejmujących wykorzystanie jedynie tej substancji w roli membrany^{100,101}. Jako wadę membrany zbudowanej z tego materiału uważa się jej słabą odporność mechaniczną oraz łatwość degradacji. W odpowiedzi na podane problemy, sukcesem ostatnich lat było użycie kompresji cieplnej w procesie produkcji membrany z koncentratu fibrynowego płytek krwi, które spowodowało polepszenie właściwości mechanicznych takiej membrany, jednocześnie nie poświęcając jej najważniejszego aspektu, czyli biokompatybilności z organizmem pacjenta¹⁰². Takie rozwiązanie stanowi aktualnie podstawę wykorzystywania koncentratu płytek krwi pacjenta i jest bezpiecznym rozwiązaniem w procesie doboru odpowiedniej membrany w GBR.

6. Innowacje

Membrany stworzone na bazie kolagenu są ważną częścią GBR. Obecnie naukowcy pracują nad poprawą jakości membran kolagenowych. Wadami tych tworzyw jest niska odporność na trawienie oraz problem w funkcjonalności jako bariera kości od tkanki łącznej. Poszukiwane są również alternatywy dla membran niewchłaniających, które najpierw zostają wszczepione do organizmu, lecz muszą zostać usunięte podczas kolejnego zabiegu, zwiększając szansę na wystąpienie powikłań.

Odpowiedzią ze strony naukowców jest stworzenie nowych matryc kolagenowych, których nie dotyczą słabości mechaniczne oraz wytrzymałościowe. Jednym z rozwiązań jest zastosowanie światłoczułego atelokolagenu połączonego z nienasyconymi monomerami chlorku 4-winylobenzylowego oraz bezwodnikiem metakrylowym. Membrana stworzona na bazie takiej mieszanki biomateriałów jest bardziej odporna na trawienie oraz lepiej sprawdza się w roli bariery niż poprzednie generacje membran kolagenowych¹⁰³. Podobnymi cechami charakteryzuje się membrana zbudowana z sieciowanego światłem UV kolagenu połączonego z magnezem oraz polikaprolaktonem metakryloilu, stanowiąca alternatywę dla starszych poprzedników¹⁰⁴.

Kolejną alternatywą dla niedoskonałych membran kolagenowych, a także membran niewchłaniających są biodegradowalne membrany stworzone całkowicie (w 99,95%) z czystego magnezu. Membrany takie spełniają założone wymagania. Magnezowe membrany skutecznie izolują tkankę kostną podlegającą procesowi regeneracji od tkanki łącznej leżącej w sąsiedztwie rannego miejsca. Membrana ta po rozpadzie zostaje całkowicie zastąpiona nową, zdrową tkanką kostną. Zastosowanie tych magnezowych implantów

daje porównywalne efekty zdrowotne kości w porównaniu z zastosowaniem klasycznych membran kolagenowych, stanowią zatem dobrą alternatywę dla membran kolagenowych¹⁰⁵.

Podsumowanie

Sterowana regeneracji kości jest ważnym narzędziem wykorzystywanym do leczenia ubytków kostnych. Obecnie trwają poszukiwania nad stworzeniem biomateriałów umożliwiających wykonanie idealnych membran, które przyczynią się do jeszcze szybszego procesu odbudowy tkanki kostnej. Zadaniem klinicystów pozostaje dobór właściwego tworzywa membranowego w terapii spersonalizowanej. Prawidłowy dobór biomateriału może całkowicie zmienić przebieg choroby i zagwarantować szybszy powrót do zdrowia chorych.

Referencje

1. Perić Kačarević Ž, Rider P, Alkildani S, Retnasingh S, Pejakić M, Schnettler R, Gosau M, Smeets R, Jung O, Barbeck M. An introduction to bone tissue engineering. *Int J Artif Organs*. 2020 Feb;43(2):69-86. doi: 10.1177/0391398819876286. Epub 2019 Sep 23. PMID: 31544576.
2. Öz UC, Toptaş M, Küçüktürkmen B, Devrim B, Saka OM, Deveci MS, Bilgili H, Ünsal E, Bozkır A. Guided bone regeneration by the development of alendronate sodium loaded in-situ gel and membrane formulations. *Eur J Pharm Sci*. 2020 Dec 1;155:105561. doi: 10.1016/j.ejps.2020.105561. Epub 2020 Sep 17. PMID: 32950618.
3. Stodolak, E., Bogun, M., Kolawa-Kozioł, A., Błażewicz, M., & Mikołajczyk, T. (2009). Nanokompozyty PVA/(HAp lub SiO₂)/PCL jako membrany do sterowanej regeneracji kości (GBR). *Engineering of Biomaterials*, 12, nr 89–91, 227–231.
4. Kucharska, M., Bubak, G., Kowalczyk, M., Bojar, W., Brynk, T., Koperski, Ł., Ciach, T., 2011. Ocena własności fizycznych i biologicznych samoorganizującego się biomateriału otrzymanego z chitozanu/fosforanu wapnia/alginianu do zastosowań stomatologicznych. *Engineering of Biomaterials*, 14(105), s. 20–24.

5. Elgali I, Omar O, Dahlin C, Thomsen P. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. *Eur J Oral Sci.* 2017;125(5):315-337. doi:10.1111/eos.12364
6. Retzepi M, Donos N. Guided Bone Regeneration: biological principle and therapeutic applications. *Clinical Oral Implants Research.* 2010;21(6):567-576. doi:10.1111/j.1600-0501.2010.01922.x.
7. Soldatos NK, Stylianou P, Koidou VP, Angelov N, Yukna R, Romanos GE. Limitations and options using resorbable versus non-resorbable membranes for successful guided bone regeneration. *Quintessence Int.* 2017;48(2):131-147. doi: 10.3290/j.qi.a37133. PMID: 27834419.
8. J. M. Anderson, A. Rodriguez, D. T. Chang, *Semin. Immunol.* 2008, 20, 86.
9. F. Taraballi, M. Sushnitha, C. Tsao, G. Bauza, C. Liverani, A. Shi, E. Tasciotti, *Adv. Healthcare Mater.* 2018, 7, 1800490.
10. Liu Y, Luo D and Wang T. Hierarchical structures of bone and bio-inspired bone tissue engineering. *Small* 2016; 12(34): 4611–4632
11. Piaia L, Salmoria GV and Hotza D. Additive manufacturing of nanostructured bone scaffolds. In: Souza JCM, Hotza D, Henriques B, et al. (eds) *Nanostructured biomaterials for Cranio-maxillofacial and oral applications.* Amsterdam: Elsevier Inc, 2018, pp. 181–210
12. Mohammadi M, Shaegh SAM, Alibolandi M, et al. Micro and nanotechnologies for bone regeneration: recent advances and emerging designs. *J Controlled Release.* 2018;274:35–55. doi:10.1016/j.jconrel.2018.01.032
13. Orgbo S, Sukyai P. Bacterial cellulose-based scaffold materials for bone tissue engineering. *Appl Mater Today.* 2018;11:34–49. doi:10.1016/j.apmt.2018.01.004
14. Wubneh A, Tsekoura E, Ayranci C, et al. Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering. *Acta Biomater* 2018; 80: 1–30

15. Li B, Wang H, Qiu G, et al. Synergistic effects of vascular endothelial growth factor on bone morphogenetic proteins induced bone formation in vivo: influencing factors and future research directions. *Biomed Res Int* 2016; 2016: 2869572.
16. Han Y, You X, Xing W, et al. Paracrine and endocrine actions of bone – the functions of secretory proteins from osteoblasts, osteocytes, and osteoclasts. *Bone Res* 2018; 6: 16–11
17. Charoenlarp P, Rajendran AK and Iseki S. Role of fibroblast growth factors in bone regeneration. *Inflamm Regen* 2017; 37: 10–17. Charoenlarp P, Rajendran AK and Iseki S. Role of fibroblast growth factors in bone regeneration. *Inflamm Regen* 2017; 37: 10–17.
18. Schemitsch EH. Size matters: defining critical in bone defect size! *J Orthop Trauma* 2017; 31: S20–S22.
19. Sheikh Z, Brooks P, Barzilay O, et al. Macrophages, foreign body giant cells and their response to implantable biomaterials. *Materials* 2015; 8(9): 5671–5701
20. Hesketh M, Sahin KB, West ZE, et al. Macrophage phenotypes regulate scar formation and chronic wound healing. *Int J Mol Sci* 2017; 18(7): 1545–1510.
21. Ghanaati S, Unger RE, Webber MJ, et al. Scaffold vascularization in vivo driven by primary human osteoblasts in concert with host inflammatory cells. *Biomaterials* 2011; 32(32): 8150–8160.
22. Barbeck M, Dard M, Kokkinopoulou M, et al. Small-sized granules of biphasic bone substitutes support fast implant bed vascularization. *Biomatter* 2015; 5: e1056943.
23. Jensen SS, Gruber R, Buser D, et al. Osteoclast-like cells on deproteinized bovine bone mineral and biphasic calcium phosphate: light and transmission electron microscopical observations. *Clin Oral Implants Res* 2015; 26(8): 859–864.
24. Barbeck M, Unger RE, Booms P, et al. Monocyte preseeding leads to an increased implant bed vascularization of biphasic calcium phosphate bone substitutes via vessel maturation. *J Biomed Mater Res A* 2016; 104(12): 2928– 2935.

25. Wang HL, Boyapati L. "PASS" principles for predictable bone regeneration. *Implant Dent.* 2006 Mar;15(1):8-17. doi: 10.1097/01.id.0000204762.39826.0f. PMID: 16569956
26. Dahlin C, Linde A, Gottlow J, et al. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg.* 1988;81:672–676.
27. Fugazzotto PA. Maintenance of soft tissue closure following guided bone regeneration: Technical considerations and report of 723 cases. *J Periodontol.* 1999;70:1085–1097. \
28. Goldstein M, Boyan BD, Schwartz Z. The palatal advanced flap: A pedicle flap for primary coverage of immediately placed implants. *Clin Oral Implants Res.* 2002;13:644–650
29. Schmid J, Wallkamm B, Hammerle CH, et al. The significance of angiogenesis in guided bone regeneration. A case report of a rabbit experiment. *Clin Oral Implants Res.* 1997;8:244–248.
30. Winet H. The role of microvasculature in normal and perturbed bone healing as revealed by intravital microscopy. *Bone.* 1996;19:39S–57S.
31. Degidi M, Piattelli A. 7-year follow-up of 93 immediately loaded titanium dental implants. *J Oral Implantol.* 2005;31:25–31
32. Brunski JB, Moccia AF Jr, Pollack SR, et al. The influence of functional use of endosseous dental implants on the tissue-implant interface. I. Histological aspects. *J Dent Res.* 1979;58:1953–1969
33. Friberg B, Sennerby L, Linden B, et al. Stability measurements of one-stage Brånemark implants during healing in mandibles. A clinical resonance frequency analysis study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1999;28:266–272
34. Schemitsch, EH. Size matters: defining critical in bone defect size! *J Orthop Trauma* 2017; 31: S20–S22
35. Küçük Türkmen B, Öz UC, Toptaş M, Devrim B, Saka OM, Bilgili H, Devci MS, Ünsal E, Bozkır A. Development of Zoledronic Acid Containing Biomaterials for Enhanced Guided Bone Regeneration. *J Pharm Sci.* 2021 Sep;110(9):3200-3207. doi: 10.1016/j.xphs.2021.05.002. Epub 2021 May 11. PMID: 33984339.

36. J. Caballe-Serrano, A. Munar-Frau, O. Ortiz-Puigpelat, D. SotoPenaloza, M. Penarrocha, F. Hernandez-Alfaro, *J. Clin. Exp. Dent.* 2018, 10, 0
37. O. Omar, I. Elgali, C. Dahlin, P. Thomsen, *J. Clin. Periodontol.* 2019, 46, 103.
38. A. Hoornaert, C. D'Arros, M.-F. Heymann, P. Layrolle, *Biomed. Mater.* 2016, 11, 045012.
39. M. Weshler, I. V. Antoniac, *Handbook of Bioceramics and Biocomposites*, Springer, Berlin 2014. <https://www.springer.com/gp/book/9783319124599>.
40. S. H. Oh, J. H. Kim, J. M. Kim, J. H. Lee, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* 2006, 17, 1375
41. L. Rispoli, F. Fontana, M. Beretta, C. E. Poggio, C. Maiorana, *J. Otolaryngol. Rhinol.* 2015, 1, 8.
42. F. Zivic, S. Affatato, T. Miroslav, M. Schnabelrauch, N. Grujovic, K. L. Choy, *Biomaterials in Clinical Practice*, Springer International Publishing, Cham 2018
43. G. Sam, B. R. M. Pillai, *J. Clin. Diagn. Res.* 2014, 8, ZE14.
44. M. C. Bottino, V. Thomas, G. Schmidt, Y. K. Vohra, T. M. G. Chu, M. J. Kowolik, G. M. Janowski, *Dent. Mater.* 2012, 28, 703.
45. Wang Q, Huang Y, Qian Z. Nanostructured Surface Modification to Bone Implants for Bone Regeneration. *J Biomed Nanotechnol.* 2018 Apr 1;14(4):628-648. doi: 10.1166/jbn.2018.2516. PMID: 31352938.
46. Liu J, Kerns DG. Mechanisms of guided bone regeneration: a review. *Open Dent J* 2014; 8: 56–65
47. Sam G, Pillai BR. Evolution of barrier membranes in periodontal regeneration—"are the third generation membranes really here?". *J Clin Diagn Res* 2014; 8: Ze14–Ze17.
48. Hammerle CH, Jung RE, Feloutzis A. A systematic review of the survival of implants in bone sites augmented with barrier membranes (guided bone regeneration) in partially edentulous patients. *J Clin Periodontol* 2002; 29(Suppl): 226–231; discussion 232–223

49. Keestra JA, Barry O, Jong L, Wahl G. Long-term effects of vertical bone augmentation: a systematic review. *J Appl Oral Sci* 2016; 24: 3–17.
50. Rakhmatia YD, Ayukawa Y, Furuhashi A, Koyano K. Current barrier membranes: titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications. *J Prosthodont Res* 2013; 57: 3–14.
51. Liu SH, Yang RS, al-Shaikh R, Lane JM. Collagen in tendon, ligament, and bone healing. A current review. *Clin Orthop Relat Res* 1995; 318: 265–278.
52. Bunyaratavej P, Wang H-L. Collagen membranes: a review. *J Periodontol* 2001; 72: 215–229
53. Rothamel D, Schwarz F, Sager M, Herten M, Sculean A, Becker J. Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat. *Clin Oral Implants Res* 2005; 16: 369–378.
54. Jorge-Herrero E, Fernandez P, Turnay J, Olmo N, Calero P, García R, Freile I, Castillo-Olivares J. Influence of different chemical cross-linking treatments on the properties of bovine pericardium and collagen. *Biomaterials* 1999; 20: 539–545
55. Tal H, Kozlovsky A, Nemcovsky C, Moses O. Bioresorbable collagen membranes for guided bone regeneration In: Tal H, ed. *Bone regeneration*. Croatia: InTech, 2012; 111–139
56. Liu J, Kerns DG. Mechanisms of guided bone regeneration: a review. *Open Dent J* 2014; 8: 56–65.
57. Bondioli E, Fini M, Veronesi F, Giavaresi G, Tschon M, Cenacchi G, Cerasoli S, Giardino R, Melandri D. Development and evaluation of a decellularized membrane from human dermis. *J Tissue Eng Regen Med* 2014; 8: 325–336
58. Ma S, Chen Z, Qiao F, Sun Y, Yang X, Deng X, Cen L, Cai Q, Wu M, Zhang X, Gao P. Guided bone regeneration with tripolyphosphate cross-linked asymmetric chitosan membrane. *J Dent* 2014; 42: 1603–1612.

59. Lee KY, Mooney DJ. Alginate: properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci* 2012; 37: 106–126.
60. Boyne PJ. Restoration of osseous defects in maxillofacial casualties. *J Am Dent Assoc* 1969; 78: 767–776.
61. Brunette DM. Titanium in medicine: material science, surface science, engineering, biological responses and medical applications. Berlin: Springer, 2001.
62. Artzi Z, Dayan D, Alpern Y, Nemcovsky CE. Vertical ridge augmentation using xenogenic material supported by a configured titanium mesh: clinicohistopathologic and histochemical study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003; 18: 440–446.
63. Couri CJ, Maze GI, Hinkson DW, Collins BH 3rd, Dawson DV. Medical grade calcium sulfate hemihydrate versus expanded polytetrafluoroethylene in the treatment of mandibular class II furcations. *J Periodontol* 2002; 73: 1352–1359.
64. Anderud J, Jimbo R, Abrahamsson P, Isaksson SG, Adolfsson E, Malmstrom J, Kozai Y, Hallmer F, Wennerberg A. Guided bone augmentation using a ceramic space-maintaining device. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2014; 118: 532–538.
65. Polimeni G, Koo KT, Qahash M, Xiropaidis AV, Albandar JM, Wikesjo UM. Prognostic factors for alveolar regeneration: effect of tissue occlusion on alveolar bone regeneration with guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 730–735.
66. Gentile P, Chiono V, Tonda-Turo C, Ferreira AM, Ciardelli G. Polymeric membranes for guided bone regeneration. *Biotechnol J* 2011; 6: 1187–1197.
67. Merli, M.; Merli, I.; Raffaelli, E.; Pagliaro, U.; Nastri, L.; Nieri, M. Bone Augmentation at Implant Dehiscences and Fenestrations. A Systematic Review of Randomised Controlled Trials. *Eur. J. Oral Implant* 2016, 9, 11–32
68. Lundgren, D.; Sennerby, L.; Falk, H.; Friberg, B.; Nyman, S. The Use of a New Bioresorbable Barrier for Guided Bone Regeneration in Connection with Implant Installation. *Case Reports. Clin. Oral Implant Res.* 1994, 5, 177–184.

69. Mayfield, L.; Nobreus, N.; Attstrom, R.; Linde, A. Guided Bone Regeneration in Dental Implant Treatment Using a Bioabsorbable Membrane. *Clin. Oral Implant Res.* 1997, 8, 10–17.
70. Sheikh, Z.; Hamdan, N.; Ikeda, Y.; Grynypas, M.; Ganss, B.; Glogauer, M. Natural Graft Tissues and Synthetic Biomaterials for Periodontal and Alveolar Bone Reconstructive Applications: A Review. *Biomater. Res.* 2017, 21, 9.
71. Meinig RP. Clinical use of resorbable polymeric membranes in the treatment of bone defects. *Orthop Clin North Am.* 2010;41(1):. doi:10.1016/j.ocl.2009.07.012
72. Zitzmann, N.U.; Naef, R.; Scharer, P. Resorbable versus Nonresorbable Membranes in Combination with Bio-Oss for Guided Bone Regeneration. *Int. J. Oral Maxillofac. Implant* 1997, 12, 844–852.
73. Thoma, D.S.; Bienz, S.P.; Figuero, E.; Jung, R.E.; Sanz-Martín, I. Efficacy of Lateral Bone Augmentation Performed Simultaneously with Dental Implant Placement: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Clin. Periodontol.* 2019, 46, 257–276.
74. Selvig, K.A.; Kersten, B.G.; Chamberlain, A.D.; Wikesjo, U.M.; Nilveus, R.E. Regenerative Surgery of Intrabony Periodontal Defects Using EPTFE Barrier Membranes: Scanning Electron Microscopic Evaluation of Retrieved Membranes versus Clinical Healing. *J. Periodontol.* 1992, 63, 974–978.
75. Augthun, M.; Yildirim, M.; Spiekermann, H.; Biesterfeld, S. Healing of Bone Defects in Combination with Immediate Implants Using the Membrane Technique. *Int. J. Oral Maxillofac. Implant* 1995, 10, 421–428.
76. Rakhmatia, Y.D.; Ayukawa, Y.; Furuhashi, A.; Koyano, K. Current Barrier Membranes: Titanium Mesh and Other Membranes for Guided Bone Regeneration in Dental Applications. *J. Prosthodont. Res.* 2013, 57, 3–14.
77. Hurzeler, M.B.; Kohal, R.J.; Naghshbandi, J.; Mota, L.F.; Conradt, J.; Hutmacher, D.; Caffesse, R.G. Evaluation of a New Bioresorbable Barrier to Facilitate Guided Bone Regeneration around Exposed Implant Threads. An Experimental Study in the Monkey. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 1998, 27, 315–320.

78. Kostopoulos, L.; Karring, T. Augmentation of the Rat Mandible Using Guided Tissue Regeneration. *Clin. Oral Implant Res.* 1994, 5, 75–82.
79. Abou Fadel, R.; Samarani, R.; Chakar, C. Guided Bone Regeneration in Calvarial Critical Size Bony Defect Using a Double-Layer Resorbable Collagen Membrane Covering a Xenograft: A Histological and Histomorphometric Study in Rats. *Oral Maxillofac. Surg.* 2018, 22, 203–213.
80. Urban, I.A.; Lozada, J.L.; Wessing, B.; Suarez-Lopez del Amo, F.; Wang, H.-L. Vertical Bone Grafting and Periosteal Vertical Mattress Suture for the Fixation of Resorbable Membranes and Stabilization of Particulate Grafts in Horizontal Guided Bone Regeneration to Achieve More Predictable Results: A Technical Report. *Int. J. Periodontics Restor. Dent.* 2016, 36, 153–159.
81. Lang, N.P.; Hammerle, C.H.; Bragger, U.; Lehmann, B.; Nyman, S.R. Guided Tissue Regeneration in Jawbone Defects Prior to Implant Placement. *Clin. Oral Implant. Res.* 1994, 5, 92–97.
82. Becker, W.; Dahlin, C.; Becker, B.E.; Lekholm, U.; van Steenberghe, D.; Higuchi, K.; Kultje, C. The Use of E-PTFE Barrier Membranes for Bone Promotion around Titanium Implants Placed into Extraction Sockets: A Prospective Multicenter Study. *Int. J. Oral Maxillofac. Implant* 1994, 9, 31–40.
83. Carpio, L.; Loza, J.; Lynch, S.; Genco, R. Guided Bone Regeneration around Endosseous Implants with Anorganic Bovine Bone Mineral. A Randomized Controlled Trial Comparing Bioabsorbable versus Non-Resorbable Barriers. *J. Periodontol.* 2000, 71, 1743–1749. [CrossRef] [PubMed] *Materials* 2020, 13, 786 13 of 16
84. Sheikh, Z.; Qureshi, J.; Alshahrani, A.M.; Nassar, H.; Ikeda, Y.; Glogauer, M.; Ganss, B. Collagen Based Barrier Membranes for Periodontal Guided Bone Regeneration Applications. *Odontology* 2017, 105.
85. Sbricoli L, Guazzo R, Annunziata M, Gobbato L, Bressan E, Nastro L. Selection of Collagen Membranes for Bone Regeneration: A Literature Review. *Materials.* 2020;13(3):786. doi:10.3390/ma13030786

86. Mir-Mari, J.; Benic, G.I.; Valmaseda-Castellon, E.; Hammerle, C.H.F.; Jung, R.E.; Valmaseda-Castellón, E.; Hämmerle, C.H.F.; Jung, R.E. Influence of Wound Closure on the Volume Stability of Particulate and Non-Particulate GBR Materials: An In Vitro Cone-Beam Computed Tomographic Examination. Part II. *Clin. Oral Implant Res.* 2017, 28, 631–639.
87. Simion, M.; Baldoni, M.; Rossi, P.; Zaffe, D. A Comparative Study of the Effectiveness of E-PTFE Membranes with and without Early Exposure during the Healing Period. *Int. J. Periodontics Restor. Dent.* 1994, 14, 166–180.
88. Simion, M.; Scarano, A.; Gionso, L.; Piattelli, A. Guided Bone Regeneration Using Resorbable and Nonresorbable Membranes: A Comparative Histologic Study in Humans. *Int. J. Oral Maxillofac. Implant* 1996, 11, 735–742
89. Chiapasco, M.; Zaniboni, M. Clinical Outcomes of GBR Procedures to Correct Peri-Implant Dehiscences and Fenestrations: A Systematic Review. *Clin. Oral Implant Res.* 2009, 20, 113–123.
90. Jensen, S.S.; Terheyden, H. Bone Augmentation Procedures in Localized Defects in the Alveolar Ridge: Clinical Results with Different Bone Grafts and Bone-Substitute Materials. *Int. J. Oral Maxillofac. Implant* 2009, 24, 218–236.
91. Darby, I. Ridge Preservation: Does It Actually Work? *Ann. R. Australas. Coll. Dent. Surg.* 2010, 20, 52–55.
92. Buser, D.; Chappuis, V.; Kuchler, U.; Bornstein, M.M.; Wittneben, J.G.; Buser, R.; Cavusoglu, Y.; Belser, U.C. Long-Term Stability of Early Implant Placement with Contour Augmentation. *J. Dent. Res.* 2013, 92, 176S–182S.
93. Jensen, S.S.; Yeo, A.; Dard, M.; Hunziker, E.; Schenk, R.; Buser, D. Evaluation of a Novel Biphasic Calcium Phosphate in Standardized Bone Defects: A Histologic and Histomorphometric Study in the Mandibles of Minipigs. *Clin. Oral Implant Res.* 2007, 18, 752–760.
94. Jensen, S.S.; Broggini, N.; Hjorting-Hansen, E.; Schenk, R.; Buser, D. Bone Healing and Graft Resorption of Autograft, Anorganic Bovine Bone and Beta-Tricalcium Phosphate. A Histologic

- and Histomorphometric Study in the Mandibles of Minipigs. *Clin. Oral Implant Res.* 2006, 17, 237–243.
95. Grabowski, G.; Cornett, C.A. Bone Graft and Bone Graft Substitutes in Spine Surgery: Current Concepts and Controversies. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* 2013, 21, 51–60.
96. Farmani AR, Nekoofar MH, Ebrahimi Barough S, et al. Application of Platelet Rich Fibrin in Tissue Engineering: Focus on Bone Regeneration. *Platelets.* 2021;32(2):183-188. doi:10.1080/09537104.2020.1869710
97. Ozdemir H, Ezirganli S, Isa Kara M, Mihmanli A, Baris E. Effects of platelet rich fibrin alone used with rigid titanium barrier. *Arch Oral Biol* 2013; 58: 537–544
98. He L, Lin Y, Hu X, Zhang Y, Wu H. A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 108: 707–713.
99. Dhurat R, Sukesh M. Principles and methods of preparation of platelet-rich plasma: a review and author's perspective. *J Cutan Aesthet Surg* 2014; 7: 189–197.
100. Agarwal A, Gupta ND, Jain A. Platelet rich fibrin combined with decalcified freeze-dried bone allograft for the treatment of human intrabony periodontal defects: a randomized split mouth clinical trail. *Acta Odontol Scand* 2016; 74: 36–43
101. Toffler M, Toscano N, Holtzclaw D. Osteotome-mediated sinus floor elevation using only platelet-rich fibrin: an early report on 110 patients. *Implant Dent* 2010; 19: 447–456
102. Kawase T, Kamiya M, Kobayashi M, Tanaka T, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H. The heat-compression technique for the conversion of platelet-rich fibrin preparation to a barrier membrane with a reduced rate of biodegradation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2015; 103: 825–831.
103. Liang H, Yin J, Man K, et al. A long-lasting guided bone regeneration membrane from sequentially functionalised photoactive atelocollagen. *Acta Biomaterialia.* 2022;140:190-205. doi:10.1016/j.actbio.2021.12.004

104. Wang F, Xia D, Wang S, et al. Photocrosslinkable Col/PCL/Mg composite membrane providing spatiotemporal maintenance and positive osteogenic effects during guided bone regeneration. *Bioactive Materials*. 2022;13:53-63. doi:10.1016/j.bioactmat.2021.10.019
105. Rider P, Kačarević ŽP, Elad A, et al. Biodegradable magnesium barrier membrane used for guided bone regeneration in dental surgery. *Bioactive Materials*. 2022;14:152-168. doi:10.1016/j.bioactmat.2021.11.018

WPŁYW STRESU NA DŁUGOŚĆ TELOMERÓW I W KONSEKWENCJI NA PROCES STARZENIA SIĘ KOMÓREK. WYKORZYSTANIE TELOMERAZY W TERAPII PRZECIWSTRZENIOWEJ

Natalia Denisiewicz, Michał Bielówka, Łukasz Czogalik, Michał Janik,
Magdalena Stencel, Jakub Kufel

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

Abstrakt: Telomery to końcowe sekwencje chromosomów, które ulegają skróceniu przy każdym podziale komórkowym. W niektórych komórkach występuje enzym zwany telomerazą, który wydłuża te sekwencje. Interesującym kierunkiem badań stała się możliwość zapobiegania skracania końcowych fragmentów chromosomów, poprzez wzrost aktywności telomerazy w komórkach. Krótkie telomery związane są ze starzeniem się komórki i rozwojem wielu chorób. Poza naturalnym starzeniem replikacyjnym, występuje również starzenie komórkowe, na które wpływają czynniki takie jak przewlekły stres psychologiczny i nie mają związku z telomerami. Dlatego terapia telomerazą wciąż nie może przynieść oczekiwanych efektów, dodatkowo może negatywnie wpływać na regulację cyklu komórkowego i powodować nowotworzenie. Wciąż prowadzonych jest wiele badań, które sprawdzają jak zahamować starzenie się i umożliwić długowieczność organizmów. Pomimo rozwoju wiedzy w ostatnich latach, jeszcze wiele czasu minie do wykorzystania jej w praktyce medycznej.

Słowa kluczowe: telomery, telomeraza, starzenie się komórek, stres, terapia przeciwstarzeniowa

Abstract: Telomeres are the end sequences of chromosomes that get shortened during each cell division. Some cells contain an enzyme called telomerase that makes these sequences longer. An interesting direction of research has become the possibility of preventing the shortening of terminal fragments of chromosomes by increasing the activity of telomerase in cells. Short telomeres are associated with aging of cells and the development of many diseases. In addition to natural replicative aging, cellular aging also occurs, which is influenced by factors such as chronic psychological stress and is unrelated to telomeres. Therefore, telomerase therapy still cannot bring the expected results, and may also negatively affect the regulation of the cell cycle and cause different kinds of cancer. There is still a lot of research being done on how to stop aging and enable organisms to live long. Despite the development of knowledge in recent years, it will still take a lot of time to use it in medical practice.

Keywords: telomere, telomerase, aging, stress, anti-aging therapy

1. Wprowadzenie

Przewlekły stres jest jedną z przyczyn szybkiego starzenia się organizmu i rozwoju chorób¹. Dzieje się to poprzez mechanizmy molekularne zachodzące w komórkach, prowadzące do skracania się telomerów występujących na końcach chromosomów, z jednoczesnym zahamowaniem działania telomerazy, która umożliwia ich wydłużanie². Telomery chronią genom, zabezpieczając przed ścieraniem się odcinków kodujących³. Im krótsze telomery, tym mniej stabilny jest genom. Starzenie się komórek oznacza zatrzymanie ich wzrostu i zmiany w ich funkcjonowaniu⁴. Przyczyną chorób wieku starczego mogą być starzejące się komórki układu immunologicznego, co prowadzi do jego nieprawidłowego funkcjonowania i braku odpowiedniej obrony organizmu². Wraz z wiekiem starzejące komórki kumulują się w tkankach, prowadząc do niewydolności narządów zbudowanych z tych tkanek. Największy ubytek telomerów następuje podczas okresu najszybszego wzrostu organizmu kiedy to proliferacja komórek i wydatek energetyczny są wysokie. Sposób, w jaki zmiany w komórce wpływają na rozwój choroby nie został nadal do końca poznany, dlatego temat ten wciąż wymaga wielu badań⁴. Wykazano, że krótkotrwały stres występujący u badanego miesiąc przed zmierzeniem długości telomerów nie ma takiego wpływu na ich długość⁵.

Telomeraza nie jest aktywna we wszystkich komórkach organizmu. Tylko nieliczne z nich mogą posiadać odpowiednią długość telomerów przez całe życie, są to komórki macierzyste, gamety i komórki nowotworowe². Te komórki mogą się dzielić wielokrotnie, bez utraty stabilności genomu. Proponuje się wykorzystanie telomerazy, która ma zdolność wydłużania telomerów, w terapii przeciwstarzeniowej⁶, dzięki której wszystkie komórki organizmu nie będą starzeć się z powodu wielokrotnych podziałów. Jednak zahamowanie działania telomerazy i zaprzestanie wydłużania telomerów jest ważnym aspektem w terapii nowotworowej, które umożliwia ograniczenie potencjału replikacji komórek nowotworowych⁶. Wyłania się tu konflikt interesów, który wciąż pozostaje nierozwiązany.

Zaburzenia biologii telomerów, takie jak dyskeratoza wrodzona, niedokrwistość Fanconiego, zespół Shwachmana-Diamonda, niedokrwistość Diamonda-Blackfana i wrodzona małopłytkowość amegakariocytowa są spowodowane mutacjami, które zakłócają normalne utrzymywanie telomerów, chroniące komórki jądrzaste przed utratą lub uzyskaniem materiału genetycznego⁷.

Celem niniejszego rozdziału jest przybliżenie mechanizmów komórkowych wpływających na proces starzenia się oraz podsumowanie najnowszych informacji dotyczących terapii antystarzeniowej. Bliżej przyjrzymy się także czynnikom wynikającym z przewlekłego stresu, czyli glikokortykosteroidom, takim jak kortyzol, stresowi oksydacyjnemu oraz stanom zapalnym. Przybliżymy również mechanizmy działania telomerazy, które mogą w przyszłości być wykorzystane w prewencji chorób wynikających z wieku starczego.

2. Telomery

2.1 Struktura i funkcja telomerów

Telomery to nukleoproteinowe struktury znajdujące się na końcach każdego ramienia chromosomu⁸. U wszystkich ssaków składają się z krótkich tandemowych powtórzeń DNA (TTAGGG), o wysoce konserwatywnej strukturze⁸ oraz z kompleksu białkowego nazywanego shelterin^{1,9} (ryc.1). Struktury te stabilizują genom oraz umożliwiają odróżnienie naturalnych końców chromosomów od pęknięć dwuniciowego DNA (dsDNA). Dzięki czemu nie dochodzi do fuzji sekwencji telomerycznych⁴.

Telomerowe DNA składa się z fragmentu dwuniciowego DNA (dsDNA) oraz znacznie krótszego, bogatego w guaninę fragmentu pojedynczej nici DNA (ssDNA), zwanego nicią-G⁸. Fragment pojedynczej nici zamyka się w strukturze swoistej pętli (t-loop), tworząc dsDNA¹⁰. Utworzenie takiej struktury umożliwia ochronę końców chromosomów, poprzez uniemożliwienie dostępu niepożądanym czynnikom¹⁰. Powtarzalne sekwencje telomerowe zawarte w dsDNA i ssDNA wiążą kompleks białek ochronnych, czyli kompleks shelterin, który stabilizuje strukturę telomerów, chroni przed aktywacją niepożądanych szlaków naprawczych i reguluje dostępność telomerazy, poprzez wiązanie się z rozpoznanymi sekwencjami telomerów¹⁰⁻¹². W skład kompleksu shelterin wchodzi następujące białka: TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, TPP1 oraz POT1. Białka przytwierdzają się do nici DNA w parach^{10,13}, do dsDNA poprzez białko TRF1 lub TRF2 (ryc.1), natomiast do nici pojedynczej poprzez białko POT1¹⁰. Brak składowych kompleksu, w szczególności białek TRF2 i POT1 uruchamia niepożądane szlaki naprawcze materiału genetycznego^{14,15}. Do nici DNA może przyłączyć się enzym telomeraza. Jest to możliwe wyłącznie, gdy struktura telomerów oraz białek ochronnych jest rozluźniona i występuje w postaci „otwartej”. Gdy ich struktura ulega zwarciu,

nukleotydy deoksyrybonukleinowe¹⁰. Enzymem łączącym powstałe fragmenty z resztą nici jest ligaza¹⁰. Polimeraza DNA nie ma możliwości dołączenia się do nici opóźnionej w sposób, który umożliwiłby uzupełnienie odcinka po wyciętym starterze. Jest to spowodowane „problemem replikacji końca”^{10,12}. Jedna z nici DNA, która jest dobudowywana w sposób wiodący, ulega skróceniu. Dzieje się tak, ponieważ fragment RNA, starter, dzięki któremu możliwe było rozpoczęcie procesu, zostaje usunięty, a polimeraza DNA nie jest zdolna do uzupełnienia tego fragmentu nukleotydami deoksyrybonukleinowymi¹⁷. Enzym dobudowuje kolejne nukleotydy wyłącznie w kierunku od 5' do 3'¹⁶. Druga nić matrycowego DNA jest replikowana poprzez dobudowywanie fragmentów Okazaki, które po wycięciu starterów przez nukleazę, łączą się przy pomocy ligazy w ciągłą nić. Nie występuje tutaj „problem replikacji końca”¹⁰. Na etapie terminacji replikacji, telomeraza dołącza się do końcowego fragmentu ssDNA, na końcu 3', a następnie przyłącza kolejne nukleotydy komplementarne do jej matrycy. Przyłączenie enzymu do końców chromosomów jest możliwe wyłącznie gdy nić DNA i białka pomocnicze są w odpowiedniej konformacji¹⁰. Druga nić jest wydłużana za pomocą polimerazy DNA, która dołącza nukleotydy komplementarne do dłuższej nici¹⁶. Jednak jedna z nici, nić-G, zawsze pozostaje nieco dłuższa z powodu niemożności samodzielnego działania polimerazy DNA¹⁶. Po zakończonym procesie nić-G tworzy zabezpieczającą strukturę t-loop¹⁰.

3. Telomeraza

Telomeraza to specyficzna polimeraza DNA. Jest kompleksem rybonukleoproteinowym (RNP), którego rdzeń obejmuje odwrotną transkryptazę telomerazy (TERT) i RNA telomerazy (TER), zawierające miejsce matrycowe do wydłużania DNA^{16,18}. Kompleks telomerazy zawiera również szereg składników pomocniczych, które zapewniają jej funkcjonowanie, np. umożliwiają wiązanie enzymu z telomerami, lub regulują aktywność enzymu^{16,19}. Nawet najmniejsze wahania aktywności telomerazy mogą prowadzić do choroby¹⁸.

Główną funkcją tego wyspecjalizowanego enzymu jest wydłużanie telomerów¹, poprzez dodanie bogatych w guaninę sekwencji powtarzalnych¹⁶. Enzym wydłuża koniec 3' chromosomu, natomiast nić komplementarna jest uzupełniana przez polimerazy DNA¹⁶. Telomery zostają skrócone podczas każdego podziału komórkowego. Aktywność telomerazy nie występuje we wszystkich komórkach organizmu, co jest przyczyną ich skracania i w konsekwencji, starzenia się oraz apoptozy. Aktywność telomerazy jest widoczna w

gametach, komórkach macierzystych i nowotworowych¹⁶ oraz w limfocytach T i B na niektórych etapach ich rozwoju².

Mechanizm działania oraz struktura telomerazy jest uznawana za kluczowy determinant długowieczności, a poprzez wzrost aktywności enzymu przyczynia się do nieśmiertelności komórek nowotworowych i napędza ich proliferację^{11,13}. Spadek aktywności telomerazy przyczynia się do nieprawidłowego różnicowania komórek macierzystych i wywołuje choroby, takie jak wrodzona dyskeratoza, niedokrwistość aplastyczna oraz zwłóknienie płuc^{11,13}.

4. Długość telomerów

W poszczególnych tkankach obserwuje się różną długość telomerów. Najczęściej jest mierzona w komórkach układu odpornościowego, ponieważ są one łatwo pozyskiwane z krwi. Dodatkowo komórki te krążą po całym organizmie, przez co są narażone zarówno na szkodliwe działanie czynników wewnętrznych jak i zewnętrznych. Dzięki temu mogą być wykorzystane w szerokich badaniach, dostarczając rozległe informacje na temat szybkości skracania telomerów pod wpływem różnych czynników, a czas oczekiwania na wyniki badań jest stosunkowo krótki¹.

Długość początkowa, oraz szybkość skracania telomerów różni się między limfocytami T CD4+, TCD8+ i B. Te ostatnie charakteryzują się najdłuższymi fragmentami oraz najwolniejszym ich skracaniem, co jest powiązane z największą aktywnością telomerazy^{1,2,21}. Długość telomerów mierzona we krwi krążącej jest skumulowanym odczytem zarówno składu, jak i historii replikacji wszystkich typów komórek¹. Dotychczas prowadzone badania skupiały się na pomiarze telomerów w całkowitych leukocytach lub komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej¹, co nie pozwala na wnioskowanie czy i w jaki sposób zróżnicowane profile telomerów i starzejących się poszczególnych typów komórek mogą być powiązane z określonymi chorobami lub ryzykiem^{1,21}.

Brakuje bezpośrednich dowodów na powiązanie odpowiedniej długości telomerów i aktywności telomerazy, a prawidłowym funkcjonowaniem układu immunologicznego. Jednak kilka badań potwierdza, że nieprawidłowa długość końców chromosomów może mieć wpływ na wystąpienie choroby, przez zmniejszenie odporności organizmu². Powiązano długość telomerów komórek odpornościowych z kilkoma zaburzeniami fizycznymi i psychicznymi oraz ze stanami związanymi ze stresem²².

5. Wpływ długości telomerów na rozwinięcie choroby

Kluczowe badanie, które pozwoliło na rozwój informacji na temat powiązania długości telomerów, a zachorowalnością i śmiertelnością ludzi, to badanie Richarda Cawthona et al. opublikowane w 2003 r.²³. Zmierzono długość telomerów w komórkach krwi u 143 niespokrewnionych osób w wieku powyżej 60 lat. Okazało się, że u osób z krótszymi telomerami częściej pojawiały się choroby związane z wiekiem, co wpływało na wyższą śmiertelność²³. Ryzyko nadmiernej śmiertelności nie wiązało się z płcią, wiekiem podczas pobierania próbki, ani czasem, jaki upłynął od pobrania próbki^{1,23}. Następne badania pozwoliły na kolejne metaanalizy i stworzenie listy chorób, które najczęściej powiązane były ze skróconymi telomerami. Są to głównie choroby sercowo-naczyniowe, cukrzyca i zespół metaboliczny, POChP i idiopatyczne zwłóknienie płuc, zakażenie, zaburzenia psychiczne, choroby autoimmunologiczne oraz niektóre rodzaje nowotworów^{1,24-27,33}. Z drugiej strony, skrócenie telomerów może nie wpływać na śmiertelność, ale może być kontrolowane przez proces starzenia się, który zwiększa śmiertelność przez inne mechanizmy¹⁶.

6. Zespoły krótkich telomerów

Zespoły telomerowe charakteryzują się różnorodnymi objawami klinicznymi. Badania przeprowadzane już w latach 90 XX wieku, pozwoliły znaleźć wspólną ich cechę - skrócone telomery²⁸. Najczęściej powodem jest nieprawidłowe działanie telomerazy, spowodowane brakiem elementu składowego enzymu. Niemożliwe jest przedłużanie telomerów po każdej replikacji, dlatego ich skrócenie obserwuje się także w komórkach zarodkowych. Objawy nie zawsze są widoczne we wszystkich tkankach, których dotyczy defekt. Zazwyczaj uwidacznia się w jednej z nich, natomiast w pozostałych występują jedynie objawy subkliniczne. Na przykład pacjenci z idiopatyczną chorobą płuc (ang. *Idiopathic pulmonary fibrosis, IPF*), którzy mają zmutowane geny telomerazy, są narażeni na zwiększone ryzyko rozwoju niewydolności szpiku kostnego. Natomiast, osoby z niedokrwistością aplastyczną związaną z telomerami mają zwiększoną częstość występowania śmiertelnego zwłóknienia płuc, gdy są narażone na działanie leków toksycznych dla płuc podczas przeszczepu szpiku kostnego, nawet jeśli wcześniej nie miały żadnych objawów²⁸.

Według badań zespoły telomerowe powodują zwiększone ryzyko wystąpienia nowotworów, mimo, że wiele badań pokazuje chroniącą funkcję krótkich telomerów przed nowotworzeniem. Jest kilka możliwych ścieżek,

poprzez które krótkie telomery mogą promować nowotwory. Pierwsza z nich to dysfunkcja układu immunologicznego, który nie może kontrolować tkanek i zapobiegać niekontrolowanym podziałom. Innym powodem jest ogólna niewydolność tkanki i w konsekwencji rozwój nowotworu ²⁸.

Udowodniono dziedziczność długości telomerów, głównie w linii ojcowskiej, przy czym odziedziczalność wynosi od 0,36 do 0,84 ²⁹. Oznacza to, że zespoły telomerowe są dziedziczne ²⁸, a razem z nimi predyspozycje do zachorowalności na choroby, głównie na idiopatyczną chorobę płuc ³⁰, dyskeratozę ³¹ i niedokrwistość aplastyczną ³².

7. Wpływ stresu na skracanie telomerów

Wiele badań pokazuje, że przewlekły stres wpływa na skrócenie telomerów u wielu gatunków. Nie poznano jeszcze kompleksowego modelu, tłumaczącego w jaki sposób zachodzi ten proces, jednak literatura często mówi o zmianach w aktywności telomerazy spowodowanych stresem oksydacyjnym ¹. Stres wpływa na długość życia i zdrowie również na poziomie międzypokoleniowym. Narażenie na stres w okresie płodowym przyczynia się do skracania telomerów u płodu. Dziedziczone krótkie telomery prowadzą do zespołów telomerowych i w konsekwencji do chorób i wczesnego starzenia się.

Stres psychologiczny przyczynia się do fizjologicznych zmian neuroendokrynych, autonomicznych, komórkowych i molekularnych ¹. Proces ten łączy wiele szlaków, które mogą na siebie wpływać, tworząc sprzężone pętle dodatnie ¹. Szczególną rolę odgrywają mediatory stresu- glukokortykoidy (GC), reaktywne formy tlenu (ROS) z osłabieniem obrony antyoksydacyjnej i stanem zapalnym ¹.

Oprócz wymienionych mediatorów przyczyną skracania telomerów mogą być błędy replikacji tj. stres replikacyjny. Nie wykazano jednak wpływu przewlekłego stresu psychologicznego na te błędy. Są na niego głównie narażone komórki o wysokiej proliferacji ¹ Przewlekły stres prowadzi nie tylko do starzenia się komórek, ale jest również przyczyną wielu zaburzeń psychicznych oraz fizycznych.

Różnorodne badania, których przeglądu dokonali Epel i Prather et al., przeprowadzone na zwierzętach różnych gatunków, w tym na ludziach, wykazują wpływ stresu na szybsze skracanie telomerów ¹. Połączono występowanie wielu zaburzeń psychicznych z większą częstotliwością występowania innych zaburzeń medycznych. Przedstawiono stres jako biologiczny korelat

wielu zaburzeń psychicznych, prowadzący do skracania telomerów, które są markerami starzenia się^{33,34}.

7.1 Wpływ glikokortykosteroidów

Wyrzut glikokortykosteroidów, takich jak kortyzol, jest spowodowany aktywacją osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (oś HPA)³⁵. Oś HPA obejmuje interakcje zwrotne między podwzgórzem, przysadką mózgową i nadnerczami, które są odpowiedzialne za wydzielanie kortyzolu, końcowego produktu osi HPA³⁶. Zwiększony poziom kortyzolu, który obserwuje się przy przewlekłym stresie, jest powiązany z występowaniem krótszych telomerów³⁷. Podstawowy poziom kortyzolu nie wpływa na ich długość³⁶.

Sideridis et al. w swoim badaniu udowodnili, że wysoki poziom kortyzolu wpływa na skracanie się telomerów³⁷. Zespół brał pod uwagę stężenie kortyzolu mierzone we włosach 92 kobiet w ciąży i długość telomerów w komórkach dziecka płci żeńskiej, pobranych z krwi pępowinowej^{1,38}.

Winkler et al. przeprowadzili badania eksperymentalne na ptakach, które potwierdziły zależność zwiększonej ilości uwalnianego kortyzolu z szybszym skracaniem telomerów¹.

Wystawiono pisklęta dzikiej jaskółki drzewnej na egzogenną dawkę kortykosteronu raz dziennie przez 5 dni, a następnie zmierzono ich morfologię, poziom wyjściowy i wywołany stresem poziom kortykosteronu oraz długość telomerów. Dodatkowo dowiedziono, że wysoki poziom kortykosteronu, obecny w jaju może stymulować aktywność telomerazy i zapobiegać skracaniu telomerów po wykluciu³⁹.

Dzieje się tak, ponieważ glukokortykoidy powodują zwiększenie metabolizmu komórki i wzrost aktywności mitochondriów, co powoduje nadprodukcję reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species, ROS*)^{1,40}. Zwiększają ekspresję genów prozapalnych i hamują przeciwzapalnych⁴¹. Prawdopodobna jest też regulacja kompleksu shelterin, białek wchodzących w skład telomerazy, na poziomie transkrypcyjnym^{1,42}. Wciąż potrzeba więcej badań, aby dokładnie poznać mechanizmy działania tych interakcji¹.

7.2 Wpływ stresu oksydacyjnego wywołanego reaktywnymi formami tlenu produkowanymi przez mitochondria

W komórkach narażonych na stres oksydacyjny następuje uszkodzenie materiału genetycznego. Dochodzi do pęknięć nici DNA lub modyfikacji

nukleotydów⁴³. Telomery narażonych komórek skracają się 5-krotnie szybciej⁴³. Tempo utraty końcowych fragmentów chromosomów zależy jednak również od zdolności antyoksydacyjnych komórki⁴⁴. Dużo mniej podatne na stres oksydacyjny są komórki o dużych właściwościach antyoksydacyjnych⁴³.

ROS są przyczyną stresu oksydacyjnego, który negatywnie wpływa na funkcjonowanie komórek. Oddziałuje na szlaki endokrynne, immunologiczne i metaboliczne⁴⁵. Większość badań przeprowadzonych w populacjach ludzkich potwierdza negatywną korelację między ROS i telomerami¹. Szybkość skracania telomerów zależy od stężenia tlenu^{1,46}. Zaobserwowano większy wpływ na te końcowe odcinki chromosomów, w porównaniu z innymi sekwencjami DNA. Sekwencje DNA bogate w guaninę są bardziej wrażliwe na ROS⁴⁷. ROS indukują również pęknięcia pojedynczych nici w telomerach lub jako produkty pośrednie w naprawie uszkodzeń, prowadząc do zapadania się widełek replikacyjnych i utraty telomerów¹. Budowa telomerów, a dokładniej obecność kompleksu shelterin, która zapobiega rozpoznawaniu telomerów jako uszkodzeń DNA, jest przyczyną niewłaściwej reakcji na uszkodzenia w ich obrębie, spowodowane m.in. przez ROS^{1,47}. Zdecydowanie przeważające są negatywne działania reaktywnych form tlenu, jednak możliwe jest, że dzięki nim telomery mogą być silniej wydłużane^{12,48,49}, ponieważ utlenione telomery są łatwiej dostępne dla działania telomerazy¹. ROS są generowane egzogennie i endogennie. Głównie produkowane przez komórki układu odpornościowego w odpowiedzi na stan zapalny, oraz podczas metabolizmu tlenu w mitochondriach¹.

Krótkie telomery i dysfunkcje mitochondriów są ze sobą ściśle związane. Napędzają się wzajemnie. Skrócone lub uszkodzone telomery powodują zaburzenia biosyntezy mitochondriów, przez hamowanie promotorów regulujących procesy zachodzące w mitochondriach⁵⁰. Natomiast dysfunkcyjne działanie mitochondriów powoduje utratę telomerów, a dodatkowo nieprawidłowe działanie telomerazy, ponieważ aż 10-20% całkowitej komórkowej podjednostki białka telomerazy hTERT pochodzi z mitochondriów^{1,51}. Uszkodzenie mitochondriów jest nieuniknione, tak samo jak skracanie telomerów podczas replikacji. Przyczyną jest starzenie się komórek, które są podstawową jednostką struktury i funkcji organizmu, a mitochondria są motorem napędowym i centrum metabolicznym komórek. W związku z tym starzenie się komórek i dysfunkcja mitochondriów powoduje degenerację i dysfunkcję tkanki lub narządu, po której nastąpi somatyczne starzenie się na wielu szlakach⁵². Białko mitochondrialnej telomerazy może chronić komórki przed uszkodzeniem ROS poprzez wiązanie się z mitochondrialnym DNA

(mtDNA) oraz mitochondrialnym tRNA⁵³.

7.3. Wpływ reakcji zapalnych

Starzeniu się może towarzyszyć przewlekły stan zapalny. Przewlekła aktywacja makrofagów i limfocytów T powoduje wzrost cytokin prozapalnych np. IL-6, IL-1 β , TNF α ⁵⁴. Badania przeprowadzone na ludziach w różnych kohortach udowodniły, że występowanie przewlekłego stanu zapalnego z podwyższonym mianem cytokin prozapalnych wiąże się z krótkimi telomerami⁵⁵. W jednym z badań osoby z wysokim, skumulowanym obciążeniem zapalnym, u których zanotowano wysoki poziom IL-6 i TNF α , miały zwiększone prawdopodobieństwo wystąpienia zespołu krótkich telomerów⁵⁶. Inne badanie pokazało, że u osób z najdłuższymi telomerami występuje najniższe stężenie IL-6 i białko C-reaktywne (ang. *c-reactive protein*, CRP)⁵⁷. Kolejne badanie potwierdziło, że występowanie krótkich telomerów wiąże się z wysokim poziomem CRP, ale u mężczyzn bez chorób psychicznych, takich jak depresja⁵⁸. Sama depresja może generować stan zapalny lub wynikać z niego, przez co nie można wskazać jednoznacznego związku między długością telomerów i poziomem CRP u osób na nią chorych¹.

Stan zapalny i dysfunkcja telomerów współdziałają ze sobą, przyczyniając się do ryzyka i progresji choroby¹. Zostało przedstawionych kilka mechanizmów komórkowych wyjaśniających to powiązanie. Przewlekły stan zapalny obecny np. przy wirusowym zapaleniu wątroby typu B i C⁵⁹ powoduje aktywację immunologiczną i ekspansję klonalną¹, więc również przyspieszoną proliferację i szybsze skracanie telomerów. Endogenne ligandy także mogą wywołać reakcję zapalną, podczas której uwalniane są czynniki prozapalne, wpływające na skracanie telomerów. Zakażenie bez udziału czynników egzogennych nazywamy jałowym, nasila się ono wraz z wiekiem i jest związane z chorobami wieku starczego¹.

Chen et al. badali myszy, którym usunięto geny telomerazy TERT¹, oznaczono u nich podwyższony poziom cytokin prozapalnych⁶⁰. Sugeruje to, że reakcja zapalna wpływa na długość telomerów, ale jest to działanie dwukierunkowe, więc skracanie telomerów, również ma wpływ na zwiększenie wydzielania czynników prozapalnych.

Warto zauważyć więc, że pewne biochemiczne szlaki wspólne dla starzenia się, reakcji na stres i ścierania się telomerów, dlatego końce chromosomów są bardzo czułymi markerami stresu i wiarygodnymi wskaźnikami starzenia się komórek⁶¹.

8. Wpływ innych czynników na skracanie się telomerów

8.1. Wpływ diety

Na proces starzenia się, poprzez skracanie się telomerów ma również wpływ styl życia, szczególnie dieta. Próbuje się dobrać składniki pokarmowe w taki sposób, aby dieta miała właściwości przeciwstarzeniowe⁶². Istnieje związek między stresem oksydacyjnym a ścieraniem się telomerów. Prawdopodobne jest, że spożywanie pokarmów bogatych w przeciwutleniacze, szczególnie roślin jadalnych bogatych w karotenoidy, może przynieść ważne korzyści zdrowotne, pomagając przeciwdziałać skracaniu się telomerów⁶².

Lee et al. przeprowadzili badania w populacji Koreańczyków w średnim i starszym wieku⁶³. Zidentyfikowali dwa główne wzorce diety⁶². „Ostrożny” wzorec żywieniowy charakteryzował się wysokim spożyciem pełnych ziaren, roślin strączkowych, warzyw, owoców morza i wodorostów. „Zachodni” wzorec żywieniowy charakteryzował się wysokim spożyciem rafinowanego ziarna, czerwonego lub przetworzonego mięsa oraz słodzonych napojów gazowanych⁶². Ci, którzy od co najmniej 10 lat przestrzegali pierwszego wzorca, wykazywali dłuższe telomery⁶², natomiast u grupy przestrzegającej drugiego wzorca żywieniowego nie zaobserwowano powiązań diety z długością telomerów⁶².

Nasiona to produkty bogate w przeciwutleniacze. Przeprowadzono wiele badań sprawdzających, czy spożywanie pokarmów bogatych w przeciwutleniacze może pomóc w zachowaniu telomerów⁶². Wyniki badań były bardzo zróżnicowane. Tucker et al. wykonali badania wśród ponad 5500 kobiet i mężczyzn z kohorty National Health and Nutrition Examination Survey. Potwierdziły one pozytywne powiązanie między długością telomerów a spożyciem nasion i orzechów^{62,63}. Natomiast badania przeprowadzone w Chinach⁶⁴ i Iranie⁶⁵ w 2006 r. nie znajdują tego powiązania. Przyczyną tych zróżnicowanych wyników może być fakt, że duża część spożywanych pokarmów zbożowych zostaje poddana procesowi rafinacji, podczas którego tracone są przeciwutleniacze zawarte w zewnętrznej warstwie ziaren⁶².

8.2. Wpływ aktywności fizycznej

W ostatnich latach przeprowadzono wiele badań potwierdzających korzystny wpływ aktywności fizycznej na długość telomerów⁴³.

Werner et al. wykazali, że już trzy tygodnie ćwiczeń wpływały na zwiększenie aktywności telomerazy w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (ang. *peripheral blood mononuclear cells*, PMBC) i aorcie piersiowej, w porównaniu z próbą kontrolną osiadłych myszy⁶⁷. Ci sami badacze zmierzili aktywność telomerazy i długość telomerów u sportowców wytrzymałościowych w różnym wieku oraz u osób prowadzących siedzący tryb życia w różnym wieku⁴³. Aktywność telomerazy była zwiększona u sportowców w każdym wieku, natomiast zwiększoną długość telomerów zaobserwowano wyłącznie u starszych sportowców⁴³. Młodszy sportowcy charakteryzowali się tą samą długością telomerów co ich rówieśnicy prowadzący siedzący tryb życia.

Dimauro et al. zbadali wpływ aktywności fizycznej na długość telomerów u osób chorych na cukrzycę typu 2⁶⁸. Grupą kontrolną były osoby zdrowe, uprawiające sport. W obu grupach wysiłek fizyczny miał korzystny wpływ na długość telomerów w PMBC⁴³.

8.3. Wpływ chorób sercowo-naczyniowych

W ostatnich latach zostało przeprowadzonych wiele badań, które potwierdziły związek występowania miażdżycy i choroby niedokrwiennej serca (ChNS) z długością telomerów⁶⁹. Brouillette et al. udowodnili, że średnia długość telomerów u pacjentów z ChNS jest równoważna z długością telomerów u 11 lat starszych zdrowych osobników⁷⁰. ChNS jest przyczyną biologicznego starzenia się ścian naczyń krwionośnych⁶⁹.

Choroby sercowo-naczyniowe są częściowo dziedziczone przez krótkie telomery⁷¹, dlatego prawdopodobnie długość telomerów jest pierwotną przyczyną miażdżycy⁶⁹.

8.4. Wpływ cukrzycy typu 2

Powiązano występowanie cukrzycy typu 2 z krótkimi telomerami, jednak na podstawie dotychczas wykonanych badań, niemożliwe jest ocenienie czy jest to przyczyna czy skutek choroby⁶⁹. Długość telomerów jest użytecznym markerem, związanym z progresją cukrzycy typu 2. Badanie Adaikalakoteswari et al. przedstawia zależność między długością telomerów a stadium choroby⁷². U pacjentów z upośledzoną tolerancją glukozy telomery były krótsze niż u zdrowych pacjentów, natomiast u osób ze zdiagnozowaną cukrzycą typu 2 były jeszcze krótsze⁷².

8.4. Wpływ współistnienia choroby sercowo-naczyniowej i cukrzycy typu 2

Współistnienie wymienionych chorób wpływa na zwiększone skracanie się telomerów⁶⁹. Oliviri et al. wykazali, że pacjenci ze zdiagnozowaną cukrzycą typu 2 po przebytych zawałach mięśnia sercowego mieli krótsze telomery niż chorzy na cukrzycę bez przebytego zawału⁷³. Sugeruje to, że skrócona długość telomerów, spowodowana przez wspólne czynniki ryzyka chorób sercowo-naczyniowych i cukrzycy oraz odziedziczone krótkie telomery, prawdopodobnie odzwierciedla szybsze starzenie się tkanek i większą częstość występowania starzejących się fenotypów w różnych tkankach, w tym w ścianie naczyń i wyspach trzustkowych⁶⁹.

9. Starzenie komórkowe

Starzenie się komórki, to nieodwracalne zatrzymanie proliferacji, któremu towarzyszą zmiany w funkcjonowaniu komórki. Dochodzi do zatrzymania wzrostu ze względu na represję genów potrzebnych do przejścia komórki przez cykl komórkowy oraz poprzez aktywację genów hamujących wzrost^{4,74}. Zmiany czynnościowe obejmują wydzielanie czynników takich jak enzymy, cytokiny prozapalne i czynniki wzrostu, które mogą zmieniać integralność, funkcję i homeostazę proliferacyjną tkanek⁴. Mechanizm zmian czynnościowych nie jest jeszcze dokładnie poznany, jednak wiadoma jest korelacja między zahamowaniem wzrostu i zmianami funkcjonalnymi⁴. Brak starzenia się komórek mógłby prowadzić do niekontrolowanych podziałów i przyczynić się do rozwoju nowotworów, dlatego przypuszcza się, że reakcja przeciwstarzeniowa u ssaków wyewoluowała, aby zapobiec nowotworzeniu⁴. Szybkość starzenia się komórki nie zależy od długości telomerów przy urodzeniu. U myszy laboratoryjnych, które charakteryzują dłuższe niż ludzkie telomery, starzeją się znacznie szybciej, przy mniejszej proliferacji i częściej aktywności telomerazy⁴. Przyczyną tego mogą być inne uszkodzenia, niezależne od telomerów, jak ekspozycja na wysokie stężenie tlenu w hodowli^{75,76}. Komórka starzeje się w obliczu różnych potencjalnie onkogennych uszkodzeń lub bodźców, takich jak dysfunkcyjne telomery, uszkodzenia DNA, zaburzenia w chromatynie oraz ekspresja pewnych onkogenów, takich jak zmutowane białko RAS⁴. Telomeraza może zapobiegać starzeniu się komórki, przez ciągłe wydłużanie telomerów, oznacza to, że zapobiega starzeniu replikatywnemu, a nie ma wpływu na starzenie komórkowe spowodowane innymi czynnikami. W starzeniu komórkowym istotną

rolę odgrywają białka supresorowe nowotworu p53 i pRb, ich inaktywacja zapobiega starzeniu się komórek ludzkich w odpowiedzi na uszkodzenia DNA, onkogenny RAS oraz wysoką proliferację⁷⁷⁻⁷⁹.

Starzenie replikacyjne jest przykładem ewolucyjnej plejotropii antagonisticznej⁴. Oznacza to, że wybrany na drodze ewolucji mechanizm skracania telomerów, który u młodych osobników chroni przed nowotworzeniem, u starszych jest przyczyną wielu dysfunkcji⁸⁰. W młodych tkankach zatrzymanie wzrostu komórki najprawdopodobniej nie przynosi szkodliwych efektów, dlatego ten mechanizm zabezpiecza tkanki w okresie młodości, a przyczynia się do wystąpienia chorób na starość gdy starzejące się komórki kumulują się w tkankach^{4,81}.

Pomimo iż skracanie telomerów jest mechanizmem zabezpieczającym przed powstaniem nowotworów, zakumulowane uszkodzone komórki tworzą mikrośrodowiska, które na starość mogą stymulować wzrost i rakotwórczą progresję fibroblastów⁸².

9.1 Telomeraza w terapii przeciwstarzeniowej

Dowody na istnienie związku między długością telomerów a starzeniem się i podatnością na różne choroby, skłaniają badaczy do ciągłego poszukiwania źródła młodości⁶. Telomeraza może być w przyszłości wykorzystywana do walki ze starzeniem się poprzez terapię komórkową i regenerację tkanek, jednak problemem może być fakt, że hamowanie tego enzymu pomaga w terapii antynowotworowej. Wyzwaniem zatem staje się zrozumienie dokładnych mechanizmów, które regulują potencjalne korzyści z hamowania i aktywacji telomerazy⁶. Odnotowano ekspresję tego enzymu w wielu typach komórek, takich jak fibroblasty, keratynocytach skóry, komórkach satelitarnych mięśni, śródbłonku naczyń, osteoblastach, myometrium, nabłonek barwnikowy siatkówki, komórki nabłonka sutka, ludzkie komórki β , astrocyty i komórki progenitorowe pochodzące z ludzkiego rdzenia kręgowego płodu^{6,83-87}. W tej sytuacji nasuwa się pytanie, czy ta ekspresja pomoże przeciwdziałać starzeniu replikacyjnym komórki i czy będzie miała wpływ na leczenie chorób związanych z wiekiem. Ryzyko, jakie niesie terapia komórkowa, daje wiele obaw, ale wyjątkowo niepokojący jest fakt, że może przyczynić się do wzrostu ryzyka wystąpienia nowotworów^{6,88}.

Przeprowadzonych zostało kilka wstępnych badań, sprawdzających możliwość wykorzystania telomerazy w terapii przeciwstarzeniowej, poprzez unieśmiertelnienie komórek różnych tkanek⁸⁹⁻⁹³. Badania wykonane przez

Shay i Wright polegały na unieśmiertelnieniu telomerazą komórek nabłonka rogowki i keratynocytów w celu potwierdzenia strategii wytwarzania zmodyfikowanych rogowek do przeszczepu⁸⁹. Telomerazę wykorzystano również do unieśmiertelnienia keratynocytów, melanocytów i fibroblastów, wykorzystane do stworzenia kultur organotypowych skóry, które można przeszczepić ksenoorzeczepem⁹⁰. Kolejne badanie pozwoliło dowiedzieć, że pomimo terapii komórkowej telomerazą, fibroblasty płuc zachowują zdolność do normalnego różnicowania^{6,91,92}. Inny model badań, stosowany przez Petera Hornsby'ego et al.⁶ bazuje na przywróceniu poziomu hormonów glukokortykoidowych u myszy z niedoborem odporności, którym przeszczepiono komórki kory nadnerczy⁹³. W próbie przeszczepienia komórek kontrolnych i unieśmiertelniczonych telomerazą nie zauważono różnic w poziomie wydzielania hormonów przez korę nadnerczy oraz w wielkości, histologii i tempie proliferacji komórek^{5,61}. Pozwala to na wnioskowanie, że zmodyfikowane komórki nie niosą w tym przypadku szkodliwych zmian w tkance.

10. Wnioski

Dowodzono, że przewlekły stres ma istotny wpływ na skracanie się telomerów, a w konsekwencji na starzenie się komórek i rozwój chorób. Istnieją badania potwierdzające, że telomeraza jest zdolna zapobiec procesowi starzenia się, przez ciągłe wydłużanie telomerów. Jednak na ten proces wpływ ma również wiele innych czynników, które nie są zależne od działania telomerazy. W pewnym stopniu skracanie telomerów również zapobiega chorobom, ponieważ krócej żyjąca komórka jest krócej narażona na szkodliwe czynniki⁶¹. Przedstawiono obawy związane z przeciwnym mechanizmem terapii przeciwstarzeniowej w porównaniu z terapią antynowotworową. Nadal pozostaje jednak wiele niewyjaśnionych kwestii na temat wiecznej młodości i nieśmiertelności. Potrzebne są kolejne badania na ten temat, które pozwolą zrozumieć mechanizmy działania telomerazy umożliwiające wykorzystanie jej w terapiach z jedynie pozytywnymi konsekwencjami.

Referencje

1. Lin, J., & Epel, E. (2022). Stress and telomere shortening: Insights from cellular mechanisms. *Ageing research reviews*, 73, 101507.
2. Hodes, R. J., Hathcock, K. S., & Weng, N. P. (2002). Telomeres in T and B cells. *Nature reviews immunology*, 2(9), 699-706

3. Giardini, M. A., Segatto, M., Da Silva, M. S., Nunes, V. S., & Cano, M. I. N. (2014). Telomere and telomerase biology. *Progress in molecular biology and translational science*, 125, 1-40.
4. Campisi, J., Kim, S. H., Lim, C. S., & Rubio, M. (2001). Cellular senescence, cancer and aging: the telomere connection. *Experimental gerontology*, 36(10), 1619-1637.
5. Mathur, M. B., Epel, E., Kind, S., Desai, M., Parks, C. G., Sandler, D. P., & Khazeni, N. (2016). Perceived stress and telomere length: A systematic review, meta-analysis, and methodologic considerations for advancing the field. *Brain, behavior, and immunity*, 54, 158-169.
6. Shawi, M., & Autexier, C. (2008). Telomerase, senescence and ageing. *Mechanisms of ageing and development*, 129(1-2), 3-10.
7. Olson, T. S., & Myers, K. C. Dyskeratosis congenita and other telomere biology disorders.
8. Turner, K. J., Vasu, V., & Griffin, D. K. (2019). Telomere biology and human phenotype. *Cells*, 8(1), 73.
9. Dhaene, K., Van Marck, E., & Parwaresch, R. (2000). Telomeres, telomerase and cancer: an up-date. *Virchows Archiv*, 437(1), 1-16.
10. Wysoczańska, B. (2013). Zachowanie długości telomerów. *Advances in Hygiene & Experimental Medicine/Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczałnej*, 67.
11. De Boeck, G., Forsyth, R. G., Praet, M., & Hogendoorn, P. C. (2009). Telomere-associated proteins: cross-talk between telomere maintenance and telomere-lengthening mechanisms. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 217(3), 327-344.
12. Palm, W., & de Lange, T. (2008). How shelterin protects mammalian telomeres. *Annual review of genetics*, 42, 301-334.
13. Baumann, P., & Cech, T. R. (2001). Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science*, 292(5519), 1171-1175.
14. Denchi, E. L. (2009). Give me a break: how telomeres suppress the DNA damage response. *DNA repair*, 8(9), 1118-1126.

15. Stewart, J. A., Chaiken, M. F., Wang, F., & Price, C. M. (2012). Maintaining the end: roles of telomere proteins in end-protection, telomere replication and length regulation. *Mutation research/ Fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*, 730(1-2), 12-19.
16. Zvereva, M. I., Shcherbakova, D. M., & Dontsova, O. A. (2010). Telomerase: structure, functions, and activity regulation. *Biochemistry (Moscow)*, 75(13), 1563-1583.
17. Christensen, K., & Hulick, P. J. Basic genetics concepts: Chromosomes and cell division.
18. Wang, Y., Sušac, L., & Feigon, J. (2019). Structural biology of telomerase. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 11(12), a032383.
19. Shcherbakova, DM, Zvereva, ME, Shpanchenko, OV i Dontsova, OA (2006) *Mol. Biol. (Moskwa)* , 40, 1-15
20. Bajaj, S., Kumar, M. S., Peters, G. J., & Mayur, Y. C. (2020). Targeting telomerase for its advent in cancer therapeutics. *Medicinal Research Reviews*, 40(5), 1871-1919.
21. Lin, J., Epel, E., Cheon, J., Kroenke, C., Sinclair, E., Bigos, M., ... & Blackburn, E. (2010). Analyses and comparisons of telomerase activity and telomere length in human T and B cells: insights for epidemiology of telomere maintenance. *Journal of immunological methods*, 352(1-2), 71-80.
22. de Punder, K., Heim, C., Wadhwa, P. D., & Entringer, S. (2019). Stress and immunosenescence: The role of telomerase. *Psychoneuroendocrinology*, 101, 87-100.
23. Cawthon, R. M., Smith, K. R., O'Brien, E., Sivatchenko, A., & Kerber, R. A. (2003). Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *The Lancet*, 361(9355), 393-395.
24. Cheng, F., Carroll, L., Joglekar, M. V., Januszewski, A. S., Wong, K. K., Hardikar, A. A., ... & Ma, R. C. (2021). Diabetes, metabolic disease, and telomere length. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 9(2), 117-126.

25. Habib, R., Ocklenburg, S., Hoffjan, S., Haghikia, A., Epplen, J. T., & Arning, L. (2020). Association between shorter leukocyte telomeres and multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 341, 577187.
26. Zeng, Z., Zhang, W., Qian, Y., Huang, H., Wu, D. J., He, Z., ... & Wen, C. (2020). Association of telomere length with risk of rheumatoid arthritis: a meta-analysis and Mendelian randomization. *Rheumatology*, 59(5), 940-947.
27. Noppert, G. A., Feinstein, L., Dowd, J. B., Stebbins, R. C., Zang, E., Needham, B. L., ... & Aiello, A. E. (2020). Pathogen burden and leukocyte telomere length in the United States. *Immunity & Ageing*, 17(1), 1-10.
28. Armanios, M., & Blackburn, E. H. (2012). The telomere syndromes. *Nature Reviews Genetics*, 13(10), 693-704.
29. Aviv, A. (2012). Genetics of leukocyte telomere length and its role in atherosclerosis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 730(1-2), 68-74.
30. Armanios, M. Y., Chen, J. J. L., Cogan, J. D., Alder, J. K., Ingersoll, R. G., Markin, C., ... & Loyd, J. E. (2007). Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *New England Journal of Medicine*, 356(13), 1317-1326.
31. Keller, R. B., Gagne, K. E., Usmani, G. N., Asdourian, G. K., Williams, D. A., Hofmann, I., & Agarwal, S. (2012). CTC1 Mutations in a patient with dyskeratosis congenita. *Pediatric blood & cancer*, 59(2), 311-314.
32. Yamaguchi, H., Baerlocher, G. M., Lansdorp, P. M., Chanock, S. J., Nunez, O., Sloand, E., & Young, N. S. (2003). Mutations of the human telomerase RNA gene (TERC) in aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. *Blood*, 102(3), 916-918.
33. Epel, E. S., & Prather, A. A. (2018). Stress, telomeres, and psychopathology: toward a deeper understanding of a triad of early aging. *Annual review of clinical psychology*, 14, 371.

34. Lindqvist, D., Epel, E. S., Mellon, S. H., Penninx, B. W., Révész, D., Verhoeven, J. E., ... & Wolkowitz, O. M. (2015). Psychiatric disorders and leukocyte telomere length: underlying mechanisms linking mental illness with cellular aging. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *55*, 333-364.
35. Munhoz, C. D., Sorrells, S. F., Caso, J. R., Scavone, C., & Sapolsky, R. M. (2010). Glucocorticoids exacerbate lipopolysaccharide-induced signaling in the frontal cortex and hippocampus in a dose-dependent manner. *Journal of Neuroscience*, *30*(41), 13690-13698.
36. Jiang, Y., Da, W., Qiao, S., Zhang, Q., Li, X., Ivey, G., & Zilioli, S. (2019). Basal cortisol, cortisol reactivity, and telomere length: A systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*, *103*, 163-172.
37. Vartak, S., Deshpande, A., & Barve, S. (2014). Reduction in the telomere length in human T-lymphocytes on exposure to cortisol. *Current Research in Medicine and Medical Sciences*, *4*(2), 20-25.
38. Enlow, M. B., Sideridis, G., Bollati, V., Hoxha, M., Hacker, M. R., & Wright, R. J. (2019). Maternal cortisol output in pregnancy and newborn telomere length: Evidence for sex-specific effects. *Psychoneuroendocrinology*, *102*, 225-235.
39. Noguera, J. C., da Silva, A., & Velando, A. (2020). Egg corticosterone can stimulate telomerase activity and promote longer telomeres during embryo development. *Molecular Ecology*.
40. Chatelain, M., Drobniak, S. M., & Szulkin, M. (2020). The association between stressors and telomeres in non-human vertebrates: a meta-analysis. *Ecology Letters*, *23*(2), 381-398.
41. Escoter-Torres, L., Caratti, G., Mechtidou, A., Tuckermann, J., Uhlenhaut, N. H., & Vettorazzi, S. (2019). Fighting the fire: mechanisms of inflammatory gene regulation by the glucocorticoid receptor. *Frontiers in immunology*, *10*, 1859.
42. Butler, K. S., Hines, W. C., Heaphy, C. M., & Griffith, J. K. (2012). Coordinate regulation between expression levels of telomere-binding proteins and telomere length in breast carcinomas. *Cancer medicine*, *1*(2), 165-175.

43. Saretzki, G. (2018). Telomeres, telomerase and ageing. *Biochemistry and Cell Biology of Ageing: Part I Biomedical Science*, 221-308.
44. Von Zglinicki, T., Serra, V., Lorenz, M., Saretzki, G., Lenzen-Großimlighaus, R., Geßner, R., ... & Steinhagen-Thiessen, E. (2000). Short telomeres in patients with vascular dementia: an indicator of low antioxidative capacity and a possible risk factor?. *Laboratory investigation*, 80(11), 1739-1747.
45. Black, C. N., Bot, M., Revesz, D., Scheffer, P. G., & Penninx, B. (2017). The association between three major physiological stress systems and oxidative DNA and lipid damage. *Psychoneuroendocrinology*, 80, 56-66.
46. Passos, J. F., Saretzki, G., Ahmed, S., Nelson, G., Richter, T., Peters, H., ... & Von Zglinicki, T. (2007). Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. *PLoS biology*, 5(5), e110.
47. Wang, Z., Rhee, D. B., Lu, J., Bohr, C. T., Zhou, F., Vallabhaneeni, H., ... & Liu, Y. (2010). Characterization of oxidative guanine damage and repair in mammalian telomeres. *PLoS genetics*, 6(5), e1000951.
48. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, et al. 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279:349–52
49. Opresko, P. L., Fan, J., Danzy, S., Wilson III, D. M., & Bohr, V. A. (2005). Oxidative damage in telomeric DNA disrupts recognition by TRF1 and TRF2. *Nucleic acids research*, 33(4), 1230-1239.
50. Passos, J. F., Nelson, G., Wang, C., Richter, T., Simillion, C., Proctor, C. J., ... & Von Zglinicki, T. (2010). Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Molecular systems biology*, 6(1), 347.
51. Gordon, D., Schmidtke, H. R., Beigl, M., & Zengen, G. V. (2010). *Proceedings of the 14th International Symposium on Wearable Computers*,

52. Zhu, Y., Liu, X., Ding, X., Wang, F., & Geng, X. (2019). Telomere and its role in the aging pathways: telomere shortening, cell senescence and mitochondria dysfunction. *Biogerontology*, 20(1), 1-16.
53. Haendeler, J., Dröse, S., Büchner, N., Jakob, S., Altschmied, J., Goy, C., ... & Dimmeler, S. (2009). Mitochondrial telomerase reverse transcriptase binds to and protects mitochondrial DNA and function from damage. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 29(6), 929-935.
54. Wikby, A., Nilsson, B. O., Forsey, R., Thompson, J., Strindhall, J., Löfgren, S., ... & Johansson, B. (2006). The immune risk phenotype is associated with IL-6 in the terminal decline stage: findings from the Swedish NONA immune longitudinal study of very late life functioning. *Mechanisms of ageing and development*, 127(8), 695-704.
55. Pusceddu, I., Herrmann, W., Kleber, M. E., Scharnagl, H., Hoffmann, M. M., Winklhofer-Roob, B. M., März, W., & Herrmann, M. (2020). Subclinical inflammation, telomere shortening, homocysteine, vitamin B6, and mortality: The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *European Journal of Nutrition*, 59(4), 1399–1411.
56. O'Donovan, A., Pantell, M. S., Puterman, E., Dhabhar, F. S., Blackburn, E. H., Yaffe, K., Cawthon, R. M., Opresko, P. L., Hsueh, W. C., Satterfield, S., Newman, A. B., Ayonayon, H. N., Rubin, S. M., Harris, T. B., Epel, E. S., & Health Aging and Body Composition Study (2011). Cumulative inflammatory load is associated with short leukocyte telomere length in the Health, Aging and Body Composition Study. *PloS one*, 6(5), e19687.
57. Schroeksnadel, K., Grammer, T. B., Boehm, B. O., März, W., & Fuchs, D. (2010). Total homocysteine in patients with angiographic coronary artery disease correlates with inflammation markers. *Thrombosis and haemostasis*, 103(5), 926–935
58. Shin, D., Shin, J., & Lee, K. W. (2019). Effects of inflammation and depression on telomere length in young adults in the United States. *Journal of Clinical Medicine*, 8(5), 711.

59. Bellon, M., & Nicot, C. (2017). Telomere dynamics in immune senescence and exhaustion triggered by chronic viral infection. *Viruses*, 9(10), 289.
60. Chen, R., Zhang, K., Chen, H., Zhao, X., Wang, J., Li, L., ... & Liu, J. P. (2015). Telomerase deficiency causes alveolar stem cell senescence-associated low-grade inflammation in lungs. *Journal of Biological Chemistry*, 290(52), 30813-30829.
61. Lulkiewicz, M., Bajsert, J., Kopczynski, P., Barczak, W., & Rubis, B. (2020). Telomere length: how the length makes a difference. *Molecular Biology Reports*, 47(9), 7181-7188.
62. Crous-Bou, M., Molinuevo, J. L., & Sala-Vila, A. (2019). Plant-Rich Dietary Patterns, Plant Foods and Nutrients, and Telomere Length. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*, 10(Suppl_4), S296-S303.
63. Lee, J. Y., Jun, N. R., Yoon, D., Shin, C., & Baik, I. (2015). Association between dietary patterns in the remote past and telomere length. *European journal of clinical nutrition*, 69(9), 1048-1052.
64. Tucker, L. A. (2017). Consumption of nuts and seeds and telomere length in 5,582 men and women of the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). *The journal of nutrition, health & aging*, 21(3), 233-240.
65. Chan, R., Woo, J., Suen, E., Leung, J., & Tang, N. (2010). Chinese tea consumption is associated with longer telomere length in elderly Chinese men. *British journal of nutrition*, 103(1), 107-113.
66. Karimi, B., Nabizadeh, R., Yunesian, M., Mehdipour, P., Rastkari, N., & Aghaie, A. (2018). Foods, dietary patterns and occupational class and leukocyte telomere length in the male population. *American Journal of Men's Health*, 12(2), 479-492.
67. Werner, C., Fürster, T., Widmann, T., Pöss, J., Roggia, C., Hanhoun, M., ... & Laufs, U. (2009). Physical exercise prevents cellular senescence in circulating leukocytes and in the vessel wall. *Circulation*, 120(24), 2438-2447.
68. Dimauro, I., Sgura, A., Pittaluga, M., Magi, F., Fantini, C., Mancinelli, R., ... & Caporossi, D. (2017). Regular exercise participation

- improves genomic stability in diabetic patients: an exploratory study to analyse telomere length and DNA damage. *Scientific reports*, 7(1), 1-12.
69. Salpea, K. D., & Humphries, S. E. (2010). Telomere length in atherosclerosis and diabetes. *Atherosclerosis*, 209(1), 35-38.
70. Brouillette, S., Singh, R. K., Thompson, J. R., Goodall, A. H., & Samani, N. J. (2003). White cell telomere length and risk of premature myocardial infarction. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 23(5), 842-846.
71. Salpea, K. D., Nicaud, V., Tiret, L., Talmud, P. J., & Humphries, S. E. (2008). The association of telomere length with paternal history of premature myocardial infarction in the European Atherosclerosis Research Study II. *Journal of Molecular Medicine*, 86(7), 815-824.
72. Adaikalakoteswari, A., Balasubramanyam, M., Ravikumar, R., Deepa, R., & Mohan, V. (2007). Association of telomere shortening with impaired glucose tolerance and diabetic macroangiopathy. *Atherosclerosis*, 195(1), 83-89.
73. Olivieri, F., Lorenzi, M., Antonicelli, R., Testa, R., Sirolla, C., Cardelli, M., ... & Procopio, A. (2009). Leukocyte telomere shortening in elderly Type2DM patients with previous myocardial infarction. *Atherosclerosis*, 206(2), 588-593.
74. Campisi, J. (2000). Cancer, aging and cellular senescence. *In vivo* (Athens, Greece), 14(1), 183-188.
75. Sherr, C. J., & DePinho, R. A. (2000). Cellular senescence: minireview mitotic clock or culture shock?. *Cell*, 102(4), 407-410.
76. Campisi, J. (2001). From cells to organisms: can we learn about aging from cells in culture?. *Experimental gerontology*, 36(4-6), 607-618.
77. Chen, Q. M., Bartholomew, J. C., Campisi, J., Acosta, M., Reagan, J. D., & Ames, B. N. (1998). Molecular analysis of H₂O₂-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication. *Biochemical Journal*, 332(1), 43-50.

78. Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D., & Lowe, S. W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 88(5), 593-602.
79. Shay, J. W., Pereira-Smith, O. M., & Wright, W. E. (1991). A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Experimental cell research*, 196(1), 33-39.
80. Kirkwood, T. B., & Austad, S. N. (2000). Why do we age?. *Nature*, 408(6809), 233-238.
81. Paradis, V., Youssef, N., Dargère, D., Bâ, N., Bonvoust, F., Deschatrette, J., & Bedossa, P. (2001). Replicative senescence in normal liver, chronic hepatitis C, and hepatocellular carcinomas. *Human pathology*, 32(3), 327-332.
82. Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P. Y., & Campisi, J. (2001). Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(21), 12072-12077.
83. Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C. P., Morin, G. B., ... & Wright, W. E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *science*, 279(5349), 349-352.
84. Roy, N. S., Cleren, C., Singh, S. K., Yang, L., Beal, M. F., & Goldman, S. A. (2006). Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. *Nature medicine*, 12(11), 1259-1268.
85. Moon, I. K., & Jarstfer, M. B. (2007). The human telomere and its relationship to human disease, therapy, and tissue engineering. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 12(7), 4595-4620.
86. Narushima, M., Kobayashi, N., Okitsu, T., Tanaka, Y., Li, S. A., Chen, Y., ... & Yoon, J. W. (2005). A human β -cell line for transplantation therapy to control type 1 diabetes. *Nature biotechnology*, 23(10), 1274-1282.

87. Huang, Q., Chen, M., Liang, S., Acha, V., Liu, D., Yuan, F., ... & Hornsby, P. J. (2007). Improving cell therapy—experiments using transplanted telomerase-immortalized cells in immunodeficient mice. *Mechanisms of ageing and development*, 128(1), 25-30.
88. Robertson, D. M., Li, L., Fisher, S., Pearce, V. P., Shay, J. W., Wright, W. E., ... & Jester, J. V. (2005). Characterization of growth and differentiation in a telomerase-immortalized human corneal epithelial cell line. *Investigative ophthalmology & visual science*, 46(2), 470-478.
89. Vaughan, M. B., Ramirez, R. D., Brown, S. A., Yang, J. C., Wright, W. E., & Shay, J. W. (2004). A reproducible laser-wounded skin equivalent model to study the effects of aging in vitro. *Rejuvenation Research*, 7(2), 99-110.
90. Shay, J. W., & Wright, W. E. (2005). Use of telomerase to create bioengineered tissues. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1057(1), 479-491.
91. Vaughan, M. B., Ramirez, R. D., Wright, W. E., Minna, J. D., & Shay, J. W. (2006). A three-dimensional model of differentiation of immortalized human bronchial epithelial cells. *Differentiation*, 74(4), 141-148.
92. Thomas, M., Northrup, S. R., & Hornsby, P. J. (1997). Adrenocortical tissue formed by transplantation of normal clones of bovine adrenocortical cells in scid mice replaces the essential functions of the animals' adrenal glands. *Nature medicine*, 3(9), 978-983.
93. Thomas, M., Yang, L., & Hornsby, P. J. (2000). Formation of functional tissue from transplanted adrenocortical cells expressing telomerase reverse transcriptase. *Nature biotechnology*, 18(1), 39-42.

CRISPR-CAS9: PRZEGLĄD BADAŃ KLINICZNYCH NOWEJ METODY TERAPII GENOWEJ

Łukasz Czogalik, Magdalena Stencel, Natalia Denisiewicz, Michał Janik, Michał Bielówka, Jakub Kufel

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

Abstrakt: Obecnie wiele chorób doczekało się alternatywnych rozwiązań terapeutycznych. Medycyna spersonalizowana, terapia genowa oraz edycja genów stanowią przyszłość jako precyzyjne i dopasowane metody lecznicze. CRISPR (ang. Clustered Regularly-Interspaced Short Palindromic Repeats) oraz endonukleaza Cas9 (ang. CRISPR associated protein 9) to nowe narzędzie służące do edycji genomu. Dzięki wysokiej wydajności i specyficzności działania oraz względnej prostocie użytkowania system ten zrewolucjonizował genomikę w warunkach eksperymentalnych, a coraz częściej stanowi motyw przewodni interwencyjnych badań klinicznych. Interwencję na organizmie ludzkim można przeprowadzić na komórkach somatycznych (w celu zaprowadzenia zmian u jednego pacjenta), lub na komórkach linii zarodkowej (wtedy modyfikacje w genomie stają się dziedziczne). CRISPR/Cas9 jest więc potężnym narzędziem mogącym eliminować choroby genetyczne lub zmieniać cechy fenotypowe. Obecne rozwiązania ograniczają się jednak w większości do modyfikacji somatycznych komórek *ex-vivo*. Niniejszy rozdział ma na celu przybliżyć pochodzenie systemu CRISPR/Cas9, jego krótką historię, omówić działanie i nakreślić perspektywy możliwych zastosowań. Omówimy również aktualną użyteczność terapeutyczną w leczeniu nowotworów, chorób układu krwiotwórczego oraz infekcji wirusowych, na przykładzie badań klinicznych zarejestrowanych w bazie clinicaltrials.com.

Słowa kluczowe: CRISPR/Cas9, terapia genowa, badania kliniczne, opracowywanie leków

Abstract: At present, many diseases have lived to see alternative therapeutic solutions. Personalized medicine, gene therapy and gene editing hold the future as precise and tailored treatments. CRISPR (Clustered Regularly-Interspaced Short Palindromic Repeats) and Cas9 endonuclease (CRISPR associated protein 9) is a new tool for genome editing. Thanks to its high performance and specificity, and relative ease of use, this system has revolutionized genomics in experimental settings, and is becoming a leading theme in interventional clinical trials. Intervention on

the human organism can be carried out on somatic cells (to initiate changes in a single patient), or on germline cells (in which case modifications to the genome become heritable). CRISPR/Cas9 is thus a powerful tool that can eliminate genetic diseases or alter phenotypic traits. However, current solutions are mostly limited to ex-vivo somatic cell modifications. This chapter aims to provide an overview of the origins of the CRISPR/Cas9 system, its brief history, discuss its functionality and outline prospects for possible applications. We will also discuss current therapeutic utility in the treatment of cancer, hematopoietic diseases and viral infections, using clinical trials registered in the clinicaltrials.com database as examples.

Keywords: CRISPR-Cas9, gene therapy, clinical trials, drug development

1. Wstęp

Techniki molekularne takie jak terapia genowa, edycja genów czy wyciszanie genów są obiecującym sposobem leczenia przyczynowego wielu chorób, począwszy od dziedzicznych zaburzeń genetycznych, przez choroby immunologiczne, aż po nowotwory i infekcje¹. Często stosowaną metodą jest wprowadzanie rekombinowanego DNA do wektora (najczęściej wirusowego) a następnie podanie do organizmu. Przeprowadza się również modyfikację ex-vivo genów komórek pobranych od pacjenta (jak w przypadku limfocytów CAR-T)². Pierwszym produktem terapii genowej zatwierdzonym przez Europejską Agencję Leków w 2013 roku, był lek Glybera (alipogene tiparvec) stosowany w leczeniu niedoboru lipazy lipoproteinowej³.

Na początku XXI wieku głównymi narzędziami używanymi w terapii genowej były nukleazy z motywem palca cynkowego (ang. Zinc finger nucleases - ZFN) oraz TALEN (ang. transcription activator-like effector nuclease). Obydwie techniki są zdolne do rozpoznawania określonych miejsc w DNA oraz dokonywania dwuniciowego cięcia (DSB) poprzez niespecyficzną endonukleazę FokI⁴. Białka palca cynkowego (ZFP) są w stanie rozpoznać w przybliżeniu trzy pary zasad DNA. Do wygenerowania dwuniciowego pęknięcia potrzeba dwu ZFP połączonych z FokI, jednego nad zamierzonym miejscem, drugiego poniżej tego miejsca⁵. TALEN składa się z domeny wiążącej DNA TAL złożonej z powtórzeń 33 – 39 aminokwasów oraz domeny cięcia DNA. Specyficzne sekwencje DNA są lokalizowane za pomocą hiperzmiennych reszt aminokwasowych w pozycjach 12 i 13 domeny TAL⁵. DSB są następnie naprawiane przez komórkę poprzez jeden z dwóch mechanizmów: podatne na błędy niehomologiczne łączenie końców (NHEJ) lub precyzyjną naprawę ukierunkowaną na homologię (HDR). Naprawa NHEJ jest wykorzystywana gdy zamierzonym efektem jest nokaut genu (mutacja),

naprawa HDR natomiast podczas tworzenia alternatywnych wersji genów czy białek, lub do przepisywania sekwencji DNA (edycja) ⁶.

Nowa technika CRISPR/Cas9 wyróżnia się szeregiem zalet w stosunku do wcześniejszych metod. Przede wszystkim metoda generuje niskie koszty, jest wydajna i łatwo skalowalna ⁷. Ponadto, właściwa specyficzność systemu zależy od kompleksu rybonukleinowego, który jest bardziej specyficzny od metody opartej na wiązaniu DNA przez białka (ZFN, TALEN). Co więcej, prowadząca sekwencja RNA może zostać łatwo zaprojektowana dla wielu różnych celów DNA ⁸. Celem tego rozdziału jest przegląd aktualnie zarejestrowanych interwencyjnych badań klinicznych w których wykorzystywane jest narzędzie edycji genów CRISPR/Cas9, oraz scharakteryzowanie jego najważniejszych cech.

2. CRISPR/Cas9

CRISPR (ang. Clustered Regularly-Interspaced Short Palindromic Repeats, pol. zgrupowane, regularnie rozproszone, krótkie, powtarzające się sekwencje palindromiczne) oraz endonukleaza Cas9 (ang. CRISPR associated protein 9, pol. białko 9 związane z CRISPR) są elementami adaptatywnego bakteryjnego układu odpornościowego, odgrywającego rolę w ochronie bakterii przed wirusami i plazmidami ⁹.

2.1. Historia

System CRISPR/Cas został po raz pierwszy opisany przez Yoshizumi Ishino w 1987 roku, jako nietypowe powtarzające się sekwencje w genomie bakterii *Escherichia coli* ¹⁰. W 2005 roku odkryto, że sekwencje te służą jako adaptacyjny układ odpornościowy u prokariota, co potwierdziły badania przeprowadzone dwa lata później ^{11, 12}. Żywe zainteresowanie naukowców szybko doprowadziło do nowych odkryć, jak choćby ustalenia że cząsteczką docelową dla układu CRISPR jest DNA – pojawia się możliwość wykorzystania go jako narzędzia inżynierii genetycznej ¹³. Do 2011 roku znacznie poszerzono wiedzę na temat działania Cas9 – enzymu wywołującego pęknięcie w dwuniciowym DNA (dsDNA) naprowadzanego przez CRISPR RNA (crRNA). Określono również udział elementów takich jak trans-aktywujący crRNA (tracrRNA), Cas9 oraz RNazy III w procesie dojrzewania crRNA ^{14, 15}. Badania w 2012 roku wykazały możliwość łatwego programowania bakteryjnego układu odpornościowego; pierwsze dwadzieścia nukleotydów crRNA

może zostać zaprojektowane przeciwko odpowiadającemu miejscu w DNA, umożliwiając przeprowadzenie naprowadzonego DSB^{16, 17}. Zafascynowanie nową metodą wśród badaczy zostało określone „szalem CRISPR”, a czasopiśmo *Science* nadało jej tytuł „Science's 2015 Breakthrough of the Year”^{18, 19}. Pierwszy test kliniczny narzędzia do edycji genów CRISPR na człowieku miał miejsce w 2016 roku w Chinach. Pacjentowi chorującemu na niedrobnokomórkowego raka płuca zostały podane zmodyfikowane *ex-vivo* limfocyty T²⁰.

Tylko w dwóch ostatnich latach w PubMed pojawiło się ponad 2000 publikacji na temat CRISPR/Cas9. W serwisie ClinicalTrials.gov dotychczas zarejestrowano około 50 badań klinicznych I, II i III fazy. Jennifer Doudna i Emmanuelle Charpentier za odkrycie metody edycji genów CRISPR/Cas9 otrzymały nagrodę Nobla w dziedzinie chemii w 2020 roku.

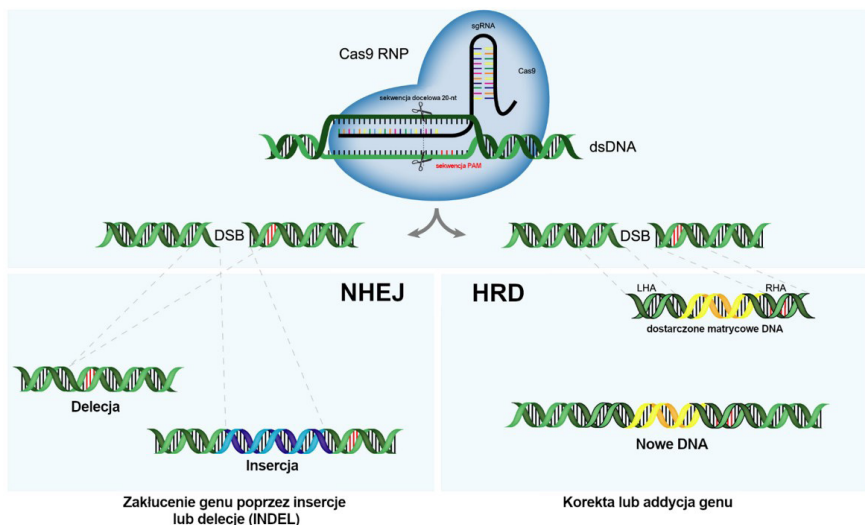
2.2. Mechanizm działania

Działanie systemu CRISPR u prokariota dzieli się na trzy zasadnicze fazy: adaptację, biogenezę crRNA czyli dojrzewanie, oraz interferencję. W pierwszej fazie obce kwasy nukleinowe zostają inkorporowane do macierzy CRISPR, w odpowiednim loci w genomie bakterii. W ten sposób tworzona jest swoista pamięć immunologiczna. Gdy zachodzi potrzeba, na podstawie „zapamiętanego” fragmentu materiału genetycznego faga tworzone jest crRNA. W przypadku ponownej infekcji, enzymy związane z CRISPR są kierowane przez crRNA do sekwencji komplementarnej pochodzącej od wirusa, która zostaje zniszczona przez restrykcję^{21, 22}. Właśnie ta zdolność precyzyjnego rozpoznawania i cięcia DNA umożliwia szerokie zastosowanie tego narzędzia w inżynierii genetycznej.

Elementami systemu CRISPR/Cas9 typu II pochodzącego od bakterii *Streptococcus Pyrogenes* są endonukleaza SpCas9 i sekwencja prowadząca sgRNA (ang. single guide RNA). sgRNA jest kombinacją crRNA i tracrRNA²³. Składa się ze 100 nukleotydów (nt), z czego pierwsze 20 nt zostaje zaprojektowane komplementarnie do miejsca zamierzonej interwencji w genomie. Endonukleaza wraz z fragmentem sgRNA tworzy kompleks - rybonukleoproteinę (RNP) (rycina 1). RNP nie może jednak zostać zaprojektowana do rozpoznawania dowolnego miejsca w genomie – do funkcjonowania wymaga obecności specyficznego motywu sąsiadującego z protoprzerywnikiem (PAM). Specyficzność systemu zależy więc nie tylko od wiązania sgRNA/DNA, ale również bliskości odpowiedniego PAM. Sekwencja PAM różni się między

systemami pochodzącymi od różnych gatunków bakterii (dla *Streptococcus Pyrogenes* sekwencja to NGG).

Cas9 jest uruchamiany gdy nastąpi rozpoznanie PAM oraz związanie sekwencji docelowej. Przecięcie następuje 3 – 4 nt powyżej sekwencji PAM. Następuje etap właściwej edycji genu, przeprowadzany przez komórkowe mechanizmy naprawy DNA ²⁴. Naprawa może zostać przeprowadzona przez jeden z dwu mechanizmów: NHEJ – podatny na błędy, łączący ze sobą dwa końce, mogą tworzyć się insercje lub delecje (INDEL), lub HRD – naprawa precyzyjna, ukierunkowana, do naprawy pęknięcia wykorzystywana jest siostrzana chromatyna lub szablon DNA dostarczony z zewnątrz ⁶. W przypadku NHEJ powstawanie INDELI może zmienić ramkę odczytu, doprowadzając do tworzenia przedwczesnych kodonów STOP i ostatecznie nokautu genu. Jednak skutek naprawy NHEJ jest nieprzewidywalny, co prowadzi do stworzenia niejednorodnej populacji komórek z różnymi INDELami. Niektóre z nich nie zmieniają ekspresji genu, lub nie powodują zmiany funkcji białka. Naprawa HRD umożliwi wprowadzenie zmian genetycznych za pomocą matrycy DNA. Szablon ten, dostarczany do komórki, zawiera nową sekwencję oflankowaną przez ramiona homologii (LHA, RHA, ang. left/right homology arm), czyli sekwencje homologiczne do sekwencji docelowej ²⁴.



Rycina 1. Na schemacie przedstawiono proces edycji genomu przez CRISPR-Cas9. Rybonukleoproteina Cas9 jest kierowana przez 100-nt sgRNA do właściwego miejsca w genomie, a 20-nt na końcu 5' rozpoznaje komplementarny fragment DNA przez parowanie zasad.

Po przeprowadzeniu DSB, miejsce cięcia może zostać naprawione przez jeden z dwóch szlaków²⁴

2.3. Zastosowania

Ze względu na charakter działania systemu CRISPR/Cas9 i łatwość jego wykorzystania, możliwości zastosowania tej techniki są niemal nieograniczone. Dzięki postępowi w zrozumieniu patogenezы molekularnej chorób człowieka, coraz więcej genów staje się celem terapeutycznym w różnorodnych zaburzeniach. Celowane terapie komórkowe są źródłem wielkich nadziei, zwiastując świetlaną przyszłość medycyny spersonalizowanej²⁵. Rozpoczęto liczne badania przedkliniczne wykorzystujące CRISPR/Cas9 do leczenia chorób ludzkich, w tym chorób neurodegeneracyjnych (choroba Alzheimera²⁶, choroba Huntingtona²⁷), infekcji wirusowych (HIV²⁸, HBV²⁹, HPV³⁰, EBV³¹), chorób uwarunkowanych genetycznie (mukowiscydoza^{32, 33}, anemia sierpowata³⁴, β -talasemia³⁵, dystrofia mięśniowa Dunchenne'a³⁶), czy też chorób nowotworowych^{37, 38, 39}, nie zapominając o chorobach układu krążenia⁴⁰ i alergiach⁴¹.

Poza klasycznymi przykładami wykorzystania jej do terapii genowej, ogromną zaletą techniki CRISPR/Cas9 jest zdolność wykonania zwielokrotnie edycji w obrębie jednego genomu. W jednej macierzy CRISPR możliwe jest zakodowanie wielu sekwencji sgDNA, by prowadzić jednoczesną edycję genów w kilku miejscach (multipleksowa inżynieria genomu)⁴².

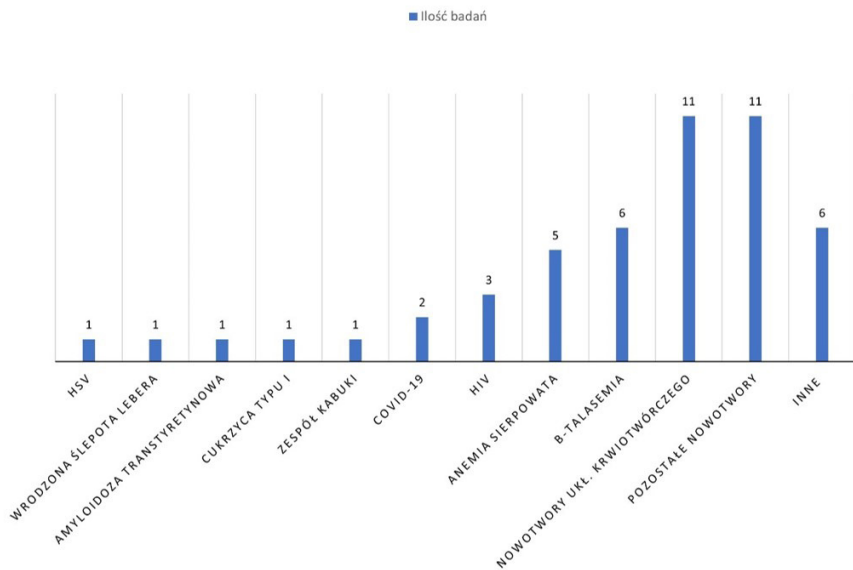
Ponadto, opracowana została metoda zaprogramowanej konwersji pojedynczej zasady DNA, dzięki fuzji CRISPR/Cas9 i enzymu deaminazy cytydyny. Obecny tu katalityczny martwy enzym Cas9 (dCas9) który dzięki przeprowadzonym mutacjom stracił właściwości nukleazy, jest wciąż w stanie wiązać DNA w sposób narzucony przez zaprogramowane sgRNA. Nie dochodzi więc do powstania DSB. Właściwa reakcja katalizowana jest przez deaminazę cytydyny polega na przekształceniu cytydyny do uracylu, co w efekcie daje substytucję C \rightarrow T (lub G \rightarrow A). Taki „edytor zasad” jest w stanie przeprowadzać korektę mutacji punktowych w sposób mniej przypadkowy niż komórkowa naprawa DSB, która w wielu przypadkach powoduje głównie losowe INDELe⁴³.

System umożliwia także ingerencję w DNA ludzkich embrionów. W ten sposób można zapobiec chorobom genetycznym wywołanym przez pojedynczą mutację. Możliwa staje się również zmiana pewnych załoonych cech fenotypowych. To podejście wywołało szeroką dyskusję nad bezpieczeństwem i etycznością modyfikacji genów linii zarodkowej⁴⁴. Mimo względnego konsensusu naukowców w tej sprawie oraz ścisłych regulacji prawnych w wielu krajach świata, w 2018 roku Jiankui et al. (Chiny) poinformował

o narodzinach pierwszych bliźniąt poczętych ze zmodyfikowanych genetycznie embrionów⁴⁵. Lulu i Niny posiadają zmieniony gen kodujący CCR5 (ang. C-C chemokine receptor type 5) na limfocytach T CD4⁺. Receptor ten jest wykorzystywany przez ludzkiego wirusa niedoboru odporności do przedostania się do wnętrza komórki. Mutacja części CCR5 chroni limfocyty przed zainfekowaniem szczepem HIV-1⁴⁶. Eksperyment zyskał szeroki rozgłos w mediach, jak również w środowisku naukowym, jednak dotychczas nie został opisany w recenzowanym czasopiśmie. Specjaliści poddają w wątpliwość skuteczność zastosowanego rozwiązania, jego zasadność oraz przede wszystkim bezpieczeństwo narodzonych dzieci⁴⁷. Amerykańska FDA (Food and Drug Administration) wyklucza choćby możliwość recenzji jakiegokolwiek leku lub produktu biologicznego którego działanie wiąże się z modyfikacją genetyczną ludzkiego embrionu⁴⁸. Przy obecnym stanie wiedzy i doświadczenia, eksperci odradzają edycji i manipulacji genomem zarodkowym u ludzi, jednocześnie kładąc nacisk na właściwą edukację i informację o tej potężnej technologii leczenia chorób genetycznych człowieka, o związanych z nią implikacjach etycznych, prawnych i społecznych. Podobnie wspierane są transparentne badania mające ocenić skuteczność technologii CRISPR/Cas9 w modelach ludzkich i nieludzkich, oraz możliwe przyszłe zastosowania kliniczne w terapii genowej linii zarodkowej⁴⁹.

3. Przegląd badań klinicznych

Aktualnie zarejestrowane interwencyjne badania kliniczne zostały wyszukane w bazie clinicaltrials.gov należącej do United States National Library of Medicine. Badania musiały dotyczyć użycia CRISPR/Cas9 do edycji genów. Wyszukiwanie wyodrębniło sumarycznie 51 badań, dotyczących różnych chorób ludzkich (wykres 1.). Większość z nich dotyczy bezpośrednich narzędzi terapeutycznych, 6 spośród badań zajmuje się wykorzystaniem CRISPR/Cas9 do celów diagnostycznych lub oceny stanu chorego, jedno badanie miało charakter obserwacyjny nieinterwencyjny, a w 2 przypadkach były to długoterminowe badania kontrolne dla pacjentów wcześniej poddanych terapii.



Wykres 1. Ilość badań poświęconych danemu zagadnieniu klinicznemu
[opracowanie własne]

4. Nowotwory

Zaraz po chorobach układu krążenia, nowotwory stanowią wciąż drugą najczęstszą przyczynę zgonów na świecie ⁵⁰. Klasyczna chemioterapia mimo udowodnionej skuteczności posiada liczne wady, jak choćby brak swoistego ukierunkowania, czy też możliwość oporności nowotworu na chemoterapeutyki ⁵¹. Dlatego istnieje potrzeba stworzenia nowych strategii leczenia onkologicznego. Immunoterapia jest rozwijającą się metodą terapeutyczną stosowaną klinicznie wraz z chirurgią, radioterapią i chemioterapią. 14 badań klinicznych włączonych do przeglądu było poświęcone immunoterapii nowotworów z użyciem limfocytów T wyposażonych w chimeryczny receptor antygenowy (CAR). Receptor ten jest zmodyfikowanym genetycznie białkiem transbłonowym składającym się z trzech domen. Część zewnętrzna wiąże specyficzny antygen komórkowy, rozpoznawany przez pojedynczy łańcuch lekkiego. Domena transmembralna stanowi rusztowanie dla receptora CAR-T. Natomiast endogenny kompleks TCR umożliwia transdukcję sygnału po rozpoznaniu antygeny i aktywację limfocyta T. W CAR wyposażane są autologiczne limfocyty pobrane w tym celu od pacjenta. Po ponownym wprowadzeniu do ustroju, limfocyty CAR-T namnażają się i po rozpoznaniu swoistych

antygenów eliminują posiadające je komórki nowotworowe⁵². Mimo pewnych nieuniknionych wad, terapia wykazuje ogromny potencjał. W ciężkich typach opornych na leczenie nowotworów hematologicznych z limfocytów B u dzieci i młodych dorosłych, wskaźnik remisji w badaniach klinicznych wynosił do 94%. Warto zaznaczyć, że znaczna część badań CAR-T rekrutuje pacjentów u których inne dostępne terapie nie przyniosły rezultatów⁵³. Wśród obecnie zarejestrowanych badań klinicznych limfocytów CAR-T zmodyfikowanych za pomocą CRISPR/Cas9, 8 badań dotyczy limfocytów swoistych wobec CD19 (Clincialtrials.gov: NCT04637763, NCT04037566, NCT03399448, NCT05037669, NCT04557436, NCT03398967, NCT04035434, NCT03166878), w 3 badaniach użyto limfocytów CAR-T ukierunkowanych na mezotelinę (Clincialtrials.gov: NCT03545815, NCT03747965, NCT04842812), a 2 badania dotyczą limfocytów swoistych dla CD70 (Clincialtrials.gov: NCT04438083, NCT04502446). Komórki CAR-T anty-CD19 używane są w terapii nawracających lub opornych na leczenie nowotworów hematologicznych. Chiny przeprowadziły badanie kliniczne (Clincialtrials.gov: NCT03398967) integrując w limfocytach T dwa CAR (CD19 oraz CD20, lub CD22) dla eliminacji komórek CD19⁺⁵⁴. Inne badanie kliniczne (ClinicalTrials.gov : NCT03166878) dotyczące chłoniaka i odpornej na leczenie białaczki CD19⁺ dodatkowo wykorzystuje CRISPR do wyciszenia genów TCR i B2M w celu zmniejszenia immunogenności – możliwe jest uniknięcie choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi²⁴. Przykładem wykorzystania limfocytów CAR-T anty-CD70 jest badanie (ClinicalTrials.gov: NCT04438083) przeciwko rakowi nerkowokomórkowemu i nowotworom hematologicznym.

Kolejnym rozwiązaniem wprowadzanym w terapię immunologiczną jest zakłócanie genu receptora zaprogramowanej śmierci (PD-1) w limfocytach T. Ligand tego receptora (PD-L1) jest negatywnym regulatorem aktywności tych limfocytów. PD-L1 ulega ekspresji na komórkach dendrytycznych oraz niektórych komórkach nowotworowych, wiążąc PD-1 na aktywowanych limfocytach T⁵⁵. Nokaut genu kodującego PD-1 w limfocytach pobranych od pacjentów chorych na nowotwór, spowodował zwiększenie wydzielania interferonu γ oraz wzrost cytotoksyczności⁵⁶. Skuteczność inhibitorów punktów kontrolnych znajduje odzwierciedlenie w prowadzonych aktualnie badaniach, wśród których 11 dotyczy komórek odpornościowych z nokautem PD-1 (Clincialtrials.gov: NCT03545815, NCT04990557, NCT03399448, NCT03747965, NCT03044743, NCT02793856, NCT04417764, NCT03081715, NCT02863913, NCT02867345, NCT02867332).

Pierwsze użycie narzędzia CRISPR/Cas9 w badaniu klinicznym na człowieku (ClinicalTrials.gov: NCT02793856) również wykorzystano do nokautu PD-1 w terapii przerzutowego niedrobnokomórkowego raka płuc²⁰. W 2020 roku poinformowano, że u wszystkich 12 uczestników którzy otrzymali leczenie, modyfikowane genetycznie limfocyty T utrzymywały się we krwi obwodowej, a metodę można uznać za bezpieczną i skuteczną⁵⁷.

4.1. Niedokrwistości

Niedokrwistość sierpowatokrwinkowa (SC) jest schorzeniem układu krwiotwórczego, spowodowanym przez mutację w genie kodującym łańcuch β -globiny, przez co dochodzi do powstania nieprawidłowego tetrameru hemoglobiny HbS⁵⁸. Przywrócenie prawidłowej funkcji erytrocytów jest możliwe dzięki korekcie genu HbS w genomie hematopoetycznych komórek macierzystych (HSCs) CD34⁺ za pomocą CRISPR⁵⁹. Według badań jest to bezpieczna i obiecująca metoda terapii SC,^{60, 61} nad którą prowadzone są interwencyjne testy kliniczne (ClinicalTrials.gov: NCT04774536, NCT03745287, NCT04819841, NCT05329649).

β -talasemia (niedokrwistość tarczowatokrwinkowa) to powszechnie występujące zaburzenie krwi spowodowane mutacją w genie hemoglobiny beta (HBB). Homozygoty rozwijają ciężką niedokrwistość wymagającą częstych transfuzji krwi i chelatacji żelaza⁶². Terapia, podobnie jak w przypadku anemii sierpowatej obejmuje podanie autologicznych HSCs CD34⁺ z prawidłowym genem HBB, zmodyfikowanym za pomocą CRISPR/Cas9 (ClinicalTrials.gov: NCT03655678, NCT04925206, NCT04208529, NCT03728322, NCT05444894, NCT05356195).

4.2. Ludzki wirus niedoboru odporności

Abstrahując od chorób związanych z krwiotworzeniem, modyfikacja genetyczna HSCs jest stosowana w badaniach nad terapią genową przeciw wirusowi HIV. Xu L. et. al w swoim badaniu (ClinicalTrials.gov: NCT03164135) przedstawił możliwość wyleczenia pacjenta zakażonego wirusem HIV-1, chorującego jednocześnie na ostrą białaczkę limfoblastyczną. HSCs pochodzące od allogenicznego dawcy zostały zmodyfikowane w celu nokautu genu CCR5. Po przeszczepie, nowa populacja komórek CD4⁺ z niefunkcyjnym CCR5 powinna zapewnić odporność na wirusa HIV-1 a jednocześnie jego długotrwałą eradykację, jednak odsetek zaburzonych CCR5 wyniósł 5%. Przeszczep

powiódł się, jednak w przypadku AIDS nie uzyskano oczekiwanego efektu terapeutycznego⁶³.

Zgłoś inne podejście prezentują badania (Clinicaltrials.gov: NCT05144386, NCT05143307) wykorzystujące system CRISPR/Cas9 do bezpośredniej interwencji w genom wirusa in-vivo. Preparat EBT-101 zawiera CRISPR/Cas9 specyficzny dla wirusa HIV-1, dostarczany z adenowirusem o serotypie 9.

5. Podsumowanie

Nie ulega wątpliwości, że żyjemy w czasach rozkwitu technologii umożliwiającej manipulowanie genomem. Na zaburzenia, które przez lata były celem leczenia objawowego, pada nowe światło, otwierają się możliwości wyeliminowania dotychczas nieuleczalnych chorób. Do życia powoływane są narzędzia łączące najnowsze odkrycia wielu dziedzin biologii, genetyki, chemii. Najlepszym tego przykładem jest system CRISPR/Cas9. Nigdy wcześniej edycja genów nie była dostępna dla tak szerokiej społeczności uczonych. Dzięki tej dostępności szybko postępują badania na modelach zwierzęcych, a to przekłada się na rosnącą liczbę badań klinicznych. Większość z nich jest obecnie dopiero w I lub II fazie. Dotychczas kładziono nacisk na bezpieczeństwo i skuteczność używanych metod, by w pełni zrozumieć mechanizmy molekularne związane z edycją genów. Należy zaznaczyć że narzędzie nie jest idealne. Zdarzają się nieoczekiwane efekty mutacji wtórnych, po zastosowaniu CRISPR/Cas9. Nie jesteśmy w stanie przewidzieć wszystkich skutków modyfikacji zastosowanych in-vivo. Mimo wysokiej specyficzności, ograniczenie co do miejsca działania systemu wyznacza PAM. Wreszcie, nie jesteśmy w stanie w pełni kontrolować procesów zależnych od mechanizmów wewnątrzkomórkowych. Co więcej, niezwykle istotne stają się dyskusje natury etycznej, prawnej i stricte naukowej. Potrzeba dialogu środowiska naukowego i opinii publicznej by zezwolić na globalne zastosowanie nowej technologii w warunkach klinicznych. Nie zapominajmy o widmie edycji komórek linii zarodkowej – wcześniej czy później „zaprojektowane dzieci” mogą stać się faktem. Przyszłość prezentuje się jednak w kolorowych barwach. Potrzeba badań by zweryfikować wszystkie zagrożenia i korzyści nowych metod terapii genowej, oraz czasu by ominąć ograniczenia i odkryć ich pełny potencjał kliniczny. Na dalsze postępy CRISPR/Cas9 będziemy wyczekiwać z zainteresowaniem.

Referencje

1. Dunbar, C. E., High, K. A., Joung, J. K., Kohn, D. B., Ozawa, K., & Sadelain, M. (2018). Gene therapy comes of age. *Science*, 359(6372), eaan4672.
2. Gonçalves, G., & Paiva, R. (2017). Gene therapy: advances, challenges and perspectives. *Einstein (Sao Paulo, Brazil)*, 15(3), 369–375. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082017RB4024>
3. Ylä-Herttua, S. (2012). Endgame: glybera finally recommended for approval as the first gene therapy drug in the European union. *Molecular Therapy*, 20(10), 1831-1832.
4. Smith, A. J., Carter, S. P., & Kennedy, B. N. (2017). Genome editing: the breakthrough technology for inherited retinal disease?. *Expert opinion on biological therapy*, 17(10), 1245–1254. <https://doi.org/10.1080/14712598.2017.1347629>
5. Eid, A., & Mahfouz, M. M. (2016). Genome editing: the road of CRISPR/Cas9 from bench to clinic. *Experimental & molecular medicine*, 48(10), e265. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.111>
6. Krejci, L., Altmannova, V., Spirek, M., & Zhao, X. (2012). Homologous recombination and its regulation. *Nucleic acids research*, 40(13), 5795–5818. <https://doi.org/10.1093/nar/gks270>
7. Chakraborty, C., Teoh, S. L., & Das, S. (2017). The Smart Programmable CRISPR Technology: A Next Generation Genome Editing Tool for Investigators. *Current drug targets*, 18(14), 1653–1663. <https://doi.org/10.2174/1389450117666160527142321>
8. Yang, H., Wu, J. J., Tang, T., Liu, K. D., & Dai, C. (2017). CRISPR/Cas9-mediated genome editing efficiently creates specific mutations at multiple loci using one sgRNA in *Brassica napus*. *Scientific reports*, 7(1), 7489. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07871-9>
9. Murugan, K., Babu, K., Sundaresan, R., Rajan, R., & Sashital, D. G. (2017). The Revolution Continues: Newly Discovered Systems Expand the CRISPR-Cas Toolkit. *Molecular cell*, 68(1), 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.09.007>

10. Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology*, 169(12), 5429-5433.
11. Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of molecular evolution*, 60(2), 174–182. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>
12. Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A., & Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5819), 1709–1712. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>
13. Marraffini, L. A., & Sontheimer, E. J. (2008). CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science (New York, N.Y.)*, 322(5909), 1843–1845. <https://doi.org/10.1126/science.1165771>
14. Garneau, J. E., Dupuis, M. È., Villion, M., Romero, D. A., Barrangou, R., Boyaval, P., Fremaux, C., Horvath, P., Magadán, A. H., & Moineau, S. (2010). The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 468(7320), 67–71. <https://doi.org/10.1038/nature09523>
15. Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pizada, Z. A., Eckert, M. R., Vogel, J., & Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471(7340), 602–607. <https://doi.org/10.1038/nature09886>
16. Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2012). Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(39), E2579–E2586. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109>

17. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6096), 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
18. Pennisi E. (2013). The CRISPR craze. *Science (New York, N.Y.)*, 341(6148), 833–836. <https://doi.org/10.1126/science.341.6148.833>
19. <https://www.science.org/content/article/and-science-s-2015-breakthrough-year>
20. Cyranoski D. (2016). CRISPR gene-editing tested in a person for the first time. *Nature*, 539(7630), 479. <https://doi.org/10.1038/nature.2016.20988>
21. Hille, F., Richter, H., Wong, S. P., Bratovič, M., Ressel, S., & Charpentier, E. (2018). The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. *Cell*, 172(6), 1239–1259. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.032>
22. Hille, F., & Charpentier, E. (2016). CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 371(1707), 20150496. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0496>
23. Chylinski, K., Makarova, K. S., Charpentier, E., & Koonin, E. V. (2014). Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic acids research*, 42(10), 6091–6105. <https://doi.org/10.1093/nar/gku241>
24. Jensen, T. I., Axelgaard, E., & Bak, R. O. (2019). Therapeutic gene editing in haematological disorders with CRISPR/Cas9. *British journal of haematology*, 185(5), 821–835. <https://doi.org/10.1111/bjh.15851>
25. Lee, C. S., Bishop, E. S., Zhang, R., Yu, X., Farina, E. M., Yan, S., Zhao, C., Zheng, Z., Shu, Y., Wu, X., Lei, J., Li, Y., Zhang, W., Yang, C., Wu, K., Wu, Y., Ho, S., Athiviraham, A., Lee, M. J., Wolf, J. M., ... He, T. C. (2017). Adenovirus-Mediated Gene Delivery: Potential Applications for Gene and Cell-Based Therapies

- in the New Era of Personalized Medicine. *Genes & diseases*, 4(2), 43–63. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2017.04.001>
26. Rohn, T. T., Kim, N., Isho, N. F., & Mack, J. M. (2018). The Potential of CRISPR/Cas9 Gene Editing as a Treatment Strategy for Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease & Parkinsonism*, 8(3), 439. <https://doi.org/10.4172/2161-0460.1000439>
27. Yang, S., Chang, R., Yang, H., Zhao, T., Hong, Y., Kong, H. E., Sun, X., Qin, Z., Jin, P., Li, S., & Li, X. J. (2017). CRISPR/Cas9-mediated gene editing ameliorates neurotoxicity in mouse model of Huntington's disease. *The Journal of clinical investigation*, 127(7), 2719–2724. <https://doi.org/10.1172/JCI92087>
28. Ebina, H., Misawa, N., Kanemura, Y., & Koyanagi, Y. (2013). Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Scientific reports*, 3, 2510. <https://doi.org/10.1038/srep02510>
29. Dong, C., Qu, L., Wang, H., Wei, L., Dong, Y., & Xiong, S. (2015). Targeting hepatitis B virus cccDNA by CRISPR/Cas9 nuclease efficiently inhibits viral replication. *Antiviral research*, 118, 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.03.015>
30. Yoshida, T., Saga, Y., Urabe, M., Uchibori, R., Matsubara, S., Fujiwara, H., & Mizukami, H. (2019). CRISPR/Cas9-mediated cervical cancer treatment targeting human papillomavirus E6. *Oncology letters*, 17(2), 2197–2206. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9815>
31. Chen, J., Sathiyamoorthy, K., Zhang, X., Schaller, S., Perez White, B. E., Jardetzky, T. S., & Longnecker, R. (2018). Ephrin receptor A2 is a functional entry receptor for Epstein-Barr virus. *Nature microbiology*, 3(2), 172–180. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0081-7>
32. Schwank, G., Koo, B. K., Sasselli, V., Dekkers, J. F., Heo, I., Demircan, T., Sasaki, N., Boymans, S., Cuppen, E., van der Ent, C. K., Nieuwenhuis, E. E., Beekman, J. M., & Clevers, H. (2013). Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell stem cell*, 13(6), 653–658. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.11.002>
33. Marangi, M., & Pistrutto, G. (2018). Innovative Therapeutic Strategies for Cystic Fibrosis: Moving Forward to CRISPR

- Technique. *Frontiers in pharmacology*, 9, 396. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00396>
34. Wen, J., Tao, W., Hao, S., & Zu, Y. (2017). Cellular function reinstatement of offspring red blood cells cloned from the sickle cell disease patient blood post CRISPR genome editing. *Journal of hematology & oncology*, 10(1), 119. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0489-9>
35. Xie, F., Ye, L., Chang, J. C., Beyer, A. I., Wang, J., Muench, M. O., & Kan, Y. W. (2014). Seamless gene correction of β -thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggy-Bac. *Genome research*, 24(9), 1526–1533. <https://doi.org/10.1101/gr.173427.114>
36. Long, C., McAnally, J. R., Shelton, J. M., Mireault, A. A., Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2014). Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science (New York, N.Y.)*, 345(6201), 1184–1188. <https://doi.org/10.1126/science.1254445>
37. Aubrey, B. J., Kelly, G. L., Kueh, A. J., Brennan, M. S., O'Connor, L., Milla, L., Wilcox, S., Tai, L., Strasser, A., & Herold, M. J. (2015). An inducible lentiviral guide RNA platform enables the identification of tumor-essential genes and tumor-promoting mutations in vivo. *Cell reports*, 10(8), 1422–1432. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.02.002>
38. Feng, Y., Sassi, S., Shen, J. K., Yang, X., Gao, Y., Osaka, E., Zhang, J., Yang, S., Yang, C., Mankin, H. J., Hornicek, F. J., & Duan, Z. (2015). Targeting CDK11 in osteosarcoma cells using the CRISPR-Cas9 system. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 33(2), 199–207. <https://doi.org/10.1002/jor.22745>
39. Lian, Y. F., Yuan, J., Cui, Q., Feng, Q. S., Xu, M., Bei, J. X., Zeng, Y. X., & Feng, L. (2016). Upregulation of KLHDC4 Predicts a Poor Prognosis in Human Nasopharyngeal Carcinoma. *PloS one*, 11(3), e0152820. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152820>
40. Seidah N. G. (2013). Proprotein convertase subtilisin kexin 9 (PCSK9) inhibitors in the treatment of hypercholesterolemia and

- other pathologies. *Current pharmaceutical design*, 19(17), 3161–3172. <https://doi.org/10.2174/13816128113199990313>
41. Malaviya, R., Laskin, D. L., & Malaviya, R. (2010). Janus kinase-3 dependent inflammatory responses in allergic asthma. *International immunopharmacology*, 10(8), 829–836. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.04.014>
42. Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6121), 819–823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>
43. Komor, A. C., Kim, Y. B., Packer, M. S., Zuris, J. A., & Liu, D. R. (2016). Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 533(7603), 420–424. <https://doi.org/10.1038/nature17946>
44. Baltimore, D., Berg, P., Botchan, M., Carroll, D., Charo, R. A., Church, G., ... & Yamamoto, K. R. (2015). A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science*, 348(6230), 36–38.
45. Rose, B. I., & Brown, S. (2019). Genetically Modified Babies and a First Application of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR-Cas9). *Obstetrics and gynecology*, 134(1), 157–162. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000003327>
46. Didigu, C. A., Wilen, C. B., Wang, J., Duong, J., Secreto, A. J., Danet-Desnoyers, G. A., ... & Doms, R. W. (2014). Simultaneous zinc-finger nuclease editing of the HIV coreceptors ccr5 and cxcr4 protects CD4+ T cells from HIV-1 infection. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 123(1), 61–69.
47. Rose, B. I., & Brown, S. (2019). Genetically Modified Babies and a First Application of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR-Cas9). *Obstetrics and gynecology*, 134(1), 157–162. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000003327>
48. Cohen, I. G., & Adashi, E. Y. (2016). The FDA is prohibited from going germline. *Science*, 353(6299), 545–546.

49. Baltimore, D., Berg, P., Botchan, M., Carroll, D., Charo, R. A., Church, G., Corn, J. E., Daley, G. Q., Doudna, J. A., Fenner, M., Greely, H. T., Jinek, M., Martin, G. S., Penhoet, E., Puck, J., Sternberg, S. H., Weissman, J. S., & Yamamoto, K. R. (2015). Biotechnology. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science (New York, N.Y.)*, 348(6230), 36–38. <https://doi.org/10.1126/science.aab1028>
50. Cooper, G. M., & Hausman, R. E. (2007). *The Development and Causes of Cancer. The Cell: A 654 Molecular Approach*.
51. Alfarouk, K. O., Stock, C. M., Taylor, S., Walsh, M., Muddathir, A. K., Verduzco, D., Bashir, A. H., Mohammed, O. Y., Elhassan, G. O., Harguindey, S., Reshkin, S. J., Ibrahim, M. E., & Rauch, C. (2015). Resistance to cancer chemotherapy: failure in drug response from ADME to P-gp. *Cancer cell international*, 15, 71. <https://doi.org/10.1186/s12935-015-0221-1>
52. Zhang, C., Liu, J., Zhong, J. F., & Zhang, X. (2017). Engineering CAR-T cells. *Biomarker research*, 5, 22. <https://doi.org/10.1186/s40364-017-0102-y>
53. Sadelain M. (2017). CD19 CAR T Cells. *Cell*, 171(7), 1471. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.002>
54. Fousek, K., Watanabe, J., Joseph, S. K., George, A., An, X., Byrd, T. T., Morris, J. S., Luong, A., Martínez-Paniagua, M. A., Sanber, K., Navai, S. A., Gad, A. Z., Salsman, V. S., Mathew, P. R., Kim, H. N., Wagner, D. L., Brunetti, L., Jang, A., Baker, M. L., Varadarajan, N., ... Ahmed, N. (2021). CAR T-cells that target acute B-lineage leukemia irrespective of CD19 expression. *Leukemia*, 35(1), 75–89. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-0792-2>
55. Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J., & Sharpe, A. H. (2008). PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annual review of immunology*, 26, 677–704. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331>
56. Su, S., Hu, B., Shao, J., Shen, B., Du, J., Du, Y., Zhou, J., Yu, L., Zhang, L., Chen, F., Sha, H., Cheng, L., Meng, F., Zou, Z., Huang, X., & Liu, B. (2016). CRISPR-Cas9 mediated efficient PD-1

- disruption on human primary T cells from cancer patients. *Scientific reports*, 6, 20070. <https://doi.org/10.1038/srep20070>
57. Lu, Y., Xue, J., Deng, T., Zhou, X., Yu, K., Deng, L., Huang, M., Yi, X., Liang, M., Wang, Y., Shen, H., Tong, R., Wang, W., Li, L., Song, J., Li, J., Su, X., Ding, Z., Gong, Y., Zhu, J., ... Mok, T. (2020). Safety and feasibility of CRISPR-edited T cells in patients with refractory non-small-cell lung cancer. *Nature medicine*, 26(5), 732–740. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0840-5>
58. Sundd, P., Gladwin, M. T., & Novelli, E. M. (2019). Pathophysiology of Sickle Cell Disease. *Annual review of pathology*, 14, 263–292. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012838>
59. Wen, J., Tao, W., Hao, S., & Zu, Y. (2017). Cellular function reinstatement of offspring red blood cells cloned from the sickle cell disease patient blood post CRISPR genome editing. *Journal of hematology & oncology*, 10(1), 119. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0489-9>
60. Sato, M., Saitoh, I., & Inada, E. (2016). Efficient CRISPR/Cas9-based gene correction in induced pluripotent stem cells established from fibroblasts of patients with sickle cell disease. *Stem cell investigation*, 3, 78. <https://doi.org/10.21037/sci.2016.11.05>
61. Demirci, S., Leonard, A., Haro-Mora, J. J., Uchida, N., & Tisdale, J. F. (2019). CRISPR/Cas9 for Sickle Cell Disease: Applications, Future Possibilities, and Challenges. *Advances in experimental medicine and biology*, 1144, 37–52. https://doi.org/10.1007/5584_2018_331
62. Cao, A., & Galanello, R. (2010). Beta-thalassemia. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 12(2), 61–76. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181cd68ed>
63. Xu, L., Wang, J., Liu, Y., Xie, L., Su, B., Mou, D., Wang, L., Liu, T., Wang, X., Zhang, B., Zhao, L., Hu, L., Ning, H., Zhang, Y., Deng, K., Liu, L., Lu, X., Zhang, T., Xu, J., Li, C., ... Chen, H. (2019). CRISPR-Edited Stem Cells in a Patient with HIV and Acute Lymphocytic Leukemia. *The New England journal of medicine*, 381(13), 1240–1247. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1817426>

DOUSTNA ANTYKONCEPCJA DLA MĘŻCZYŹN

Dominika Majer, Krzysztof Krukowski, Emilia Słabońska

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

Abstrakt: Na rynku dostępnych jest wiele metod antykoncepcji (o zróżnicowanej skuteczności) dla kobiet: metody mechaniczne tj.: prezerwatywy, błona dopochwowa lub wkładki wewnątrzmaciczne, chemiczne np.: kremy, globulki lub żele plemnikobójcze oraz hormonalne np.: tabletki antykoncepcyjne (jedno- lub dwuskładnikowe), plastry antykoncepcyjne, pierścienie dopochwowe, a także iniekcje domięśniowe. Metody zapobiegania ciąży przez mężczyzn ograniczają się do prezerwatyw oraz inwazyjnej wazektomii, która nie w każdym przypadku jest odwracalna. Naukowcy opracowują doustny środek antykoncepcyjny dla mężczyzn, który umożliwiłby skuteczną ochronę przed nieplanowaną ciążą.

Słowa kluczowe: antykoncepcja, mężczyźni, tabletki, hormony

Abstract: There are many contraceptive methods (with varying effectiveness) for women available on the market: barrier methods such as condoms, vaginal membranes or intrauterine devices, chemical methods for example spermicidal creams, globules or gels, and hormonal ones, e.g. contraceptive pills (one- or two-component), contraceptive patches, vaginal rings, as well as intramuscular injections. Male pregnancy prevention methods are limited to condoms and invasive vasectomy, which are not always reversible. Scientists are developing an oral contraceptive for men that would provide effective protection against unplanned pregnancies.

Keywords: contraception, male, pills, hormones

1. Wstęp

Wraz z rozwojem medycyny naukowcom udało się opracować inne niż mechaniczne, bardziej nowoczesne metody antykoncepcji, które prawidłowo stosowane mogą skutecznie chronić przed nieplanowaną ciążą. Dotyczy to

jednak kobiet, gdyż dostępna antykoncepcja dla mężczyzn ogranicza się do prezerwatyw, inwazyjnej wazektomii oraz wstrzemięźliwości seksualnej [1]. Mały wybór wśród produktów do antykoncepcji dla mężczyzn powoduje, że odpowiedzialność za antykoncepcję oraz ewentualne wystąpienie skutków ubocznych ponoszą kobiety.

2. Antykoncepcja dla mężczyzn

2.1. Prezerwatywy

Prezerwatywy męskie są zaliczane do barierowych środków antykoncepcyjnych². Uważa się je za najstarszą metodą antykoncepcji przeznaczoną dla mężczyzn. Używali ich już Starożytni Egipcjanie i Rzymianie, którzy mieli wykonywać je z jelit zwierzęcych. Pod koniec XIX wieku były najpopularniejszą metodą antykoncepcji. Od początku XX wieku większość prezerwatyw wykonywano z gum lateksowych¹⁵.

Obecnie prezerwatywy są najczęściej stosowaną metodą antykoncepcji wśród mężczyzn¹⁶. Ich zaletą jest duża dostępność - można je kupić bez recepty w każdej aptece a nawet zwykłym sklepie spożywczym¹⁸. Prezerwatywy są również stosunkowo tanie i łatwe w użyciu. Możliwe, iż to właśnie te cechy spowodowały, że prezerwatywy męskie stały się najczęściej wybieraną metodą antykoncepcji wśród chłopców i dziewcząt poniżej 18 roku życia. Badanie przeprowadzone w latach 2006 – 2010 w Stanach Zjednoczonych wykazało, że 80% dorastających mężczyzn i 68% dorastających kobiet korzystało z prezerwatyw męskich przy swoim pierwszym stosunku płciowym.

Kolejną niepodważalną zaletą stosowania prezerwatyw jest zmniejszenie ryzyka przeniesienia wirusa HIV, kiły i innych chorób przenoszonych drogą płciową (STD)^{3, 4, 5, 15}. Uważa się, że ich skuteczność w antykoncepcji waha się pomiędzy 64% a 97% w zależności od poprawności stosowania jednak według Światowej Organizacji Zdrowia konsekwentne stosowanie męskich prezerwatyw ma wskaźnik 98% skuteczności w zapobieganiu nieplanowanym ciążom i infekcjom przenoszonym drogą płciową (STI)⁶. Wadą prezerwatyw mogą być: ryzyko pęknięcia lub ześlizgnięcia przy niewłaściwym użytkowaniu i możliwość wystąpienia reakcji alergicznej na lateks i/lub inne substancje wykorzystywane w produkcji prezerwatyw. Szacuje się, że około 4,3 % kobiet i mężczyzn może być uczulonych na lateks¹⁷, co stanowi w zasadzie jedyne przeciwwskazanie do stosowania prezerwatyw lateksowych jednak na rynku dostępne są już alternatywne prezerwatywy wykonane z poliuretanu.

Brak jest doniesień jakoby prezerwatywy lateksowe lub poliuretanowe miały być bardziej lub mniej wytrzymałe, jednak prezerwatywy poliuretanowe mogą być mniej skuteczne w antykoncepcji niż prezerwatywy lateksowe ze względu na ich luźniejsze dopasowanie, co może powodować częstsze zsuwanie się z prącia⁸. Niektórzy mężczyźni skarżą się na zmniejszone czucie podczas stosunku płciowego w prezerwatywach jednak producenci oferują w swoich produktach dodatki mające poprawić doznania seksualne samego użytkownika jak i partnerki lub partnera.

Kolejnym problemem może być fakt, iż założenie prezerwatywy musi nastąpić po osiągnięciu erekcji ale przed rozpoczęciem penetracji, co bywa trudne dla mężczyzn, szczególnie młodych oraz borykających się z zaburzeniami erekcji.

3. Wazektomia

Wazektomia jest zabiegiem chirurgicznym polegającym na przerwaniu drożności nasieniowodów¹⁷ i ma na celu uniemożliwienie dostania się plemników do ejakulatu.

Początki wazektomii sięgają pierwszej połowy XIX wieku, kiedy w 1827 roku Sir Ashley Cooper przeprowadził na psach w Wielkiej Brytanii pierwsze badania dotyczące wazektomii. W latach 60. ubiegłego wieku wazektomia zaczęła zyskiwać na popularności w Stanach Zjednoczonych, następnie w Europie i krajach trzeciego świata. Aktualnie jest uważana za najprostszą, najskuteczniejszą (ryzyko niepowodzeń jest mniejsze niż 1%)¹⁵ i najtańszą metodę antykoncepcji dla mężczyzn. W 2004 roku prawie 43 miliony mężczyzn na całym świecie poddało się zabiegowi wazektomii⁸. Jest ona czwartą najczęstszą metodą antykoncepcji po prezerwatywach, doustnych środkach antykoncepcyjnych i podwiązaniu jajowodów²¹. W Stanach Zjednoczonych 10% par korzysta z wazektomii jako jedynej metody antykoncepcji^{14, 15}. Istnieje wiele metod wykonywania wazektomii przy czym najpopularniejsze to wazektomia klasyczna (nacinana) i bez użycia skalpela. Wazektomię klasyczną wykonuje się poprzez pośrodkowe lub obustronne nacięcie moszny. Cały zabieg nie wymaga użycia żadnych specjalnych instrumentów¹⁹.

Wazektomia bez użycia skalpela (NSV) to wywodząca się z Chin metoda o znacznie mniejszej liczbie powikłań i krótszym czasie operacji⁹. Przy pomocy ostrego zacisku (dysektora) otwiera się skórę nad nasieniowodem, który jest przymocowany specjalnym zaciskiem pierścieniowym. Dysektor dzieli osłonkę nasieniowodu, a obrócenie dysektora i uchwycenie zaciskiem pozwala

na zwichnięcie nasieniowodu. Kolejnym etapem jest odcięcie nasieniowodów i obróbka ich końców. Bez względu na metodę, doświadczenie chirurga ma największy wpływ na częstość wystąpienia powikłań. Jedno z badań wykazało, że powikłania pojawiają się o jedną trzecią rzadziej jeśli chirurg wykonuje 50 zabiegów rocznie w porównaniu z chirurgiem, który wykonuje 10 zabiegów rocznie.

Do najczęstszych powikłań wazektomii zalicza się krwawienia, krwiaki i zespół bólu po wazektomii. Ryzyko powstania krwiaka może sięgać od do 20%. Zespół bólu po wazektomii (PVPS) to utrzymujący się przez co najmniej 3 miesiące od zabiegu ból moszny, który pojawia się u około 15% pacjentów. Patofizjologia tego bólu nie została jeszcze do końca poznana. Podobnie nie udało się jeszcze odpowiedzieć na pytanie czy zabieg wazektomii wiąże się ze zwiększonym ryzykiem raka prostaty. Wyniki badań są kontrowersyjne i nie pozwalają wysnuć jednoznacznych wniosków^{9, 13, 20}. Około 3-5% mężczyzn, którzy przeszli wazektomię decyduje się na jej odwrócenie (wazowazostomię)²². Najczęstszym uzasadnieniem jest śmierć dziecka, zmiana partnera lub sytuacji materialnej¹⁵. Poddanie się wazektomii nie gwarantuje bezpłodności od razu po zabiegu. Aby ją potwierdzić, konieczne jest wykonanie analizy nasienia po wazektomii (PVSA) po 8 - 12 tygodniach. Bada się wtedy obecność i ruchliwość plemników w ejakulacie. Za efekt pożądany uważa się azoospermie (brak plemników) lub <100 000 nieruchliwych plemników w ejakulacie (RNMS) i dopiero wtedy można bezpiecznie zrezygnować z innych metod antykoncepcji. Jeśli po 6 miesiącach od wykonania operacji w badaniu PVSA widoczne są jakiegokolwiek ruchliwe plemniki to wazektomię należy uznać za zakończoną niepowodzeniem. Ryzyko zajścia w ciążę po udanej wazektomii wynosi 1 na 2000. Powodem może być opóźniona rekanalizacja^{10, 11}.

3.1. Wstrzemięźliwość seksualna

Wstrzemięźliwość seksualna polega na powstrzymywaniu się od stosunku płciowego w dni płodne kobiety, które można wyliczyć na podstawie tzw. kalendarzyka małżeńskiego. Nie jest to jednak metoda na której warto polegać jako wyłączność. W przypadku odstawienia i okresowej abstynencji obserwuje się bowiem najwyższe wskaźniki niepowodzeń antykoncepcji⁷.

3.2. Stosunek przerywany

Stosunek przerywany bywa wymieniany jako metoda antykoncepcji dla mężczyzn. Szacuje się, że jest to metoda wybierana przez 3-5% par w Stanach Zjednoczonych. Nie jest to jednak metoda popierana przez środowisko medyczne ze względu na to, że deklarowany roczny odsetek niepowodzeń w przypadku par stosujących tylko tę metodę antykoncepcji wynosi 20-30%.¹⁵

4. Nowoczesna metoda antykoncepcji dla mężczyzn

Naukowcy opracowują nowoczesną metodę antykoncepcji dla mężczyzn, która mogłaby skutecznie chronić przed nieplanowaną ciążą, a jej działanie byłoby bezpieczne. Opracowanie tego typu środków wymaga ostrożności. Mechanizm działania miałby opierać się na odwracalnym zahamowaniu produkcji nasienia, zmniejszeniu liczby plemników przy jednoczesnym zachowaniu odpowiedniego poziomu testosteronu w organizmie mężczyzny.^{4, 23}

4.1. Żel antykoncepcyjny Nestorone® połączony z żelem testosteronowym

Rada Populacyjna (ang. Population Council) opracowała wraz z CCNT (ang. Contraceptive Clinical Trials Network) żel antykoncepcyjny zawierający testosteron i progestagen, który znajduje się w II fazie testów klinicznych¹.

Randomizowane, podwójnie zaślepienie badanie związane ze skutecznością antykoncepcji zostało przeprowadzone przez CCNT, a ośrodkami rekrutującymi mężczyzn do badania były: Los Angeles Biomedical Research Institute w Harbour-UCLA Medical Center w Los Angeles, CA oraz w Centrum Badań nad Rozrodem i Antykoncepcją w Los Angeles²⁴. Rekrutowano zdrowych mężczyzn w wieku od 18-50 r.ż. Mężczyźni, którzy brali udział w badaniu, aplikowali codziennie przez okres sześciu miesięcy żel Nestorone 8 mg na skórę brzucha oraz żel Testosteronowy 10 g na skórę barków. Badania wykazały, że u 89% mężczyzn stężenie plemników zmniejszyło się do poziomu ≤ 1 miliona/ml^{24, 25}.

Aplikacja dwóch żeli transdermalnych skutecznie obniża stężenie plemników u zdrowych mężczyzn jednak jest niepraktyczna²⁴ dlatego naukowcy postanowili połączyć dwa składniki i stworzyć jeden żel o miejscowym odwracalnym działaniu.

Particle Science opracowało żel Nestorone-Testosteron, który w 5 ml objętości zawierał 8,3 mg Nestorone oraz 62,5 mg testosteronu²⁴. Pacjenci zostali podzieleni na dwie grupy: grupę, która otrzymywała żel z samym

testosteronem (AndroGel®) oraz grupę, która testowała dwa żele połączone w jeden. Uczestnicy badania codziennie stosowali żel na oba ramiona. Po zastosowaniu preparatu uczestnicy nie powinni brać prysznicza przez co najmniej 2 godziny²⁴.

W grupie badawczej, która stosowała kombinację żelu Nestorone-Testosteron zauważono znaczne obniżenie stężenia hormonów folikulotropowego (FSH) i luteinizującego (LH) przez 28-dniowy okres stosowania. W grupie, która przyjmowała sam żel testosteronowy zauważono, że stężenia hormonu folikulotropowego obniżają się poniżej wartości wyjściowych w 7, 11, 25 i 28 dniu leczenia, ale nie zauważamy obniżenia tego hormonu w dniu 14 oraz 21. W tej samej grupie stężenia hormonu luteinizującego były obniżone poniżej wartości wyjściowych w 11, 25 i 28 dniu leczenia, ale nie w 7, 14 oraz 21 dniu²⁴.

Stężenia FSH i LH były znacząco obniżone w grupie stosującej żel Nestorone-Testosteron w porównaniu z grupą stosującą żel testosteronowy do 7 dnia leczenia i pozostawały na niskim poziomie przez 28-dniowy okres leczenia oraz do drugiego dnia rekonwalescencji (30 dzień badania)²⁴. Stężenie gonadotropin w surowicy powróciły do odpowiednich wartości ok. 56-go dnia²⁴.

Blisko 85% uczestników grupy Nestorone-Testosteron doświadczyło supresji FSH i LH w surowicy do stężeń ($\leq 1,0$ j.m./l), które zapobiegają nieplanowanej ciąży i mogą być skutecznie stosowane jako środek antykoncepcji hormonalnej. W grupie stosującej żel z testosteronem tylko 17% grupy obejmowały powyższe wyniki.

Istotny jest fakt, iż w grupie z żelem Nestorone-Testosteron stężenia FSH i LH były obniżone poniżej 1IU/l przez 2 dni od ostatniego użycia, co może świadczyć o skutecznej ochronie przed nieplanowaną ciążą również przy jednorazowym, ewentualnie dwukrotnym pominięciu dawki.

Skuteczność żelu jest również powiązana z czasem, przez który substancja powinna znajdować się na skórze barków. Prawdopodobnie zanim organizm wytworzy rezerwuuar w warstwie rogowej naskórka, w sytuacji zmycia żelu pod prysznicem lub wytarcia go w czasie krótszym niż 2 godziny od nałożenia preparatu, może substancji Nestorone-Testosteron we krwi mogą ulegać obniżeniu. W efekcie dochodzi do zmniejszenia skuteczności antykoncepcji, co wiąże się ze wzrostem ryzyka nieplanowanej ciąży²⁴.

Podczas badania nie wystąpiły żadne niebezpieczne dla zdrowia lub życia działania niepożądane.

W grupie żelu testosteronowego jeden z uczestników badania zgłosił obniżone libido oraz jeden zauważył oparzenie słoneczne w miejscu aplikacji

żelu. W grupie z żelem Nestorone-Testosteron jedna osoba miała suchą skórę w miejscu aplikacji oraz jedna osoba zgłosiła oparzenie słoneczne obejmujące miejsce aplikacji żelu. Osoby, które zgłaszały działania niepożądane wyzdrowiały do końca badania. Spośród wszystkich uczestników, żaden nie zrezygnował z dalszego testowania żelu z powodu zgłoszonych działań niepożądanych. 80% badanych uznało, że stosowałoby żel Nestrone-Testosteron do antykoncepcji, gdyby był dostępny w sprzedaży²⁴.

4.2. Doustna antykoncepcja hormonalna

Opracowywane są syntetyczne związki, które mogą być stosowane doustnie, raz dziennie np. 7 α -metylo-19-nortestosteron (MENT) i undekanian dimetandrolonu (DMAU).

4.2.1. MENT

Proces spermatogenezy może zostać zahamowany dzięki połączonemu działaniu testosteronu z progestagenem. W tym celu naukowcy opracowali lek - 7 α -metylo-19-nortestosteron (MENT), który jest syntetycznym androgenem odpornym na 5 α -reduktazę²⁶. 5 α -reduktaza jest enzymem, który bierze udział w metabolizmie steroidów, m.in. androgenów i estrogenów. MENT mógłby spełniać funkcję środka antykoncepcyjnego dla mężczyzn²⁷, jednak wymagana dawka wiązała się z różnymi działaniami niepożądanymi np. wzrostem hemoglobiny i hematokrytu^{26,27}.

Badania wykazują, że na początku leczenia, w pierwszych tygodniach stosowania MENT, wystąpiła gwałtowna supresja spermatogenezy. Po dwunastu tygodniach stosowania u pacjentów zaobserwowano spadek ilości plemników do mniej niż 1×10^6 /ml.

Po ośmiu tygodniach z powodu skutków ubocznych, m.in. spadku libido, wielu mężczyzn nie kontynuowało leczenia MENT. Oprócz obniżonego libido do skutków ubocznych zaliczono także wzrost skurczowego ciśnienia krwi.

Potencjalną zaletą stosowania 7 α -metylo-19-nortestosteronu może być pozytywny wpływ na działanie prostaty. Obecne dane wykazują spadek stężenia PSA w surowicy²⁶.

4.2.2. DMAU

Undekanian dimerandrolonu (DMAU) to środek antykoncepcyjny, który łączy działanie testosteronu oraz środka progestagenowego. Jest to pochodna 19-nortestosteronu, który wykazuje działanie zarówno androgenne jak i progestagenne²⁸.

Badania, w których wzięło udział 82 zdrowych mężczyzn, wykazały, że zażywana dawka o wartości 400 mg/dobę była bezpieczna dla zdrowia, a uczestnicy dobrze tolerowali substancję. Wykazano, że obniża ona poziom testosteronu, poziom hormonu luteinizującego oraz hormonu folikulotropowego do stężenia chroniącego przed nieplanowaną ciążą. Pacjenci zobowiązani byli przyjmować preparat wraz z pokarmem^{29, 30}.

Skutki uboczne, które odnotowano w trakcie badania dotyczyły przyrosty masy ciała, wzrostu hematokrytu oraz zmniejszenia cholesterolu HDL³¹.

4.3. Technika RISUG®

(ang. Reversible inhibition of sperm under guidance)

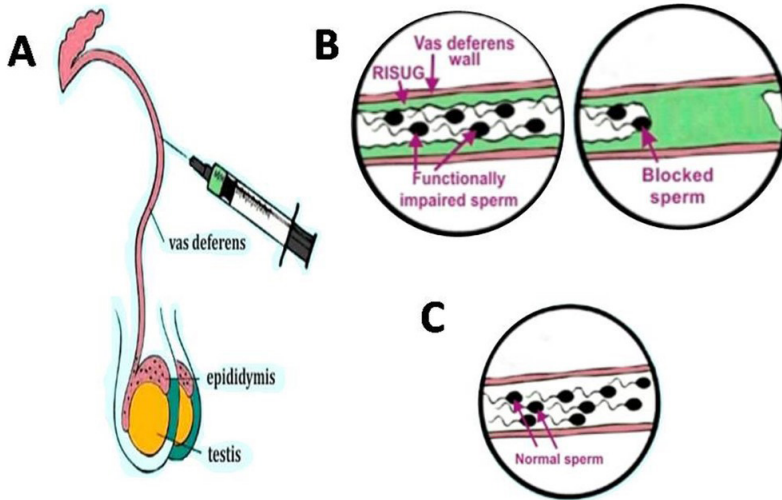
Technika RISUG opiera się na iniekcji do nasieniowodu środka antykoncepcyjnego, którym jest kopolimer SMA (RISUG) blokujący nasieniowód³³. RISUG jest syntetyzowany przez rozpuszczenie 60 mg SMA w 120 µl DMSO.

Po 72 godzinach od wstrzyknięcia, kopolimer SMA tworzy dodatnio naładowane cząsteczki osiadające na ścianie nasieniowodu. Dodatni ładunek powoduje zakwaszenie środowiska, co w konsekwencji uszkadza akrosomy i uniemożliwia plemnikom zapłodnienie komórki jajowej kobiety³³. Wykazano, że RISUG blokuje światło nasieniowodu i przepływ plemników. Toksyczność polimeru SMA została oceniona na gryzoniach i wykazała, że związek ten może być bezpiecznie stosowany³⁴. Badania kliniczne wykazują, iż azospermia występuje u pacjentów po 4 tygodniach od zastosowania RISUG i utrzymuje się przez wiele lat³³.

W przypadku, gdy mężczyzna decyduje się na potomstwo uprzednio wstrzyknięty kopolimer SMA zostaje rozpuszczony za pomocą roztworu DMSO/NAHCO₃³³.

Badania kliniczne fazy I wykazały po dwuletniej obserwacji, że zastosowany RISUG nie prowadzi do skutków ubocznych u pacjentów poddanych procedurze.

RISUG znajduje się obecnie w III fazie badań klinicznych w Indiach³³.



Ryc.1. Schemat przedstawia: (A) Wstrzyknięcie RISUG za pomocą mikrostrzykawki do wyeksponowanej dystalnej części nasieniowodu. (B) RISUG pokrywa ścianę nasieniowodu, blokując ruch plemników. (C) Odblokowanie nasieniowodu za pomocą wstrzykniętej substancji DMSO/NAHCO₃ – składnik rozpuszczający RISUG ³².

5. Podsumowanie

Obecnie dostępne formy antykoncepcji dla mężczyzn ograniczają się do prezerwatyw, które ze względu na dyskomfort w trakcie stosunku często są odrzucane przez mężczyzn na rzecz stosunku przerywanego oraz wazektomii, która choć jest bardzo skuteczna, nie zawsze jest odwracalna, dlatego nie mogą się na nią zdecydować osoby, które w przyszłości planują założenie rodziny.

Naukowcy próbują opracować nowe środki antykoncepcyjne, jednak jest to skomplikowane, gdyż wiąże się to z małą ilością ochotników, którzy godzą się na przeprowadzenie badań, niskim zainteresowaniem koncernów farmaceutycznych oraz wieloma skutkami ubocznymi.

Obiecujące są wyniki badań przeprowadzone z użyciem żelu antykoncepcyjnego Nestorone połączonego z żelem testosteronowym oraz zastosowanie metody RISUG.

Opracowanie doustnej antykoncepcji dla mężczyzn wymaga wielu badań naukowych i prawdopodobnie jeszcze przez długi czas nie będzie dostępna na rynku do sprzedaży.

Referencje

1. Reynolds-Wright JJ, Cameron NJ, Anderson RA. Will Men Use Novel Male Contraceptive Methods and Will Women Trust Them? A Systematic Review. *J Sex Res.* 2021;58(7):838-849. doi:10.1080/00224499.2021.1905764
2. Porche DJ. Condom effectiveness. *J Assoc Nurses AIDS Care.* 1998;9(3):91-94. doi:10.1016/S1055-3290(98)80023-X
3. Billow JA. Choosing condoms. *Am Pharm.* 1992;NS32(9):55-58. doi:10.1016/s0160-3450(15)31005-9
4. Festin MPR. Overview of modern contraception. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2020;66:4-14. doi:10.1016/j.bpobgyn.2020.03.004
5. Apter D. Contraception options: Aspects unique to adolescent and young adult. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2018;48:115-127. doi:10.1016/j.bpobgyn.2017.09.010
6. González-Hernández AM, Escobar-Estupinan JL, Vallejo-Medina P. Condom Use Errors and Problems in a Sample of Young Colombian Adults. *J Sex Res.* 2020;57(9):1217-1224. doi:10.1080/00224499.2020.1728207
7. Bradley SEK, Polis CB, Bankole A, Croft T. Global Contraceptive Failure Rates: Who Is Most at Risk?. *Stud Fam Plann.* 2019;50(1):3-24. doi:10.1111/sifp.12085
8. Kreuzzig-Langefeld T, Lellig E, Hinz P, Zilg F. Vasektomie : Aktuelle Informationen [Vasectomy : Current information]. *Urologe A.* 2021;60(4):523-532. doi:10.1007/s00120-021-01494-9
9. Yang F, Li J, Dong L, et al. Review of Vasectomy Complications and Safety Concerns. *World J Mens Health.* 2021;39(3):406-418. doi:10.5534/wjmh.200073
10. Velez D, Pagani R, Mima M, Ohlander S. Vasectomy: a guidelines-based approach to male surgical contraception. *Fertil Steril.* 2021;115(6):1365-1368. doi:10.1016/j.fertnstert.2021.03.045
11. Johnson D, Sandlow JI. Vasectomy: tips and tricks. *Transl Androl Urol.* 2017;6(4):704-709. doi:10.21037/tau.2017.07.08

12. Abbe CR, Page ST, Thirumalai A. Male Contraception. *Yale J Biol Med.* 2020 Sep 30;93(4):603-613. PMID: 33005125; PMCID: PMC7513428.
13. Minhaj Siddiqui M, Giovannucci EL, Mucci LA. Can there be consensus on whether vasectomy is a prostate cancer risk factor?. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2021;24(4):939-941. doi:10.1038/s41391-021-00400-w
14. Nya-Ngatchou JJ, Amory JK. New approaches to male non-hormonal contraception. *Contraception.* 2013;87(3):296-299. doi:10.1016/j.contraception.2012.08.016
15. Amory JK. Development of Novel Male Contraceptives. *Clin Transl Sci.* 2020;13(2):228-237. doi:10.1111/cts.12708
16. Ross J, Hardee K. USE OF MALE METHODS OF CONTRACEPTION WORLDWIDE. *J Biosoc Sci.* 2017;49(5):648-663. doi:10.1017/S0021932016000560
17. Dominiak Z, Huras H, Kręcisz P, Krzeszowski W, Szymański P, Czarnecka K. Promising results in development of male contraception. *Bioorg Med Chem Lett.* 2021;41:128005. doi:10.1016/j.bmcl.2021.128005
18. Beksinska M, Wong R, Smit J. Male and female condoms: Their key role in pregnancy and STI/HIV prevention. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2020;66:55-67. doi:10.1016/j.bpobgyn.2019.12.001
19. Rajfer J, Bennett CJ. Vasectomy. *Urol Clin North Am.* 1988;15(4):631-634.
20. Baboudjian M, Rajwa P, Barret E, et al. Vasectomy and Risk of Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Eur Urol Open Sci.* 2022;41:35-44. Published 2022 May 19. doi:10.1016/j.euros.2022.04.012
21. Smith-Harrison LI, Smith RP. Vasectomy reversal for post-vasectomy pain syndrome. *Transl Androl Urol.* 2017;6(Suppl 1):S10-S13. doi:10.21037/tau.2017.04.37
22. Kirby EW, Hockenberry M, Lipshultz LI. Vasectomy reversal: decision making and technical innovations. *Transl Androl Urol.* 2017;6(4):753-760. doi:10.21037/tau.2017.07.22

23. [https://www.popcouncil.org/research/ nestorone-testosterone-transdermal-gel-for-male-contraception](https://www.popcouncil.org/research/nestorone-testosterone-transdermal-gel-for-male-contraception)
24. Anawalt BD, Roth MY, Ceponis J, et al. Combined nestorone-testosterone gel suppresses serum gonadotropins to concentrations associated with effective hormonal contraception in men. *Andrology*. 2019;7(6):878-887. doi:10.1111/andr.12603
25. Ilani N, Roth MY, Amory JK, et al. A new combination of testosterone and nestorone transdermal gels for male hormonal contraception. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(10):3476-3486. doi:10.1210/jc.2012-1384
26. Walton MJ, Kumar N, Baird DT, Ludlow H, Anderson RA. 7alpha-methyl-19-nortestosterone (MENT) vs testosterone in combination with etonogestrel implants for spermatogenic suppression in healthy men. *J Androl*. 2007;28(5):679-688. doi:10.2164/jandrol.107.002683
27. von Eckardstein S, Noe G, Brache V, et al. A clinical trial of 7 alpha-methyl-19-nortestosterone implants for possible use as a long-acting contraceptive for men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(11):5232-5239. doi:10.1210/jc.2002-022043
28. Gava G, Meriggiola MC. Update on male hormonal contraception. *Ther Adv Endocrinol Metab*. 2019;10:2042018819834846. Published 2019 Mar 14. doi:10.1177/2042018819834846
29. Attardi BJ, Hild SA, Reel JR. Dimethandrolone undecanoate: a new potent orally active androgen with progestational activity. *Endocrinology*. 2006;147(6):3016-3026. doi:10.1210/en.2005-1524
30. Thirumalai A, Ceponis J, Amory JK, et al. Effects of 28 Days of Oral Dimethandrolone Undecanoate in Healthy Men: A Prototype Male Pill. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019;104(2):423-432. doi:10.1210/jc.2018-01452
31. Ayoub R, Page ST, Swerdloff RS, et al. Comparison of the single dose pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of two novel oral formulations of dimethandrolone undecanoate (DMAU): a potential oral, male contraceptive. *Andrology*. 2017;5(2):278-285. doi:10.1111/andr.12303

32. Khilwani B, Badar A, Ansari AS, Lohiya NK. RISUG[®] as a male contraceptive: journey from bench to bedside. *Basic Clin Androl.* 2020;30:2. Published 2020 Feb 13. doi:10.1186/s12610-020-0099-1
33. Misro MM, Kaur H, Mahajan S, Guha SK. An intravasal non-occlusive contraceptive device in rats. *J Reprod Fertil.* 1982;65(1):9-13. doi:10.1530/jrf.0.0650009
Misro MM, Kaur H, Mahajan S, Guha SK. An intravasal non-occlusive contraceptive device in rats. *J Reprod Fertil.* 1982;65(1):9-13. doi:10.1530/jrf.0.0650009

TERAPIA KOMÓRKAMI MACIERZYSTYMI W CHOROBYCH JELITA CIENKIEGO ORAZ GRUBEGO

Maciej Smreczak, Julia Cieśla, Kinga Dworak, Natalia Trędotą

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

Abstrakt: Choroby jelita cienkiego oraz grubego są jednymi z najczęściej występujących na całym świecie. Mimo lepszego ich zrozumienia oraz postępów w terapii tych schorzeń, nadal pozostają one znacznym problemem epidemiologicznym. Terapia komórkami macierzystymi jest prężnie rozwijającą się dziedziną medycyny, która niesie ze sobą obiecujące perspektywy w leczeniu wielu chorób, w tym jelita cienkiego i grubego. Przeprowadzono dotychczas szereg badań dotyczących możliwości terapeutycznych m.in. mezenchymalnych komórek macierzystych (MSCs) czy komórek macierzystych jelita (ISCs). Badania te potwierdziły rolę komórek macierzystych w skutecznej terapii chorób takich jak Choroba Leśniowskiego - Crohna (CD), Martwicze zapalenie jelit (NEC) czy wrzodziejące zapalenie jelita grubego (UC). Duże nadzieje pokłada się również w stworzeniu funkcjonalnych fragmentów jelit metodami inżynierii tkankowej z wykorzystaniem komórek macierzystych. Artykuł ten ma na celu zebranie dotychczasowych badań opisujących terapeutyczne możliwości wykorzystania komórek macierzystych w chorobach jelita grubego oraz cienkiego.

Słowa kluczowe: jelito grube, jelito cienkie, komórki macierzyste

Abstract: Disease of the small and large intestine are one of the most common diseases in the world. Despite their better understanding and advances in the treatment of these diseases, they still remain a significant epidemiological problem. Stem cell therapy is a thriving field of medicine with promising prospects in the treatment of many diseases, including the small and large intestine. So far, a number of studies have been carried out on therapeutic possibilities, including mesenchymal stem cells (MSCs) or intestinal stem cells (ISCs). These studies confirmed the role of stem cells in the effective treatment of diseases such as Crohn's disease (CD), Necrotizing enterocolitis (NEC) or ulcerative colitis (UC). High hopes are also placed on the creation of functional intestinal fragments by tissue engineering using stem cells. This article aims to collect the current research describing the therapeutic possibilities of using stem cells in diseases of the large and small intestine.

Key words: small intestine, large intestine, stem cells

1. Wstęp

Pierwsze wykorzystanie terminu „komórka macierzysta”, czy oryginalnie „Stammzelle“ pochodzi z końca XIX wieku. Zostało ono użyte w roku 1877 przez niemieckiego darwinistę Ernsta Haeckela by opisać zapłodnioną komórkę jajową jako komórkę, z której pochodzą wszystkie inne komórki organizmu zwierzęcego lub ludzkiego. Hematolog Artur Pappenheim rozwinął tę definicję w czasie swoich badań nad komórkami płazów. Jego koncepcja komórki macierzystej dotyczyła komórki embrionalnej, która miała potencjał do różnicowania się w różne linie komórkowe i w ten sposób do tworzenia podstaw dla różnych typów komórek krwi, tkanek ciała i komórek zarodkowych. Próbuąc leczyć różne postaci białaczki posługiwał się tezą, że mielocyty i limfocyty pochodzą z tej samej „*multipotencjalnej komórki macierzystej limfomieloblastu*”¹.

Dzisiejsza definicja komórek macierzystych obejmuje komórki, które posiadają nieskończoną zdolność do dzielenia się i potencjał do różnicowania się w różne wyspecjalizowane typy komórek². Dotychczas zbadano już komórki macierzyste na tyle, że ze względu na ich różne cechy, można je podzielić na 5 oddzielnych grup³. Należą do nich: embrionalne komórki macierzyste (*ang. embryonal stem cells*, ECS), bardzo małe komórki macierzyste podobne do embrionów (*ang. very small embryonic like stem cells*, VSEL), komórki macierzyste transferu jądra (*ang. nuclear transfer stem cells*, NTSC), przeprogramowane komórki macierzyste (*ang. reprogrammed stem cells*, RSC) oraz dorosłe komórki macierzyste (*ang. adult stem cells*, ASC).

W terapii chorób jelit najczęściej wykorzystywane są mezenchymalne komórki macierzyste (*ang. mesenchymal stem cells*, MSC). MSC są komórkami multipotencjalnymi^{4,5}, a więc ich różnicowanie ogranicza się do wytwarzania linii komórkowych odpowiednich do ich lokalizacji⁴. Ich zastosowanie w medycynie regeneracyjnej umożliwia modulację chorób nieuleczalnych⁶. MSCs posiadają zasadniczą przewagę nad RSC oraz ECS, ponieważ ich wykorzystanie pozbawione jest problemów etycznych związanych z potrzebą pobrania ECS z wewnętrznej masy komórkowej zarodka⁷⁻⁹ oraz problemów związanych z systemem zgodności tkankowej^{9,10}. Ponadto, użycie MSCs charakteryzuje się minimalnym ryzykiem związanym z nowotworzeniem, które zostało wskazane m.in. dla ESCs⁹⁻¹¹. Jest to jednak kwestia dyskusyjna, ponieważ badania przeprowadzone na zwierzętach wskazują na proliferacyjny wpływ MSC na komórki nowotworowe^{12,13}. Jednakże, zaletą MSCs jest relatywna łatwość pobierania⁶ oraz możliwość pozyskania z wielu tkanek takich

jak tkanka tłuszczowa¹⁴, szpik kostny¹⁵, pępowina¹⁶, krew menstruacyjna¹¹. Ponadto, posiadają one znaczną zaletę związaną z możliwością ich autologicznego przeszczepu, co sprawia, że znacząco obniżone jest ewentualne prawdopodobieństwo wystąpienia powikłań po ich zastosowaniu w porównaniu z zastosowaniem komórek allogenicznych⁵. Jednak starzenie się znacząco ogranicza ich potencjał do proliferacji i różnicowania, dlatego ich autologiczne użycie jest mniej skuteczne w przypadku ludzi starszych⁶. Zostały już jednak poczynione próby związane z opóźnieniem starzenia się MSC¹⁷⁻¹⁹.

2. Wykorzystanie komórek macierzystych w terapii chorób jelit

2.1 Perforacje jelit

Perforacje powstające ze wcześniejszych ran oraz uszkodzeń w układzie pokarmowym mogą się ujawnić zarówno na skutek przebiegu choroby jak i urazów mechanicznych. Zdarzenia perforacji podczas operacji przewodu pokarmowego są jednymi z najniebezpieczniejszych, ponieważ prowadzą do dużej śmiertelności²⁰. Potencjalnie perforacja może prowadzić do zapalenia otrzewnej i tym samym do sepsy²¹. Manieri i in. przeprowadzili badania, w których sprawdzono regeneracyjne właściwości mezenchymalnych komórek macierzystych w przebiegu regeneracji okrężnicy na modelu mysim. W tym celu sztucznie wywołano u nich ogniskowe rany w błonie śluzowej okrężnicy, które rozwinęły się do postaci wrzodów przenikających przez zewnętrzną ścianę mięśni gładkich. W badaniu tym dowiedziono, że wstrzyknięte do uszkodzonej błony śluzowej MSC zapobiegały penetracji wrzodów do zewnętrznej ściany jelita poprzez stymulowanie angiogenezy zależnej od VEGF²². Terapia komórkami macierzystymi w przypadku wrzodziejącego jelita grubego może być bardzo dobrą alternatywą dla osób posiadających niedobór czynników takich jak PGI₂, która stymuluje ekspresję VEGF oraz branie przewlekle niesteroidowych leków przeciwzapalnych i inhibitorów VEGF²².

2.2 Uszkodzenia na skutek radioterapii

Niezwykłe częste uszkodzenia jelit są także spowodowane poprzez radioterapię zmian złośliwych w obrębie miednicy oraz brzucha. Pomimo, że radioterapia jest skutecznym środkiem w walce z tymi zmianami, to niektóre skutki popromienne takie jak niedokrwienie jelit, owrzodzenie błon śluzowych, czy

nawet martwica spowodowane są nieuniknione^{23,24}. Badania przeprowadzone na modelach szczurzych w poszukiwaniu odpowiedniego leczenia przebytej radioterapii przez Semont i in. pokazało, że dożylnie podanie MCS stymuluje endogenne komórki progenitorowe gospodarza stymulując tym samym procesy regeneracyjne w owrzodzonym jelicie po radioterapii²⁵. Podobne badanie wykonane przez Gong i in. na modelach mysich miało na celu porównanie jelita myszy napromieniowanych dawką 14 Gy. Jedna grupa myszy była leczona solą fizjologiczną buforowaną fosforanem (PBS), a inna została poddana terapii MSC. Po 3,5 dniach wyniki wskazywały na ogólną dłuższą przeżywalność myszy poddanej terapii MSC, posiadały one dłuższe jelito cienkie, lepiej zachowaną strukturę krypt oraz kosmków. Po 5 dniach długości jelit myszy poddanych terapii MSC były takiej samej długości, jak te należące do myszy niepoddanych działaniu promieniowania. Zaobserwowano też częściową regenerację błony śluzowej w przeciwieństwie do myszy poddanych leczeniem PBS²⁶.

2.3 Nieswoiste zapalenie jelit

Nieswoiste zapalenie jelit jest chorobą charakteryzującą się zwiększoną nieprawidłową aktywnością limfocytów T oraz niepohamowaną odpowiedzią immunologiczną na antygeny znajdujące się wewnątrz światła jelita^{27,28}. Wyróżnia się dwa rodzaje nieswoistego zapalenia jelit: wrzodziejące zapalenie jelita grubego oraz choroba Leśniowskiego - Crohna. Obydwie postacie tej choroby niosą ze sobą duże ryzyko zachorowalności oraz śmiertelności. Lekki immunomodulujące, które wprowadzane są w przebiegu nieswoistego zapalenia jelit są skuteczne w kontroli przebiegu choroby. Jednakże, są one drogie, mogą wykazywać efekt toksyczny oraz nie są skuteczne u każdego chorego, co przyczynia się do nawrotów choroby²⁷.

Choroba Leśniowskiego - Crohna (*ang. Crohn's Disease, CD*) charakteryzuje się przewlekłym, niekontrolowanym zapaleniem błony śluzowej jelita z występującymi zmianami ziarniniakowymi oraz odcinkowym przezściennym zapaleniem błony śluzowej. Zmiany mogą dotyczyć dowolnego odcinka przewodu pokarmowego. Bardzo prawdopodobnym jest, że na wystąpienie choroby duży wpływ mają czynniki genetyczne²⁹. W badaniu przeprowadzonym przez Panés i in. zbadano właściwości regeneracyjne autologicznie pobranych komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej (Cx601) w terapii choroby Leśniowskiego - Crohna. Autorzy w swoim badaniu stwierdzili, że efekty kliniczne powiązane z zastosowaniem Cx601 są lepsze w porównaniu

z wynikami grupy kontrolnej niepoddanej terapii komórkami macierzystymi. Ponadto, po okresie jednego roku znacznie większy odsetek pacjentów z grupy eksperymentalnej osiągnął stan remisji choroby²⁹.

Jednym z powikłań choroby Leśniowskiego - Crohna dotyczącym aż do 30 % pacjentów jest rozwinięcie się przetok między przewodem pokarmowym, a innymi tkankami. W przypadku klinicznym opisanym przez Moniuszko i in. przedstawiono przypadek kobiety, którą przyjęto do szpitala ze względu postępującą infekcję dróg moczowych. Krytyczny stan pacjentki związany był z obecną chorobą Leśniowskiego - Crohna od 12 lat. Choroba, z powodu niepoddawania się klinicznej remisji pod wpływem immunosupresantów, sterydów oraz leków przeciwko TNF sprawiła, że pacjentka musiała zostać poddana wielu laparotomiom w przeszłości. Kobieta ponadto była niedożywiona, obecna była u niej przetoka jelitowo-pęcherzową. Autorzy mając na uwadze zły stan zdrowia pacjentki zdecydowali podjąć się próbę zastosowania alternatywnej metody leczenia związanej z wykorzystaniem komórek regeneracyjnych pochodzących z tkanki tłuszczowej (*ang. adipose tissue-derived regenerative cells*, ADRC). Podczas operacji zamknięcia przetoki jelitowo pęcherzowej dodatkowo wstrzyknięto autologiczne ADRC pobrane 2 godziny przed operacją. Jak podają autorzy, zauważono skuteczne zamknięcie przetoki, co było pierwszym takim zaobserwowanym przez autorów zdarzeniem w przypadku pacjenta w stanie krytycznym obciążonym dużym ryzykiem powikłań wynikających z przeprowadzenia leczenia chirurgicznego³⁰.

Wrzodziejące zapalenie jelita grubego (*ang. Ulcerative colitis*, UC) uważa się za chorobę o złożonym podłożu etiologicznym na które składają się m.in. czynniki środowiskowe, infekcje, brak równowagi immunologicznej między regulatorowymi, a efektorowymi limfocytami T. Może ona dotyczyć dowolnego odcinka okrężnicy. Przebieg UC jest nawracający oraz ma zmienny charakter - choroba może być bezobjawowa i charakteryzować się łagodnym przebiegiem, ale także może prowadzić do powikłań w postaci rozległego zapalenia okrężnicy²³. W badaniu przeprowadzonym przez Hu i in. sprawdzono skuteczność terapii wrzodziejącego zapalenia jelita grubego mezenchymalnymi komórkami zrębowymi pozyskanymi z pępownicy. Porównano efekty leczenia grupy kontrolnej z grupą eksperymentalną, której dodatkowo podczas leczenia UC dwa razy wykonano wlewy zawierające te komórki macierzyste. Okres obserwacji po wykonanym leczeniu trwał jeszcze przez dwa lata i wyciągnięto z niego wnioski, że wszystkie oceny -zarówno endoskopowe, patologiczne, wyniki skali Mayo oraz subiektywne oceny przebiegu choroby wynikające z wypełnienia kwestionariusza IBDQ uległy znacznej poprawie w porównaniu

z wynikami uzyskanymi z grupy kontrolnej nie poddanej dodatkowo terapii komórkami macierzystymi³¹.

Gonzalez-Rey i in. wywołali na modelach mysich przewlekłe zapalenie okrężnicy siarczanem dekstranu oraz sepsę na modelach mysich poprzez podwiązanie oraz nakłucie kątnicy lub wstrzyknięcie endotoksyn³². Zabieg ten na celu miał ocenę skuteczności terapii z wykorzystaniem Mezenchymalnych komórek macierzystych pozyskanych z tkanki tłuszczowej (*ang. adipose derived stem cells*, ASCs). Doświadczenie to wykazało, że dożylnie podanie ASCs spowodowało zniesienie utraty masy ciała, biegunki, zwiększyło przeżywalność oraz zmniejszyło histopatologiczne nasilenie zapalenia okrężnicy³². Ponadto, podanie komórek macierzystych obniżyło stężenia mediatorów prozapalnych i osłabiło aktywację komórek Th1 zarówno w okrężnicy, jak i w drenujących te obszary węzłach chłonnych, co przyczyniło się do ich ochrony przed ciężkim przebiegiem sepsy³². W innym, podobnym badaniu na modelach mysich wykonanym przez Sala i in. wykazano bardzo podobne rezultaty przy użyciu MSC pozyskanych ze szpiku kostnego (*ang. bone marrow mesenchymal stem cells*, BM-MSC). Poprzez tworzenie agregatów w otrzewnej oraz wydzielanie cząsteczek o funkcjach immunomodulujących takich jak FOXP-3 czy IL-10 terapia BM-MSC zmniejszyła nasilenie zapalenia okrężnicy, zwiększyła średnią masę ciała myszy oraz zmniejszyła stężenie markerów zapalnych jelita³³.

2.4 Martwicze zapalenie jelit

Martwicze zapalenie jelit (*ang. necrotising enterocolitis*, NEC) jest chorobą dotyczącą w przeważającej większości noworodki, a w szczególności wcześniaki. Charakteryzuje się dużym odsetkiem zachorowalności oraz wysokim wskaźnikiem śmiertelności³⁴. Etiologia oraz przyczyny wystąpienia tej choroby nie są jasne, choć spekuluje się, że wpływ na jej wystąpienie mają czynniki takie jak karmienie mlekiem modyfikowanym, nieprawidłowa kolonizacja bakteryjna, czy czynniki genetyczne³⁵.

W badaniu przeprowadzonym na noworodkowych modelach szczurzych wykonanych przez Tayman i in. sprawdzono potencjał terapeutyczny egzogenych mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących ze szpiku kostnego (BM-MSC) w leczeniu NEC. Szczury podzielono na 2 grupy kontrolne (jedna grupa miała wywołane NEC, lecz nie została poddana wpływowi BM-MSC oraz druga bez wywołanego NEC, lecz poddana wpływowi BM-MSC) oraz grupę eksperymentalną. Martwicze zapalenie jelit zostało sztucznie wyindukowane poprzez żywienie dojelitowe, stres związany z zimnem

oraz narażenie na hipoksję - hiperoksję. Z przeprowadzonego eksperymentu wynika, że osobniki, którym zostały podane dootrzewnowo DM-MSc w porównaniu z grupą kontrolną z NEC wykazywały lepszy przyrost masy, poprawę przebiegu klinicznego choroby oraz posiadały znacząco ograniczone uszkodzenia w jelitach, co zostało wykazane w badaniach histopatologicznych²³. W innym badaniu dotyczącym terapii NEC wykonanym przez Zhou i in. sprawdzono możliwości neuroregeneracyjne jelita, także na modelach szczurzych, z wykorzystaniem nerwowych komórek macierzystych (ang. *Neural stem cells*, NSC). Wszczepienie NSC doprowadziło do znacznej poprawy ruchliwości jelit, zachowania integralności jelit z wydłużeniem kosmków oraz znacznego zwiększenia przeżywalności grupy eksperymentalnej w porównaniu z grupą kontrolną³⁶.

2.5 Rekonstrukcje jelit

Dużym problemem dla współczesnej medycyny jest kwestia wypełniania ubytków w uszkodzonych jelitach. Nadzieje związane z tworzeniem sztucznych fragmentów jelit, które mogłyby być potencjalnie przeszczepione pacjentom z uszkodzeniami są związane z jelitowymi komórkami macierzystymi (ang. *intestinal stem cells* - ISC). Zgodnie z ostatnimi doniesieniami słusznym podejściem wydaje się być stworzenie funkcjonalnych rusztowań (ang. *Scaffold*) dla ISC, które wzmacniałyby proliferację i różnicowanie ISC. Prototyp rusztowania stworzonego z syntetycznego niebiodegradowalnego hydrożelu 3D został zaprezentowany przez Dosh i in. Zgodnie z tym modelem w hodowli możliwe było otrzymanie komórek, które wykazywały cechy enterocytów, komórek kubkowych, enteroendokrynnych i komórek Panetha³⁷. Z drugiej strony, możliwe jest również użycie biodegradowalnych rusztowań poliestrowych w celu wczepienia organoidów pochodzących z ISC. W tym przypadku skład polimeru, rozpiętość włókien rusztowania, wielkość porów i rodzaj technik wykorzystanych w celu stworzenia takiego rusztowania odgrywają znaczącą rolę. Najlepszym efektem w stymulowaniu powstawania błony śluzowej jelita z ISC wśród poliestrowych rusztowań charakteryzują się konstrukty z włókniny PGA potraktowanych kwasem poli-L-mlekowym³⁸. Dobrą skutecznością we wzmacnianiu wzrostu ISC charakteryzuje się również rusztowanie rurowe zaprezentowane przez Shaffiey i in. Kokultura IPSc z miofibroblastami, makrofagami i bakteriami probiotycznymi wzmocniła strukturę i poziom różnicowania IPSc. Badanie to zostało przeprowadzone z użyciem mysich i ludzkich IPSc, a efektywność scaffoldu została oceniona na modelach psich

po mukozektomii odbytnicy. Potrzebne jest zatem przełożenie tych badań na organizm ludzki i sprawdzenie czy rusztowanie to równie dobrze sprawdzi się w regeneracji ludzkiej błony śluzowej przewodu pokarmowego³⁹. W konstruowaniu scaffoldów należy wziąć pod uwagę przede wszystkim właściwości fizjologicznego nabłonka jelitowego, którego błona śluzowa zbudowana jest ze złożonego systemu kosmków i krypt, a także niszy komórek macierzystych odpowiedzialnych za ich ciągłą przebudowę. Rusztowanie zaprezentowane przez Creff i in. jako pierwsze odwzorowuje strukturę 3D nabłonka jelitowego. Składa się ono z fotopolimeryzowanego hydrożelu, którego zadaniem jest wspieranie proliferacji ISC^s⁴⁰. Pomimo wielu prób stworzenia funkcjonalnych "sztucznych" jelit metodami inżynierii tkankowej z użyciem rusztowań i zaszczepienia na nich IPSc problemem wciąż wydaje się odwzorowanie właściwości mechanicznych macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. Extracellular matrix, ECM), które wpływają na proliferację i różnicowanie ISC^s. W kolejnych próbach opracowania rusztowań dla ISC^s należy wziąć pod uwagę interakcje pomiędzy ISC^s a ECM, aby z jak największą dokładnością odwzorować naturalne środowisko wzrostu i proliferacji ISC^s⁴¹.

Konieczne jest zbadanie błony podśluzowej jelita cienkiego (ang. small intestine submucosa, SIS) jako naturalnego rusztowania dla komórek macierzystych. Próby wykorzystania SIS w inżynierii tkankowej wykonywane były między innymi w celu rekonstrukcji łąkotki in vitro. W tym celu hodowano komórki łąkotki i komórki macierzyste pochodzące z błony maziowej na błonie podśluzowej jelita cienkiego. Konstruktor ten wzmagal proliferację i różnicowanie komórek macierzystych⁴². Podobnie, Du i in. Wykorzystali SIS do rekonstrukcji tchawicy z użyciem autologicznych mezenchymalnych komórek macierzystych na modelu królika, co może być nową, obiecującą strategią w leczeniu schorzeń takich jak zwężenie tchawicy⁴³. Rolę SIS zbadano również w próbach rekonstrukcji dróg moczowych z użyciem komórek nabłonka dróg moczowych i komórek mięśni gładkich zróżnicowanych z komórek macierzystych pochodzących z moczu (ang. urine-derived stem cells, USC^s). W próbie tej, komórki wysiane w hodowli dynamicznej na SIS w postaci porowatego rusztowania wnikały głęboko w jego warstwy. Dzięki temu powstała wielowarstwowa struktura przypominająca nabłonek dróg moczowych⁴⁴. Pozbawione komórek SIS może być także dobrym rusztowaniem dla komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej. Rusztowanie to charakteryzuje się wysokim stopniem odporności mechanicznej oraz wzmagania zdolności proliferacyjne ADSC^s⁴⁵. Pomimo wielu prób wykorzystania SIS w inżynierii tkankowej wciąż brakuje danych na temat możliwości wysiania

na tego typu rusztowaniu ISCs. Potrzebne są dalsze badania, które być może doprowadzą do powstania funkcjonalnych fragmentów jelit, które będzie można przeszczepić pacjentom z ubytkami w przewodzie pokarmowym.

2.6 Choroba nowotworowa jelita grubego

Rak jelita grubego (ang. colorectal cancer, CRC) to coraz bardziej powszechna choroba na całym świecie. Największe obciążenie CRC obserwuje się w Europie, natomiast kraje rozwijające się zmagają się z największymi trudnościami w leczeniu i zapobieganiu CRC. Ryzyko zachorowania na raka jelita grubego zależy od położenia geograficznego kraju chorego, statusu społeczno-ekonomicznego, wieku i płci. Częściej choroba ta dotyka mężczyzn, a zgodnie z prognozami poziom zachorowań będzie w ciągu najbliższych lat nadal rósł⁴⁶. Ze względu na trudności w leczeniu nowotworów jelita grubego w zaawansowanym stadium dużą uwagę zwraca się uwagę na patomechanizmy powstawania tego rodzaju nowotworu, które mogą potencjalnie wskazać drogę do szukania nowych metod terapeutycznych. W przypadku nowotworów jelit komórki macierzyste są uważane raczej za cel (ang. target) terapii przeciwnowotworowej. W kontekście nowotworów jelita grubego, a także innych schorzeń onkologicznych zaczęto używać pojęcia “nowotworowe komórki macierzyste (ang. cancer stem cells, CSCs), jako rodzaj komórek inicjujących proces nowotworowy⁴⁷. Problemem związanym z CSCs jest oporność na radioterapię i chemioterapię, co implikuje m.in. powstawanie przerzutów mimo skutecznej terapii onkologicznej⁴⁸. Biorąc pod uwagę wysoki poziom proliferacji jelitowych CSCs, oporność na leczenie, a także główną rolę w tworzeniu przerzutów w ostatnich latach poczyniono duże postępy w zrozumieniu biologii tych komórek. Markerami powierzchniowymi charakterystycznymi dla jelitowych CSCs są: CD44, CD133, CD24, EpCAM, LGR5 i ALDH⁴⁹. Jednakże, CSCs mają wiele wspólnych cech, markerów i receptorów powierzchniowych z prawidłowymi komórkami macierzystymi ustroju, dlatego celem dalszych badań powinno być jak najbardziej selektywne oddziaływanie na CSCs. Zaburzenie wzajemnych relacji jelitowych komórek macierzystych oraz komórek nabłonkowych, a także zachwianie procesów regulacyjnych i szlaków komórkowych takich jak Wnt i Hedgehog uważane jest za czynnik etiopatogenetyczny nowotworów jelit, a także tworzenia przerzutów⁵⁰. Fu i in. Dowiedli, że aktywacja FXR (jelitowy receptor farnesoidowy X), którego zahamowanie przez sole kwasów żółciowych jest uznawane za czynnik aktywujący kaskadę nowotworzenia w CRC, powoduje zahamowanie wzrostu

CSC i rozwoju CRC⁵¹. Zgodnie z paradygmatem "całkowitej terapii przeciwnowotworowej" zgodnie z którą oprócz celowania w komórki nowotworowe należy hamować rozwój również CSCs dowiedziono, że mitramycyna A może działać na oba rodzaje komórek skutecznie hamując rozwój raka jelita grubego poprzez indukowanie śmierci komórek⁵². Obiecującym podejściem wydaje się być również zastosowanie inhibitorów czynnika transkrypcyjnego Myc w komórkach CSCs, aby zahamować ich wzrost, proliferację i tworzenie przerzutów CRC⁵³. Potrzebne są dalsze badania w celu zwiększenia wiedzy na temat biologii CSCs, a także metod hamowania ich wzrostu i progresji raka jelita grubego poprzez celowanie w szlaki sygnalizacji związane z CSCs.

3. Podsumowanie

Terapia komórkami macierzystymi niesie ze sobą ogromne możliwości. Potencjalne korzyści wynikające z wprowadzenia komórek macierzystych do praktyki klinicznej leczenia chorób jelit są obiecujące. Nadzieje pokłada się między innymi w wykorzystaniu komórek macierzystych w terapii chorób zapalnych jelit, dzięki ich właściwościom immunomodulującym. W większości przeprowadzonych badań terapia komórkami macierzystymi przeprowadzana jest na zwierzętach. Dotychczas ich stosowanie przyniosło pożądane klinicznie efekty, zatem kolejnym krokiem powinno być zwiększenie ilości badań klinicznych na ludziach, aby potwierdzić potencjał kliniczny komórek macierzystych. Konieczne jest także stworzenie protokołów izolowania komórek macierzystych do tych celów i ustalenie, który przeszczepiony rodzaj może przynieść największe korzyści w leczeniu chorób jelit. Podobnie, w celu stworzenia „sztucznego jelita” przyszłe próby powinny skupiać się na rozwoju tworzenia rusztowań dla komórek macierzystych metodami inżynierii tkankowej. Kolejne badania powinny przybliżyć nowoczesną medycynę do upowszechnienia oraz standaryzacji terapii komórkami macierzystymi, jako skutecznej terapii niosącej ze sobą minimalne ryzyko powikłań, nie tylko w chorobach jelita grubego oraz cienkiego, ale także w wielu innych.

Referencje

- 1 Maehle, Andreas-Holger. "Ambiguous cells: the emergence of the stem cell concept in the nineteenth and twentieth centuries." *Notes and Records of the Royal Society* 65.4 (2011): 359-378.

2. Bongso, Ariff, and Mark Richards. "History and perspective of stem cell research." *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology* 18.6 (2004): 827-842.
3. Liu, Gele, et al. "Advances in pluripotent stem cells: history, mechanisms, technologies, and applications." *Stem cell reviews and reports* 16.1 (2020): 3-32.
4. Alison, M. R., and S. Islam. "Attributes of adult stem cells." *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland* 217.2 (2009): 144-160.
5. Swenson, E. S., and N. D. Theise. "Stem cell therapeutics: potential in the treatment of inflammatory bowel disease." *Clinical and experimental gastroenterology* 3 (2010):
6. Hwang, D., S. Kim, and H. Hong. "Substance P improves MSC-mediated RPE regeneration by modulating PDGF-BB." *Cytherapy* 21.5 (2019): S73.
7. Biswas, Atindriya, and Robert Hutchins. "Embryonic stem cells." *Stem cells and development* 16.2 (2007): 213-222.
8. Green, Ronald M. "Can we develop ethically universal embryonic stem-cell lines?." *Nature Reviews Genetics* 8.6 (2007): 480-485.
9. Ma, S., et al. "Immunobiology of mesenchymal stem cells." *Cell Death & Differentiation* 21.2 (2014): 216-225.
10. Nagamura-Inoue, Tokiko, and Haiping He. "Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: their advantages and potential clinical utility." *World journal of stem cells* 6.2 (2014): 195.
11. Nagamura-Inoue, Tokiko, and Haiping He. "Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: their advantages and potential clinical utility." *World journal of stem cells* 6.2 (2014): 195.
12. De Boeck, Astrid, et al. "Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote colorectal cancer progression through paracrine neuregulin 1/HER3 signalling." *Gut* 62.4 (2013): 550-560.
13. Shinagawa, Kei, et al. "Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer." *International journal of cancer* 127.10 (2010): 2323-2333.

14. Ra, Jeong Chan, et al. "Stem cell treatment for patients with autoimmune disease by systemic infusion of culture-expanded autologous adipose tissue derived mesenchymal stem cells." *Journal of translational medicine* 9.1 (2011): 1-11.
15. Awad, Hani A., et al. "Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon." *Tissue engineering* 5.3 (1999): 267-277.
16. Ding, Dah-Ching, et al. "Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy." *Cell transplantation* 24.3 (2015): 339-347.
17. Gu, Zhifeng, et al. "Rapamycin reverses the senescent phenotype and improves immuno-regulation of mesenchymal stem cells from MRL/lpr mice and systemic lupus erythematosus patients through inhibition of the mTOR signaling pathway." *Aging (Albany NY)* 8.5 (2016): 1102.
18. Fehrer, Christine, et al. "Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan." *Aging cell* 6.6 (2007): 745-757.
19. Csicsvari, Jozsef, et al. "Ensemble patterns of hippocampal CA3-CA1 neurons during sharp wave-associated population events." *Neuron* 28.2 (2000): 585-594.
20. Trébol, Jacobo, et al. "Stem cell therapy applied for digestive anastomosis: Current state and future perspectives." *World Journal of Stem Cells* 14.1 (2022): 117.
21. Markel, Troy A., et al. "Stem cells as a potential future treatment of pediatric intestinal disorders." *Journal of pediatric surgery* 43.11 (2008): 1953-1963.
22. Manieri, Nicholas A., et al. "Mucosally transplanted mesenchymal stem cells stimulate intestinal healing by promoting angiogenesis." *The Journal of clinical investigation* 125.9 (2015): 3606-3618.
23. Hosseini-Asl, Seyed-Kazem, Davood Mehrabani, and Feridoun Karimi-Busheri. "Therapeutic effect of mesenchymal stem cells in ulcerative colitis: a review on achievements and challenges." *Journal of Clinical Medicine* 9.12 (2020): 3922.

24. Yan, Li, et al. "Present status and perspectives of stem cell-based therapies for gastrointestinal diseases." *Stem Cell Reviews and Reports* 5.3 (2009): 278-282.
25. Gong, Wei, et al. "Mesenchymal stem cells stimulate intestinal stem cells to repair radiation-induced intestinal injury." *Cell death & disease* 7.9 (2016): e2387-e2387.
26. Nikolic, M., et al. "Allogeneic expanded adipose-derived stem cells in the treatment of rectovaginal fistulas in Crohn's disease." *Colorectal Disease* 23.1 (2021): 153-158.
27. Singh, Udai P., et al. "Stem cells as potential therapeutic targets for inflammatory bowel disease." *Frontiers in bioscience (Scholar edition)* 2 (2010): 993.
28. Sala, Emanuela, et al. "Mesenchymal stem cells reduce colitis in mice via release of TSG6, independently of their localization to the intestine." *Gastroenterology* 149.1 (2015): 163-176.
29. Panés, Julián, et al. "Long-term efficacy and safety of stem cell therapy (Cx601) for complex perianal fistulas in patients with Crohn's disease." *Gastroenterology* 154.5 (2018): 1334-1342.
30. Moniuszko, Andrzej, et al. "Successful treatment of an enterovesical fistula due to Crohn's disease with stem cell transplantation: a case report." *Przegląd Gastroenterologiczny* 13.4 (2018): 332.
31. Hu, Jianxia, et al. "Safety and therapeutic effect of mesenchymal stem cell infusion on moderate to severe ulcerative colitis." *Experimental and Therapeutic Medicine* 12.5 (2016): 2983-2989.
32. del Pilar Martínez-Montiel, María, Gonzalo Jesús Gómez-Gómez, and Ana Isabel Flores. "Therapy with stem cells in inflammatory bowel disease." *World journal of gastroenterology: WJG* 20.5 (2014): 1211.
33. Ko, In Kap, et al. "Targeting improves MSC treatment of inflammatory bowel disease." *Molecular Therapy* 18.7 (2010): 1365-1372.
34. Eaton, Simon, et al. "Stem cells as a potential therapy for necrotizing enterocolitis." *Expert opinion on biological therapy* 13.12 (2013): 1683-1689.

35. Tayman, Cüneyt, et al. "Mesenchymal stem cell therapy in necrotizing enterocolitis: a rat study." *Pediatric research* 70.5 (2011): 489-494.
36. Voswinkel, Jan, et al. "Use of mesenchymal stem cells (MSC) in chronic inflammatory fistulizing and fibrotic diseases: a comprehensive review." *Clinical reviews in allergy & immunology* 45.2 (2013): 180-192.
37. Dosh, Rasha H., et al. "Use of l-pNIPAM hydrogel as a 3D-scaffold for intestinal crypts and stem cell tissue engineering." *Biomaterials science* 7.10 (2019): 4310-4324.
38. Chen, David C., et al. "Comparison of polyester scaffolds for bioengineered intestinal mucosa." *Cells Tissues Organs* 184.3-4 (2006): 154-165.
39. Shaffiey, Shahab A., et al. "Intestinal stem cell growth and differentiation on a tubular scaffold with evaluation in small and large animals." *Regenerative medicine* 11.1 (2016): 45-61.
40. Creff, Justine, et al. "Fabrication of 3D scaffolds reproducing intestinal epithelium topography by high-resolution 3D stereolithography." *Biomaterials* 221 (2019): 119404.
41. Onfroy-Roy, Lauriane, et al. "Extracellular matrix mechanical properties and regulation of the intestinal stem cells: when mechanics control fate." *Cells* 9.12 (2020): 2629.
42. Tan, Yunbing, Yuanyuan Zhang, and Ming Pei. "Meniscus reconstruction through coculturing meniscus cells with synovium-derived stem cells on small intestine submucosa—a pilot study to engineer meniscus tissue constructs." *Tissue Engineering Part A* 16.1 (2010): 67-79.
43. Du, Xiao Fei, et al. "Tracheal reconstruction by mesenchymal stem cells with small intestine submucosa in rabbits." *International journal of pediatric otorhinolaryngology* 76.3 (2012): 345-351.
44. Wu, Shaofeng, et al. "Human urine-derived stem cells seeded in a modified 3D porous small intestinal submucosa scaffold for urethral tissue engineering." *Biomaterials* 32.5 (2011): 1317-1326.

45. Ferdowsi Khosroshahi, Ahad, et al. "Adipose tissue-derived stem cells upon decellularized ovine small intestine submucosa for tissue regeneration: An optimization and comparison method." *Journal of cellular physiology* 235.2 (2020): 1556-1567.
46. Douaiher, Jeffrey, et al. "Colorectal cancer—global burden, trends, and geographical variations." *Journal of surgical oncology* 115.5 (2017): 619-630.
47. Ricci-Vitiani, Lucia, et al. "Colon cancer stem cells." *Journal of Molecular Medicine* 87.11 (2009): 1097-1104.
48. Phi, Lan Thi Hanh, et al. "Cancer stem cells (CSCs) in drug resistance and their therapeutic implications in cancer treatment." *Stem cells international* 2018 (2018).
49. Zhou, Yujuan, et al. "Cancer stem cells in progression of colorectal cancer." *Oncotarget* 9.70 (2018): 33403.
50. Brabletz, S., O. Schmalhofer, and T. Brabletz. "Gastrointestinal stem cells in development and cancer." *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland* 217.2 (2009): 307-317.
51. Fu, Ting, et al. "FXR regulates intestinal cancer stem cell proliferation." *Cell* 176.5 (2019): 1098-1112.
52. Quarni, Waise, et al. "Mithramycin A inhibits colorectal cancer growth by targeting cancer stem cells." *Scientific reports* 9.1 (2019): 1-13.
53. Elbadawy, Mohamed, et al. "Emerging roles of C-Myc in cancer stem cell-related signaling and resistance to cancer chemotherapy: a potential therapeutic target against colorectal cancer." *International journal of molecular sciences* 20.9 (2019): 2340.

ROLA WITAMIN W ZAPOBIEGANIU I LECZENIU DEPRESJI

Michał Janik¹, Michał Bielówka¹, Łukasz Czogalik¹, Natalia Denisiewicz¹,
Magdalena Stencel¹, Jakub Kufel¹, Maciej Koźlik²

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

2. Klinika Kardiologii i Chorób Strukturalnych Serca,
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Abstrakt: Według danych WHO depresja jest jedną z najczęściej występujących chorób na świecie i dominującą chorobą psychiczną. W najcięższych przypadkach uniemożliwia funkcjonowanie i jest przyczyną samobójstw. W leczeniu farmakologicznym stosuje się najczęściej inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny, a także leki z innych grup. Poszukiwane są stale nowe metody leczenia i zapobiegania wystąpieniu epizodu depresyjnego. Obecnie wiele badań ukazuje zależności pomiędzy spożyciem witamin i ich poziomem we krwi, a ryzykiem wystąpienia objawów depresji. Największe znaczenie wydają się mieć witaminy z grupy B (szczególnie witamina B9 i B12) oraz witamina D3. Celem poniższej pracy jest przegląd badań i przedstawienie aktualnej wiedzy dotyczącej tego zagadnienia. Prace badawcze zawarte w tym rozdziale odnoszą się do roli witamin zarówno w leczeniu depresji jak i zapobieganiu wystąpieniu epizodu depresyjnego. Niektóre z badań skupiają się na mechanizmie działania poszczególnych witamin, a także na wpływie na konkretny rodzaj depresji, np. na depresję poporodową, depresję wieku podeszłego. Istnieje potrzeba dalszych badań weryfikujących dotychczasowe odkrycia w tym temacie. Możliwe, że poziomy witamin będą oznaczane i ich suplementacja będzie wykorzystywana do wspomagania leczenia depresji, a także zaburzeń lękowych i innych chorób psychicznych.

Słowa kluczowe: depresja, witaminy z grupy B, leczenie depresji, nowe podejście w leczeniu depresji

Abstract: According to WHO data, depression is one of the most common diseases in the world and the dominant mental illness. In the most severe cases, it makes one impossible to function and causes suicide. In pharmacological treatment, the most commonly used are serotonin reuptake inhibitors, as well as drugs from other groups. New methods of treatment and prevention of a depressive episode are constantly being researched. Currently, many studies show the relationship between vitamin intake and their level in the blood, and the risk of depression symptoms. Vitamins from group B (especially vitamins B9 and B12) and vitamin D3 seem to be of the greatest importance. The aim of this work is to review the research and present the current knowledge on this issue. The research included in this chapter refers

to the role of vitamins not only in the treatment of depression but also in the prevention of a depressive episode. Some of the studies also focus on the mechanism of action of individual vitamins, as well as the impact on a specific type of depression, e.g. postpartum depression, late-life depression. Unfortunately, the current knowledge does not allow to determine what dose of which vitamin can prevent the disease. Undoubtedly, in the coming years there will be new studies verifying the discoveries made so far in this topic and it is possible that vitamin levels will be determined soon and their supplementation will be used to support the treatment of depression, as well as anxiety disorders and other mental diseases.

Keywords: depression, group B vitamins, depression treatment, new way of treating depression

1. Wstęp

Depresja jest zaburzeniem psychicznym, jedną z najczęściej występujących na świecie chorób. Epizod depresyjny może wystąpić zarówno w przebiegu choroby afektywnej jednobiegunowej (zaburzenia depresyjnego nawracającego), jak i rzadszej choroby afektywnej dwubiegunowej – dlatego mówi się odpowiednio o depresji jednobiegunowej lub o depresji dwubiegunowej ¹. Według WHO chorobą tą dotknięte jest ok. 300 mln ludzi ², a do 2030 r. depresja prawdopodobnie zajmie pierwsze miejsce jako dominujące zaburzenie na całym globie. Znacznie obniża także jakość życia i może prowadzić do śmierci, jest najczęstszą przyczyną samobójstw, dlatego tak ważna jest profilaktyka oraz jej leczenie ³.

Według klasyfikacji ICD-10, aby stwierdzić występowanie epizodu depresyjnego, muszą występować przez co najmniej dwa tygodnie przynajmniej dwa z trzech poniższych objawów ⁴:

- obniżenie nastroju,
- utrata zainteresowań i zdolności do radowania się (anhedonia),
- zmniejszenie energii prowadzące do wzmożonej męczliwości i zmniejszenia aktywności,
- oraz dwa lub więcej spośród następujących objawów:
 - osłabienie koncentracji i uwagi,
 - niska samoocena i mała wiara w siebie,
 - poczucie winy i małej wartości,
 - pesymistyczne, czarne widzenie przyszłości,
 - myśli i czyny samobójcze,
 - zaburzenia snu,
 - zmniejszony apetyt

Głównym powodem występowania objawów depresji są zaburzenia w syntezie, rozkładzie i wydzielaniu neuroprzekaźników w synapsach (głównie serotoniny, noradrenaliny i dopaminy). Obecnie dostępne farmakologiczne metody leczenia stanowią trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne, inhibitory monoaminoooksydazy, selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny, selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny i noradrenaliny, inne atypowe leki przeciwdepresyjne, a także terapia elektrowstrząsowa. Choć w większości przypadków jedna z tych metod w połączeniu z psychoterapią daje satysfakcjonujące efekty, to istnieją także pacjenci u których występuje depresja lekooporna ⁵.

W ostatnich latach zauważono powiązania pomiędzy nawykami żywieniowymi, a ryzykiem wystąpienia depresji. Znaczącą rolę odgrywają witaminy i ich zawartość w diecie, a także suplementacja tych substancji ⁶.

Witaminy są grupą organicznych związków chemicznych niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Są substancjami egzogennymi, dlatego muszą być dostarczane z pożywieniem - jedynie witamina D może być syntetyzowana w skórze z jej prekursorów.

Witaminy (szczególnie z grupy B) odgrywają istotną rolę w funkcjonowaniu mózgu i neuronów, a ich poważne niedobory korelują z nasileniem zaburzeń psychicznych ⁷. Również podczas badań nad witaminą D oraz zaburzeniami nastroju badacze ujawnili zależność pomiędzy niskim poziomem tej witaminy, a występowaniem depresji ⁸. W badaniach na zwierzętach zauważono także powiązanie witaminy C z działaniem m.in. przeciwdepresyjnym - w tym przypadku do potwierdzenia tego zjawiska jest jednak znacznie większa ilość badań na ludziach ⁹.

Celem niniejszego rozdziału jest dokonanie przeglądu artykułów oraz badań dotyczących wykorzystania witamin w zapobieganiu depresji, a także wpływu ich niedoborów na zaburzenia depresyjne i nastroj.

2. Witaminy z grupy B

Tabela 1. Spis witamin z grupy B oraz ich aktywna forma w organizmie (na podstawie ¹⁰)

Witamina	Aktywna forma
B1 (tiamina)	TPP - pirofosforan tiaminy
B2 (ryboflawina)	FMN, FAD
B3 (niacyna)	NAD ⁺ , NADP ⁺
B5 (kwas pantotenowy)	CoA - koenzym A

B6 (pirydoksyna/pirydoksamina/pirydoksal)	PLP - fosforan pirydoksalu
B7 / H (biotyna)	Biotyna związana z enzymem
B9 (kwas foliowy)	Kwas tetrahydrofoliowy
B12 (kobalamina)	Metylokobalamina, deoksyadenozylkobalamina

Wszystkie witaminy przedstawione w tabeli 1 są rozpuszczalne w wodzie, a ich niedobory są spowodowane najczęściej nieprawidłowym żywieniem. Zbyt niski poziom wielu z nich skutkuje neurologicznymi powikłaniami, np. niedobór tiaminy prowadzi do zespołu Wernickego-Korsakowa oraz choroby beri-beri, a niedobór kwasu foliowego w diecie u kobiet w ciąży prowadzi do wad cewy nerwowej u płodu¹¹. Przeprowadzono także wiele badań rozpatrujących korelacje pomiędzy niektórymi witaminami z grupy B, a depresją, w kilku przypadkach znaleziono interesujące zależności, Natomiast wciąż brakuje badań ukazujących powiązania między witaminami B5 i B7 a depresją i jej objawami¹²⁻³³.

2.1. Witamina B3 - niacyna, nikotynamid

Hai Duc Nguyen et al. w swoim badaniu przeprowadzonym w Korei, dowiedli że obniżony poziom witamin B1 i B3 jest czynnikiem zwiększającym ryzyko wystąpienia zaburzeń depresyjnych. Wywnioskowano, iż regularne, zwiększone spożycie obu witamin zarówno osobno, jak i jako kompleks tiamina + niacyna mogą zapobiegać objawom depresji. W badaniu tym wzięło udział 9848 osób. Kontrolowano spożycie obu witamin w diecie oraz objawy chorobowe w poszczególnych grupach. W przypadku samej witaminy B3 nie wykazano znaczącego działania na nastrój¹².

Natsuki Tsujita et al. w swoim badaniu przeprowadzonym na 30 studentach z Kyoto University wykazali, że witamina B3 jest również pomocna w leczeniu depresji w skojarzeniu z tryptofanem oraz witaminą B6. Było to badanie randomizowane, w którym studenci z depresją przyjmowali pomiędzy posiłkami tryptofan (TRP), witaminę B6 oraz suplementy zawierające nikotynamid (próba badawcza), a inni studenci otrzymywali placebo (próba kontrolna). Czas trwania badania wyniósł 7 dni. Nastrój mierzono za pomocą Skali Depresji Centrum Badań Epidemiologicznych (CES-D, ang. *Center for Epidemiologic Studies Depression Scale*) oraz Profilu Stanów

Nastroju (POMS, ang. *Profile of Mood States Scale*). Badano także próbki krwi pacjentów. Wynik skali CES-D uległ obniżeniu w obu grupach - zarówno u badanych przyjmujących suplementy jak i placebo. Wynik skali CES-D był współmierny zarówno w próbie badanej, jak i kontrolnej prawdopodobnie ze względu na to, że jest to skala obrazująca nastrój na przestrzeni tygodni. Z kolei skala POMS odpowiada za nastrój w danym momencie, dlatego wynik w skali POMS był niższy tylko u osób przyjmujących kompleks TRP, witaminę B6 i nikotynamid.. Potwierdzono więc wpływ tego kompleksu na obniżenie objawów depresyjnych i poprawę nastroju. Działanie witaminy B3 w tym kompleksie polega na tym, że spowalnia ona obwodowy rozpad tryptofanu w organizmie. Tryptofan jest natomiast w organizmie prekursorem serotoniny, której obniżony poziom w synapsach odpowiada za występowanie objawów depresji ¹³.

2.2. Witamina B1 - tiamina

Jose Enrique de la Rubia Orti et al. przeanalizowali w populacji hiszpańskiej nawyki żywieniowe 51 pacjentów chorych na stwardnienie rozsiane (SM - sclerosis multiplex), na tej podstawie stwierdzono, że niedobór witaminy B1 oraz węglowodanów w diecie prowadzi do ciężkiej depresji często związanej z SM. Zwrócono również uwagę, że produkty przetworzone zawierające tiaminę oraz węglowodany proste zmniejszają aktywność witaminy B1 w organizmie, z badań tych wynika więc, zaleca się więc spożywanie produktów nieprzetworzonych ¹⁴.

W Chinach Geng Zhang oraz jego zespół przeprowadzili badanie wśród 1587 obu płci w wieku 50-70 lat. Mierzono stężenia wolnej tiaminy oraz jej estrów we krwi i sprawdzano obecność objawów depresyjnych. Objawy depresji oceniano za pomocą skali CES-D. Brano pod uwagę również aktywność fizyczną oraz nawyki żywieniowe. Zauważono, że u osób z wyższym poziomem tiaminy w jej różnych formach, niższa była zapadalność na depresję lub obniżone było nasilenie jej objawów. Nie jest do końca znany mechanizm tego działania. Przypuszcza się, że powiązana z tym jest funkcja difosforanu tiaminy bowiem jest on niezbędnym koenzymem w biosyntezie wielu neuroprzekazników, w tym: acetylocholin, gamma-aminomaślanu oraz serotoniny, której niskie stężenie w synapsach najczęściej odpowiada za występowanie objawów depresji i zaburzeń lękowych ¹⁵.

2.3. Witamina B2 - ryboflawina

W Tajwanie 120 kobiet wzięło udział w badaniu oceniającym stan odżywienia u pacjentek, które chorowały na depresję poporodową (PPD - *Postpartum Depression*) (23 kobiety) oraz u pacjentek nie wykazujących objawów tego typu depresji (97 kobiet). Okazało się, że u kobiet z objawami PPD we krwi występował m.in. niższy poziom witaminy B2 niż u zdrowych pacjentek. Wyniki tego badania sugerują, że optymalne spożycie ryboflawiny może zapobiegać wystąpieniu objawów depresji poporodowej¹⁶.

Podobne wyniki, lecz bez określenia konkretnego typu depresji ukazało badanie przekrojowe na 98 pielęgniarkach (45 chorujących na depresję i 53 zdrowych kobietach). Określono w nim dzienne spożycie ryboflawiny, oraz jej poziom we krwi jako współczynnik aktywności reduktazy glutationowej w erytrocytach, a także dodatkowo oznaczono stężenie hs-CRP w osoczu. Zauważono, iż obniżony poziom ryboflawiny był częstszy u osób borykających się z depresją¹⁷.

2.4. Witamina B6 - pirydoksyna, pirydoksamina, pirydoksal

Witamina B6 bierze udział w prawidłowym metabolizmie neuroprzekazników, które biorą udział w manifestacji objawów depresji¹⁸, np. jest potrzebna do syntezy serotoniny z tryptofanu (jako koenzym fosforan pirydoksalu - PLP)¹⁹. Na tej podstawie wysunięto hipotezę, że pirydoksyna i jej pochodne mogą być skuteczne w leczeniu depresji¹⁸.

W Iranie przeprowadzono badanie na kobietach ciężarnych objętych ryzykiem wystąpienia PPD. Wybrano 81 kobiet objętych ryzykiem depresji poporodowej - 40 z nich otrzymywało codziennie 80 mg witaminy B6 przed porodem, a po porodzie 40 mg, a 41 pacjentek otrzymało jedną tabletkę placebo przez cały ten okres. Na podstawie uzyskanych wyników wywnioskowano, że suplementacja witaminy B6 może być skuteczna w zapobieganiu PPD (podobnie jak wyżej wspomniana witamina B2), ale zaleca się dalsze badania²⁰.

W badaniu przeprowadzonym przez Samuel Berkins et al. wzięło udział 9426 uczestników. Badano wpływ diety wegetariańskiej na objętość mózgu oraz samopoczucie i nastrój. Ze względu na to, iż wśród wegetarian częściej występują niedobory witaminy B6, B9 oraz B12 skutkuje to częstszym występowaniem depresji w tej populacji, a także zmniejszoną objętością mózgu²¹.

Już w latach 70. XX w zauważono pierwsze efekty niedoboru witaminy B6 związane z występowaniem depresji przy stosowaniu doustnej antykoncepcji.

Dlatego też Anna C. Curtin i Carol S. Johnston z Arizona State University przeprowadzili badanie, które ostatecznie ukończyło 8 kobiet, warunkiem zakwalifikowania był wiek 18-25 lat oraz przyjmowanie złożonych doustnych środków antykoncepcyjnych, a także wyjściowy poziom PLP bliski normy. Kobiety stosujące doustne środki antykoncepcyjne wykazywały niższy poziom witaminy B6, co skutkowało, obniżeniem nastroju oraz częstszym występowaniem depresji w tej grupie. Część kobiet otrzymywała codziennie 100 mg witaminy B6, a część placebo. Badanie trwało 12 tygodni i w jego trakcie mierzono poziom witaminy we krwi. Na podstawie własnego badania oraz przeglądu badań z ubiegłych lat zauważono, że suplementacja witaminą B6 podczas stosowania doustnej antykoncepcji może zapobiegać tym objawom²². Według Bergsjo sugerowana dawka to 20-50 mg/dzień²³.

2.5. Witamina B9 - kwas foliowy

Maryam Khosravi et al. przeprowadzili w Iranie badanie kliniczno-kontrolne, do którego zrekrutowano 110 pacjentów z objawami depresji oraz 220 zdrowych osób w wieku od 18 do 65 lat. Poza nasileniem objawów depresyjnych i nawykami żywieniowymi analizowano również próbki krwi badanych osób pod kątem zawartości witaminy B12 oraz B9, a także całkowite stężenie homocysteiny ze względu na to, że zarówno kobalamina jak i kwas foliowy biorą udział w jej przemianach. Zauważono, że osoby zdrowe stosujące prawidłową, zbilansowaną dietę posiadają wyższy poziom obu witamin, co może mieć wpływ na brak występowania u tych osób objawów depresyjnych. Analogicznie u pacjentów chorujących na zaburzenia depresyjne dieta często była niewłaściwa co powodowało niedobory witamin B12 i B9²⁴.

W Chinach Tze-Pin Ng wraz z zespołem zbadali podobną zależność tzn. wpływ poziomu kobalaminy, kwasu foliowego oraz homocysteiny na występowanie depresji wśród 669 Chińczyków w wieku powyżej 55 lat. Objawy depresyjne mierzono za pomocą Geriatrycznej Skali Depresji. Zauważono podobną zależność i działanie kompleksu B12 i B9 jak w badaniu przeprowadzonym w Iranie, natomiast zwrócono również uwagę, że izolowany niski poziom samej witaminy B9 także wpływa niekorzystnie na nastrój i koreluje z występowaniem objawów depresyjnych²⁵.

Simon N. Young na podstawie przeglądu obecnej wiedzy i badań z poprzednich lat stwierdził, że obniżony poziom witaminy B9 wiąże się z występowaniem zaburzeń depresyjnych i lękowych, a także zaleca przyjmowanie

dawki około 2 mg kwasu foliowego na dzień jako leczenie uzupełniające podczas depresji ²⁶.

Ansley Bender et al. przeprowadzili meta-analizę odnośnie związku kwasu foliowego i depresji. Analizowano poziom witaminy B9 u osób z objawami chorobowymi i u osób zdrowych. Tak jak w uprzednio wspomnianych badaniach osoby chore miały obniżony poziom kwasu foliowego. Zaproponowano także, że suplementacja L-metylofolianem może mieć korzystny wpływ na leczenie depresji ²⁷.

Biorąc pod uwagę wszystkie dotychczasowe badania, dalsze zainteresowanie wpływem witaminy B9 na zaburzenia depresyjne, a także lękowe jest uzasadnione i może w przyszłości służyć jako wspomaganie klasycznego leczenia ²⁷.

2.6. Witamina B12 – kobalamina

Witamina B12 jest głównie zawarta w pokarmach mięsnych, dlatego wegetarianie oraz weganie zwykle mają obniżony poziom tej witaminy. Również dzieci karmione piersią przez matki odżywiające się wyłącznie pokarmami roślinnymi mogą wykazywać niedobory witaminy B12 w okresie niemowlęcym co może utrudniać prawidłowy rozwój mózgowia i całego układu nerwowego ²⁸.

Już w 1990r. Stabler wraz z zespołem przebadali 300 osób z niedoborem kobalaminy i zauważyli pewną zależność. Związek ten bierze udział w przemianach homocysteiny, która może być przekształcana w metioninę stanowiącą prekursor neuroprzekazników biorących udział w patogenezie depresji. Ze względu na to, jej niedobory prowadzą do hiperhomocysteinemii, a także obniżonej syntezy neurotransmiterów co prawdopodobnie ma związek z nasileniem zaburzeń depresyjnych ²⁹.

Lora Peppard et al. w badaniu przeprowadzonym na kobietach powyżej 20 roku życia w Stanach Zjednoczonych dowiedli, że obniżony poziom witaminy B12 zwiększa prawie czterokrotnie narażenie na depresję przedporodową, a jej suplementacja u tych kobiet może zapobiegać lub ułatwiać leczenie depresji prenatalnej ³⁰.

Podobnie jak w podrozdziale o witaminie B9 także tutaj natrafiliśmy na metaanalizę badań na temat poziomu folianu i kobalaminy oraz ich związku z depresją, brano pod uwagę także płeć oraz wiek uczestników. Analizę przeprowadzili Eleni Th Petridou et al. , a na podstawie uzyskanych wyników wywnioskowano, iż niski poziom zarówno samego folianu jak i samej kobalaminy w organizmie wydaje się być związany z depresją u osób starszych ³¹.

Prerna Sangle et al. dokonali przeglądu i analizy badań dotyczących poziomu oraz suplementacji witaminy B12 i jej wpływu na wystąpienie oraz leczenie depresji. Na tej podstawie stwierdzono, że chociaż nie ma konkretnych dowodów na pozytywny wpływ witaminy B12 na leczenie objawów zaburzeń depresyjnych to niższy poziom kobalaminy wiąże się z wyższym ryzykiem rozwoju tej choroby³².

Almeida et al. z University of Western Australia przeprowadzili przegląd systematyczny i metaanalizę badań, aby ocenić czy w porównaniu z placebo leczenie witaminą B9 oraz B12 (w kompleksie oraz osobno) zmniejsza objawy depresyjne, przyspiesza remisję i zapobiega wystąpieniu klinicznych objawów u osób z grupy ryzyka. Na podstawie wyników z przeanalizowanych badań, stwierdzono, że krótkotrwałe stosowanie tych witamin (do kilku tygodni) nie ma wpływu na występujące objawy i samopoczucie u osób ze stwierdzoną dużą depresją, leczonych antydepresantami. Za to długotrwała suplementacja folianu i kobalaminy (od kilku tygodni do kilku lat) może zmniejszać ryzyko nawrotu choroby i zapobiegać wystąpieniu objawów klinicznych u osób z grupy ryzyka³³.

Spośród witamin z grupy B witamina B12 wydaje się w największym stopniu wpływać na leczenie oraz profilaktykę zaburzeń depresyjnych, lecz tak jak w przypadku pozostałych substancji zaleca się dalsze badania.

3. Witamina D - kalcyferol

Pierwsze sugestie odnoszące się do związku witaminy D z depresją opierały się na związku między jej niskim poziomem jesienią i zimą ze względu na ograniczone przebywanie na słońcu, a występowaniem sezonowych zaburzeń afektywnych w naszych szerokościach geograficznych. Od tego czasu opublikowano wiele badań przeprowadzonych na różnych grupach, które dostarczyły wyników odnośnie zależności poziomu tej witaminy w surowicy, a występowaniem objawów depresji³⁴.

Jedno z badań przeprowadzone przez Goran Hogberg et al. u 54 nastolatków z objawami chorobowymi wykazało, że niższy poziom witaminy D odpowiada za obniżenie nastroju i możliwe występowanie objawów depresji w tej grupie. W tym badaniu suplementacja witaminą D korelowała z poprawą samopoczucia i remisją objawów choroby³⁵.

Lars Libuda w Niemczech wraz z zespołem także skupili się na powiązaniu niskiego poziomu 25(OH)D (poniżej 30 nmol/l) z co najmniej łagodną depresją wg Skali Depresji Becka, brano także pod uwagę ocenę objawów

depresyjnych przez rodziców wg niemieckiej skali DISYPS-II. Osoby zakwalifikowane do badania zostały przydzielone losowo do dwóch grup: jedna z grup otrzymywała 2640 IU witaminy D3 na dzień, a druga placebo. Badanie to wykazało, że badania nad wpływem aktywnej formy kalcyferolu na objawy depresyjne u dzieci i młodzieży pozostają sprzeczne, bowiem w grupie badanej nie zauważono poprawy w samoocenie w Skali Depresji Becka, za to rodzice nastolatków zgłaszali poprawę nastroju i obniżenie nasilenia objawów depresyjnych u swoich dzieci. Również wpływ na rozbieżny wynik mógł mieć krótki czas badania tj. 28 dni ³⁶.

Mercedes J. Szpunar z Uniwersytetu Kalifornijskiego przeprowadził przegląd pięciu badań analizujących wpływ niedoboru 25(OH)D na częstość występowania depresji poporodowej. W trzech z pięciu badań mierzone stężenie 25(OH)D w pierwszym lub drugim trymestrze ciąży w surowicy i stwierdzono, że niedobór w tym okresie może wpływać na rozwój PPD. W jednym badaniu zauważono odwrotną zależność, a w jednym nie znaleziono związku. Na tej podstawie stwierdzono, że suplementacja witaminą D może być pomocna i jest zalecana w czasie ciąży w celu zapobiegania depresji poporodowej ³⁷.

Nad powiązaniem PPD z depresją pracowali również Raji R. Pillai et al., którzy przeprowadzili badanie w Indiach na 660 kobietach (330 kobiet próba badawcza, 330 próba kontrolna). Objawy depresji oceniano za pomocą Edynburskiej Skali Depresji Poporodowej (EDPS - *Edinburg Postnatal Depression Scale*), a stężenie całkowite 25-hydroksywitaminy D oraz jej formy wolnej i biodostępnej w surowicy oznaczano metodą ELISA. Stężenie każdej z form witaminy D było niższe u kobiet z PPD niż u kobiet bez objawów depresji poporodowej. Na podstawie uzyskanych wyników wywnioskowano, iż hipowitaminoza D po porodzie może być czynnikiem ryzyka wystąpienia depresji poporodowej ³⁸.

Także Fariba Aghajafari et al. przeprowadzili przegląd systematyczny wśród badań nad niedoborem witaminy D a depresją przedporodową (AD - *Antenatal Depression*) i poporodową. Pięć z dziewięciu badań nad PPD wykazało znaczący związek pomiędzy niedoborem witaminy D, a tym typem depresji. W przypadku AD pięć z siedmiu badań wykazało istotną korelację wystąpienia objawów z niskim poziomem witaminy. Te wyniki wskazują na związek między niższym poziomem kalcyferolu, a zwiększonym ryzykiem wystąpienia objawów zarówno w czasie ciąży jak i po jej zakończeniu ³⁹.

Przeglądu systematycznego i metaanalizy podjął się również Simon Spedding. Badania poddano krytycznej ocenie pod kątem jakości metodologicznej

oraz wad biologicznych, a w końcowej analizie wyników brano pod uwagę tylko te prawidłowo zaprojektowane i przeprowadzone. Stwierdzono, że wiele badań zawierających błędy nie miało jednoznacznych wyników. Natomiast w badaniach, w których wykluczono wady biologiczne lub błędy metodologiczne wykazano, iż efekt witaminy D w leczeniu depresji jest porównywalny z efektem leków przeciwdepresyjnych. Zwrócono również uwagę na fakt, że w przypadku badań nad suplementacją, powinno się sprawdzać jej wpływ także na osoby z niedoborem, a nie tylko efekt dodatkowej suplementacji u osób z prawidłowym poziomem 25(OH)D. Zaznaczono także, iż w dalszym ciągu nie określono konkretnego poziomu witaminy D lub dawki stosowanej podczas suplementacji, dzięki którym można zaobserwować poprawę nastroju i zmniejszenie występowania objawów depresyjnych⁴⁰.

Guwei Li et al. dokonali przeglądu badań porównujących wpływ doustnej suplementacji witaminą D na objawy depresyjne w porównaniu z placebo. Stwierdzono, że analiza tych randomizowanych badań kontrolnych nie potwierdza skuteczności suplementacji witaminy D w depresji i wymagane jest przeprowadzenie większej ilości badań z udziałem pacjentów z depresją łagodną, umiarkowaną lub ciężką, które wniosą dodatkowe dane oraz przyczynią się do uzyskania innych wyników niż dotychczas przedstawiane.

Olivia I. Okereke oraz Ankura Singh z Bostonu przeprowadziły przegląd aktualnych badań dotyczących roli witaminy D w zapobieganiu depresji u osób starszych. Zebrane dane pozwoliły na tej podstawie stwierdzić, że niedobór witaminy D jest czynnikiem ryzyka depresji w wieku podeszłym. Jednak podobnie jak w uprzednio opisanym badaniu przeprowadzonym przez Simona Speddinga, tutaj także nie określono konkretnego poziomu witaminy D, który może powodować objawy depresyjne tzn. nie ma jasnej granicy niedoboru ani określonej dawki zalecanej podczas suplementacji w celu zapobiegania depresji. Obecnie trwające oraz przeprowadzone w przyszłości badania mogą pomóc odpowiedzieć na 100% czy suplementacja tą witaminą lub modyfikacja diety faktycznie zmniejsza ryzyko depresji i poprawia nastrój⁴¹.

Velegkatt oraz Menon et al. dokonali metaanalizy RCT w celu oceny wpływu suplementacji witaminy D na przebieg choroby u osób ze stwierdzoną ciężką depresją. Do metaanalizy włączono cztery badania, z czego trzy uznano za klinicznie skuteczne. Na podstawie analizy tych badań, a także błędów w nich zawartych wywnioskowano, że witamina D wpływa na lepsze samopoczucie i zmniejszenie objawów u osób ze stwierdzoną dużą depresją. Zwrócono także uwagę na to, iż depresja może mieć podłoże wieloczynnikowe, powodem może być m.in. stres oksydacyjny, dlatego właściwości

przeciwwłaniające witaminy D mogą być czynnikiem odpowiadającym za korzystne jej działanie u pacjentów ze stwierdzoną depresją⁴².

Guoewi Li et al. dokonali przeglądu systematycznego badań porównujących wpływ doustnej suplementacji witaminą D na objawy depresyjne w porównaniu z placebo. Stwierdzono, że analiza tych randomizowanych badań kontrolnych nie potwierdza skuteczności suplementacji witaminy D w depresji i wymagane jest więcej badań z udziałem pacjentów z depresją łagodną, umiarkowaną lub ciężką. Ten przegląd, tak jak wszystkie wyżej opisane pokazuje, że niestety w dalszym ciągu występują rozbieżności w badaniach oraz mamy zbyt mało danych, aby stwierdzić, że witamina D jest „lekiem” na depresję³⁴.

Warto jednak rozważyć suplementację witaminy D u osób z depresją lub będących w grupie ryzyka oraz posiadających niedobór tego składnika.

4. Podsumowanie

Terapia witaminami B9, B12 i D3 może być pomocna w przebiegu depresji, szczególnie lekoopornej, ze względu na potencjał w zmniejszaniu nasilenia i występowania epizodów depresyjnych. Większość antydepresantów posiada liczne działania niepożądane. Wyrównanie niedoborów witaminowych przełożyłoby się bezpośrednio na ilość zażywanych antydepresantów, a w skutek tego na zmniejszenie ilości działań niepożądanych tych leków. Poszukiwanie skutecznych metod profilaktycznych i terapeutycznych względem depresji jest istotne także z poziomu zdrowia publicznego, ze względu na możliwość ograniczenia wydatków na hospitalizację i leczenie pacjentów ze stwierdzoną depresją.

Obecnie najbardziej rozsądnym wykorzystaniem witamin w tego typu zaburzeniach wydaje się być wspomaganie klasycznego leczenia kompleksem witamin (szczególnie B9, B12 i D3).

Jeśli to możliwe, warto oznaczyć poziom wyżej wymienionych witamin u pacjentów z objawami depresji różnego typu. W Polsce lekarz rodzinny może zlecić bezpłatnie badanie poziomu witaminy B9 i B12. Badania pozostałych, równie ważnych w przebiegu depresji witamin nie są finansowane z NFZ, w związku z czym wyzwaniem w diagnostyce mogą stanowić kwestie finansowe, bowiem nie wszyscy pacjenci mogą sobie pozwolić na wykonanie prywatnie tego typu oznaczeń.

Dokładniejsze poznanie mechanizmu działania tych witamin na nastrój może znacznie pomóc w leczeniu oraz zapobieganiu zaburzeń psychicznych, szczególnie depresji, która jest obecnie dominującą chorobą na całym świecie.

Referencje

1. Rybakowski, J., Pużyński, S., Wciórka, J. (2010). *Psychiatria*. T. 2. Wrocław: Elsevier Urban & Partner, s. 305–375. ISBN 978-83-7609-102-0
2. Malhi, G. S., & Mann, J. J. (2018). Depression. *Lancet* (London, England), 392(10161), 2299–2312. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31948-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31948-2)
3. McNamara, M. E., Shumake, J., Stewart, R. A., Labrada, J., Alario, A., Allen, J., Palmer, R., Schnyer, D. M., McGeary, J. E., & Beevers, C. G. (2021). Multifactorial prediction of depression diagnosis and symptom dimensions. *Psychiatry research*, 298, 113805. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2021.113805>
4. Pużyński, S., Wciórka, J. (2007). Klasyfikacja zaburzeń psychicznych i zaburzeń zachowania w ICD-10. Opisy kliniczne i wskazówki diagnostyczne. Kraków: UWM „Vesalius”, 2007, s. 107–116. ISBN 83-85688-25-0
5. Holtzheimer, P. E., 3rd, & Nemeroff, C. B. (2006). Advances in the treatment of depression. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 3(1), 42–56. <https://doi.org/10.1016/j.nurx.2005.12.007>
6. Lang, U. E., Beglinger, C., Schweinfurth, N., Walter, M., & Borgwardt, S. (2015). Nutritional aspects of depression. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 37(3), 1029–1043. <https://doi.org/10.1159/000430229>
7. Mozaffari, H., Darooghegi Mofrad, M., Surkan, P. J., Askari, M., & Azadbakht, L. (2021). Associations between dietary intake of B-vitamins and psychological disorders among Iranian women: a cross-sectional study. *Public health nutrition*, 24(7), 1787–1797. <https://doi.org/10.1017/S1368980020002943>

8. Geng, C., Shaikh, A. S., Han, W., Chen, D., Guo, Y., & Jiang, P. (2019). Vitamin D and depression: mechanisms, determination and application. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 28(4), 689–694. [https://doi.org/10.6133/apjcn.201912_28\(4\).0003](https://doi.org/10.6133/apjcn.201912_28(4).0003)
9. Bonnet, U. (2019). The sour side of vitamin C might mediate neuroprotective, anticonvulsive and antidepressant-like effects. *Medical hypotheses*, 131, 109320. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2019.109320>
10. Chawla, J., & Kvarnberg, D. (2014). Hydrosoluble vitamins. *Handbook of clinical neurology*, 120, 891–914. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4087-0.00059-0>
11. Lanska D. J. (2010). Chapter 30: historical aspects of the major neurological vitamin deficiency disorders: the water-soluble B vitamins. *Handbook of clinical neurology*, 95, 445–476. [https://doi.org/10.1016/S0072-9752\(08\)02130-1](https://doi.org/10.1016/S0072-9752(08)02130-1)
12. Nguyen, H. D., Oh, H., & Kim, M. S. (2022). Mixtures modeling identifies vitamin B1 and B3 intakes associated with depression. *Journal of affective disorders*, 301, 68–80. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2021.12.133>
13. Tsujita, N., Akamatsu, Y., Nishida, M. M., Hayashi, T., & Moritani, T. (2019). Effect of Tryptophan, Vitamin B6, and Nicotinamide-Containing Supplement Loading between Meals on Mood and Autonomic Nervous System Activity in Young Adults with Subclinical Depression: A Randomized, Double-Blind, and Placebo-Controlled Study. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 65(6), 507–514. <https://doi.org/10.3177/jnsv.65.507>
14. Ortí, J., Cuerda-Ballester, M., Drehmer, E., Carrera-Juliá, S., Motos-Muñoz, M., Cunha-Pérez, C., Benlloch, M., & López-Rodríguez, M. M. (2020). Vitamin B1 Intake in Multiple Sclerosis Patients and its Impact on Depression Presence: A Pilot Study. *Nutrients*, 12(9), 2655. <https://doi.org/10.3390/nu12092655>
15. Zhang, G., Ding, H., Chen, H., Ye, X., Li, H., Lin, X., & Ke, Z. (2013). Thiamine nutritional status and depressive symptoms are inversely associated among older Chinese adults. *The Journal of nutrition*, 143(1), 53–58. <https://doi.org/10.3945/jn.112.167007>

16. Lin, Y. H., Chen, C. M., Su, H. M., Mu, S. C., Chang, M. L., Chu, P. Y., & Li, S. C. (2019). Association between Postpartum Nutritional Status and Postpartum Depression Symptoms. *Nutrients*, 11(6), 1204. <https://doi.org/10.3390/nu11061204>
17. Naghashpour, M., Amani, R., Nutr, R., Nematpour, S., & Haghizadeh, M. H. (2011). Riboflavin status and its association with serum hs-CRP levels among clinical nurses with depression. *Journal of the American College of Nutrition*, 30(5), 340–347. <https://doi.org/10.1080/07315724.2011.10719977>
18. Anna-leila Williams, Anne Cotter, Alyse Sabina, Christine Girard, Jonathan Goodman, David L Katz, The role for vitamin B-6 as treatment for depression: a systematic review, *Family Practice*, Volume 22, Issue 5, October 2005, Pages 532–537, <https://doi.org/10.1093/fampra/cmi040>
19. Ramírez, L. A., Pérez-Padilla, E. A., García-Oscos, F., Salgado, H., Atzori, M., & Pineda, J. C. (2018). A new theory of depression based on the serotonin/kynurenine relationship and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud*, 38(3), 437–450. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.3688>
20. Khodadad, M., Bahadoran, P., Kheirabadi, G. R., & Sabzghabae, A. M. (2021). Can Vitamin B6 Help to Prevent Postpartum Depression? A Randomized Controlled Trial. *International journal of preventive medicine*, 12, 136. https://doi.org/10.4103/ijpvm.IJPVM_240_19
21. Berkins, S., Schiöth, H. B., & Rukh, G. (2021). Depression and Vegetarians: Association between Dietary Vitamin B6, B12 and Folate Intake and Global and Subcortical Brain Volumes. *Nutrients*, 13(6), 1790. <https://doi.org/10.3390/nu13061790>
22. Curtin, A., & Johnston, C. S. (2022). Vitamin B6 Supplementation Reduces Symptoms of Depression in College Women Taking Oral Contraceptives: A Randomized, Double-Blind Crossover Trial. *Journal of dietary supplements*, 1–13. Advance online publication. <https://doi.org/10.1080/19390211.2022.2030843>

23. Bergsjo, P. (1974). Depresjon, P-piller og pyridoksin (vitamin B6) [Depression, contraceptive pills and pyridoxine (vitamin B6)]. *Tidsskrift for den Norske lægeforening : tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke*, 94(14), 936.
24. Khosravi, M., Sotoudeh, G., Amini, M., Raisi, F., Mansoori, A., & Hosseinzadeh, M. (2020). The relationship between dietary patterns and depression mediated by serum levels of Folate and vitamin B12. *BMC psychiatry*, 20(1), 63. <https://doi.org/10.1186/s12888-020-2455-2>
25. Ng, T. P., Feng, L., Niti, M., Kua, E. H., & Yap, K. B. (2009). Folate, vitamin B12, homocysteine, and depressive symptoms in a population sample of older Chinese adults. *Journal of the American Geriatrics Society*, 57(5), 871–876. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2009.02229.x>
26. Young, S. N. (2007). Folate and depression--a neglected problem. *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN*, 32(2), 80–82.
27. Bender, A., Hagan, K. E., & Kingston, N. (2017). The association of folate and depression: A meta-analysis. *Journal of psychiatric research*, 95, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2017.07.019>
28. Black, M. M. (2008). Effects of vitamin B12 and folate deficiency on brain development in children. *Food and nutrition bulletin*, 29(2 Suppl), S126–S131. <https://doi.org/10.1177/15648265080292S117>
29. Stabler, S. P., Allen, R. H., Savage, D. G., & Lindenbaum, J. (1990). Clinical spectrum and diagnosis of cobalamin deficiency. *Blood*, 76(5), 871–881.
30. Peppard, L., Oh, K. M., Gallo, S., & Milligan, R. (2019). Risk of depression in pregnant women with low-normal serum Vitamin B12. *Research in nursing & health*, 42(4), 264–272. <https://doi.org/10.1002/nur.21951>
31. Petridou, E. T., Kousoulis, A. A., Michelakos, T., Papatoma, P., Dessypris, N., Papadopoulos, F. C., & Stefanadis, C. (2016). Folate and B12 serum levels in association with depression in the aged: a systematic review and meta-analysis. *Aging & mental health*, 20(9), 965–973. <https://doi.org/10.1080/13607863.2015.1049115>

32. Sangle, P., Sandhu, O., Aftab, Z., Anthony, A. T., & Khan, S. (2020). Vitamin B12 Supplementation: Preventing Onset and Improving Prognosis of Depression. *Cureus*, 12(10), e11169. <https://doi.org/10.7759/cureus.11169>
33. Almeida, O. P., Ford, A. H., & Flicker, L. (2015). Systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials of folate and vitamin B12 for depression. *International psychogeriatrics*, 27(5), 727–737. <https://doi.org/10.1017/S1041610215000046>
34. Li, G., Mbuagbaw, L., Samaan, Z., Zhang, S., Adachi, J. D., Papaioannou, A., & Thabane, L. (2013). Efficacy of vitamin D supplementation in depression in adults: a systematic review protocol. *Systematic reviews*, 2, 64. <https://doi.org/10.1186/2046-4053-2-64>
35. Högberg, G., Gustafsson, S. A., Hällström, T., Gustafsson, T., Klawitter, B., & Petersson, M. (2012). Depressed adolescents in a case-series were low in vitamin D and depression was ameliorated by vitamin D supplementation. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*, 101(7), 779–783. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2012.02655.x>
36. Libuda, L., Timmesfeld, N., Antel, J., Hirtz, R., Bauer, J., Führer, D., Zwanziger, D., Öztürk, D., Langenbach, G., Hahn, D., Ring, S., Peters, T., Hinney, A., Bühlmeier, J., Hebebrand, J., Grasmann, C., & Föcker, M. (2020). Effect of vitamin D deficiency on depressive symptoms in child and adolescent psychiatric patients: results of a randomized controlled trial. *European journal of nutrition*, 59(8), 3415–3424. <https://doi.org/10.1007/s00394-020-02176-6>
37. Szpunar, M. J. (2020). Association of antepartum vitamin D deficiency with postpartum depression: a clinical perspective. *Public health nutrition*, 23(7), 1173–1178. <https://doi.org/10.1017/S136898001800366X>
38. Pillai, R. R., Premkumar, N. R., Kattimani, S., Sagili, H., Wilson, A. B., Sharon, L., & Rajendiran, S. (2021). Reduced Maternal Serum Total, Free and Bioavailable Vitamin D Levels and its Association with the Risk for Postpartum Depressive Symptoms. *Archives of medical research*, 52(1), 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.10.003>

39. Aghajafari, F., Letourneau, N., Mahinpey, N., Cosic, N., & Giesbrecht, G. (2018). Vitamin D Deficiency and Antenatal and Postpartum Depression: A Systematic Review. *Nutrients*, 10(4), 478. <https://doi.org/10.3390/nu10040478>
40. Spedding S. (2014). Vitamin D and depression: a systematic review and meta-analysis comparing studies with and without biological flaws. *Nutrients*, 6(4), 1501–1518. <https://doi.org/10.3390/nu6041501>
41. Okereke, O. I., & Singh, A. (2016). The role of vitamin D in the prevention of late-life depression. *Journal of affective disorders*, 198, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2016.03.022>
42. Vellekkatt, F., & Menon, V. (2019). Efficacy of vitamin D supplementation in major depression: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of postgraduate medicine*, 65(2), 74–80. https://doi.org/10.4103/jpgm.JPGM_571_17
43. Balanzá Martínez, V. (2017). Nutritional supplements in psychotic disorders. *Actas espanolas de psiquiatria*, 45(Supplement), 16–25.

TERAPIA Z WYKORZYSTANIEM TECHNIK WIRTUALNEJ RZECZYWISTOŚCI W LECZENIU FOBII SPOŁECZNEJ

Magdalena Stencel, Michał Bielówka, Łukasz Czogalik,
Natalia Denisiewicz, Michał Janik, Jakub Kufel

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

Abstrakt: Fobia społeczna to jedna z najczęściej występujących chorób psychicznych, należąca do grupy zaburzeń lękowych. Leczenie tej choroby opiera się głównie na farmakoterapii i psychoterapii. Najczęściej stosowana w tym zaburzeniu jest terapia poznawczo-behawioralna. Jednym z elementów tej terapii jest ekspozycja, polegająca na prezentacji bodźców fobicznych. Obecnie podejmowane są próby wykorzystania w tym komponencie technik wirtualnej rzeczywistości. Mogą one stanowić bardziej użyteczną alternatywę dla standardowej ekspozycji in vivo. Ich wykorzystanie rodzi wiele perspektyw terapeutycznych, ponieważ pacjent może zostać wystawiony na wiele bodźców, których odtworzenie w gabinecie terapeutycznym byłoby niemożliwe. Wykorzystanie technik wirtualnej rzeczywistości w leczeniu fobii stwarza także możliwości terapii w warunkach domowych. Celem niniejszego rozdziału jest omówienie aspektów związanych z wykorzystaniem technik wirtualnej rzeczywistości w leczeniu fobii społecznej. W tym celu przeanalizowano związaną z tematem literaturę dostępną w bazach medycznych takich jak: PubMed, Google Scholar, Scopus.

Słowa kluczowe: fobia społeczna, wirtualna rzeczywistość, terapia poznawczo-behawioralna

Abstract: Social anxiety disorder is one of the most common mental illnesses which belongs to the group of anxiety disorders. Treatment of this disease is based on pharmacotherapy and psychotherapy. The most often used treatment for this disorder is cognitive behavioral therapy. One of the components of this therapy is exposure, which is based on a presentation of phobic stimuli. Currently, it is attempted to use virtual reality in the treatment of anxiety disorder. It is said that virtual reality can be a more useful alternative for conventional in vivo exposure. Use of this technology opens a wide perspective of therapies due to the possibility of a patient being exposed to more stimuli which normally would not be possible in a therapist's consulting room. Furthermore, use of a virtual reality allows treatment of phobias at home. The aim of this section is to discuss aspects related to use of virtual technology in treatment of social anxiety disorder. To achieve that, we analyzed literature available at popular medical bases: PubMed, Google Scholar, Scopus.

Keywords: social anxiety disorder, virtual reality, cognitive-behavioral therapy

1. Wstęp

Fobia społeczna (ang. social anxiety disorder - SAD) jest chorobą należąca do grupy zaburzeń lękowych, charakteryzuje się ona nadmiernym lękiem przed negatywną oceną i odrzuceniem przez inne osoby oraz przed zakłopotaniem lub upokorzeniem. Sytuacje społeczne takie jak rozmowa lub spotkanie z nieznanym powodują u pacjenta wysoki poziom lęku¹. Osoby cierpiące na to zaburzenie postrzegają sytuacje społeczne jako niebezpieczne, co prowadzi do unikania takich sytuacji i stosowania zachowań bezpiecznych. Zaburzenie to w znacznym stopniu oddziałuje na pacjenta, wpływając na wiele aspektów jego życia. Powoduje m.in. zakłócenie tworzenia sieci społecznych czy relacji intymnych².

SAD jest jednym z najczęściej występujących zaburzeń psychicznych w populacji ogólnej. Oszacowana na podstawie badań z różnych części świata częstość występowania SAD wynosi 4,5%³. Jednak nowsze badania wskazują na fakt, że ryzyko zachorowania na fobię społeczną w ciągu życia wynosi nawet 13%⁴. SAD rozpoczyna się zazwyczaj w okresie dzieciństwa lub dojrzewania, znacznie rzadziej zdarza się, aby pierwsze objawy występowały później. U osób młodych zaburzenie to pojawia się z podobną częstością u obydwu płci, z kolei u osób starszych występuje dwukrotnie częściej u kobiet niż u mężczyzn⁵.

W przypadku fobii społecznej możemy mieć do czynienia z podtypem uogólnionym lub nieuogólnionym. Większość przypadków SAD to podtyp uogólniony, w którym większość sytuacji społecznych prowadzi do lęku. Z kolei w nieuogólnionym typie fobii społecznej, lęk pojawia się w jednej konkretnej sytuacji lub kilku. Najczęściej występującym jest lęk przed wystąpieniami publicznymi (ang. public speaking anxiety - PSA)⁵.

W tym zaburzeniu występuje błędne koło katastroficznych przekonań na temat przebiegu wystąpienia publicznego oraz jego oceny przez innych³. To błędne koło prowadzi do unikania sytuacji lękowych (a to z kolei powoduje, że katastroficznych przekonań nigdy nie można podważyć) albo do wzmożonej reaktywności fizjologicznej w sytuacji wystąpienia wzmożonej samouważności i/lub dysfunkcyjnych zachowań zabezpieczających⁶.

Lęk przed wystąpieniami występuje bardzo często. Jedna trzecia populacji zgłasza nadmierny niepokój przed wystąpieniem przed publicznością, a u 10% populacji powoduje on znaczne cierpienie lub zakłócenie życia codziennego⁷. Badanie Tillfors et al. wykazało, że lęk przed wystąpieniami

publicznymi jest najbardziej rozpowszechnionym lękiem społecznym zarówno wśród osób z fobią społeczną 71,4%, jak i bez 8,7%⁸.

Etiologia SAD jest wieloczynnikowa, znaczenie mają zarówno czynniki biologiczne, jak i psychologiczne. U znacznej ilości pacjentów cierpiących na SAD stwierdza się zaburzenia układu serotonergicznego. Czasami SAD występuje rodzinnie, co może mieć podłoże w uwarunkowaniach genetycznych SAD lub w przejmowaniu zachowań występujących u członków rodziny⁵.

Leczenie SAD obejmuje psychoterapię i farmakoterapię. Badania wskazują na większą skuteczność farmakoterapii w porównaniu z psychoterapią, jednak największą skutecznością wydaje się cechować leczenie obejmujące zarówno psychoterapię, jak i farmakoterapię⁹.

Farmakoterapia w leczeniu fobii społecznej obejmuje przede wszystkim selektywne inhibitory zwrotnego wychwyty serotoniny (ang. selective serotonin reuptake inhibitor -SSRI) oraz inhibitory zwrotnego wychwyty serotoniny i noradrenaliny (ang. serotonin norepinephrine reuptake inhibitor - SNRI). Inne opcje leczenia obejmują m. in. trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne czy inhibitory monoaminooksydazy. Benzodiazepiny są stosowane doraźnie i nie zaleca się ich rutynowego przyjmowania^{5,9}.

Psychoterapia w większości zaburzeń lękowych opiera się na terapii poznawczo-behawioralnej (ang. cognitive-behavioral therapy - CBT)¹⁰. Jest to terapia krótkoterminowa, skoncentrowana na umiejętnościach, która ma na celu zmianę reakcji emocjonalnych pacjenta poprzez zmianę myśli lub/i zachowań pacjenta¹¹. CBT łączy w sobie elementy poznawcze i behawioralne¹².

Terapie te można stosować łącznie lub oddzielnie, poddając pacjenta terapii poznawczej lub behawioralnej. Obydwie wykazują skuteczność w leczeniu SAD, jednak badania skupiające się na porównaniu tych dwóch terapii wykazały większą skuteczność terapii poznawczej¹³.

W CBT wykorzystywane są różne techniki psychoterapeutyczne m.in. ekspozycja. Stosowana jest ona w terapii behawioralnej i ma ona na celu przyzwyczajenie pacjenta do danych bodźców, konfrontację z katastroficznymi przekonaniami, a w efekcie także zmniejszenie lęku jaki powodują bodźce fobiczne. Nowym, obiecującym narzędziem w terapii ekspozycyjnej jest wirtualna rzeczywistość¹⁴.

2. Wirtualna rzeczywistość

Rzeczywistość wirtualna (ang. *virtual reality* - VR) to trójwymiarowy obraz cyfrowej rzeczywistości stworzony poprzez wykorzystanie systemów

komputerowych w połączeniu z różnymi urządzeniami wyświetlającymi i interfejsowymi w celu zapewnienia efektu immersji w interaktywnym środowisku¹⁵. Wirtualna rzeczywistość wpływa na doświadczenia zmysłowe odbiorcy, oddziałując na takie zmysły jak wzrok czy słuch. Możliwe jest także wykreowanie wrażeń dotykowych.

2.1. Wirtualna rzeczywistość w terapii ekspozycyjnej

Terapia ekspozycyjna z wykorzystaniem wirtualnej rzeczywistości (ang. *virtual reality exposure therapy* - VRET) polega na wykorzystaniu wirtualnej rzeczywistości do prezentacji bodźców, które powodują u osoby cierpiącej na fobię społeczną reakcję podobne do tych, które wywołują rzeczywiste bodźce fobiczne¹⁴.

W VRET dla pacjentów z fobią społeczną lub lękiem przed wystąpieniami generowane są wirtualne środowiska naśladujące typowe miejsca, w których odbywają się sytuacje zmuszające osobę do wejścia w interakcje z innymi ludźmi (np. sklep, szkoła, urząd) lub wygłoszenia publicznego wystąpienia (np. sale konferencyjne, aule). Te środowiska wypełnione są awatarami, którymi można manipulować, w różnym stopniu w zależności od zaawansowania oprogramowania. Zadaniem uczestnika jest zazwyczaj rozmowa z awatarem lub wygłoszenie krótkiej przemowy przed wirtualną publicznością na zadany przez terapeutę temat^{4,14,16}.

W terapii ekspozycyjnej z wykorzystaniem technik wirtualnej rzeczywistości zwykle stosuje się wyświetlacz umieszczony na głowie. Ma on postać gogli z dwoma ekranami, wyświetlającymi obraz nieznacznie różny dla każdego oka, w celu stworzenia wrażenia trójwymiarowości. Wyświetlacz jest kooperatywny z ruchem głowy, dzięki obecności specjalnych czujników, umożliwiając użytkownikowi rozglądanie się po wirtualnym środowisku. Zaangażowanie sensoryczne może być zwiększane poprzez interaktywny dźwięk, dostarczany przez słuchawki stereo i ręczne kontrolery. Pozwala to na zwiększenie immersji i umożliwia większą interakcję z wirtualnym środowiskiem^{4,14,17}.

3. Terapia ekspozycyjna z wykorzystaniem wirtualnej rzeczywistości w leczeniu fobii społecznej

Charakter fobii społecznej powoduje problemy w zastosowaniu w jej leczeniu terapii ekspozycyjnej ze względu na to, że sytuacje fobiczne są trudne do odtworzenia w warunkach terapeutycznych. Te problemy mogą jednak

zostać rozwiązane przez systemy wirtualnej rzeczywistości. VRET umożliwia naśladowanie sytuacji społecznych, które są istotne w kontekście terapeutycznym, dzięki czemu staje się istotnym narzędziem terapeutycznym¹⁸.

Wyniki badań na temat skuteczności VRET w leczeniu fobii społecznej są obiecujące. Większość badaczy zgadza się, co do faktu, że VRET jest skutecznym narzędziem w leczeniu fobii społecznej¹⁸.

Badanie obejmujące pacjentów z wysokim poziomem lęku społecznego, u których zastosowano leczenie z wykorzystaniem systemu wirtualnej rzeczywistości zaprojektowanego specjalnie w celu ekspozycji na wywołujące lęk sytuacje społeczne, doprowadziło do zmniejszenia lęku społecznego i zwiększenia poczucia własnej wartości po dwóch sesjach terapeutycznych¹⁹.

Badania na temat skuteczności VRET w porównaniu z ekspozycją *in vivo* w leczeniu SAD nie dostarczają jednoznacznych wyników. Niektóre wskazują na niższą skuteczność VRET²⁰, szczególnie zaznacza się to, gdy ekspozycje nie są wspomagane interwencją poznawczą²¹. Inne pokazują, że VRET ma taką samą skuteczność jak terapia poznawczo-behawioralna *in vivo*²²⁻²³ lub wyższą²⁴.

Ponadto badania wskazują na niższy odsetek pacjentów opuszczających sesję z użyciem VR w porównaniu ze standardowymi sesjami terapeutycznymi²³, a także na dłuższe utrzymywanie się efektów leczenia za pomocą VRET²².

Przeprowadzono także badania, które miały wykazać jaka jest optymalna ilość sesji z udziałem VR, która przynosi poprawę. Wykazano, że już 5-6 sesji może być skuteczne w leczeniu SAD, przy czym za optymalną długość uznaje się 9-10 sesji. Przy braku wystarczającej poprawy, dodatkowe sesje przynoszą jedynie minimalną korzyść²⁵.

4. Terapia ekspozycyjna z wykorzystaniem wirtualnej rzeczywistości w leczeniu lęku przed wystąpieniami

Ze względu na to, że w lęku przed wystąpieniami występują błędne, katastroficzne przekonania o przebiegu wystąpienia publicznego oraz jego ocenie przez innych³, chorzy unikają sytuacji lękowych – co powoduje, że katastroficznych myśli nigdy nie można podważyć. Wystąpienia publiczne powodują u chorych wzmożoną reaktywność fizjologiczną i dysfunkcyjne zachowanie zabezpieczające⁴.

Protokół leczenia jest więc ukierunkowany na konkretne katastroficzne przekonania danego pacjenta²⁶, które próbuje się wyprzeć poprzez ćwiczenia, polegające na ekspozycji. Kładą one nacisk na naukę kontrolowania

psychologicznych reakcji²⁷. Protokół leczenia lęku przed wystąpieniami z użyciem technik VR opiera się na tradycyjnych technikach ekspozycji podczas sesji^{28,29}. Leczenie działa poprzez negowanie katastrofalnych przekonań i zwiększenie samooceny⁴.

Wiele badań wskazuje na skuteczność VRET w terapii PSA, mierzoną zarówno poprzez ocenę kwestionariuszową, jak i poprzez ocenę somatyzacji wykorzystując m.in. badanie tętna³⁰⁻³⁴.

Ocena skuteczności jednosesyjnej terapii ekspozycyjnej z wykorzystaniem VR w przebiegu PSA w warunkach rutynowej opieki wykazała, że system VR jest gotowy do wejścia do użytku klinicznego. W opisywanym badaniu terapia polegała na wykonywaniu ćwiczeń mowy przed cyfrowo wygenerowaną publicznością. Pacjenci wykonywali zadania, które polegały na przykład na przedstawieniu się bądź wypowiedzianiu szybko słów na daną literę, terapeuci tworzyli również swoje zadania ukierunkowane na katastroficzne przekonania pacjenta. Zauważalną zaletą systemu VR było dostosowanie nastroju, atmosfery, otoczenia, reakcji publiczności w przebiegu wykonywanych przez pacjenta zadań. Pacjenci po wykonaniu zadania mieli także dostęp do swojej mowy, którą mogą oglądać, jako członek publiczności. Rezultatem przeprowadzonego badania było zmniejszenie u pacjentów katastroficznych przekonań, a także wzrost oceny własnych możliwości⁴.

Warty podkreślenia jest jednak fakt, że reakcja fizjologiczna na występ w wirtualnej rzeczywistości jest mniejsza, niż gdy występuje prawdziwa ekspozycja⁴. Istnieją dwie hipotezy na wyjaśnienie tego zjawiska.

Pierwsza zakłada, że ten fakt może być związany ze złożonością graficznych przedstawień i ludzkich reakcji w postaci cyfrowej³⁵. Jednak niektóre badania przeczą tej hipotezie, wskazując na fakt, że reakcja lękowa osób z PSA jest znaczna, nawet jeśli wierność graficzna i behawioralna awatarów jest niska³⁶.

Druga hipoteza bierze pod uwagę fakt, że w lęku przed wystąpieniami katastroficzne przekonania często dotyczą oceny przez innych, a to może być trudne do przywołania w wirtualnej rzeczywistości, gdy pacjent ma świadomość, że nie ma do czynienia z prawdziwymi ludźmi⁴. Istnieje jednak możliwość rozwiązania tego problemu, dzięki zastąpieniu awatarów sterowanych przez oprogramowanie realnymi osobami przez nie reprezentowanymi³⁷. Wpływ takiego rozwiązania powinien jednak być przedmiotem dalszych badań⁴.

Aspektem, na który warto zwrócić uwagę przy projektowaniu sesji z udziałem VRET, jest fakt, że nastawienie publiczności wpływa na poziom lęku u pacjenta, co może mieć implikacje kliniczne i wpływ na leczenie³⁸.

5. Terapia poznawczo-behawioralna w psychoterapii z użyciem wirtualnej rzeczywistości

Terapia poznawczo-behawioralna w leczeniu SAD polega na poddawaniu pacjenta ekspozycji, która obejmuje konfrontację z bodźcami fobicznymi, jednocześnie eliminując zachowania związane z bezpieczeństwem, tak aby uświadomić pacjentom, że ich negatywne konsekwencje są mało prawdopodobne¹⁸.

Przeprowadzono wiele badań w celu sprawdzenia konieczności zastosowania w terapii zarówno elementów poznawczych, jak i behawioralnych. Na ich podstawie nie można jednoznacznie stwierdzić czy wystarczy sama terapia behawioralna, poznawcza, czy jednak niezbędne jest połączenie obu tych komponentów^{11,39}.

W badaniu pilotażowym, w którym porównywano skuteczność VRET do terapii poznawczej (ang. *cognitive therapy* –CT) i CBT w leczeniu PSA wykazano redukcję lęku w przebiegu każdej z terapii w porównaniu do listy oczekujących, przy czym same terapie nie różniły się od siebie znacząco skutecznością². Ten aspekt wymaga jednak dalszych badań podobnie jak porównanie skuteczności VRET zarówno z jak i bez restrukturyzacji poznawczej w porównaniu ze standardową ekspozycją i terapią poznawczo-behawioralną *in vivo*.

Istotnym elementem CBT jest przymierze terapeutyczne⁴⁰, opisywane jako stopień w jakim pacjent i terapeuta są zaangażowani we wspólną pracę, zmierzającą do konkretnego celu⁴¹. Ze względu na użycie technik wirtualnej rzeczywistości jakość przymierza terapeutycznego mogłaby być pogorszona. Badania wykazały, jednak że pacjenci poddawani terapii VRET zgłaszają porównywalne oceny przymierza terapeutycznego do osób poddawanych tradycyjnej terapii ekspozycyjnej *in vivo*, co zaprzecza tym hipotezom⁴².

6. Sprzęt i oprogramowanie

Do niedawna wykorzystanie VR było ograniczone ze względu na koszty użycia oraz niską jakość sprzętu, a także występowanie choroby lokomocyjnej na skutek użytkowania⁴³.

Postęp techniki i obecne osiągnięcia technologiczne m.in. gotowe platformy VR umożliwiają powszechne wykorzystanie VR do celów terapeutycznych²¹.

W randomizowanym kontrolnym badaniu klinicznym Lindner i in. sprawdzili czy tani, konsumencki sprzęt i oprogramowanie VR można wykorzystać do przeprowadzenia VRET. Do badania użyto Samsung Gear VR oraz gotowej aplikacji VirtualSpeech, która została zaprojektowana do praktyki wystąpień publicznych. Wyniki wykazały, że terapia z użyciem takiego sprzętu prowadzi do spadku lęku u pacjentów³⁴.

7. Poczucie obecności

Jedną z cech VR jest immersja, którą możemy zdefiniować jako zmysłowy kontekst doświadczanej rzeczywistości, powodujący wrażenie bycia w tej rzeczywistości.

Immersję możemy osiągnąć poprzez usunięcie realnych bodźców i zastąpienie ich doznaniem ze środowiska wirtualnego. Na immersję wpływa wiele aspektów m.in. jakość użytego sprzętu, a co za tym idzie rozdzielczość obrazu, szybkość odświeżania, przestrzenność dźwięku¹⁷.

Związana z nią jest kolejna cecha - poczucie obecności, które może być zdefiniowane, jako odczuwanie środowiska wirtualnego jakby było realne⁴⁴. Jej wyznacznikiem jest stopień, w jakim ludzie przebywający w wirtualnym środowisku reagują realistycznie na prezentowane bodźce zarówno pod względem fizjologicznym, jak i emocjonalnym czy behawioralnym⁴⁵.

Można wyróżnić dwie składowe poczucia obecności: iluzję miejsca - poczucie, że rzeczywiście jest się w prezentowanym miejscu i iluzję prawdopodobieństwa - złudzenie, że doświadczana sytuacja jest realna^{17,46}.

Obecność jest jednak zależna nie tylko od immersji, ale też od zaangażowania użytkownika i siły emocji jakie wywołują bodźce środowiska wirtualnego¹⁷.

Autorzy badań nie zawsze rozgraniczają pojęcia poczucia obecności i immersji.

Można jednak stwierdzić, że badania nie są do końca jednoznaczne jeśli chodzi o związek immersji i poczucia obecności z poziomem lęku. Część badań wskazuje na związek poczucia obecności i immersji z poziomem odczuwanego strachu⁴⁷⁻⁴⁹. Inne badania wskazują jednak na brak zależności między tymi parametrami a poziomem lęku⁵⁰.

Badania nie wykazują jednak, aby obecność miała znaczący wpływ na leczenie zaburzeń lękowych⁵¹. Wskazują raczej na fakt, że pewien stopień immersji i poczucia obecności jest konieczny do przeprowadzenia skutecznej terapii ekspozycyjnej VR, ale zwiększenie ich nie wpływa istotnie na leczenie⁵².

8. Bezpieczeństwo terapii

Badania co do bezpieczeństwa terapii z użyciem VR są stosunkowo spójne. Badani albo nie zgłaszają skutków ubocznych przy stosowaniu VRET⁵³ albo zgłaszają raczej niskie natężenie objawów ubocznych. Jednak zdarzają się pacjenci, u których skutki uboczne są dotkliwe, dlatego pacjenci poddawani VRET powinni być monitorowani pod tym kątem⁵⁴.

Ponadto większość pacjentów ocenia swoje doświadczenia z terapią z użyciem VR jako przyjemne lub neutralne⁵⁵. Warto jednak zwrócić uwagę na fakt, że w wyniku ekspozycji na VR może dojść do wzrostu doświadczenia dysocjacyjnego i zmniejszenia poczucia obecności w rzeczywistości⁵⁶.

Współczynniki pogorszenia w VRET są porównywalne z innymi podejściami terapeutycznymi. Ponadto współczynnik pogorszenia jest mniejszy u pacjentów leczonych VR w porównaniu z pacjentami z grup kontrolnych na liście oczekujących⁵⁷.

9. Terapia zdalna

Terapia ekspozycji w rzeczywistości wirtualnej (VRET) może mieć w przyszłości także zastosowanie w warunkach domowych.

Opracowywane są systemy, takie jak system Memphis, które będą mogły być zastosowane do terapii fobii społecznej w warunkach domowych. System Memphis dodatkowo zawiera wirtualnego agenta zdrowia, który prowadzi pacjentów przez różne etapy terapii⁵⁸.

Potencjał wykorzystania tego typu terapii jest duży, może ona stanowić część zdalnej nadzorowanej terapii domowej lub dodatkowego systemu prac domowych poza regularną terapią. Niezbędne są jednak dalsze badania w celu sprawdzenia użyteczności i skuteczności tych systemów⁵⁸.

We wspomnianym wcześniej badaniu Lindner et al. sprawdzili możliwości wykorzystania samodzielnie prowadzonej terapii VR w leczeniu PSA. Połowa uczestników była leczona jedną sesją VRET połączoną z restrukturyzacją poznawczą w gabinecie terapeuty, a następnie 4-tygodniowym programem składającym się z ćwiczeń VRET w domu i ćwiczeń ekspozycji publicznych in vivo dwa razy w tygodniu. Druga połowa uczestników otrzymała takie samo leczenie, ale w pełni samodzielnie prowadzona w domu. Obie terapie doprowadziły, do znacznego zmniejszenia zgłaszanego przez nich lęku przed wystąpieniami publicznymi w porównywalnym stopniu. Jednak do oceny

czy samodzielna interwencja może być łatwo zastosowana w praktyce klinicznej, niezbędne są dalsze badania ³⁴.

10. Zalety stosowania terapii ekspozycyjnej z wykorzystaniem wirtualnej rzeczywistości

Zaletami stosowania technik wirtualnej rzeczywistości jest możliwość odtworzenia rzeczywistych bodźców fobicznych, co jest szczególnie istotne dla osób, które mają problem z żywym wyobrażaniem sobie sytuacji lub unikają pozostawania w wyobrażonej sytuacji stresowej, a także w sytuacjach, w których naśladowanie bodźców i sytuacji, które są istotne w kontekście terapeutycznym, jest trudne bądź niemożliwe do naśladowania w warunkach standardowej terapii ¹⁸.

Kolejną zaletą jest pełna kontrola użytkownika lub terapeuty nad doświadczeniem terapeutycznym ^{2,4}, a przez to także możliwość dostosowania bodźców do indywidualnych lęków pacjenta ⁵⁹. Techniki wirtualnej rzeczywistości pozwalają terapeutom na lepsze kontrolowanie ekspozycji na bodźce wywołujące lęk (np. zmiana sytuacji stresowych, dodanie nowych źródeł bodźców) niż na to miejsce w sesjach ekspozycji *in vivo* ²³.

Dodatkowo poziom lęku może być kontrolowany przez obiektywne parametry takie jak np. częstość akcji serca, co pozwala na bezpieczne dostosowanie ekspozycji do odczuwanego przez pacjenta poczucia zagrożenia ⁶⁰.

SAD jest zaburzeniem, które często współwystępuje z innymi chorobami i może powodować zmniejszoną chęć poszukiwania leczenia ⁶¹. Terapia z użyciem VR może być alternatywą dla osób niechęcych poddać się innemu leczeniu ⁶². W szczególności terapia zdalna stwarza nowe perspektywy dla osób, które obawiają się poddać standardowemu leczeniu.

VRET może także w przyszłości umożliwić automatyzację terapii i zmniejszenie jej kosztów ^{63, 64}. Ważną zaletą VR-CBT (ang. *virtual reality cognitive-behavioral therapy*) jest także mniejszy odsetek pacjentów porzucających terapię w porównaniu ze standardowym CBT ⁶⁵.

11. Podsumowanie

Użycie technik wirtualnej rzeczywistości w terapii ekspozycyjnej w leczeniu fobii społecznej było poddawane licznym badaniom. Ich wyniki są niezwykle obiecujące, wykazano dużą skuteczność takiej terapii zarówno w podtypie uogólnionym, jak i w lęku przed wystąpieniami. Wyniki leczenia

za pomocą VRET w porównaniu do standardowej ekspozycji *in vivo* są podobne.

Badania wskazują na gotowość VRET do wejścia do użytku klinicznego. Możliwe do wykorzystania w tym celu jest tani, konsumencki sprzęt i gotowe oprogramowania.

Jednak w celu zoptymalizowania efektywności terapii VR konieczne są dalsze badania nad wpływem różnych czynników na skuteczność leczenia, a także stworzenie lepszych oprogramowań z bardziej realistycznymi dialogami i większą możliwością zróżnicowania scenariuszy, którym poddawany jest pacjent.

Terapia z użyciem VR ma wiele zalet i może być niezwykle pomocna w przebiegu psychoterapii, podnosząc skuteczność leczenia, szczególnie gdy nie jest możliwa standardowa ekspozycja *in vivo*.

Szerokie możliwości wykorzystania daje samodzielna terapia z użyciem VR. Może stanowić to alternatywę dla osób, które nie mają czasu lub środków na standardową terapię. Takie wykorzystanie VR wymaga jednak dalszych badań i stworzenia nowych, zoptymalizowanych oprogramowań.

Referencje

1. American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*.
2. Wallach, H. S., Safir, M. P., & Bar-Zvi, M. (2011). Virtual reality exposure versus cognitive restructuring for treatment of public speaking anxiety: a pilot study. *The Israel journal of psychiatry and related sciences*, 48(2), 91–97.
3. Somers, J. M., Goldner, E. M., Waraich, P., & Hsu, L. (2006). Prevalence and incidence studies of anxiety disorders: a systematic review of the literature. *Canadian journal of psychiatry. Revue canadienne de psychiatrie*, 51(2).
4. Lindner, P., Dagö, J., Hamilton, W., Miloff, A., Andersson, G., Schill, A., & Carlbring, P. (2021). Virtual Reality exposure therapy for public speaking anxiety in routine care: a single-subject effectiveness trial. *Cognitive behaviour therapy*, 50(1).
5. Rabe-Jabłońska, J. (2002). Fobia społeczna. Rozpowszechnienie, kryteria rozpoznawania, podtypy, przebieg, współchorobowość, leczenie. *Psychiatria w Praktyce Ogólnolekarskiej*, 2(3).

6. Kessler, R. C., Petukhova, M., Sampson, N. A., Zaslavsky, A. M., & Wittchen, H. (2012). Twelve-month and lifetime prevalence and lifetime morbid risk of anxiety and mood disorders in the United States. *International journal of methods in psychiatric research*, 21(3).
7. Stein, M. B. (1996). Public-speaking fears in a community sample. *Archives of General Psychiatry*, 53(2).
8. Tillfors, M., & Furmark, T. (2007). Social phobia in Swedish university students: Prevalence, subgroups and avoidant behavior. *Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology*, 42(1).
9. Bandelow, B., Michaelis, S., & Wedekind, D. (2017). Treatment of anxiety disorders. *Dialogues in clinical neuroscience*, 19(2), 93–107.
10. National Collaborating Centre for Mental Health (UK). (2013). *Social Anxiety Disorder: Recognition, Assessment and Treatment*. British Psychological Society (UK).
11. Kaczurkin, A. N., & Foa, E. B. (2015). Cognitive-behavioral therapy for anxiety disorders: an update on the empirical evidence. *Dialogues in clinical neuroscience*, 17(3), 337–346.
12. Craske, M. G. (1999). *Anxiety disorders: Psychological approaches to theory and treatment*. Boulder, CO: Westview Press.
13. Clark, D. M., Ehlers, A., Hackmann, A., McManus, F., Fennell, M., Grey, N., Waddington, L., & Wild, J. (2006). Cognitive therapy versus exposure and applied relaxation in social phobia: A randomized controlled trial. *Journal of consulting and clinical psychology*, 74(3)).
14. Vanni, F., Conversano, C., Del Debbio, A., Landi, P., Carlini, M., Fanciullacci, C., Bergamasco, M., Di Fiorino, A., & Dell'Osso, L. (2013). A survey on virtual environment applications to fear of public speaking. *European review for medical and pharmacological sciences*, 17(12), 1561–1568.
15. Pan, Z., Cheok, A., Yang, H., Zhu, J. and Shi, J., (2006). Virtual reality and mixed reality for virtual learning environments. *Computers & Graphics*, 30(1), 20-28.

16. Kampmann, I.L., Emmelkamp, P.M.G., Hartanto, D., Brinkman, W.-P., Zijlstra, B.J.H., Morina, N. (2016). Exposure to virtual social interactions in the treatment of social anxiety disorder: A randomized controlled trial. *Behaviour Research and Therapy*, 77, 147-156.
17. Kruk, D., Mętel, D., & Cechnicki, A. (2019). A paradigm description of virtual reality and its possible applications in psychiatry. *Advances in Psychiatry and Neurology/Postępy Psychiatrii i Neurologii*, 28(2), 116-134.
18. Kampmann, I. L., Emmelkamp, P. M., & Morina, N. (2016). Meta-analysis of technology-assisted interventions for social anxiety disorder. *Journal of anxiety disorders*, 42, 71-84.
19. Morina, N., Brinkman, W. P., Hartanto, D., Kampmann, I. L., & Emmelkamp, P. M. (2015). Social interactions in virtual reality exposure therapy: A proof-of-concept pilot study. *Technology and health care : official journal of the European Society for Engineering and Medicine*, 23(5), 581-589.
20. Wechsler, T. F., Kümpers, F., & Mühlberger, A. (2019). Inferiority or Even Superiority of Virtual Reality Exposure Therapy in Phobias?-A Systematic Review and Quantitative Meta-Analysis on Randomized Controlled Trials Specifically Comparing the Efficacy of Virtual Reality Exposure to Gold Standard in vivo Exposure in Agoraphobia, Specific Phobia, and Social Phobia. *Frontiers in psychology*, 10, 1758.
21. Klinger, E., Bouchard, S., Légeron, P., Roy, S., Lauer, F., Chemin, I., & Nugues, P. (2005). Virtual reality therapy versus cognitive behavior therapy for social phobia: a preliminary controlled study. *Cyberpsychology & behavior : the impact of the Internet, multimedia and virtual reality on behavior and society*, 8(1), 76-88.
22. Emmelkamp, P., Meyerbröker, K., & Morina, N. (2020). Virtual Reality Therapy in Social Anxiety Disorder. *Current psychiatry reports*, 22(7), 32.
23. Klinger, E., Légeron, P., Roy, S., Chemin, I., Lauer, F., & Nugues, P. (2004). Virtual reality exposure in the treatment of social phobia. *Studies in health technology and informatics*, 99, 91-119.

24. Bouchard, S., Dumoulin, S., Robillard, G., Guitard, T., Klinger, É., Forget, H., Loranger, C., & Roucaut, F. X. (2017). Virtual reality compared with in vivo exposure in the treatment of social anxiety disorder: a three-arm randomised controlled trial. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science*, 210(4), 276–283.
25. Jeong, H. S., Lee, J. H., Kim, H. E., & Kim, J. J. (2021). Appropriate Number of Treatment Sessions in Virtual Reality-Based Individual Cognitive Behavioral Therapy for Social Anxiety Disorder. *Journal of clinical medicine*, 10(5), 915
26. Hofmann, S. G. (2007). Cognitive factors that maintain social anxiety disorder: A comprehensive model and its treatment implications. *Cognitive Behaviour Therapy*, 36(4), 193–209.
27. Craske, M. G., Treanor, M., Conway, C. C., Zbozinek, T., & Vervliet, B. (2014). Maximizing exposure therapy: An inhibitory learning approach. *Behaviour Research and Therapy*, 58, 10–23
28. Ollendick, T. H., & Davis, T. E. (2013). One-session treatment for specific phobias: A review of Öst's single-session exposure with children and adolescents. *Cognitive Behaviour Therapy*, 42 (4), 275–283.
29. Öst, L. G. (1989). One-session treatment for specific phobias. *Behaviour Research and Therapy*, 27 (1), 1–7.
30. North, M. M., North, S. M., & Coble, J. R. (1997). Virtual reality therapy: an effective treatment for psychological disorders. *Studies in health technology and informatics*, 44, 59–70.
31. Harris, S. R., Kemmerling, R. L., & North, M. M. (2002). Brief virtual reality therapy for public speaking anxiety. *CyberPsychology & Behavior*, 5(6), 543–550.
32. Anderson, P., Rothbaum, B. O., & Hodges, L. F. (2003). Virtual reality exposure in the treatment of social anxiety. *Cognitive and Behavioral Practice*, 10(3), 240–247.
33. Anderson, P. L., Zimand, E., Hodges, L. F., & Rothbaum, B. O. (2005). Cognitive behavioral therapy for public-speaking anxiety using virtual reality for exposure. *Depression and anxiety*, 22(3), 156–158.

34. Lindner, P., Miloff, A., Fagernäs, S., Andersen, J., Sigeman, M., Andersson, G., Furmark, T., & Carlbring, P. (2019b). Therapist-led and self-led one-session virtual reality exposure therapy for public speaking anxiety with consumer hardware and software: A randomized controlled trial. *Journal of Anxiety Disorder*, 61(2), 45–54.
35. Seyama, J., & Nagayama, R. S. (2007). The uncanny valley: Effect of realism on the impression of artificial human faces. *Presence: Teleoperators & Virtual Environments*, 16(4), 337–351.
36. Slater, M., Pertaub, D. P., Barker, C., & Clark, D. M. (2006). An experimental study on fear of public speaking using a virtual environment. *Cyberpsychology & behavior : the impact of the Internet, multimedia and virtual reality on behavior and society*, 9(5), 627–633.
37. Oh, C. S., Bailenson, J. N., & Welch, G. F. (2018). A systematic review of social presence: Definition, antecedents, and implications. *Frontiers in Robotics and AI*, 5.
38. Pertaub, D.-P., Slater, M., & Barker, C. (2002). An experiment on public speaking anxiety in response to three different types of virtual audience. *Presence: Teleoperators and Virtual Environments*, 11(1), 68–78.
39. Butler, A. C., Chapman, J. E., Forman, E. M., & Beck, A. T. (2006). The empirical status of cognitive-behavioral therapy: a review of meta-analyses. *Clinical psychology review*, 26(1), 17–31.
40. Wampold B. E. (2015). How important are the common factors in psychotherapy? An update. *World psychiatry : official journal of the World Psychiatric Association (WPA)*, 14(3), 270–277.
41. Horvath A. O. (2006). The alliance in context: Accomplishments, challenges, and future directions. *Psychotherapy (Chicago, Ill.)*, 43(3), 258–263.
42. Ngai, I., Tully, E. C., & Anderson, P. L. (2015). The course of the working alliance during virtual reality and exposure group therapy for social anxiety disorder. *Behavioural and cognitive psychotherapy*, 43(2), 167–181.

43. Lindner, P., Miloff, A., Hamilton, W., Reuterskiöld, L., Andersson, G., Powers, M. B., & Carlbring, P. (2017). Creating state of the art, next-generation Virtual Reality exposure therapies for anxiety disorders using consumer hardware platforms: Design considerations and future directions. *Cognitive Behaviour Therapy*, 46(5), 404–420.
44. Lee, K. M. (2004). Presence, explicated. *Communication Theory*, 14(1), 27–50.
45. Sanchez-Vives, M. V., & Slater, M. (2005). From presence to consciousness through virtual reality. *Nature reviews. Neuroscience*, 6(4), 332–339.
46. Slater M. (2009). Place illusion and plausibility can lead to realistic behaviour in immersive virtual environments. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 364(1535), 3549–3557.
47. Price, M., Mehta, N., Tone, E. B., & Anderson, P. L. (2011). Does engagement with exposure yield better outcomes? Components of presence as a predictor of treatment response for virtual reality exposure therapy for social phobia. *Journal of anxiety disorders*, 25(6), 763–770.
48. Juan, M. C., & Pérez, D. (2009). Comparison of the levels of presence and anxiety in an acrophobic environment viewed via HMD or cave. *Presence: Teleoperators and Virtual Environments*, 18(3), 232–248.
49. Visch, V. T., Tan, E. S., & Molenaar, D. (2010). The emotional and cognitive effect of immersion in film viewing. *Cognition & Emotion*, 24(8), 1439–1445.
50. Freeman J, Lessiter J, Pugh K, Keogh E. (2005) When presence and emotion are related, and when they are not.
51. Mühlberger, A., Wiedemann, G., Pauli, P. (2005). Subjective and physiologic reactions of flight phobics during virtual reality exposure and treatment outcome: what adds motion simulation? *Cyberpsychol. Behav.* 8, 345.
52. Diemer J, Alpers GW, Peperkorn HM, Shibani Y and Mühlberger A (2015) The impact of perception and presence on emotional

- reactions: a review of research in virtual reality. *Frontiers in Psychology* 6.
53. Da Costa, R. M., & de Carvalho, L. A. (2004). The acceptance of virtual reality devices for cognitive rehabilitation: a report of positive results with schizophrenia. *Computer methods and programs in biomedicine*, 73(3), 173–182.
54. Bouchard, S., St-Jacques, J., Renaud, P., & Wiederhold, B. (2009). Side effects of immersions in virtual reality for people suffering from anxiety disorders. *Journal of CyberTherapy & Rehabilitation*, 2(2), 127–137.
55. Valmaggia, L. R., Freeman, D., Green, C., Garety, P., Swapp, D., Antley, A., Prescott, C., Fowler, D., Kuipers, E., Bebbington, P., Slater, M., Broome, M., & McGuire, P. K. (2007). Virtual reality and paranoid ideations in people with an 'at-risk mental state' for psychosis. *The British journal of psychiatry. Supplement*, 51, 63–68.
56. Aardema, F., O'Connor, K., Côté, S., & Taillon, A. (2010). Virtual reality induces dissociation and lowers sense of presence in objective reality. *Cyberpsychology, behavior and social networking*, 13(4), 429–435.
57. Fernández-Álvarez, J., Rozental, A., Carlbring, P., Colombo, D., Riva, G., Anderson, P. L., Baños, R. M., Benbow, A. A., Bouchard, S., Bretón-López, J. M., Cárdenas, G., Difede, J., Emmelkamp, P., García-Palacios, A., Guillén, V., Hoffman, H., Kampmann, I., Moldovan, R., Mühlberger, A., North, M., ... Botella, C. (2019). Deterioration rates in Virtual Reality Therapy: An individual patient data level meta-analysis. *Journal of anxiety disorders*, 61, 3–17.
58. Hartanto, D., Brinkman, W.-P., Kampmann, I. L., Morina, N., Emmelkamp, P. G., & Neerincx, M. A. (2015). Design and implementation of home-based virtual reality exposure therapy system with a virtual eCoach. *Intelligent Virtual Agents*, 287–291.
59. Fodor, L. A., Coteș, C. D., Cuijpers, P., Szamoskozi, Ș., David, D., & Cristea, I. A. (2018). The effectiveness of virtual reality based interventions for symptoms of anxiety and depression: A meta-analysis. *Scientific reports*, 8(1), 10323.

60. Wiederhold, B. K., Jang, D. P., Kim, S. I., & Wiederhold, M. D. (2002). Physiological monitoring as an objective tool in virtual reality therapy. *Cyberpsychology & behavior : the impact of the Internet, multimedia and virtual reality on behavior and society*, 5(1), 77–82.)
61. Ruscio, A. M., Brown, T. A., Chiu, W. T., Sareen, J., Stein, M. B., & Kessler, R. C. (2008). Social fears and social phobia in the USA: results from the National Comorbidity Survey Replication. *Psychological medicine*, 38(1), 15–28.
62. Garcia-Palacios, A., Hoffman, H. G., See, S. K., Tsai, A., & Botella, C. (2001). Redefining therapeutic success with virtual reality exposure therapy. *CyberPsychology & Behavior*, 4(3), 341–348.
63. Freeman, D., Haselton, P., Freeman, J., Spanlang, B., Kishore, S., Albery, E., Denne, M., Brown, P., Slater, M., & Nickless, A. (2018). Automated psychological therapy using immersive virtual reality for treatment of fear of heights: a single-blind, parallel-group, randomised controlled trial. *The lancet. Psychiatry*, 5(8), 625–632.
64. Lindner, P., Miloff, A., Bergman, C., Andersson, G., Hamilton, W., & Carlbring, P. (2020). Gamified, Automated Virtual Reality Exposure Therapy for Fear of Spiders: A Single-Subject Trial Under Simulated Real-World Conditions. *Frontiers in psychiatry*, 11, 116.
65. Wallach, H. S., Safir, M. P., & Bar-Zvi, M. (2009). Virtual reality cognitive behavior therapy for public speaking anxiety: a randomized clinical trial. *Behavior modification*, 33(3), 314–338.

POSŁOWIE

Skąd wiemy jaki jest świat? Jakie treści kryją się w cudach przyrody czy kosmosu, jak działa człowiek i dlaczego coś w nim działać przestaje? Jak to opisać, zrozumieć a potem ... naprawić jeśli jest potrzeba. O tym, że świat się składa z atomów dowiedzieliśmy się od filozofów, roboty stworzyli artyści, a pierwszymi użytkownikami Internetu byli bohaterowie powieści fantastycznych. Rozum, wyobraźnia, odwaga próbowania odpowiedzi na pytania, które daleko przekraczają to co wynika z możliwości doświadczenia przez nasze zmysły. Dzięki innowacyjności, wyobraźni i pracy odnieśliśmy sukces jako gatunek ludzki. Budujemy naszą cywilizację. Gdy się urodziłem mieszkało tu 3 mld ludzi, obecnie 8 się zmieściło. W 2000 roku gdy rozpoczynałem projekt Robin Heart'a było ludzi 6 mld, którym towarzyszyło 1 mln robotów zatrudnionych w przemyśle. Kilka robotów próbowano stosować w chirurgii. Dzisiaj już dawno przekroczyliśmy milion operacji rocznie (nawet w Polsce 2 tysiące), a robotów w medycynie jest dziesiątki tysięcy (w diagnostyce, terapii, rehabilitacji,...). Nigdy nie byliśmy tak bogaci jak teraz – nikomu nie powinno zabraknąć jedzenia, wody i dachu nad głową. Potrafimy kontrolować coraz więcej obszarów życia i natury. A jednak czasem bezradnie musimy się schować w domach, bo zagraża mało widoczny wirus czy bardziej widoczny smog.

Postęp wiedzy związany jest z techniką i prowadzi do zmian cywilizacyjnych. Od czasu jak udało się nam zamienić obrazy i sygnały na zbiór 0-1, gromadzimy, analizujemy, przesyłamy na odległość informacje, które można wykorzystać dla rozrywki i ... dla ratowania życia. Od przesyłania na odległość sygnałów wchodzimy obecnie w przesyłanie – dzięki robotom – działania.

Człowiek może wykonywać usługę medyczną w postaci pracy intelektualnej i fizycznej – mechanicznej. Wyposażony w narzędzia wykorzystuje różne zjawiska fizyczne. Jednak najczęściej praca lekarza, to proces analizowania

danych i podejmowania decyzji. W przypadku specjalności zabiegowych podejmuje on też określone czynności fizyczne. W przypadku chirurga jego praca polega na inwazyjnym wtargnięciu w ludzki organizm, zadawaniu ran i ich leczeniu. Medycyna to często sztuka pomagania przez tworzenie chwilowych, kontrolowanych w danej strefie organizmu sytuacji kryzysowych.

Praca lekarza, encyklopedycznie podchodząc, polega na udzielaniu świadczeń zdrowotnych, w szczególności: badaniu stanu zdrowia, rozpoznawaniu chorób i zapobieganiu im, leczeniu i rehabilitacji chorych, udzielaniu porad, a także wydawaniu opinii i orzeczeń lekarskich. Każda próba wprowadzenia innowacji, czyli wynalazku, który ktoś kupi, czyli powszechnie stosować zaczyna, może zwiększyć skuteczność naszej pomocy dla chorego.

Po raz kolejny, z wielkim szacunkiem, gratuluję redaktorom, Jakubowi Kufłowi i Piotrowi Lewandowskiemu, studentów Koła Naukowego im.prof. Zbigniewa Religi Śląskiego Uniwersytetu Medycznego, że udało im się, wraz z innymi studentami napisać i samodzielnie wydać ważną pozycję książkową poświęconą innowacjom medycznym. W tej monografii mieliśmy okazję zapoznać się z wachlarzem technologii i ich aplikacji w różnych dziedzinach medycyny. Od serca przez zaburzenie neurologiczne do nowotworów. Od technologii bio- do wirtualnej rzeczywistości.

Ot przykład. Dzisiaj leczenie gruźlicy to podawanie 4 leków przez 2 miesiące, a następnie 2 leków przez 4 miesiące. Zwykle po około 2 tygodniach chory przestaje prątkować, czyli być zaraźliwy dla otoczenia.. A przecież, gdyby nie mikroskop i pewien lekarz obwodowy z Wolsztyna (1872–1880), czy potem Sławęć (1903) gdyby nie jego technika hodowli kultur bakterii na żelatynie i w końcu postulat, pozwalające określić, czy dana bakteria jest czynnikiem chorobotwórczym, chorzy ciągle korzystaliby z sanatorium Sokołowsku.

Bo ...„Nikt tu nigdy nie chorował na płuca. A dodatkowo wysokość położenia pozostaje w granicach niezbędnych dla leczenia chorób płucnych, bo znowu nie przyspiesza zbytnio pracy serca ...Rośnie tu las jodłowy, który nasycy powietrze ozonem, a ozon odgrywa kluczową rolę w odnawianiu krwi i całego organizmu. Samo oddychanie zatrzyma proces rozpadu .. płuc¹.” To było tak niedawno.

¹ Olga Tokarczuk, Empuzjon. Wydawnictwo Literackie 2022..

Pamiętajmy o Robercie Kochu, jego wielkich sukcesach i ... błędach, ale niezmiennej pasji dążenia do odgadnięcia przyczyn choroby i sposobu jej leczenia. I o tych aktualnych, młodych odkrywca, których niepokój twórczy popycha naszą cywilizację w dobrą, bezpieczniejszą stronę.

Dajmy im szansę. Dajmy sobie szansę.

*Zbigniew Nawrat
Zabrze 2022*

Katedra Biofizyki, Wydział Nauk Medycznych w Zabrze,
Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice, ul. H. Jordan 19, 41-808 Zabrze, Polska,
prof., znawrat@sum.edu.pl

Fundacja Rozwoju Kardiologii im. prof. Zbigniewa Religi,
ul. Wolności 345a, 41-800 Zabrze, Polska, Dyrektor Kreatywny, nawrat@frk.pl

Międzynarodowe Towarzystwo Robotyki Medycznej, Prezydent

Ósma część *Innowacji w medycynie*, jest kolejnym w serii kompendium poświęconym najnowszym osiągnięciom współczesnej medycyny.

Monografia zawiera 17 rozdziałów naukowych skupionych wokół problemu chorób cywilizacyjnych. Pierwsze rozdziały omawiają tematykę uszkodzenia mięśnia sercowego, wad zastawkowych czy zastosowania ECMO. W kolejnych rozdziałach odkryjemy zagadnienia związane z leczeniem choroby Alzheimera, migreny oraz zaburzeń neurologicznych. Następnie przechodzimy do tematyki leczenia chorób nowotworowych – metod ablacji czy szczepionek miRNA. Książkę kończą tematy nowych metod leczenia z wykorzystaniem osiągnięć biotechnologii czy wirtualnej rzeczywistości, a także niewykorzystanego potencjału witamin.

ISBN: 978-83-67527-35-4