



TOM 70 · NR 10
ROK 2014
ISSN 0014-8261

farmacja polska

czasopismo Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego

„Farmacja Polska” ukazuje się raz w miesiącu. Prenumeratorem czasopisma są farmaceuci, apteki ogólnodostępne i szpitalne, hurtownie farmaceutyczne, producenci środków farmaceutycznych i materiałów medycznych. Pismo dociera też do samorządu aptekarskiego, Naczelnej Izby Lekarskiej, okręgowych izb lekarskich, lekarzy wojewódzkich oraz niektórych bibliotek.

Cena prenumeraty krajowej na rok 2014 wynosi 233,10 zł (w tym 5% VAT), zagranicznej 200 USD. Emeryci – członkowie Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego otrzymują zniżkę 50%, toteż na blankiecie wpłaty należy podać numer emerytury.

W dziale finansowym PTFarm można nabywać pojedyncze zeszyty czasopisma. Prenumeratę należy opłacać w dowolnym banku lub urzędzie pocztowym na rachunek bankowy:

Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne
Millennium SA 29 1160 2202 0000 0000 2770 0281

Farmacja Polska zamieszcza płatne reklamy. Redakcja nie ponosi odpowiedzialności za treść ogłoszeń.

Redakcja nie zwraca niezamówionych materiałów. Prezentowane przez autorów prace są wyrazem ich poglądów naukowych i redakcja nie ponosi za nie odpowiedzialności.

Farmacja Polska jest indeksowana w Chemical Abstracts, Analytical Abstracts, Biochemical Abstracts, International Pharmaceuticals Abstracts i EMBASE (Excerpta Medica).



Czasopismo jest także indeksowane w Index Copernicus (ICF=9) oraz umieszczone na liście czasopism punktowanych Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (3 pkt).

WSZELKIE PRAWA ZASTRZEŻONE

KOMITET REDAKCYJNY

dr hab. Iwona Arabas (Warszawa),
dr Lucyna Bułaś (Sosnowiec),
mgr Lidia Czyż (Rzeszów),
prof. dr hab. Zbigniew Fijałek (Warszawa),
prof. dr hab. Barbara Filipek (Kraków),
dr Katarzyna Hanisz (Łódź),
prof. dr hab. Renata Jachowicz (Kraków),
prof. dr hab. Roman Kaliszan (Gdańsk),
prof. dr hab. Aleksander A. Kubis (Wrocław),
dr Jadwiga Nartowska (Warszawa),
mgr Zbigniew Niewójt (Warszawa),
prof. dr hab. Krystyna Olczyk (Sosnowiec),
prof. dr hab. Daria Orszulak-Michalak (Łódź),
prof. dr hab. Jan Pachecka (Warszawa),
prof. dr hab. Janusz Pluta (Wrocław),
prof. dr hab. Wiesław Sawicki (Gdańsk),
dr hab. Agnieszka Skowron (Kraków),
dr Elwira Telejko (Białystok),
prof. dr hab. Marek Wesołowski (Gdańsk),
prof. dr hab. Witold Wieniawski (Warszawa),
dr hab. Katarzyna Winnicka (Białystok)

REDAKCJA

Redaktor naczelny: dr Bożena Karolewicz

Redaktor techniczny: Joanna Czarnecka

Korekta: Izabela Pranga

ADRES REDAKCJI

00-238 Warszawa, ul. Długa 16, tel. 22 831 02 41 w. 12

WYDAWCA

Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne

Dział Wydawnictw – Redaktor prowadzący: Hanna Plata

00-238 Warszawa, ul. Długa 16

tel./faks 22 635 84 43

tel. 22 831 02 41 w. 15

Kolportaż: tel. 22 831 79 63 w. 19, 20

e-mail: wydawnictwa@ptfarm.pl, zamowienia@ptfarm.pl

Adres dla autorów: redakcja@ptfarm.pl

Strona PTFarm w Internecie: <http://www.ptfarm.pl>

ISSN 0014-8261

Skład i łamanie: Foxrabbit Designers, www.foxrabbit.pl

Druk: Oficyna Wydawniczo-Poligraficzna Zygmunt Siemieniak, Ząbki, tel. 22 781 51 02, faks 22 398 78 15, www.siemieniak.pl

Nakład: 5000 egz.

Printed on acid-free paper.



Spis treści

- 533 PATOGENEZA CHORÓB** · Terapia genowa padaczki
Arkadiusz Kazula, Ewa Kazula
- 548 TERAPIA I LEKI** · Talidomid i jego analogi – zastosowanie we współczesnej terapii
Karol Pach
- 552 PRAKTYKA FARMACEUTYCZNA** · Recepty lekarskie – zasady wystawiania. Część 3
Janusz Jaroszyński, Zofia Specht-Szwoch
- 556 HISTORIA FARMACJI** · Geneza oraz rozwój aptekarstwa i przemysłu chemiczno-farmaceutycznego na Kujawach i Pomorzu Gdańskim do 1919/20 r. Studium wstępne
Wojciech Ślusarczyk
- 561 OPINIE** · Program wykładów z chemii fizycznej (farmacji fizycznej) dla studentów 2. roku farmacji jako wynik 34-letniej praktyki
Tadeusz Władysław Hermann
- 563 WYWIADY** · Rozmowa z mgr. inż. Zdzisławem Mroczkiem – byłym, wieloletnim dyrektorem ds. produkcji i rozwoju w Polfie Warszawa
Maja Szczepańska, Marzena Szczucińska

Farmacja po dyplomie

- 568 TERAPIA I LEKI** · Działania niepożądane leków w obrębie jamy ustnej
Alicja Wieczorek, Dariusz Chlubek, Violetta Dziedziejko
- 572 PATOGENEZA CHORÓB** · Wykorzystanie biomarkerów apoptozy w profilaktyce schorzeń neurodegeneracyjnych
Anna Strug, Martyna Średniawa, Maciej Gawlik
- 579 REPOZYCJONOWANIE LEKÓW** · Repozycjonowanie leków, czyli jak przekuć porażkę w sukces
Marta Szumilak, Andrzej Stańczak

Table of Contents

- 533 PATHOGENESIS OF DISEASES** · Gene therapy of epilepsy
Arkadiusz Kazula, Ewa Kazula
- 548 THERAPY AND DRUG** · Thalidomide and its analogues – practice in medical science
Karol Pach
- 552 PHARMACEUTICAL PRACTICE** · Issue of prescriptions – rules. Part 3.
Janusz Jaroszyński, Zofia Specht-Szwoch
- 556 HISTORY OF PHARMACY** · The genesis and development of pharmacy and chemical-pharmaceutical industry on Kujawy and Pomorze Gdańskie before 1919/1920. The preliminary study
Wojciech Ślusarczyk
- 561 OPINIONS** · The program of lectures from Physical Chemistry (Physical Pharmacy) for students of second year of pharmacy as a result of 34-year-old practice
Tadeusz Władysław Hermann
- 563 INTERVIEWS** · Interview with Master of Pharmacy, Engineer Zdzisław Mroczek – former director of production and development in Polfa Warszawa for many years
Maja Szczepańska, Marzena Szczucińska

Postgraduate pharmacy

- 568 THERAPY AND DRUGS** · Side effects of drugs in the oral cavity
Alicja Wieczorek, Dariusz Chlubek, Violetta Dziedziejko
- 572 PATHOGENESIS OF DISEASES** · The use of biomarkers of apoptosis in the prevention of neurodegenerative diseases
Anna Strug, Martyna Średniawa, Maciej Gawlik
- 579 DRUGS REPOSITIONING** · Drug repositioning, how to transform defeat into success
Marta Szumilak, Andrzej Stańczak

Terapia genowa padaczki

Arkadiusz Kazula¹, Ewa Kazula²

¹ Apeka prywatna, ul. Wolności 54a, Nisko

² Apteka prywatna, ul. Zakładowa 50, Tarnobrzeg

Adres do korespondencji: Arkadiusz Kazula, ul. Portowa 18/4, 27-600 Sandomierz, e-mail: Kazula.gen@interia.pl

Padaczka dotyka ponad 60 milionów osób na całym świecie, co powoduje, że choroba ta jest najbardziej rozpowszechnionym zaburzeniem neurologicznym [1]. Termin padaczka obejmuje pacjentów u których zaburzenia neurologiczne mogą być przekazywane genetycznie lub są nabyte, a wspólną cechą jest trwały wzrost pobudliwości neuronów, którego efektem jest pojawianie się napadów padaczkowych. Napadem padaczkowym natomiast określamy nadmierny i niekontrolowany wzrost aktywności neuronalnej [2]. Napady mogą być dwójakiego rodzaju: uogólnione, kiedy występują szybko i angażują całą sieć neuronalną oraz ogniskowe, które ograniczają się tylko do określonej struktury mózgu [3]. Etiologicznie, zespoły padaczkowe są klasyfikowane jako: genetyczne, jeżeli wynikają ze znanych wad genetycznych, metaboliczne, powstające na skutek strukturalnych lub metabolicznych uszkodzeń, oraz stany padaczkowe o nieznanym etiologii [3]. Wykazano, że napady padaczkowe o podłożu genetycznym najczęściej są związane z uogólnionymi napadami, natomiast napady padaczkowe o podłożu metabolicznym czy strukturalnym z napadami ogniskowymi zachodzącymi wokół struktur, gdzie następują zmiany chorobowe.

Żaden z obecnie stosowanych w praktyce klinicznej leków przeciwpadaczkowych nie zapobiega rozwojowi tego schorzenia. Należy również podkreślić, że w wielu przypadkach leczenie farmakologiczne jest nieskuteczne i u co trzeciego pacjenta leczonego lekami przeciwpadaczkowymi nadal występują napady drgawkowe. Ponadto u pacjentów, u których napady są dobrze kontrolowane za pomocą terapii farmakologicznej, długotrwałe stosowanie leków może wywierać wyniszczające skutki na sieć neuronalną, powodując zaburzenia poznawcze, depresję czy demencję. W czasie przebiegu choroby istnieje potrzeba

Gene therapy of epilepsy · Gene therapy is a promising new approach for the treatment of epilepsy. Several candidate genes such as neuropeptide Y and galanin have been demonstrated in preclinical studies to have a positive effect on seizure activity. For a successful gene therapy-based treatment, efficient delivery of a transgene to target neurons is also essential. To this end, advances have been made in the areas of cell transplantation and in the development of recombinant viral vectors for gene delivery. Recombinant adeno-associated viral (rAAV) vectors in particular show promise for gene therapy of neurological disorders due to their neuronal tropism, lack of toxicity, and stable persistence in neurons, which results in robust, long-term expression of the transgene. A relatively large proportion of patients with temporal lobe epilepsy (TLE) are resistant to antiepileptic drugs (AEDs) or experience debilitating side effects from long-term treatment such as cognitive impairment, depression, or dementia. Surgery to remove the epileptic tissue may offer an improvement over AEDs, but it is only an option for patients with focal unilateral seizures in brain regions that can be safely removed without causing severe cognitive or sensory deficits.

Keywords: gene therapy of epilepsy, antiepileptic drugs, neuropeptide Y, galanin.

© Farm Pol, 2014, 70(10): 533–547

modyfikacji terapii, aby ograniczyć działanie neurologiczne czy psychiatryczne stosowanych leków przeciwpadaczkowych. Istnieje również stosunkowo duży odsetek pacjentów z padaczką skroniową, która jest odporna na działanie leków przeciwpadaczkowych [4].

Pomimo pojawienia się leków przeciwpadaczkowych nowych generacji (generacja II i III), terapia padaczki nadal pozostaje poważnym wyzwaniem. W chwili obecnej nie posiadamy odpowiednich leków cofających proces epileptogenezy i zmian neurodegeneracyjnych, które są następstwem napadów padaczkowych. Dostępna obecnie

farmakoterapia sprowadza się w dużej mierze do łagodzenia objawów, posiadając przy tym szereg skutków ubocznych. Z tego względu istnieje potrzeba opracowania innowacyjnych strategii terapeutycznych, opartych na znajomości podstawowych mechanizmów molekularnych i patogenetycznych tej choroby. W badaniach przyjęto, że jeżeli szlak metaboliczny ostatecznie prowadzi do ekspresji napadów padaczkowych, to wydaje się słuszne, że wyciszenie i zahamowanie ekspresji komponentów tego szlaku (metabolicznego) powinno zapobiec ekspresji napadów padaczkowych [4]. Nowe koncepcje oparte na terapii genowej i terapii z wykorzystaniem komórek macierzystych dają możliwość skutecznego leczenia epilepsji i hamowania zmian molekularnych następujących podczas epileptogenezy.

Możliwość zastosowania terapii genowej w leczeniu padaczki

Terapia genowa tradycyjnie jest definiowana jako podejście terapeutyczne, w którym następuje wymiana wadliwej kopii genu na funkcjonalną (niezmutowaną) kopię, a skutkiem tego procesu jest przywrócenie normalnego funkcjonowania transfekowanej populacji komórek. To podejście terapeutyczne wynika z naszej wiedzy dotyczącej chorób molekularnych. Sposób ten okazał się skuteczny w terapii chorób genetycznych, takich jak hemofilia, oraz genetycznych zaburzeń metabolicznych [5]. Warunkiem zastosowania metod terapii genowej obejmującej hamowanie ekspresji patologicznych genów za pomocą interferencji RNA, rybozymów, struktury tripleks czy antysensowych oligonukleotydów jest dokładne poznanie kaskady zdarzeń molekularnych i określonych punktów uchwytu (zmutowanych genów) dla tego typu terapii [6, 7]. Terapia genowa mająca na celu hamowanie ekspresji, wymianę i naprawę wadliwych genów oraz zapewnienie utrzymania odpowiedniego stężenia terapeutycznego związku może być odpowiednim narzędziem w terapii przeciwpadaczkowej [7]. Sugeruje się, że terapia genowa może być szczególnie pomocna w terapii przewlekłych zaburzeń napadowych,

w przypadku których nie zidentyfikowano odpowiednich centrów aktywności elektrycznej. W przeciwieństwie do objawowego hamowania napadów w wyniku farmakoterapii, istnieją nadzieje, że terapia tego typu (genowa) posiada odpowiedni potencjał, aby hamować i cofać podstawowe mechanizmy choroby, a zatem może służyć do hamowania i cofania epileptogenezy, co przyczyni się do całkowitego wyleczenia [8].

Ten typ terapii padaczki można szczególnie zastosować, w przypadku gdy jej sprawcą jest mutacja pojedynczego genu. Większość przypadków tej choroby należy do złożonych postaci, o przyczynach zarówno genetycznych, jak i środowiskowych, jakkolwiek autosomalne dominujące monogenetyczne formy padaczki zostały również zidentyfikowane. Na przykład pewna forma padaczki mioklonicznej, tzw. choroba Unverricht-Lundborga, wynika z mutacji genu kodującego proteazę cystatyny B [9]. W konsekwencji odtworzenie aktywnego genu proteazy cystatyny B byłoby racjonalnym podejściem w terapii tej formy padaczki. Innym przykładem, w którym uszkodzenie genu powoduje powstawanie napadów, jest niedobór aspartoacylazy (ASPA) u szczurów ze spontaniczną padaczką. Wydaje się, że dostarczenie za pomocą wektorów ekspresyjnych właściwego genu ASPA do neuronów może złagodzić objawy choroby (drgawki toniczne) [8]. Niestety tylko nieliczne formy genetycznych padaczek są następstwem defektu pojedynczego genu, natomiast bardziej powszechne odmiany tej choroby wynikają z dziedziczenia dwóch lub większej ilości genów podatności na to schorzenie, co znacznie utrudnia zastosowanie terapii genowej w takich przypadkach [10]. Przykładem wielogenowego mechanizmu powstawania tej choroby jest polimorfizm kanałów jonowych, który jest wynikiem mutacji genów kodujących podjednostki białkowe, budujące kanały jonowe (w receptorów jonotropowych). Pierwszą zidentyfikowaną wadą genetyczną była autosomalna mutacja podjednostki α -4 acetylocholinergicznego receptora nikotynowego, która wywoływała (nocną) padaczkę przedniego płata czołowego [10]. Od tego czasu zidentyfikowano ponad 12 mutacji w peptydach tworzących kanały jonowe, czyli tzw. kanałopatii [11]. Niemniej jednak terapia genowa poligenowych mutacji wywołujących padaczkę może być wykorzystywana w celu wywołania lokalnego uwalniania substancji o działaniu przeciwdrgawkowym (neuropeptyd Y, galanina, adenozy-na) lub w celu przywrócenia równowagi pomiędzy hamowaniem i wzbudzeniem w neuronach mózgu oraz w celu wzmocnienia aktywności kanałów jonowych lub do wspierania funkcji endogennych neuromodulatorów. Inną racjonalną strategią

Mimo wprowadzenia wielu nowych leków przeciwpadaczkowych (II i III generacji), nadal nie posiadamy odpowiednich preparatów cofających procesy epileptogenezy i zmian neurodegeneracyjnych, które są następstwem napadów padaczkowych. Dostępna obecnie farmakoterapia sprowadza się w dużej mierze do łagodzenia objawów i posiada przy tym wiele skutków ubocznych. Z tego względu istnieje potrzeba opracowania innowacyjnych strategii terapeutycznych opartych na znajomości podstawowych mechanizmów molekularnych i patogenetycznych tej choroby. Nowe koncepcje oparte na terapii genowej i terapii z wykorzystaniem komórek macierzystych stwarzają szansę na możliwość skutecznej terapii padaczki i hamowania zmian molekularnych następujących podczas epileptogenezy.

terapii genowej mogłoby być zapobieganie utracie neuronów wywołanych napadami padaczkowymi. Pionierem w tych badaniach był R. Sapolsky, który za pomocą wirusa opryszczki indukował nadekspresję genu dla transportera glukozy, zapobiegając w ten sposób apoptozie neuronów, co z kolei hamowało procesy epileptogenezy [12]. Należy zauważyć, że hamowanie apoptozy neuronów w niektórych przypadkach nie jest jedynym warunkiem niezbędnym do zahamowania zaburzeń neuronalnych [13].

Czyste odmiany jednogenowych padaczek są stosunkowo rzadkie, a w złożonych padaczkach wpływ czynników środowiskowych i genetycznych jest trudny do oceny. Trudno jednoznacznie określić podstawy zachodzących w mózgu mechanizmów molekularnych i związków ich z mutacjami. Ponadto należy stwierdzić, że trudno jest projektować odpowiednie podejście terapii genowej w chorobie, która często obejmuje duże obszary mózgu. Jest to obecnie często niewykonalne ze względu na ograniczenia techniczne limitujące transfer genów do określonych ośrodków w mózgu. Z tych powodów genetyczne formy padaczki należą do najbardziej trudnych celów terapii genowej na obecnym etapie naszej wiedzy. Ogniskowe padaczki, w szczególności padaczki skroniowe, wydają się być lepszymi kandydatami do terapii genowej. Patofizjologia padaczki skroniowej, została dobrze przebadana na modelach zwierzęcych, jak również na podstawie analizy tkanki otrzymanej podczas resekcji chirurgicznej, a kilka genów zostało zidentyfikowanych jako potencjalny cel terapeutyczny [14]. Wydaje się, że terapia genowa umożliwi specyficzne ukierunkowanie terapeutycznych genów padaczkowych w regionie, oszczędzając otaczające zdrowe tkanki i minimalizując skutki uboczne, które często idą w parze ze stosowaniem leków przeciwpadaczkowych [6].

Wybór wektora i drogi podania

W chwili obecnej próbuje się opracować strategię dostarczania genów do mózgu przez barierę krew-mózg (podanie obwodowe) za pomocą wektorów ekspresyjnych zawierających terapeutyczne geny. Jedną z takich strategii jest zastosowanie szlaku używanego przez wiele krążących endogennych molekuł, takich jak transferyny lub insulina, które docierają do neuronów i komórek glejowych [15]. Mechanizm ten polega na tym, że endogenna molekula, np. transferyna, wiąże się z komórkami śródbłonna naczyń włosowatych, powstaje specyficzny pęcherzyk zawierający odpowiedni receptor i związany koniugat, który jest następnie transportowany przez cytoplazmę śródbłonna do naczyń włosowatych obejmujących

OUN za pośrednictwem mechanizmu transportu wewnątrzkomórkowego zwanego transcytozą. W terapii genowej wektor zawierający terapeutyczny gen może być sprzężony z ligandem, np. przeciwciałem przyłączającym się do receptora transcytozy lub peptydem naśladującym naturalny ligand receptora. Warto zaznaczyć, że wektor i zasocjowany ligand ulegają transportowi przez barierę krew-mózg w stanie niemodyfikowanym. W prowadzonych badaniach na modelach zwierzęcych udowodniono, że taki transport przez barierę krew-mózg jest możliwy przy użyciu wektorów wirusowych AAV [16, 17]. Zastosowanie takich wektorów ekspresyjnych umożliwi przeniesienia antypadaczkowych genów terapeutycznych w wyniku podawania obwodowego. Drogą podania stosowaną obecnie w badaniach nad terapią genową padaczki jest zazwyczaj bezpośrednia iniekcja wektora z terapeutycznym genem do padaczkowego regionu, w większości przypadków do hipokampa. Taki sposób podania zapewnia wysoki poziom ekspresji podawanego transgenu i ogranicza odpowiedź immunologiczną. Jedną z możliwych dróg testowanych jest podanie donosowe, które zostało przetestowane przy użyciu wektora HSV-2 przenoszącego antyapoptyczny gen ACP10PK. Niestety ekspresja transgenu była mało specyficzna i o niskim poziomie ekspresji transgenu.

Wektory w terapii genowej epilepsji

Spośród istniejących koncepcji przenoszenia terapeutycznych genów do uszkodzonych neuronów w wyniku napadów padaczkowych metoda przenoszenia za pomocą wektorów wirusowych jest najbardziej obiecującym kierunkiem badań. Wirusy, ze względu na swoją naturę, posiadają zdolność do namnażania się w komórkach eukariotycznych, wnikać w czasie zakażenia do ich wnętrza. Genomy wirusów DNA lub RNA są zamknięte w otoczce białkowej lub białkowo-lipidowej i determinują cały proces życiowy wirusów [18-22].

Ogólna zasada konstrukcji wektorów wirusowych polega na zastąpieniu genów wirusa odpowiedzialnych za zjadliwość wirusa genami terapeutycznymi. Rekombinowany materiał genetyczny umieszczany jest w otoczce wirusowej, mającej na swojej powierzchni ligandy wiążące się z receptorami określonych typów komórek docelowych, np. do neuronów, astrocytów czy innych komórek glejowych. Po związaniu z receptorem lipoproteinowym na powierzchni neuronu, wektor wirusowy wprowadza materiał genetyczny z terapeutycznym genem do jego wnętrza, gdzie może nawet ulegać rekombinacji z genomem neuronu. Proces integracji zależy oczywiście

od rodzaju wirusa, który będzie użyty do konstruowania wektora wirusowego [20]. Wektory wirusowe konstruowane na bazie wirusów HSV, AAV i lentiwirusów przenoszą terapeutyczne geny do dzielących i dzielących się komórek, a przy zastosowaniu specyficznych promotorów umożliwiają ukierunkowany transfer genów w wybranej populacji neuronów. Dalsze badania w celu poprawienia skuteczności przenoszenia genów za pomocą tych wektorów są ważnym kierunkiem badań w rozwoju terapii genowej zaburzeń neurologicznych [20].

Promotory stosowane w terapii genowej

Promotory decydują o zdolności transkrypcji i stopniu ekspresji terapeutycznych genów z wektorów wirusowych dostarczonych do wnętrza neuronów. Właściwe promotory mogą decydować o natężeniu i sile ekspresji pożądanego genu terapeutycznego, czasie działania oraz mogą zapewnić wydzielanie terapeutycznego peptydu, np. neuropeptydu Y, czy galaniny do przestrzeni pozakomórkowej. Do najczęściej używanych promotorów należy zaliczyć: promotor wirusa cytomegali (CMV-*cytomegalovirus*), wirusa SV-40 (SV-40 *simian virus*), promotory bakteriofagowe (SP6, T7). Promotory te umożliwiają wydajną i konstytutywną (stałą) ekspresję leczniczych genów w transfekowanych komórkach. Badania wykazały, że najbardziej skutecznym promotorem w terapii genowej pod względem wydajności ekspresji wklonowanych genów jest promotor wirusa cytomegali (CMV) i z tego powodu pod taki promotor są najczęściej wprowadzane lecznicze geny, których białkowe produkty mogą być użytecznie terapeutycznie [20]. Większość użytych promotorów posiada wyraźny tropizm w stosunku do neuronów, ale niektóre z nich, takie jak specyficzne promotory z ludzkiego wirusa cytomegalii (hCMV) czy promotor ludzkiej β -aktyny, wykazują w wektorach słabszy tropizm do komórek glejowych [19, 20].

Terapia genowa – efekty antyepileptogenetyczne

Celem stosowania terapii genowej w padaczce jest nie tylko uzyskanie trwałego efektu przeciwdrgawkowego, ale również otrzymanie efektu hamującego procesy epileptogenezy, czyli blokowanie postępu choroby i jej rozwoju w strukturach mózgu. Proces epileptogenezy jest powiązany z ogniskowymi zmianami patologicznymi, w których następuje apoptoza neuronów, przede wszystkim utrata neuronów w hipokampie, tzw.

skleroza hipokampa (*hippocampal sclerosis*), zmiana aktywności aksonów, zmiany w plastyczności sieci neuronalnej, zaburzenie neurogenezy oraz zmiany w funkcjonowaniu kanałów jonowych i połączeń synaptycznych [21]. Molekularne mechanizmy leżące u podstaw tych zmian komórkowych wciąż są słabo poznane, ale kluczową rolę w tych zmianach może odgrywać upośledzenie aktywności neurotroficznych czynników (NTF), których geny terapeutyczne można wykorzystać w terapii genowej padaczki [21]. Czynniki neurotropowe mogą stymulować neurogenezę, działają neuroprotekcynie, ale również w czasie napadów padaczkowych mogą przyczyniać się do powstawania patologicznych połączeń w sieci neuronalnej, utrwalających zmiany patoepileptogenetyczne [22].

Jednym z czynników neurotroficznych, który bierze się pod uwagę w terapii, jest glejowy czynnik neurotroficzny (*Glial cell-derived neurotrophic factor*, GDNF). Czynniki GDNF pochodzący z komórek glejowych należy do rodziny transformujących czynników wzrostu, które promują zdolność przeżycia neuronów w wyniku stymulowania szlaków aktywujących kinazy komórkowe. Czynniki te zostały wykorzystane w badaniach nad terapią genową padaczki skroniowej. Na zwierzęcym modelu padaczki skroniowej podanie rekombinowanego GDNF tłumi napady i zmniejsza ich intensywność, natomiast nie hamuje procesu epileptogenezy [23]. Podczas podania wektora AAV, zawierającego gen terapeutyczny GDNF, do hipokampa szczurów obserwowano znaczne zmniejszenie ilości napadów wywołanych kwasem kainowym i hamowanie procesu apoptozy neuronów. Podanie tego czynnika ogranicza ekscytotoksyczną śmierć neuronów GABA-ergicznych (spowodowaną uwalnianiem glutaminianu) w okolicy CA3 hipokampa [40]. Wzrost stężenia w neuronach hipokampa czynnika GDNF posiada działanie przeciwdrgawkowe i neuroprotekcyjne [24, 25].

Następnymi czynnikami wykorzystanymi w badaniach nad terapią genową były: czynnik wzrostu fibroblastów 2 (FGF-2) i mózgowy czynnik neurotroficzny (BDNF), które mogą odgrywać szczególną rolę w procesie epileptogenezy. Czynniki te chronią neurony przed uszkodzeniem i działają neuroprotekcynie, czynnik FGF-2 jest potencjalnym czynnikiem wpływającym na proliferację nowych neuronów z komórek macierzystych, podczas gdy BDNF przyczynia się do różnicowania komórek macierzystych w kierunku tworzenia neuronów [25]. Paradiso i wsp. przyjęli tezę, że uzupełnienie poziomu FGF-2 i BDNF w hipokampie zawierającym ogniska padaczkowe może hamować szkody wywołane procesem

epileptogenezy oraz powodować neuroprotekcję neuronów w tej strukturze mózgu, a efektem tego będzie łagodzenie lub hamowanie epileptogenezy [26]. Do przetestowania tej hipotezy opracowano wektor ekspresyjny HSV-1 zawierający dwa geny terapeutyczne (FGF-2 i BDNF), który był wstrzykiwany do hipokampa cztery dni po podaniu pilokarpiny wywołującej napady padaczkowe i wywołującej uszkodzenie hipokampa. Obrazy zmian chorobowych po podaniu pilokarpiny były podobne do tych u pacjentów, gdzie wystąpienie obrazu padaczkowego jest w okresie utajenia i poprzedza początek pojawienia się spontanicznych napadów. Wektor HSV-1 podany do hipokampa umożliwiał ekspresję dwóch terapeutycznych genów, jednak ekspresja transgenów była przejściowa i trwała około 2 tygodni. W wyniku tej strategii udało się zwiększyć zewnątrzkomórkowe stężenie czynników FGF-2 i BDNF poprzez generowanie komórek zdolnych konstytutywnie, ale przejściowo wydzielających te czynniki [27]. Efektem podania wektorów zawierających geny terapeutyczne dla czynników FGF-2 i BDNF było podwyższenie procesu proliferacji, który doprowadził do wzrostu produkcji neuronów w hipokampie, natomiast szkodliwe efekty neurogenezy związane z powstawaniem niewłaściwych sieci neuronalnych zostały obniżone [27].

Terapia genowa – efekty przeciwpadaczkowe

GABA – terapeutyczne uzasadnienie

Liczne badania i obserwacje kliniczne wskazują, że przyczyną powstawania napadów padaczkowych jest zaburzona równowaga między pobudzającym systemem glutaminergicznym a hamującym układem GABA-ergicznym. Wiele spośród stosowanych obecnie leków przeciwpadaczkowych nowej generacji zwiększa transmisję GABA-ergiczną. Mechanizm działania tych leków polega na pobudzeniu receptorów GABA_A, hamowaniu rozkładu GABA (wigabatryna) oraz blokowaniu wychwytu zwrotnego GABA w szczelinie synaptycznej (tiagabina). Wzrost poziomu GABA w obszarach padaczkowych mózgu powoduje podwyższenie progu pobudliwości neuronów, co skutkuje zmniejszeniem częstotliwości występowania napadów padaczkowych [28]. Na podstawie tych danych logiczne jest, że jednym z pierwszych celów terapii genowej padaczki był system GABA-ergiczny. Stosując różne techniki *in vitro* i *in vivo* transfekcji genu GAD (dekarboksylazy kwasu glutaminowego), kluczowego enzymu w biosyntezie GABA, próbowano podwyższyć poziom neurotransmitera GABA w pożądanym obszarach OUN. W badaniach na modelach zwierzęcych epilepsji (szczury)

wykazano, że transplantacja płodowych neuronów GABA-ergicznymi do istoty czarnej (*substantia nigra*, SN), struktury zaangażowanej w propagację napadów epileptycznych, wywołuje zmniejszenie natężenia drgawek epileptycznych [28]. Efekty przeciwdrgawkowe otrzymano również w wyniku przeszczepienia uzyskanych za pomocą inżynierii tkankowej neuronów korowych i komórek glejowych, zawierających wysoką ekspresję genu GAD, do hipokampa i kory gruszkowatej (*piriform cortex*) [29]. Wszystkie techniki związane z przeszczepianiem transfekowanych neuronów do epileptycznych tkanek wykazywały tylko przejściowe efekty terapeutyczne. Obserwowane efekty terapeutyczne były konsekwencją całkowitego wzrostu poziomu GABA, a efekty takiej strategii, które mają dotyczyć tylko określonej populacji neuronów, są trudne do przewidzenia [28–30]. Przy zastosowaniu wektorów wirusowych, które przenosiły terapeutyczny gen GAD, udało się dokonać nadekspresji genu GAD i podwyższyć poziom GABA w neuronach hipokampa szczurów, co przekładało się na efekty przeciwpadaczkowe, które próbuje się utrwalić poprzez konstrukcję wektorów ekspresyjnych, w których ekspresja genów terapeutycznych będzie następowała w sposób trwały (w wyniku wklonowania genów terapeutycznych do genomu pacjenta) [30].

Eksperymentalna analiza procesów epileptogenezy, które z czasem rozwijają się w nawracające napady, nie jest jeszcze wyjaśniona, nie jest również wyjaśnione, dlaczego okres utajenia może rozciągać się na miesiące czy lata po początkowych obrażeniach mózgu, które inicjują epileptogenezę. Szczegółowa analiza genetyczna przy wykorzystaniu macierzy DNA wykazała, że ważnym czynnikiem u chorych ludzi i zwierząt doświadczalnych, wpływającym za okres utajenia choroby, są zmiany w ekspresji receptorów GABA [31, 32]. Wyniki te są wspierane przez badania, które wykazały, że terapia genowa podwyższająca poziom receptorów GABA_A może służyć do tłumienia i hamowania powstawania drgawek epileptycznych u gryzoni [33]. W badaniach prowadzonych na zwierzętach wykazano, że w komórkach ziarnistych

Celem zastosowania terapii genowej w padaczce jest nie tylko uzyskanie trwałego efektu przeciwdrgawkowego, ale również otrzymanie efektu hamującego procesy epileptogenezy, czyli blokowanie postępu choroby i jej rozwoju w strukturach mózgu. Proces epileptogenezy jest powiązany z ogniskowymi zmianami patologicznymi, w których następuje apoptoza neuronów, przede wszystkim utrata neuronów w hipokampie, tzw. skleroza hipokampa (*hippocampal sclerosis*), zmiana aktywności aksonów, plastyczności sieci neuronalnej, neurogenezy oraz zmiany w funkcjonowaniu kanałów jonowych i połączeń synaptycznych. Molekularne mechanizmy leżące u podstaw tych zmian komórkowych wciąż są słabo poznane, ale kluczową rolę w tych zmianach może odgrywać upośledzenie aktywności neurotroficznymi czynnikami (NTF), których geny terapeutyczne można wykorzystać w terapii genowej padaczki.

Jednym z możliwych celów terapii genowej padaczki jest system GABA-ergiczny. Opierając się na farmakologicznych badaniach, stwierdzono, że wzrost poziomu GABA w obszarach padaczkowych mózgu powoduje podwyższenie progu pobudliwości neuronów, co skutkuje zmniejszeniem częstotliwości występowania napadów padaczkowych. Stosując różne techniki, próbowano podwyższyć poziom neurotransmitera GABA w pożądanym obszarach OUN. W badaniach na modelach zwierzęcych epilepsji (szczury) wykazano, że przeszczepienie uzyskanych za pomocą inżynierii tkankowej neuronów korowych i komórek glejowych, zawierających wysoką ekspresję genu GAD (enzymu odpowiedzialnego za biosyntezę GABA), hamuje powstawanie napadów padaczkowych.

hipokampa podczas napadów (wywołanych pilokarpiną) zmniejsza się ekspresja podjednostki $\alpha 1$ receptora GABA_A, podczas gdy ekspresja podjednostki $\alpha 4$ ulega podwyższeniu w porównaniu do grupy kontrolnej [34]. Wydaje się, że zmiany wzorca ekspresji poszczególnych podjednostek receptora GABA_A mogą mieć znaczenie krytyczne dla generowania napadów padaczkowych. Raol i wsp. zaprojektowali wektor AAV2 zawierający sekwencję kodującą podjednostkę alfa-1, receptora GABA_A [35]. Po iniekcji tego wektora do hipokampa, dwa tygodnie przed podaniem pilokarpiny, uzyskano wzrost ekspresji receptorów GABA_A z podjednostką alfa-1, co na modelu zwierzęcym powoduje hamowanie częstotliwości powstawania napadów padaczkowych.

Haberman i wsp. przetestowali ideę dotyczącą hamowania napadów poprzez zmniejszenie siły działania sygnałów pobudzających w powstawaniu drgawek padaczkowych [36]. W tym celu sklonowano (w wektorze ekspresyjnym) czynnik antysensowy hamujący aktywność podjednostki NR1, niezbędnej do funkcjonowania receptorów NMDA. Szczegółowe badania na modelach zwierzęcych wykazały, że hamowanie aktywności receptorów NMDA w wyniku tego typu terapii skutecznie ogranicza powstawanie napadów ogniskowych.

Wykorzystanie neuropeptydów i neuromodulatorów w terapii genowej

W ciągu ostatniej dekady ustalono ważną rolę w modulacji pobudliwości neuronów, dwóch neuropeptydów, tj. neuropeptydu Y (*Neuropeptide Y*, NPY) i galaniny oraz neuromodulatora adenyliny [37–39]. Obserwacje wykazały, że napady padaczkowe powodują uwolnienie tych neuropeptydów, co doprowadziło do hipotezy, że odgrywają one ważną rolę w aktywności padaczkowej. Badania eksperymentalne potwierdziły dalej ich przeciwdrgawkową i neuroprotekcijną rolę, co zasugerowało hipotezę, że te neuropeptydy oraz ich receptory stanowią ważny endogeny system kontroli aktywności epileptycznej. Potwierdzeniem powyższych danych są badania, w których wykazano, że redukcja liczby neuronów hipokampa, w których zachodzi fizjologiczna ekspresja

neuropeptydów, takich jak: NPY, galaniny, dynorfiny i somatostatyny powoduje indukcję napadów padaczkowych i nasila proces epileptogenezy [40]. W oparciu o te dane próbuje się w terapii genowej wzmocnić ekspresję powyższych neuropeptydów i neuromodulatora (adenozyny) w celu hamowania epileptogenezy i znoszenia napadów padaczkowych [40].

Wykorzystanie galaniny w terapii genowej

Galanina (Gal) jest neuropeptydem o silnym działaniu przeciwdrgawkowym. Neuropeptyd ten występuje w neuronach ośrodkowego układu nerwowego i wraz z innymi neuromediatorami może modulować przekaźnictwo synaptyczne zarówno na poziomie pre-, jak i postsynaptycznym [41]. Wiele struktur ośrodkowego układu nerwowego wykazuje jednoczesną ekspresję Gal oraz innego neurohormonu lub neuromediatora. Gal hamuje uwalnianie neuroprzekaźników (z neuronów), takich jak: norepinefryna, serotonina czy dopamina z przodomózgowia oraz hamuje aktywność neuronalną wielu klas neuronów [42]. Neuropeptyd ten jest produkowany przez kilka typów komórek nerwowych, wliczając w to noradrenergiczne neurony miejsca sinawego i serotonergiczne neurony umieszczone w jądrze szwu grzbietowego. W hipokampie galanina produkowana jest w neuronach cholinergicznym. Neuropeptyd ten zaangażowany jest w regulację różnych procesów, do których zaliczamy m.in. hamowanie uwalniania neuroprzekaźników zaangażowanych w procesach pamięci, modulowanie przewodzenia impulsacji bólowej, powoduje zmniejszenie pobudliwości neuronów oraz hamowanie aktywności cykazy adenylnowej [43, 44].

Przeciwdrgawkowe działanie galaniny jest dobrze zbadane i wykazane na modelach (zwierzęcych) limbicznych padaczki [45–47]. Galanina uwalniana podczas napadów padaczkowych posiada hamujący wpływ na aktywność neuronów poprzez blokowanie presynaptycznej transmisji glutaminergicznej, ponadto wykazano, że galanina działa również silnie neuroprotekcjinie, hamuje zmiany neurodegeneracyjne w neuronach w czasie napadów epileptycznych. Działanie Gal wynika z pobudzenia przez ten peptyd swoistych receptorów galaninowych. Obecność tych receptorów wykazano zarówno w układzie nerwowym, jak i w tkankach obwodowych. Receptory galaninowe (GalR) należą do klasy receptorów błonowych związanych z białkiem G [48]. Dotychczas sklasyfikowano trzy typy receptorów galaninowych, określanych jako: GalR1, GalR2 oraz GalR3 [49]. Efekty biologiczne może wywierać kompletna cząsteczka galaniny [Gal(1–29)], jak i jej fragmenty, które

różnią się między sobą wielkością cząsteczki, powinowactwem do receptora, a także niekiedy kierunkiem działania. Dla interakcji z odpowiednim typem receptora kluczowe znaczenie ma N-końcowy fragment cząsteczki Gal, wykazano, że substytucja czterech początkowych aminokwasów w łańcuchu peptydowym galaniny prowadzi do całkowitej utraty powinowactwa Gal do jej receptorów [50, 51]. Galanina powstaje w wyniku enzymatycznego rozkładu 122 aminokwasowego (u człowieka) polipeptydu prekursorowego, określanego jako preprogalanina. Gen kodujący cząsteczkę preprogalaniny został zlokalizowany na chromosomie 11 (człowieka) [52, 53]. Ekspresja pre-pro-Gal mRNA w neuronach OUN wykazuje dużą zmienność i podlega kontroli ze strony układu nerwowego oraz hormonalnego.

Mechanizm hamowania napadów przez galaninę jest związany prawdopodobnie z otwarciem aktywowanych białkiem G lub ATP-wrażliwych kanałów potasowych i ostatecznie hamowanie presynaptycznej transmisji glutaminergicznej [53]. Galanina uwalniana podczas napadów padaczkowych posiada również silnie działanie neuroprotektoryjne, hamuje zmiany neurodegeneracyjne w neuronach w czasie napadów epileptycznych [54]. Neuroprotektoryjne efekty galaniny mogą wynikać ze zdolności endogennej galaniny do zmniejszenia uwalniania pobudzających aminokwasów w hipokampie, co wykazano na przykładzie hipokampa szczura [55]. Podawanie agonistów receptorów GalR łagodzi napady padaczkowe. U transgenicznych myszy z funkcjonalnie usuniętym genem Gal lub genem receptora GalR1 pojawiają się spontaniczne drgawki oraz następuje zwiększona podatność na napady padaczkowe, podczas gdy transgeniczne myszy z nadekspresją genu Gal są odporne na powstawanie napadów padaczkowych po chemicznej czy elektrycznej stymulacji. Kilka syntetycznych agonistów receptorów GalR1 i GalR2 wykazuje zdolność hamowania stymulowanych napadów padaczkowych.

Galanina – terapeutyczne zastosowanie

Obecnie podejmowane próby terapeutycznego wykorzystania galaniny w leczeniu padaczki skupiają się na przeniesieniu genu Gal za pośrednictwem wektorów AAV oraz ekspresji genu Gal i wydzielanie galaniny w określonych strukturach mózgu. W badaniach przeprowadzonych przez Lin i wsp. wykorzystano wektor wirusowy AAV, który posiadał konstytutywną (ciągłą) nadekspresję genu Gal [56]. Wektor ten był wstrzykiwany do hipokampa szczura, a następnie indukowano aktywność drgawkową neuronów (w hipokampie) poprzez iniekcję kwasem kainowym. Podanie wektora wirusowego AAV z genem Gal znacząco

obniżało aktywność napadową neuronów w hipokampie, co potwierdziło działanie przeciwpadaczkowe galaniny w warunkach *in vivo* [57]. Interesujący jest fakt, że podawanie wektora AAV-Gal stymulowało wzrost ekspresji galaniny w neuronach, ale również podwyższa transport tego neurohormonu wzdłuż neuronalnych aksonów [58, 59]. Aby umożliwić silną ekspresję genu Gal i tym samym zapewnić skuteczne działanie przeciwdrgawkowe, zastosowano wektor AAV, który zawierał terapeutyczny gen Gal podłączony pod silny promotor pochodzący z cytomegalovirusa, który umożliwiał wysoką transkrypcję mRNA-Gal oraz sygnał sekrecyjny fibronektyny, który z kolei umożliwiał wydzielanie powstałej galaniny z komórek transfekowanych [60]. Po iniekcji do hipokampa wektor ten znacznie obniżył liczbę epizodów napadowych i ograniczył całkowity czas napadów, wywołanych kwasem kainowym, oraz podwyższał próg drgawkowy w transfekowanym obszarze OUN. Przedstawione dane wykazują, że rekombinowane wektory AAV wykazują stałą i stabilną ekspresję galaniny po wstrzyknięciu ich do hipokampa szczurów, gdzie wykazują istotne efekty przeciwdrgawkowe [60]. Doświadczenia te wskazują, że hamowanie napadów padaczkowych zależy od poziomu ekspresji galaniny w hipokampie, której gen jest dostarczany przez wektory wirusowe. Zastosowanie genu Gal w terapii genowej może być kierunkiem należącym do nowych strategii terapeutycznych w leczeniu i hamowaniu napadów padaczkowych.

Neuropeptyd Y – terapeutyczne uzasadnienie

Neuropeptyd Y (*Neuropeptide Y*, NPY) jest kolejnym endogennym czynnikiem, którego działanie przeciwdrgawkowe próbuje się wykorzystać w terapii genowej [61]. Od czasu jego odkrycia, ponad dwie dekady temu, neuropeptyd Y został scharakteryzowany jako modulator, który wpływa na różnorodne funkcje fizjologiczne, takie jak: homeostaza energetyczna, funkcje układu krążenia i neuroendokrynne, lęk i funkcje poznawcze [62, 63]. Poza tym działaniem wykazano, że NPY odgrywa ważną rolę w modulowaniu pobudliwości neuronów, wpływa na indukcję drgawek padaczkowych oraz odgrywa ważną rolę w neuroprotekcji neuronów w czasie trwania napadów padaczkowych [64]. W układzie nerwowym neuropeptyd ten pełni funkcje kotransmitera, neuromodulatora i neurohormonu. Zbudowany jest z 36 aminokwasów, zawiera 5 reszt tyrozynowych. Pierwsza tyrozyna znajduje się na N-końcu, a ostatnia na C-końcu. Cząsteczka tworzy pętlę, tzw. konformację spinki do włosów ze zbliżonymi do siebie końcami N i C. Aminokwas, tyrozyna na C-końcu łańcucha

Następnym celem terapii genowej padaczki jest układ glutaminergiczny, którego wzmożona aktywność powoduje wysyłanie sygnałów pobudzających, stymulujących powstawanie drgawek padaczkowych. W celu hamowania aktywności tego układu sklonowano czynnik antysensowy hamujący aktywność podjednostki NR1 niezbędnej do funkcjonowania receptorów glutaminergicznych NMDA w wektorze AAV. Szczegółowe badania na modelach zwierzęcych wykazały, że hamowanie aktywności receptorów NMDA w wyniku tego typu terapii skutecznie ogranicza powstawanie napadów padaczkowych.

neuropeptydu, tworzy amid występujący na zewnątrz „spinki”, co łącznie z całą strukturą trzyczłonową stanowi trwałą i charakterystyczny element dla całej rodziny peptydów NPY. Gen kodujący syntezę NPY umiejscowiony jest u człowieka na chromosomie 7. Syntetyzowany neuropeptyd Y gromadzony jest w pęcherzykach synaptycznych neuronów i uwalniany jest pod wpływem impulsu depolaryzacyjnego [65]. Na modelach zwierzęcych padaczki wykazano, że indukowane napady podwyższały poziom informacyjnego RNA (mRNA) dla neuropeptydu Y oraz wykazano wzrost stężenia tego białka, sugerując ważną rolę modulacyjną tego neurohormonu w aktywności padaczkowej neuronów [10].

Potencjalne efekty terapeutyczne neuropeptydu Y są mediowane w wyniku jego oddziaływania na specyficzną rodzinę receptorów NPY, oznaczanych literą „Y” (od takiego właśnie oznaczenia w kodzie aminokwasowym dla miejsc tyrozynowych, których to wiele obserwuje się w łańcuchu peptydów rodziny NPY). Wszystkie receptory Y należą do wielkiej grupy receptorów sprzężonych z białkami G. Obecnie zidentyfikowano 6 typów receptorów Y, wszystkie poza receptorem Y3 zostały sklonowane [66–70]. Z wyjątkiem receptora Y6, wszystkie receptory działają poprzez hamowanie cykazy adenylowej. Pobudzenie receptorów Y wpływa również na kanały jonowe i zawartość jonów wapniowych w komórce [71]. Receptor Y1 jest najlepiej scharakteryzowanym receptorem NPY. Receptory Y1 znajdują się w wielu strukturach mózgu, zarówno w komórkach nerwowych, jak i komórkach glejowych, szczególnie w astrocytach. Receptory Y1 obecne w hipokampie związane są z aktywacją czynności napadowej (charakterystycznej dla padaczki). Aktywacja receptorów neuropeptydowych Y2 i Y5 hamuje uwalnianie glutaminianu w hipokampie i tłumi napady padaczkowe. Stosowanie różnych wariantów zwierząt transgenicznych, w których ekspresja poszczególnych typów receptorów Y była zaburzana, przyniosła znaczące wyniki odnośnie do wykrycia roli poszczególnych typów receptorów Y w organizmie. W badaniach wykazano, że u myszy pozbawionych neuropeptydu Y lub receptorów Y2 i Y5 rozwijała się spontanicznie aktywność padaczkowa i nastąpiło obniżenie progu indukcji napadów przez związki prodrżawkowe. Odwrotnie, nadekspresja

geny NPY w rejonie CA1 hipokampa szczurów powodowała zwiększoną ochronę przed napadami padaczkowymi. Ostatnie badania na zwierzętach transgenicznych wykazały istotną rolę receptorów Y5 w hamującym działaniu neuropeptydu Y na napady padaczkowe (w hipokampie) [87]. Jednak dwa podtypy receptorów Y1 i Y2 wydają się odgrywać kluczową rolę przeciwdrgawkową w działaniu NPY [68, 69].

Zarówno na modelach eksperymentalnych napadów, jak również u pacjentów z oporną padaczką skroniową wykryto istotne zmiany stężenia receptorów NPY w regionach mózgu, które odgrywają rolę w inicjowaniu i propagacji padaczkowej aktywności (np. hipokampie) [72]. Ponadto silną przeciwdrgawkową rolę NPY wykazano w tłumieniu aktywności padaczkowej na skutek iniekcji śródmózgowej agonistów receptorów NPY [73]. Wykazano, że NPY uwalniany jest przez GABA-ergiczne interneurony, hamuje presynaptyczne uwalnianie innych neuroprzekazników oraz wyładowania napadowe [74].

Wpływ neuropeptydu Y na uwalnianie glutaminianu

Stany drżawkowe związane z nadmiernym uwalnianiem glutaminianu prowadzą do ekscytotoksycznej śmierci komórki nerwowej. Ekscytotoksyczność jest patologicznym procesem, w którym dochodzi do uszkodzenia neuronów przez glutaminian i podobne związki chemiczne. U jej podłoża leży nadmierna aktywacja receptorów AMPA (kwas α -hydroksy-5 metyloizoksazolo-4-propionowy) i NMDA (metylo-D-asparaginian), które przewodzą jony sodu (Na^+), potasu (K^+) i wapnia (Ca^{2+}). Receptory NMDA regulują napływ wapnia do komórki, co z kolei aktywuje liczne enzymy, fosfolipazy, endonukleazy i proteazy, które uszkadzają struktury komórkowe, składniki cytoszkieletu, błony komórkowe i DNA [75]. Zjawisko ekscytotoksyczności, w których może dochodzić do nadmiernej koncentracji glutaminianu wokół neuronów, wywołuje stany padaczkowe. NPY, działając hamująco na uwalnianie glutaminianu, działa przeciwdrgawkowo, a tym samym neuroprotekcynie wobec uszkodzeń wywołanych nadmierną aktywnością drżawkową.

Udowodniono, że stanom drżawkowym, niezależnie od etiologii, towarzyszy wzrost stężenia NPY w strukturach limbicznych [76]. Drżawki powodują zwiększoną syntezę i zawartość mózgowego czynnika wzrostu (*brain-derived neurotrophic factor*, BDNF), BDNF jest czynnikiem stymulującym zwiększoną produkcję NPY. Badania na modelach zwierzęcych z bezpośrednim podawaniem NPY również potwierdzają przeciwdrgawkowe działanie NPY [77]. Hipokamp, struktura pełniąca kluczową

rolę w rozwoju zaburzeń afektywnych, jest najbardziej wrażliwą strukturą mózgu na uszkodzające działanie drgawek. Zbudowany jest w sposób bardzo uporządkowany i pobudzenia są w nim przenoszone przez kolejno ułożone neurony glutaminianowe, tworzące 3-członową pętlę hipokampalną. Na ten układ oddziałują hamująco GABA-ergiczne interneurony hipokampa, zawierające jako ko-transmitery neuropeptydy, w tym licznie występujący neuropeptyd Y [78].

Neuropeptyd Y – terapeutyczne zastosowanie

Pierwsze badanie dotyczące aktywności przeciwdrgawkowej neuropeptydu Y wykonano w 1997 r., w wyniku dokomorowego podania tego neuropeptydu [79]. W badaniu tym (na modelu zwierzęcym) wykazano silne działanie przeciwdrgawkowe neuropeptydu Y. Wyniki te wskazują, że neuropeptyd Y posiada właściwości przeciwpadaczkowe, które będzie można wykorzystać w terapii. Jednakże pierwsze podejście terapeutyczne wykorzystujące terapię genową zostało realizowane dopiero niedawno przez Richichi R. i wsp. [99], którzy wykazali szereg efektów przeciwpadaczkowych po podaniu wektorów ekspresyjnych AAV zawierających gen terapeutyczny kodujący neuropeptyd Y. W badaniach tych ekspresja genu kodującego neuropeptyd Y w neuronach hipokampa zapobiegała powstawaniu napadów padaczkowych stymulowanych podawaniem kwasu kainowego. Transfer wektora AAV z genem neuropeptydu Y do hipokampa znacznie zmniejszał siłę i częstotliwość występowania napadów padaczkowych [80, 81]. Pomimo obiecujących wyników, w badaniach nie oceniono skuteczności leczenia terapeutycznego genu NPY na modelu przewlekłej padaczki, w którym na skutek napadów następuje śmierć neuronów i reorganizacja połączeń synaptycznych. Aby przetestować skuteczność terapii genowej wektora AAV-NPY w neuropatologicznych warunkach przypominających ludzkie (padaczka skroniowa), wektor AAV zawierający ludzki gen NPY wstrzyknięto do mózgu szczurów, po indukcji stanu padaczkowego w wyniku elektrycznej stymulacji regionu CA3 w hipokampie. U większości szczurów, gdzie rozwinęły się spontaniczne nawracające napady padaczkowe, nadekspresja NPY zmniejsza proces progresji napadów, a dodatkowo w porównaniu do szczurów otrzymujących kontrolny rAAV podawanie AAV-NPY znacząco zmniejszało częstotliwość spontanicznych napadów o 40% [82]. Prowadzono badania w celu poszukiwania ewentualnych skutków ubocznych, których można się spodziewać z powodu wielu funkcji, jakie pełni NPY w OUN. Na modelach zwierzęcych wykazano, że nadekspresja

NPY nie powoduje zmian w aktywności ruchowej, uczenia i pamięci. Otrzymane wyniki utrzymują celowość badań nad wykorzystaniem wektorów AAV z terapeutycznym genem NPY w terapii genowej padaczki.

Adenozyzna – terapeutyczne uzasadnienie

Kolejnym punktem uchwytu w terapii genowej padaczki jest modulator neurotransmisji, adenozyzna. Związki takie jak puryny od dawna uznawane są jako modulatory neurotransmisji [83]. W szczególności takim prototypowym związkiem jest adenozyzna, rybonukleotyd purynowy, który jest endogennym hamującym neuromodulatorem. Ten endogenne neuromodulator oddziałuje głównie za pośrednictwem receptorów adenozyzny A_1 . Receptory A_1 należą do rodziny receptorów metabotropowych sprzężonych z białkiem G. Pobudzenie tego receptora prowadzi między innymi do presynaptycznego hamowania i stabilizacji potencjału błony postsynaptycznej [84]. Do rodziny tych receptorów należą również receptory adenozyznowe A_{2A} , A_{2B} , A_3 [104]. W badaniach na modelach zwierzęcych padaczki wykazano, że endogenna adenozyzna wykazuje silne działanie przeciwdrgawkowe w pobudzonych obszarach mózgu, gdzie dochodzi do powstawania wyładowań napadowych (np. hipokamp), oraz wykazuje potencjalną zdolność do kontroli powstawania napadów padaczkowych. Oprócz zdolności do regulacji aktywności napadowej adenozyzna wywiera również silne działanie neuroprotektoryjne oraz jest dodatkowo zaangażowana w kontroli bólu neuropatycznego [85, 86].

W dojrzałym mózgu poziom synaptycznej adenozyzny jest regulowany głównie przez cykl adenozyznowy odbywający się w astrocytach. W odróżnieniu od klasycznych neurotransmiterów, które posiadają własne zależne od energii (ATP), systemy transportu i wychwyty molekuli z synaps w celu zakończenia ich działania na receptory, adenozyzna nie posiada takiego systemu [87, 88]. Zamiast tego adenozyzna posiada dwa rodzaje równoważnych

W ciągu ostatniej dekady ustalono ważną rolę dwóch neuropeptydów, tj. neuropeptydu Y (*Neuropeptide Y*, NPY) i galaniny, w modulacji pobudliwości neuronów. Napady padaczkowe powodują uwolnienie tych neuropeptydów, co doprowadziło do hipotezy, że odgrywają one ważną rolę w aktywności padaczkowej. Badania eksperymentalne potwierdziły dalej ich przeciwdrgawkową i neuroprotektoryjną rolę, co zasugerowało hipotezę, że te neuropeptydy oraz ich receptory stanowią ważny endogenne system kontroli aktywności epileptycznej. Potwierdzeniem powyższych danych są badania, w których wykazano, że redukcja liczby neuronów hipokampa, w których zachodzi właściwa ekspresja tych neuropeptydów, powoduje indukcję napadów padaczkowych i nasila proces epileptogenezy. W oparciu o te dane próbuje się w terapii genowej wzmocnić ekspresję powyższych neuropeptydów w celu blokowania epileptogenezy i znoszenia napadów padaczkowych.

Jednym z czynników neurotroficznych, który bierze się pod uwagę w terapii jest glejowy czynnik neurotroficzny (*Glial cell-derived neurotrophic factor*, GDNF). Czynnik GDNF pochodzący z komórek glejowych, należy do rodziny transformujących czynników wzrostu, które promują zdolność przeżycia neuronów w wyniku stymulowania szlaków aktywujących kinazy komórkowe. Wzrost stężenia tego czynnika w hipokampie posiada przeciwdrgawkowe i neuroprotektoryjne efekty. Następnymi czynnikami NTF wykorzystanymi w badaniach nad terapią genową był czynnik wzrostu fibroblastów 2 (FGF-2) i mózgowy czynnik neurotroficzny (BDNF), które mogą odgrywać szczególną rolę w procesie epileptogenezy. Czynniki te chronią neurony przed uszkodzeniem i działają neuroprotektoryjnie, czynnik FGF-2 jest potencjalnym czynnikiem wpływającym na proliferację nowych neuronów z komórek macierzystych, podczas gdy BDNF przyczynia się do różnicowania komórek macierzystych w kierunku tworzenia neuronów. Efektem podania wektorów zawierających geny terapeutyczne dla tych czynników (FGF-2 i BDNF) było podwyższenie procesu proliferacji, który doprowadził do wzrostu produkcji neuronów w hipokampie i hamowanie procesu epileptogenezy.

transporterów nukleozydów adenozynowych, które znajdują się w błonie komórkowej astrocytów i umożliwiają szybki transport tego neurotransmitera i równoważenie zewnątrz i wewnątrzkomórkowego poziomu. W dojrzałym OUN synaptyczne poziomy adenozyne są w dużym stopniu kontrolowane przez odpowiednie enzymy znajdujące się w astrocytach, gdzie związek ten jest produkowany. Do najważniejszych enzymów należy kinaza adenozyne (ADK-adenozyny), która skutecznie usuwa adenozyne poprzez fosforylację adenozyne do adenozyne-5'-monofosforanu (AMP), regulując dopływ adenozyne do komórek [89]. Napady padaczkowe indukują wzrost aktywności kinazy adenozynej w astrocytach, konsekwencją tego jest redukcja poziomu adenozyne w czasie napadów padaczkowych, dowody na powiązanie utraty adenozyne z procesem epileptogenezy sugerują, że wzrost ekspresji kinazy adenozynej w neuronach nasila procesy epileptogenezy i wzmaga powstawanie napadów padaczkowych. Kinaza adenozyne, obecna głównie w komórkach astrogleju, jest uważana za kluczowy enzym w regulacji poziomu adenozyne w neuronach [90, 91]. Dotyczy to zarówno puli wewnątrzkomórkowej i zewnątrzkomórkowej adenozyne, gdyż związek ten stosunkowo łatwo przechodzi przez błony neuronów i astrocytów, ze względu na obecność w nich specyficznych transporterów dla nukleozydów. Zatem zewnątrzkomórkowe (jak i wewnątrzkomórkowe) stężenie adenozyne jest regulowane przez aktywność wewnątrzkomórkowej kinazy ADK.

W zdrowym mózgu dorosłego człowieka stężenie endogennej adenozyne utrzymuje się w zakresie od 25–250 nM i jest regulowane w wyniku stałej ekspresji kinazy ADK [92, 93]. Fizjologiczne stężenie adenozyne jest utrzymywane w zakresie jej powinowactwa do receptora adenozyne A_1 (około 70 nM) [94]. W konsekwencji, nawet niewielkie zwiększenie stężenia adenozyne mogą poszerzyć hamujące

funkcje receptora A_1 i antagonistów receptorów adenozyne. W przypadku pacjentów, jak również na modelach zwierzęcych padaczki wykazano, że zmiany gęstości receptorów A_1 są konsekwencją aktywności napadów padaczkowych i zależą od okresu lub częstotliwości napadów [95]. Wydaje się, że ostre napady padaczkowe są związane z aktywacją receptorów A_1 , podczas gdy przewlekłej padaczce towarzyszy obniżanie ilości receptorów A_1 . Ponadto utrata mechanizmów przeciwpadaczkowych mediowanych za pośrednictwem adenozyne może wywoływać nasilenie powstawania stanów padaczkowych. W hipokampie, na modelu zwierzęcym padaczki, wykazano, że napady padaczkowe powodują hamowanie systemu odpowiedzialnego za biosyntezę adenozyne na skutek spadku gęstości receptorów A_1 i zmian metabolicznych, które doprowadzają do obniżenia poziomu podstawowego adenozyne [96]. Nadekspresja genu kinazy ADK, na transgenicznym modelu padaczki, doprowadziła do spontanicznej aktywności napadowej [97, 98]. U transgenicznych myszy pozbawionych receptorów A_1 następuje zwiększenie aktywności napadów padaczkowych i utrata neuronów w prążkowie na skutek apoptozy, co sugeruje, że kinaza ADK jest regulatorem odpowiedzi zależnej receptora A_1 [99, 100]. Deficyt adenozynej neuromodulacji wyraźnie przyczynia się do epileptogenezy, wzmocnienia aktywności napadów padaczkowych i wrażliwości neuronów. W konsekwencji, strategie terapeutyczne, które modulują system adenozyne poprzez indukowane w komórkach astrogleju hamowanie aktywności kinazy ADK, stanowi racjonalne podejście terapeutyczne, które można wykorzystać w terapii genowej. Obecnie otrzymano agonistów receptora A_1 i inhibitory aktywności kinazy ADK, które stanowią substancje o silnym działaniu przeciwdrgawkowym, a które są skuteczne w modelu (myszy) lekoopornej padaczki [101, 102]. Wśród tych czynników inhibitory kinazy ADK wykazują lepsze właściwości terapeutyczne w porównaniu do agonistów receptora A_1 [103]. Jest to spowodowane faktem, że ogólnoustrojowe podawanie inhibitorów ADK może wywołać serię specyficznych efektów na skutek wzmocnienia endogennych poziomów adenozyne *in vivo* [104].

Adenozyne – terapeutyczne zastosowanie

Obiecującym kierunkiem terapii umożliwiającym uniknięcie skutków ubocznych jest terapia komórkowa wspomagająca wydzielanie adenozyne w określonych strukturach mózgu. Zastosowanie adenozyne w terapii padaczki częściowej na bazie terapii komórkowej zostało opracowane

w oparciu o modyfikowane genetycznie fibroblasty i mioblasty, u których brak ekspresji ADK. Zmodyfikowane komórki wykazujące zdolność uwalniania adenozyliny były następnie zamykane w półprzepuszczalnych błonach polimerowych (w celu uniknięcia odrzucenia przeszczepu) i wszczepiane do odpowiednich struktur mózgu, w których wydzielają adenozylinę. Adenozylinę uwalnianą przez dokomorowe implanty mózgu przeciwdziałała powstawaniu napadów padaczkowych na modelu padaczki skroniowej [105]. Przeciwdrgawkowy efekt trwał do 8 tygodni i odpowiadał długości życia zamkniętych w implantach modyfikowanych komórek. Efekt stłumienia napadów padaczkowych mediowany za pośrednictwem adenozyliny był odwrócony po zastosowaniu selektywnych antagonistów receptora A_1 . Wzrost uwalniania adenozyliny na skutek przeszczepu modyfikowanych komórek jest obiecującą strategią pozwalającą kontrolować napady drgawek, bez istotnych skutków ubocznych. Na podstawie właściwości przeciwdrgawkowych ogniskowo wydalanego adenozyliny i długoterminowego potencjału przeżycia komórek macierzystych otrzymanych z implantów mózgu, komórki macierzyste uwalniające adenozylinę mogą stanowić nowatorskie narzędzie w leczeniu padaczki. W celu wyciszenia ekspresji i aktywności genu kinazy ADK zastosowano technikę interferencji RNA. Strategie wykorzystania interferencji RNA do hamowania chorób neurodegeneracyjnych są obecnie znacznie zaawansowane, wykorzystanie tej techniki w terapii genowej padaczki jest obecnie we wstępnym etapie badań. Wydaje się, że przyczyną tego opóźnienia jest brak dobrze zdefiniowanych celów, co wiąże się z faktem, że procesy molekularne epileptogenyzy są dopiero poznawane. W przeciwieństwie do innych chorób neurodegeneracyjnych konkretne cele terapeutyczne w padaczce, służące do wyciszenia genów za pomocą interferencji RNA muszą być dopiero opracowane [104, 105]. W przypadku terapii genowej padaczki zjawisko interferencji RNA, próbuje się zastosować do wyłączenia aktywności genu kinazy ADK, w wyniku degradacji za pomocą kompleksu RISC matrycowego RNA zawierającego sekwencję kodującą gen kinazy ADK. Degradacja mRNA-ADK hamuje proces translacji tego enzymu w astrocytach, co automatycznie skutkuje wzrostem poziomu endogennej adenozyliny. Teoretycznie można by to osiągnąć w wyniku podania do organizmu cząsteczek siRNA o sekwencji komplementarnej do mRNA kodującego kinazę ADK. Wykazano, że dojrzałe komórki macierzyste modyfikowane przy użyciu interferencyjnego RNA (RNAi) w celu zablokowania aktywności kinazy adenozylinowej i powtórnie wszczepiane do

neuronów hipokampa myszy, którym uprzednio podano kwas kainowy indukujący napady padaczkowe, prowadziły do znaczącej redukcji aktywności padaczkowej i hamowały ubytek neuronów w hipokampie (podczas napadów padaczkowych) [106]. Na podstawie powyższych obserwacji wydaje się celowe zastosowanie interferencji RNA do wyciszenia ekspresji genu dla endogennej kinazy ADK, co prowadzi do wzrostu stężenia endogennej adenozyliny o właściwościach przeciwdrgawkowych. Badania dotyczące tej strategii prowadzone są obecnie w warunkach *in vivo* i *in vitro*.

Zastosowanie kliniczne terapii genowej padaczki

Wydaje się, że celem terapii genowej padaczki powinno być odwrócenie nieprawidłowej aktywności padaczkowej niż przywrócenie populacji neuronów, które zostały utracone w czasie nasilenia choroby. Przywrócenie właściwej transmisji synaptycznej może być w konsekwencji bardziej efektywne niż próby skompensowania utraty określonej populacji neuronów. W świetle istniejących danych eksperymentalnych na modelach zwierzęcych wykazano, że modulacja endogenego systemu produkcji galaniny, NPY lub adenozyliny daje pozytywne wyniki w badaniach przedklinicznych, które można przenieść na badania kliniczne.

W chwili obecnej trwają liczne badania kliniczne dotyczące zastosowania terapii genowej w terapii chorób neurologicznych. Wyniki kliniczne są bardzo zachęcające i wykazują, że terapia genowa nie niesie ze sobą zbyt wysokiego wzrostu czynników ryzyka w stosunku do innych metod. Podjęte są już badania kliniczne nad terapią genową u ludzi w celu leczenia zaburzeń neurologicznych, takich jak: choroba Alzheimera, choroba Canavan i choroba Parkinsona [107-109]. W chwili obecnej najlepszymi kandydatami do terapii genowej padaczki są pacjenci z poważnie rozwiniętą lekooporną padaczką, którym grozi dokonanie resekcji zmienionego na skutek epilepsji płata skroniowego. Trwają obecnie badania kliniczne *ex vivo*, w których próbuje się przeszczepiać modyfikowane genetycznie neurony i komórki glikowe ze zwiększoną ekspresją GABA pacjentom, którzy kwalifikują się do resekcji płata skroniowego. Stosowanie tego typu terapii niesie ze sobą kilka problemów wynikających ze

Adenozylinę, endogenny neuromodulator, wywiera silne działanie przeciwpadaczkowe i neuroprotektoryjne. Zmniejszone poziomy adenozyliny obserwowano w różnych modelach padaczki. Napady padaczkowe indukują wzrost aktywności kinazy adenozylinowej, która obniża poziom adenozyliny. Wydaje się, że redukcja aktywności kinazy adenozylinowej w czasie napadów padaczkowych może być jednym z celów terapii genowej padaczki.

stosowania transplantacji w chorobach neurologicznych. Problemy te, to ograniczony stopień przeżycia przeszczepionych komórek u pacjentów [110]. Ponadto należy zaznaczyć, że płat skroniowy jest bardzo heterogenicznym regionem, podzielonym na wiele złożonych warstw zawierających różnego rodzaju połączenia synaptyczne. Połączenie przeszczepu z tym regionem może tworzyć połączenia multisynaptyczne o nieznanym strukturze. Kłopoty te sprawiają, że terapia z wykorzystaniem wektorów AAV, jako wektorów do przenoszenia terapeutycznych genów do określonych obszarów mózgu padaczkowego, zwiększających np. syntezę GABA, może być bardziej realnym podejściem klinicznym w terapii genowej [6].

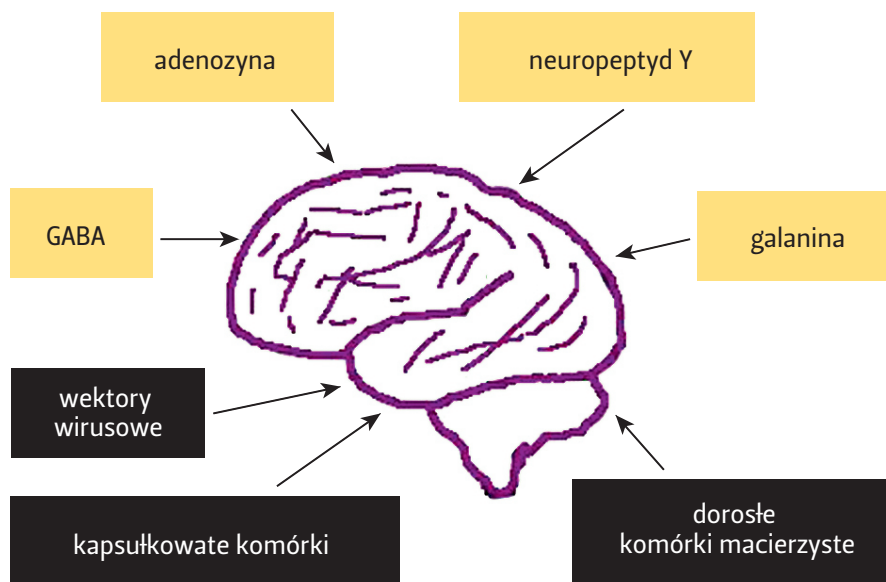
Podsumowując doświadczalne i kliniczne wyniki uzyskane w przypadku innych chorób neurologicznych, można stwierdzić, że istnieje możliwość zastosowania terapii genowej w leczeniu padaczki. Jednakże metoda terapii genowej jest nowa i potencjalne wystąpienie niepożądanych efektów jest stosunkowo mało poznane. Tak jak w przypadku leków przeciwpadaczkowych, nie jest możliwe precyzyjne określenie wpływu tego typu terapii na czynność układu limbicznego, wliczając w to pamięć czy zaburzenia nastroju [6].

Wydaje się, że utrzymywanie długotrwałej ekspresji transgenów może przynosić również

negatywne efekty, gdyż przeniesienie transgenów do innego obszaru mózgu zamiast do struktur docelowych może wywołać negatywne skutki trudne do usunięcia. Z tego powodu produkt zastosowany w terapii genowej zanim osiągnie fazę badań klinicznych musi przejść na zwierzętach rygorystyczne badania bezpieczeństwa i skuteczności różnych dawek oraz kompleksowe oceny ogólnego stanu zdrowia, zachowania, histologii narządów i biodystrybucji stosowanych wektorów (rycina 1).

Podsumowanie

Przedstawione powyżej przykłady wykazują, że terapeutyczne zwiększanie aktywności endogennych przeciwdrgawkowych systemów regulacyjnych w mózgu (GABA, adenozyne, galaniny, neuropeptyd Y) za pomocą terapii genowej jest bardzo obiecującym kierunkiem dla rozwoju racjonalnej terapii padaczki. Przy użyciu terapii genowej istnieje możliwość nie tylko zwalczania napadów padaczkowych, ale również neuroprotekcja neuronów hamująca procesy epileptogenezy, jak również istnieje możliwość zastosowania tej techniki w profilaktyce padaczki. Wzrost hamowania w oparciu o GABA-ergiczną i zależną od adenozyne neuromodulację można skutecznie osiągnąć



Rycina 1. Schemat zastosowania terapii komórkowej i genowej w leczeniu padaczki.

Przeciwpadaczkowe związki, takie jak: GABA, adenozyne, galanina i neuropeptyd Y mogą być dostarczane bezpośrednio do regionów w mózgu objętych zmianami padaczkowymi przy pomocy wektorów wirusowych lub w wyniku transplantacji modyfikowanych genetycznie komórek macierzystych. Transplantacja modyfikowanych komórek macierzystych do zmienionych padaczkowo struktur mózgowych może powodować zastąpienie zdegradowanych neuronów, przywracając właściwe funkcjonowanie sieci neuronalnej, włącznie z poprawą struktury połączeń synaptycznych. Podawanie modyfikowanych komórek macierzystych w formie kapsułkowanych implantów zapewnia bezpieczne i długotrwałe uwalnianie przeciwpadaczkowych czynników, takich jak: GABA, neuropeptyd Y czy adenozyne do określonych rejonów mózgu

w wyniku przeszczepu modyfikowanych komórek do śródmózgowia, które będą uwalniały GABA i adenozyne, lub w wyniku terapii genowej za pomocą wektorów ekspresyjnych. Natomiast dostarczanie przeciwpadaczkowych peptydów, takich jak neuromodulatory np. galaniny lub neuropeptydu Y, może być bardziej skuteczne, jeśli będą dostarczane bezpośrednio za pomocą wektorów ekspresyjnych w terapii genowej.

Terapia genowa oferuje szerokie możliwości hamowania napadów padaczkowych oraz wpływu na procesy epileptogenezy. Wraz z rozwojem nowych typów wektorów wirusowych i niewirusowych będzie można dostarczać selektywnie odpowiednie geny terapeutyczne do konkretnych obszarów mózgu w terapii napadów ogniskowych lub do wielu struktur mózgowych w celu hamowania padaczek uogólnionych. Przy pomocy odpowiednich wektorów będzie można również kontrolować czas działania odpowiednich transgenów. Stosunkowo krótko będą działały transgeny umieszczone w wektorach ekspresyjnych konstruowanych na bazie HSV, natomiast dłużej umieszczone w wektorach AAV. Również selektywność i siłę działania odpowiednich transgenów będzie można kontrolować w wyniku zastosowania odpowiednich promotorów kontrolujących aktywność podawanych genów terapeutycznych. Wstępne badania prowadzone na modelach zwierzęcych potwierdziły skuteczność terapii genowej w hamowaniu powstawania napadów i neuroprotekcji neuronów podczas epileptogenezy. Wydaje się, że postęp w rekombinacji wektorów wirusowych i technologii komórek macierzystych zapewni ekscytujące możliwości dla badań nad wykorzystaniem terapii komórkowej i genowej w terapii tej choroby. W przyszłości odpowiednie klasy klinicznych wektorów dostarczane specyficznym do ognisk padaczkowych mogą stanowić alternatywę dla resekcji chirurgicznej w leczeniu padaczki ogniskowej. Badania prowadzone w ostatnich latach wykazały, że istnieje potencjalnie możliwa korekta równowagi pomiędzy aktywnością a hamowaniem specyficznych neuronów w wyniku transplantacji odpowiednio modyfikowanych komórek. Rozwój wiedzy na temat metod otrzymywania neuronów z komórek macierzystych i odkrywanie strategii związanych z zapobieganiem apoptozy neuronów otwierają nowe możliwości terapii opornych postaci epilepsji.

Otrzymano: 2014.07.31 · Zaakceptowano: 2014.08.26

Piśmiennictwo

- Theodore W.H., Spencer S., Wiebe J.T.: Epilepsy in North America: a report prepared under the auspices of the global campaign against epilepsy, the International Bureau for Epilepsy, the International League Against Epilepsy, and the World Health Organization. *Epilepsia*. 2006, 47(10): 1700–1722.
- Fisher R.S., Van Emde Boas W., Blume W., Elger C.: Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*. 2006, 46: 470–472.
- Berg A.T., Berkovic S.F., Brodie M.J., Buchhalter J.: Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2009, 51, 676–685.
- Vajda F.J.E.: Pharmacotherapy of epilepsy. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2007, 14: 813–823.
- Chuah M.K., Collen D.: Preclinical and clinical gene therapy for haemophilia. *Haemophilia*. 2004, 10(suppl. 4): 119–125.
- Riban V., Fitzsimons H.L., Doring M.J.: Gene therapy in epilepsy. *Epilepsia*. 2009, 50(1): 24–32.
- Kazula A.: Antisense strategy, triplex structure and ribozymes in gene therapy. *Polish Pharmacy*. 2004, LX(6): 736–756.
- Berkovic S.F., Mulley J.C.: Human epilepsies: interaction of genetic and acquired factors. *Trends Neurosci*. 2006, 29, 391–397.
- Pennacchio L.A., Lehesjoki A.E.: Mutations in the gene encoding cytochrome B. *Science*. 1996, 271: 1731–1734.
- McPhee S.W., Francis J., Janson C.G.: Effects of AAV-2-mediated aspartoacylase gene transfer in the tremor rat model of Canavan disease. *Brain Res. Mol*. 2005, 135: 112–121.
- Steinlein O.K., Mulley J.C., Propping P.: A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat. Genet*. 1995, 11: 201–203.
- Lawrence M.S., Ho D.Y., Dash R., Sapolsky R.M.: Herpes simplex virus vectors overexpressing the glucose transporter gene protect against seizure-induced neuron loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995, 92, 7247–7251.
- Sapolsky R.M.: Gene therapy against neurological insults. *Trends Neurosci*. 2001, 24: 695–700.
- Vezzani A.: Gene therapy in epilepsy. *Epilepsy Curr*. 2004, 4: 87–90.
- Simionescu M., Popov D., Sima A.: Endothelial transcytosis in health and disease. *Cell Tissue Res*. 2009, 335: 27–40.
- Di Pasquale G., Chiorini J.A.: AAV transcytosis through barrier epithelia and endothelium. *Mol. Ther*. 2006, 13: 506–516.
- Foust K.D., Nurre E., Montgomery C.L.: Intravascular AAV9 preferentially targets neurons. *Nat. Biotechnol*. 2009, 27: 59–65.
- Ewert K., Slack N.L., Ahmad A.: Cationic lipid-DNA complexes for gene therapy: understanding the relationship between complex structure and gene delivery pathways at the molecular level. *Curr. Med. Chem*. 2004, 11: 133–149.
- Kazula A.: Vectors of gene therapy. *Polish Pharmacy*. 2003, 59: 289–336.
- Kazula A.: Virus vectors in gene therapy. *Polish Pharmacy*. 2004, 60: 843–852.
- Simonato M., Zucchini S.: Are the neurotrophic factors a suitable therapeutic target for the prevention of epileptogenesis? *Epilepsia* 2010, 51(Suppl. 3): 48–51.
- Simonato M., Tongiorgi E., Kokaia M.: Neurotrophic factors and epilepsy. *Trends Pharmacol Sci*. 2006, 27: 631–638.
- Humpel C.B., Hoffer L., Stromberg S.: Neurons of the hippocampal formation express glial cell line-derived neurotrophic factor messenger RNA in response to kainate-induced excitation. *Neuroscience*. 1999, 59(4): 791–795.
- Yoo Y.M., Lee U.: Neuroprotection of adenoviral-vector-mediated GDNF expression against kainic acid-induced excitotoxicity in the rat hippocampus. *Exp. Neurol*. 2006, (2): 407–417.
- Kanter-Schlifke I., B. Georgievska, D. Kirik, M. Kokaia.: Seizure suppression by GDNF gene therapy in animal models of epilepsy. *Mol. Ther*. 2007, 15(6), 1106–1113.
- Kirik D.: GDNF in gene therapy. *Mol. Ther*. 2006, 8: 766–789.
- Thoenen H., Sendtner M.: Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches. *Nat. Neurosci*. 2006, 5(Suppl): 1046–1050.
- Loscher W., Ebert U., Lehmann H., Rosenthal C.: Seizure suppression in kindling epilepsy by grafts of fetal GABAergic neurons in rat substantia nigra. *J. Neurosci Res*. 1998, 51, 196–209.
- Gernert M., Thompson K.W., Loscher W.: Genetically engineered GABA-producing cells demonstrate anticonvulsant effects and long-term transgene expression when transplanted into the central piriform cortex of rats. *Exp. Neurol*. 2002, 176: 183–192.
- Liu W., He X., Cao Z.: Efficient therapeutic gene expression in cultured rat hippocampal neurons mediated by human foamy virus vectors: a potential for the treatment of neurological diseases. *Intervirology*. 2005, 48: 329–335.
- Kazula A.: Gene therapy of nervous system diseases. *Polish Pharmacy*. 2005, LXI: 811–824.
- Hu Y., Russek S.: Surface expression of GABA receptors is transcriptionally controlled by the interplay of cAMP-response

- element-binding protein and its binding partner inducible cAMP early repressor. *J. Biol. Chem.* 2008, 283(14): 9328–9340.
33. Roberts D.S., Russek S.: Stimulation of GABA promoter activity as a mechanism for seizure induced up-regulation of GABA(A) receptor alpha4 subunit expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005, 102(33): 11894–11899.
 34. Raol Y.H., Brooks-Kayal A.: Enhancing GABA(A) receptor alpha 1 subunit levels in hippocampal dentate gyrus inhibits epilepsy development in an animal model of temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci.* 2006, 26(44), 11342–11346.
 35. Brooks-Kayal A.R., Shumate M.D., Jin H.: Selective changes in single cell GABA(A) receptor subunit expression and function in temporal lobe epilepsy. *Nat. Med.* 1999, 4: 1166–1172.
 36. Haberman R., Criswell H., Snowdy S.: Therapeutic liabilities of in vivo viral vector tropism: adenoassociated virus vectors, NMDAR1 antisense, and focal seizure sensitivity. *Mol. Ther.* 2005, 6: 495–500.
 37. McCown T.J.: Secretion of galanin suppresses limbic seizure activity in vivo. *Mol. Ther.* 2006, 14, 63–68.
 38. Boison D.: Adenosine-based cell therapy approaches for pharmacoresistant epilepsies. *Neurodegen. Dis.* 2007, 4: 28–33.
 39. Gant J.C., Thibault E.M.: Decreased number of interneurons and increased seizures in neuropilin 2 deficient mice: implication in experimental status epilepticus. *Epilepsia.* 2008, 43(Suppl): 20–29.
 40. Wasterlain C.G., Mazarati D.: Short-term plasticity of hippocampal neuropeptides and neuronal circuitry in exs for autism and epilepsy. *Epilepsia.* 2003, 50(4): 629–645.
 41. Ryan M.C., Gundlach A.L.: Localization of preprogalanin messenger RNA in rat brain and identification of transcripts in a subpopulation of cerebellar Purkinje cells. *Neuroscience* 1996, 70: 709–728.
 42. Andell-Jonsson S., Bartfai T.: Identification of the spinal degradation products and inhibition of adenylate cyclase by recombinant rat galanin message-associated peptide. *Neuropeptides.* 1998, 32: 191–196.
 43. Adeghate E., Ponery A.S.: Large reduction in the number of galanin-immunoreactive cells in pancreatic islets of diabetic rats. *Neuroendocrinology.* 2001, 13: 706–710.
 44. Mazarati A.M.: Galanin and galanin receptors in epilepsy. *Neuropeptides.* 2004, 38: 331–343.
 45. McCown T.J.: Adeno-associated virus-mediated expression and constitutive secretion of galanin suppresses limbic seizure activity *in vivo*. *Mol. Ther.* 2006, 4: 63–68.
 46. Mazarati A.M., Baldwin R.A., Shinmei S.: *In vivo* interaction between serotonin and galanin receptors types 1 and 2 in the dorsal raphe: implication for limbic seizures. *J. Neurochem.* 2005, 95: 1495–1503.
 47. Mazarati A.M., Lu X.: Serotonergic projection from dorsal raphe into the hippocampus: Role in seizures and regulation by galanin type 1 (GalR1) and type 2 (GalR2) receptors. *Epilepsia.* 2005, 46: 198–205.
 48. Branchek T.A., Smith K.E.: Galanin receptor subtypes. *Trends Pharmacol. Sci.* 2003, 21: 109–115.
 49. Shine J.: Galanin and galanin receptors. *Res. Probl. Cell Differ.* 1999, 26: 257–291.
 50. Jureus A., Langel U.: Galanin analogs distinguish between hypothalamic and galanin receptor subtype. *J. Pept. Res.* 1997, 49: 195–200.
 51. Bartfai T.: Galanin: a neuropeptide with important central nervous system actions. In: *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress.* (Bloom FE, Kupfer DJ, ed). Raven Press, New York, 1995: 563–571.
 52. Evans H.: Genomic organization and localization of the gene encoding human preprogalanin. *Genomics.* 1993, 18: 473–477.
 53. Kokaia M., Holmberg K.: Suppressed kindling epileptogenesis in mice with ectopic overexpression of galanin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001, 98: 14006–14011.
 54. Lin E.J., Richichi C., Young D.: Recombinant AAV-mediated expression of galanin in rat hippocampus suppresses seizure development. *Eur. J. Neurosci.* 2003, 18, 2087–2092.
 55. Haberman R.P., Samulski T.J.: Attenuation of seizures and neuronal death by adenoassociated virus vector galanin expression and secretion. *Nat. Med.* 2003, 9(8): 1076–1080.
 56. Śmiałowska M. Receptory dla neuropeptydu Y. W: Nowak JZ, Zawilska JB, red. Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału. Warszawa. PWN. 2003: 505–524.
 57. Michel M.C., Beck-Sickinger A.: XVI International Union of Pharmacology Recommendations for the Nomenclature of Neuropeptide Y, Peptide YY, and Pancreatic Polypeptide Receptors. *Pharmacol. Rev.* 1998, 50: 143–150.
 58. Karlsson R.S., Cho J.S.: The neuropeptide Y Y1 receptor subtype is necessary for the anxiolytic-like effects of neuropeptide Y, but not the antidepressant-like effects of fluoxetine, in mice. *Psychopharmacol.* 2008, 195, 4: 547–558.
 59. Klapstein G.J., Colmers W.F.: Neuropeptides. *J. Neurophysiol.* 1997, 78: 1651–1661.
 60. Bendotti C., Vezzani A., Serafini R.: Increased preneuropeptide Y mRNA in the rat hippocampus during the development of hippocampal kindling: comparison with the expression of preprosomatostatin mRNA. *Neurosc. Lett.* 1991, 132: 175–178.
 61. Tatemoto K.: Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982, 79: 5485–5489.
 62. Pedrazzini T., Pralong F.: Neuropeptide Y. *Cell Mol. Life Sci.* 2003, 60: 350–377.
 63. Silva A.P., Xapelli S., Grouzmann E.: The putative neuroprotective role of neuropeptide Y in the central nervous system. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 2005, 4: 331–347.
 64. Baraban S.C.: Antiepileptic actions of neuropeptide Y in the mouse hippocampus require Y5 receptors. *Epilepsia.* 2002, 43: 9–13.
 65. McNamara J.O.: Analyses of the molecular basis of kindling development. *Psychiatry Clin. Neurosc.* 2005, 49: 175–178.
 66. Redrobe J.P., Dumont Y., Fournier A.: The neuropeptide Y (NPY) Y1 receptor subtype mediates NPY-induced antidepressant-like activity in the mouse forced swimming test. *Neuropsychopharmacology.* 2002, 26: 615–624.
 67. Redrobe J.P., Dumont Y., Herzog H.: Neuropeptide Y (NPY) Y2 receptors mediate behaviour in two animal models of anxiety: evidence from Y2 receptor knockout mice. *Behav Brain Res.* 2003, 41: 251–255.
 68. Marsaban S.C., Palmiter R.D.: Role of neuropeptide Y receptor in limbic seizures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999, 96: 13518–13523.
 69. Vezzani A., Colmers W.F.: The anti-epileptic actions of neuropeptide Y in the hippocampus are mediated by Y and not Y receptors. *Eur J Neurosci.* 2005, 22: 1417–1430.
 70. Noe F.J., Nissinen A.: Gene therapy in epilepsy: the focus on NPY. *Pep-tides.* 2007, 28(2): 377–383.
 71. Noe F., Vezzani A.: Neuropeptide Y gene therapy decreases chronic spontaneous seizures in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Brain.* 2006, 131(Pt. 6): 1506–1515.
 72. Furtinger S., Pirker S.: Altered expression of neuropeptide Y, -Y(1), and -Y(2) receptors in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia.* 2002, 43(Suppl 5): 152–159.
 73. Kokaia M.: Differential suppression of seizures via Y2 and Y5 neuropeptide Y receptors. *Neurobiol. Dis.* 2005, 20: 760–772.
 74. Richichi C., Lin E.J., Stefanin D., Vezzani A.: Anticonvulsant and antiepileptogenic effects mediated by adeno-associated virus vector neuropeptide Y expression in the rat hippocampus. *J. Neurosci.* 2004, 24: 3051–3059.
 75. Fedele D.E., Gouder N., Guttinger M.: Astroglialosis in epilepsy leads to overexpression of adenosine kinase, resulting in seizure aggravation. *Brain.* 2005, 128(Pt 10): 2383–2395.
 76. Sebastiao A.M., Ribeiro J.A.: Tuning and fine-tuning of synapses with adenosine. *Curr. Neuropharmacol.* 2009, 7: 180–194.
 77. Boison D.: Adenosine augmentation therapies (AATs) for epilepsy. *Epilepsy Res.* 2009, 85: 131–141.
 78. Ren G., Boison D.: Lentiviral RNAi-induced downregulation of adenosine kinase in human mesenchymal stem cell grafts: a novel perspective for seizure control. *Exp. Neurol.* 2007, 208(1): 26–37.
 79. Woldbye D.P., Larsen P.J.: Powerful inhibition of kainic acid seizures by neuropeptide Y. *Nat. Med.* 1997, 3: 761–764.
 80. Parent J.M.: Adult neurogenesis in the intact and epileptic dentate gyrus. *Prog. Brain Res.* 2007, 163: 529–540.
 81. Huber A., Padrun V.: Grafts of adenosine suppress seizures in epilepsy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001, 98: 7611–7616.
 82. Gernert M., Thompson K.W.: Genetically engineered GABA-producing cells demonstrate anticonvulsant effects and long-term transgene expression when transplanted into the central piriform cortex of rats. *Exp. Neurol.* 2002, 176: 183–192.
 83. Burnstock G.: Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.* 1972, 24, 509–581.
 84. Fredholm B.B., Ijzerman A.P., Jacobson K.A.: International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* 2001, 53: 527–552.
 85. Cunha R.A.: Neuroprotection by adenosine in the brain. *Neurol. Disord.* 2005, 4: 325–332.
 86. McGaraughty S., Jarvis M.F.: Purinergic control of neuropathic pain. *Drug Dev. Res.* 2006, 67: 376–388.
 87. Williams M., Jarvis M.F.: Purinergic and pyrimidinergic receptors as potential drug targets. *Biochem. Pharmacol.* 2006, 59: 1173–1185.
 88. Tuszyński M.H., Thal L., Pay M., Salmon DP: Nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease. *Nat. Med.* 2005, 11: 551–555.
 89. McPhee S.W., Samulski R.J.: Immune responses to AAV in a phase I study for Canavan disease. *J. Gene Med.* 2006, 8: 577–588.
 90. Studer F.E., Fedele D.E.: Shift of adenosine kinase expression from neurons to astrocytes during postnatal development suggests dual functionality of the enzyme. *Neuroscience.* 2006, 142: 125–137.
 91. Boison D.: Adenosine kinase, epilepsy and stroke: mechanisms and therapies. *Trends Pharmacol. Sci.* 2006, 27: 652–658.
 92. Dunwiddie T.V.: The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 2001, 24: 31–55.

93. Gouder N., Scheurer L.: Overexpression of adenosine kinase in epileptic hippocampus. *J. Neurosci.* 2004, 24: 692–701.
94. Pagonopoulou O., Efthimiadou A.: Modulatory role of adenosine and its receptors in epilepsy: Possible therapeutic approaches. *Neurosci. Res.* 2006, 56: 14–20.
95. Rebola N., Coelho J.E.: Decrease of adenosine A1 receptor and adenosine neuromodulation. *Eur. J. Neurosci.* 2003, 18: 820–828.
96. Pignataro G., Studer F.E., Wilz A.: Neuroprotection in ischemic mouse brain induced by stem cell derived brain implants. *J. Neurosci.* 2006, 22: 122–132.
97. Gouder N., Güttinger M., Gabernet L.: Astrogliosis in epilepsy leads to overexpression of adenosine kinase resulting in seizure aggravation. *Brain.* 2005, 128: 2383–2395.
98. Jackson E.K.: Adenosine A1 receptor knockout mice develop lethal status epilepticus after experimental traumatic brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2006, 26: 565–575.
99. Fedele D.E., Li T.: Adenosine A1 receptors are crucial in keeping an epileptic focus localized. *Exp Neurol.* 2006, 200: 184–190.
100. Jarvis M.F., Mikusa J., Chu K.L.: Comparison of the ability of adenosine kinase inhibitors and adenosine receptor agonists to attenuate thermal hyperalgesia and reduce motor performance in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2002, 73: 573–581.
101. Mazarati A.M., Baldwin R.A., Shinmei S.: Interaction between serotonin and galanin receptors types 1 and 2 in the dorsal raphe: implication for limbic seizures. *J. Neurochem.* 2005, 95: 1495–1503.
102. Tsuchiya M.: Therapeutic potential of adenosine kinase inhibitors as analgesic agents. *Drug Dev. Res.* 2005, 50: 14–26.
103. Güttinger M., Padrun V., Pralong W.: Seizure suppression and lack of adenosine A1 receptor desensitization after focal long-term delivery of adenosine by encapsulated myoblasts. *Exp. Neurol.* 2005, 93: 53–64.
104. Fedele D.E., Koch P.: Engineering embryonic stem cell derived glia for adenosine delivery. *Neurosci Lett.* 2004, 370: 160–165.
105. Kazula A.: RNA interference—a new strategy of gene therapy. *Polish Pharmacy.* 2005, LXI: 802–810.
106. Nilsen K.E., Cock H.R.: Focal treatment for refractory epilepsy: hope for the future? *Brain Res. Rev.* 2004, 44: 141–153.
107. Kaplitt M.G., Feigin A.: Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. *Lancet.* 2007, 369: 2097–2105.
108. Fiandaca M., Forsayeth J.: Current status of gene therapy trials for Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 2008, 209: 51–59.
109. Marks W.J., Ostrem J.L.: Safety and tolerability of intraputamenal delivery of CER-120 (adeno-associated virus serotype 2-neurturin) to patients with idiopathic Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2008, 7: 400–408.
110. Bjorklund A.: Cell replacement strategies for neurodegenerative disorders. *Epilepsia.* 2004, 231: 177–185.

Talidomid i jego analogi – zastosowanie we współczesnej terapii

Karol Pach

Apteka Rodzinna, Kielce

Adres do korespondencji: Karol Pach, Apteka Rodzinna, ul. Jagiellońska 62, 25-734 Kielce, e-mail: karol_pach@wp.pl

Thalidomide and its analogues – practice in medical science

Thalidomide and its analogues, lenalidomide and pomalidomide, are immunomodulatory drugs (IMiDs) with wide biological effects. The history of thalidomide is really complex. Introduced in 1957 as a wonder drug for morning sickness, then it was withdrawn from the market due to serious side effects, finally returned as a treatment for many diseases, including multiple myeloma (MM). The analogues of thalidomide was derived by modifying the chemical structure of thalidomide to improve its effectiveness and reduce its side effects. Based on the history of thalidomide the importance of monitoring the side effects was underline. Therapeutic security of the drug on the market is directly proportional to the effectiveness of operation, by health care system workers and patients, on this field. What is more it is helpful in the process of searching new therapeutic solutions.

Keywords: thalidomide, lenalidomide, pomalidomide, multiple myeloma (MM).

© Farm Pol, 2014, 70(10): 548–551

Talidomid (TAL) wprowadzono do leczenia w Niemczech, pod koniec lat pięćdziesiątych, jako lek nasenny, przeciwbólowy i sedatywny. Cząsteczka talidomidu odznacza się prostą dwupierścieniową budową, z asymetrycznym atomem węgla. Istnieją niepotwierdzone doniesienia, iż związek był pierwotnie testowany podczas II wojny światowej jako antidotum na neurotoksyny [1, 2]. Ze względu na szybkie działanie i opinie o braku efektów ubocznych od początku lat sześćdziesiątych TAL stosowany był m.in. jako specyfik zapobiegający nudnościom w początkowym okresie ciąży. Jednocześnie na uwagę zasługuje fakt, iż talidomid nie uzyskał wówczas akceptacji FDA (*Food and Drug Administration*) i nie został, w tamtym czasie, zarejestrowany w Stanach Zjednoczonych. Brak wad wrodzonych wśród noworodków w USA zawdzięczamy dr Frances Oldham Kelsey, farmaceutce od niedawna wówczas pracującej dla FDA,

która nie ugięła się pod presją firmy chcącej wprowadzić nowy lek na rynek amerykański. Kelsey dostrzegła brak kompletnych badań leku i nie wydała zgody na jego dopuszczenie do obrotu [3].

Pierwsze doniesienia dotyczące związku pomiędzy przyjmowaniem talidomidu, a występowaniem ciężkich wad wrodzonych u dzieci pojawiły się w piśmiennictwie już w 1961 r. Z czasem wady te zaczęto określać mianem embriopatii potalomidowej, a sam lek uznano za teratogeny i w połowie 1961 r. wycofano z lecznictwa w większości z ponad czterdziestu krajów, gdzie był zarejestrowany pod różnymi nazwami handlowymi [4]. Niechłubnym wyjątkiem okazała się Kanada, gdzie decyzja o wycofaniu leku z obrotu zapadła 2 marca 1962 r., czego skutkiem było pojawienie się wad wrodzonych wśród większej populacji dzieci. U noworodków dochodziło do całkowitego niewykształcenia kończyn (amelia), ich zniekształcenia (fokomelia), a także występowania wad wrodzonych w obrębie oczu i uszu [5].

Przez wiele lat po wycofaniu talidomidu z lecznictwa starano się wyjaśnić jego teratogenne działanie. Dopiero w 2010 r. badacze japońscy ustalili, iż TAL łączy się z białkiem o nazwie cereblon (CRBN). W ten sposób nie dochodzi do utworzenia kompleksu cereblonu z innymi cząsteczkami (*DDB*, *Cu14A*, *Roc1*) i, w konsekwencji, do ekspresji fibroblastycznego czynnika wzrostu (*FGF8*). Czynnikiem ten z kolei jest podstawowym regulatorem wzrostu kończyn w życiu płodowym [6]. Ustalono także, iż lek poza hamowaniem angiogenezy wywołuje również apoptozę nowo tworzących naczyń oraz posiada działanie przeciwzapalne i immunomodulatoryjne. Działanie przeciwzapalne TAL wynika ze zmniejszenia odpowiedzi monocytów i granulocytów obojętnochłonnych na czynniki chemotaktyczne, obniżenia zdolności do fagocytozy oraz zmniejszenia procesu powstawania wolnych rodników

tlenowych. Ponadto wykazano, iż lek ten, podobnie jak glikokortykosteroidy, stabilizuje błonę lizosomów. Działania przeciwzapalnego TAL dopatruje się również w jego antagonistycznym działaniu w stosunku do prostaglandyn E2 i F2 oraz histaminy, serotoniny, a także acetylocholino [7].

Drugim kierunkiem działania TAL jest hamowanie angiogenezy. Angiogeneza polega na powstawaniu naczyń krwionośnych, w obecności czynników pobudzających ich wzrost (*aFGF*, *bFGF*, *TGF α* , *VEGF* i in.), z komórek śródbłonna już istniejących naczyń włosowatych. Ustalono, iż TAL zmniejsza ekspresję VB3 integryny znajdującej się w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych, moduluje także ekspresję cząsteczek adhezyjnych, co hamuje powstawanie naczyń krwionośnych. Nasilona angiogeneza obserwowana w stanach patologicznych, w tym również w przebiegu chorób nowotworowych, jest wynikiem zaburzeń metabolicznych i niedotlenienia tkanek. Im agresywniej rozwija się choroba, tym intensywniej przebiega rewaskularyzacja. W obrębie tych tkanek dochodzi bowiem do zwolnionego przepływu krwi oraz zwiększenia jej lepkości, a także do uszkodzenia śródbłonna naczyń [7, 8, 9].

Kolejnym kierunkiem działania TAL jest działanie immunomodulacyjne. Lek wywołuje wpływ zarówno na odpowiedź komórkową, jak i humoralną. TAL zmniejsza syntezę TNF- α przez monocyty poprzez skrócenie czasu połowicznego trwania mRNA dla TNF- α z 30 do 17 min. Lek obniża również produkcję IL-6, IL-1, IL-8 oraz nasila odpowiedź limfocytów Th2, co manifestuje się wzrostem stężenia IL-4. TAL powoduje także zwiększenie liczby limfocytów cytotoksycznych – T CD8 [7, 8, 9].

Warto również wspomnieć o działaniu sedatywnym TAL. Lek aktywuje ośrodek snu, nie powodując przy tym depresji ośrodka oddechowego i zaburzeń koordynacji ruchów [7].

Ustalenie mechanizmu teratogennego działania TAL i zestawienie uzyskanych danych z patogenezą wybranych chorób nowotworowych doprowadziło do jego powrotu na rynek. Chociaż pierwsze doniesienia o skuteczności talidomidu w terapii szpiczaka mnogiego pojawiły się już w 1965r., to nie zostały one docenione i dopiero w 1999 r. ukazała się pierwsza publikacja autorstwa Singhala i wsp. [10]. Praca dotyczyła zastosowania leku w terapii opornej postaci szpiczaka mnogiego (plazmocytowego, MM). Od tego czasu trwają wielośrodkowe badania dotyczące zastosowania TAL i jego analogów w leczeniu MM oraz wielu innych schorzeń. Obecnie, zgodnie z polską rejestracją, TAL przeznaczony jest, w połączeniu z melfalanem i prednizonem, do leczenia pierwszego rzutu nieleczzonego szpiczaka mnogiego u pacjentów w wieku ≥ 65 lat lub u pacjentów, u których nie można zastosować wysokich dawek chemioterapii [9, 10, 11].

Szpiczak mnogi (plazmocytowy, MM) jest złośliwym nowotworem szpiku kostnego, który charakteryzuje się rozrostem atypowych komórek plazmatycznych, produkujących tylko jeden rodzaj białka – monoklonalną immunoglobulinę. Powszechnie występującym powikłaniem jest osteoliza kostna, a także niewydolność nerek, hiperkalcemia i niedokrwistość. W obrazie klinicznym charakterystyczny jest ból kostny (łędźwiowy odcinek kręgosłupa, miednica, żebra), któremu towarzyszą objawy neurologiczne (niedowłady i porażenie kończyn) oraz zakażenia układu oddechowego i moczowego [2,12].

Szpiczak plazmocytowy stanowi około 1% wszystkich nowotworów złośliwych i około 14% nowotworów w obrębie układu krwiotwórczego. Występuje częściej u mężczyzn niż u kobiet (1.4:1), a szczyt zachorowalności przypada na siódmą dekadę życia, jednak może mieć miejsce we wcześniejszym okresie (15% chorych <60 lat, około 2% przed 40 r.ż.) [12].

Przyczyny choroby nie zostały ustalone. Pewną rolę przypisuje się czynnikom genetycznym oraz stymulacji antygenowej w przebiegu zakażeń bakteryjnych lub wirusowych. W patogenezie MM nie wyklucza się również roli długotrwałej ekspozycji na promieniowanie jonizujące, benzen, azbest, środki ochrony roślin oraz inne substancje stosowane w przemyśle chemicznym.

WHO wyróżniła następujące postaci szpiczaka mnogiego:

- bezobjawowy (tłący) – występuje u ok. 8% chorych, ryzyko progresji do postaci objawowej wynosi 10% na rok w ciągu pierwszych pięciu lat od rozpoznania, a następnie maleje;
- niewydzielający;
- białaczka plazmocytowa – najbardziej zaawansowane stadium choroby, występuje w 2-5% przypadków, przebiega gwałtownie, często objawem towarzyszącym jest powiększenie wątroby, śledziony i węzłów chłonnych, a samo rokowanie jest złe, większość chorych przeżywa tylko kilka miesięcy od rozpoznania [12].

Ze względu na udowodnione właściwości teratogenne TAL wszyscy pacjenci, zarówno kobiety, jak i mężczyźni, włączeni do terapii tym lekiem są zobowiązani do postępowania zgodnie z „Programem zapobiegania ciąży Thalidomide Celgene”. Zgodnie z tym programem kobiety zdolne do zajścia w ciążę muszą stosować jedną skuteczną metodę antykoncepcyjną (np. podskórny implant hormonalny, system wewnątrzmaciczny uwalniający lewonorgestrel, octan medroksyprogesteronu, sterylizację jajowodową) w okresie czterech tygodni poprzedzających terapię talidomidem, przez cały czas trwania terapii oraz przez cztery tygodnie po jej zakończeniu. Z tego zobowiązania zwolnione są

Tabela 1. Zestawienie działań niepożądanych talidomidu [9]

Objawy ogólne	gorączka osłabienie utrata masy ciała
Objawy neurologiczne	drżenie mięśni drgawienie i mrowienie kończyn utrata koordynacji ruchowej senność polineuropatie
Objawy ze strony przewodu pokarmowego	zaparcia biegunka, nudności i wymioty zapalenie błony śluzowej jamy ustnej
Objawy ze strony układu krwiotwórczego i naczyniowego	małopłytkowość neutropenia niedokrwistość zakrzepowe zapalenie żył

kobiety, które zadeklarują całkowitą wstrzeźliwość seksualną. Dopuszcza się także stosunki seksualne z partnerem poddanym wazektomii, a zabieg musi być potwierdzony dwoma ujemnymi wynikami analizy nasienia. U kobiet zdolnych do zajścia w ciążę należy, zgodnie z „Programem zapobiegania ciąży Thalidomide Celgene”, przeprowadzić pod nadzorem medycznym test ciążyowy. Test należy wykonać na trzy dni przed wizytą u lekarza zlecającego talidomid, a następnie powtarzać co 28 dni, włącznie z okresem czterech tygodni po zakończeniu terapii [12, 13].

Z uwagi na fakt, iż TAL występuje w nasieniu mężczyzn włączonych do terapii tym lekiem, również oni są zobowiązani do przestrzegania warunków „Programu zapobiegania ciąży Thalidomide Celgene”. Muszą oni rozumieć ryzyko wystąpienia wad wrodzonych dziecka w przypadku podjęcia kontaktów seksualnych z kobietą w ciąży lub zdolną do zajścia w ciążę, jeśli nie stosuje ona skutecznej antykoncepcji. W obydwu przypadkach pacjenci są zobowiązani do stosowania prezerwatyw [12, 13].

W „Programie zapobiegania ciąży Thalidomide Celgene” nie wymieniono doustnych środków antykoncepcyjnych jako skutecznej metody antykoncepcji. Wynika to z faktu, iż jednym z najpoważniejszych działań niepożądanych, które występują u pacjentów poddanych terapią TAL, jest zwiększone ryzyko żylnych chorób zatorowo-zakrzepowej. Jak należałoby przypuszczać, stosowanie doustnych środków antykoncepcyjnych potęgowałoby to działanie. Z tego względu zaleca się, aby przed zastosowaniem TAL zmienić terapię opartą na doustnej antykoncepcji na jedną z wymienionych w programie [13].

W czasie terapii TAL lekarz ma obowiązek poinformować pacjenta o możliwości wystąpienia objawów zakrzepicy żylnych. Podczas stosowania leku może pojawić się zaczerwienienie skóry, ból w kończynach, w tym objaw Homansa (ból łydki występujący przy biernym zgięciu grzbietowym stopy), a ponadto jednostronne lub obustronne obrzęki

kończyn oraz stan podgorączkowy wynikający ze stanu zapalnego wokół żyły z zakrzepem. Lekiem z wyboru stosowanym u pacjentów ze szpiczakiem mnogim i zakrzepicą żylną jest heparyna drobnocząsteczkowa (*low molecular weight heparin*, LMWH). Heparynę należy podawać przez minimum pięć dni, następnie włączyć doustny antykoagulant, aż do osiągnięcia INR 2–3, po czym w ciągu dwóch dni zakończyć leczenie [12, 14].

Modyfikacja terapii TAL przebiega w kierunku zwiększenia jej skuteczności oraz ograniczenia działań niepożądanych leku (tabela 1) [9]. W tym celu wprowadzono do lecznictwa analogi TAL – lenalidomid i pomalidomid. Zarówno TAL, jak i jego analogi zaliczamy do klasy leków immunomodulujących (IMiDs), pochodnych kwasu glutaminowego. W ostatnim czasie ukazały się również doniesienia o wytworzeniu cząsteczek hybrydowych przez naukowców z Virginia Commonwealth University. Struktury te powstały z połączenia TAL i kurkuminy, składnika aktywnego kurkumy pochodzącej z kłączy ostrzyżu (*Curcuma longa*). Kurkuminie przypisuje się aktywność przeciwnowotworową, która jest ograniczona jej słabą rozpuszczalnością w wodzie. TAL z kolei charakteryzuje się krótkim okresem półtrwania w organizmie. Po wytworzeniu cząsteczek hybrydowych właściwości farmakokinetyczne obydwu cząstek uległy poprawie. Obecnie trwają dalsze prace nad wprowadzeniem dwóch, spośród siedmiu, otrzymanych cząsteczek do terapii MM [12, 14].

W 2006 r. zarejestrowano w USA, w terapii MM, lenalidomid, analog TAL o podobnym mechanizmie działania. Rejestracja leku w Europie nastąpiła w 2007 r.

Lenalidomid charakteryzuje się 2000 razy silniejszą, w porównaniu z TAL, stymulacją proliferacji limfocytów T oraz wytwarzania IL-2. Lek wykazuje również mniej działań niepożądanych, gdyż zdecydowanie rzadziej występuje w trakcie terapii polineuropatia i senność. Pacjenci włączeni do terapii lenalidomidem muszą spełniać ustalone dla TAL warunki programu zapobiegania ciąży. Wynika to z podobnej budowy chemicznej cząsteczki lenalidomidu do TAL, jak również udowodnionego działania teratogenego analogu na płody małp podczas badań przedrejestracyjnych. W Polsce lenalidomid dostępny jest w ramach tzw. chemioterapii niestandardowej refundowanej przez NFZ. Terapia obejmuje chorych na MM, u których wcześniejsze leczenie nie przyniosło skutku lub wystąpiły nawroty choroby [2, 12, 16, 17]. W ostatnim czasie pojawiły się także doniesienia o próbach wykorzystania lenalidomidu w terapii przewlekłego bólu, doniesienia te wymagają jednak potwierdzenia podczas dalszych badań [18].

Opisano przypadki odwracalnej utraty pamięci po podaniu lenalidomidu. Ustalono, iż zwiększone ryzyko wystąpienia tego typu zaburzeń dotyczy

pacjentów, którym lek podawany był po raz kolejny bądź epizody zaburzenia funkcji poznawczych pojawiały się wcześniej. Bardziej narażone są także osoby, u których doszło do uszkodzenia naczyń krwionośnych w obrębie mózgu. Ustalenie dokładnej przyczyny zaburzeń wymaga dalszych badań [19].

W lutym 2013 r. został dopuszczony w Polsce najnowszy analog talidomidu – pomalidomid (IMNOVID). Wskazaniem do zastosowania leku jest oporna postać MM, nie reagująca na leczenie lenalidomidem i bortezomibem [12, 20]. Przeprowadzono wieloośrodkowe, randomizowane badanie, które wykazało, iż terapia pomalidomidem przynosi lepsze wyniki w połączeniu z deksametazonem w niskiej dawce (40 mg) [21]. Wykonano również próby łącznego podania pomalidomidu, deksametazonu i klarytromycyny, uzyskując wysoki odsetek skuteczności terapii. Innym sposobem terapii było łączne podanie pomalidomidu, cyklofosfamidu i prednizolonu (PCP). W tym przypadku u 59% pacjentów uzyskano częściową odpowiedź immunologiczną, a u dwóch osób zaobserwowano całkowitą remisję choroby. W celu opracowania optymalnej strategii leczenia MM z udziałem pomalidomidu niezbędne są dalsze próby jego stosowania w terapii tej poważnej jednostki chorobowej [22].

Podsumowanie

Na przykładzie talidomidu można zaobserwować pewną prawidłowość dotyczącą stosowania określonej substancji leczniczej w terapii. Początkowo uznany za cudowny lek, następnie, po stwierdzeniu poważnych działań niepożądanych, wycofany z lecznictwa, by wreszcie po kilkudziesięciu latach do niego powrócić, również w zmodyfikowanej formie. Mając na uwadze historię talidomidu, należy podkreślić niezwykle istotne znaczenie zgłaszania działań niepożądanych wywołanych przez substancje dopuszczone do obrotu. Z jednej strony umożliwia to wycofanie z obrotu leków niebezpiecznych, z drugiej natomiast, przy zachowaniu odpowiednich środków ostrożności, odkrycie nowych możliwości terapeutycznych danej substancji leczniczej.

Otrzymano: 2014.08.18 · Zaakceptowano: 2014.09.03

Piśmiennictwo

- Shortt J., Johnstone R.: Thalidomide – analogue biology: immunological, molecular and epigenetic target in cancer therapy, *Oncogene* 2013, 32: 4191–4202.
- Jurczyszyn A., Skotnicki A.: Nowe leki w terapii szpiczaka mnogiego, *Współczesna Onkologia* 2007, 11: 186–194.
- [http://www.fda.gov/aboutfda/whatwedo/history/ucm345094.htm\(stan z14.08.2014\)](http://www.fda.gov/aboutfda/whatwedo/history/ucm345094.htm(stan z14.08.2014))
- Puszczewicz M., Zimmermann-Górska I.: Talidomid – perspektywy nowych wskazań terapeutycznych, *Terapia* 2004, 156: 18–21.
- McBride W. G.: Thalidomide embryopathy, *Teratology* 1977, 16: 79–82.
- Ito T., Ando H., Suzuki T., Ogura T., Hotta K., Imamura Y.: Identification of primary target of thalidomide teratogenicity, *Science* 2010, 327: 1345–1350.
- Rokicka-Piotrowicz M.: Talidomid w leczeniu szpiczaka mnogiego, *Współczesna Onkologia* 2001, 5: 161–164.
- Dmoszyńska A.: Talidomid – nowe możliwości leczenia szpiczaka mnogiego, *Acta Haematologica Polonica* 2000, 31: 5–9.
- Rzepecki P.: Lek o silnych właściwościach immunomodulujących – talidomid, lenalidomid i pomalidomid – w leczeniu szpiczaka mnogiego, *Współczesna Onkologia* 2009, 13: 265–275.
- Hellmann A., Dietrich G., Ciepluch H., Knopińska-Pośluszy W., Prejzner W., Baran W.: Talidomid w monoterapii oraz w połączeniu z deksametazonem u chorych z oporną postacią szpiczaka mnogiego, *Współczesna Onkologia* 2001, 5: 273–277.
- Bilińska M., Usnarska-Zubkiewicz L., Dmoszyńska A.: Polineuropatia wywołana talidomidem i bortezomibem u chorych na szpiczaka mnogiego, możliwości leczenia bólu neuropatycznego. Zalecenia Polskiej Grupy Szpiczkowej, *Współczesna Onkologia* 2008, 12, 441–446.
- Dmoszyńska A., Walter-Croneck A., Usnarska-Zubkiewicz L., Stella-Holowiecka B., Walewski J., Charliński G., Jędrzejczak W., Wiaterek E., Lech-Marañá E., Mańko J., Dytfeld D., Komarnicki M., Jamrozik K., Robak T., Jurczyszyn A., Skotnicki A., Giannopoulos K.: Zalecenia Polskiej Grupy Szpiczkowej dotyczące rozpoznawania i leczenia szpiczaka plazmocytozy oraz innych dyskracji plazmocytozy na rok 2013, *Acta Haematologica Polonica* 2013, 44: 3–47.
- Charakterystyka produktu leczniczego – Thalidomide Celgene 50 mg kapsułki twarde.
- Gajewski P.: Kompendium medycyny praktycznej. Choroby wewnętrzne pod redakcją Piotra Gajewskiego na podstawie Interny Szczeklika. A. Budaj: Choroby układu krążenia. Wyd IV. Kraków: Medycyna Praktyczna, 2012: 317–327.
- Liu K., Zhang D., Chojnaeki J., Du Y., Fu H., Grant S., Zhang S.: Design and biological characterization of hybrid compounds of curcumin and thalidomide for multiple myeloma, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2013, 11: 4757–4763.
- Lenalidomide (Revlimid) charakterystyka produktu leczniczego.
- Kellner J., Liu B., Kang Y., Li Z.: Fact or fiction – identifying the elusive multiple myeloma stem cell, *Journal of Hematology & Oncology* 2013, 91: 6–91.
- Ch. Asher, T. Furnish: Lenalomid and thalidomid in the treatment of chronic pain, *Expert Opinion on Drug Safety* 2013, 12: 367–374.
- Rollin-Sillaire A., Delbeuck X., Pollet M., Mackowiak M., Lenfant P., Noel M., Facon T., Leleu X., Pasquier F., Le Rhun E.: Memory loss during lenalomid treatment: a report of two cases, *BMC Pharmacology and Toxicology* 2013, 41: 14–41.
- Pomalidomid (IMNOVID) charakterystyka produktu leczniczego.
- Miguel J., Weisel K., Moreau P.: Pomalidomid plus low-dose dexamethasone versus high-dose dexamethasone alone for patients with relapsed and refractory multiple myeloma (MM-003): a randomised, open-label, phase 3 trial, *The Lancet Oncology* 2013, 14: 105.
- Latif T., Chauhan N., Khan R., Moran A., Usmani S.: Thalidomid and its analogues in the treatment of multiple myeloma, *Experimental Hematology & Oncology* 2012, 27: 1–27.

Recepty lekarskie – zasady wystawiania. Część 3

Janusz Jaroszyński¹, Zofia Specht-Szwoch²

¹ Katedra i Zakład Zdrowia Publicznego – Uniwersytet Medyczny w Lublinie

² Wojewódzkie Centrum Onkologii w Gdańsku

Adres do korespondencji: Janusz Jaroszyński, Katedra i Zakład Zdrowia Publicznego, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, ul. W. Chodźki 1, 20-093 Lublin, e-mail: janusz_jaroszynski@tlen.pl

Issue of prescriptions – rules. Part 3. In those articles the legal analysis were presented concerning the correct form of drugs prescribed by doctors employed in the hospitals or privately practicing.

We discussed refundation method and legal, financial and penal responsibility for the possible mistakes. Also the most common mistakes were pointed according to the medical documentation.

Keywords: prescriptions, mistakes, refundation.

© Farm Pol, 2014, 70(10): 552–555

* Podstawa prawna

- 1) Ustawa z dnia 12 maja 2011 r. o refundacji leków, środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego oraz wyrobów medycznych (Dz.U. 2011 nr 122 poz. 696).
- 2) Ustawa z dnia 27 sierpnia 2004 r. o świadczeniach opieki zdrowotnej finansowanych ze środków publicznych (Dz.U. 2008 nr 164 poz. 1027).
- 3) Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 21 grudnia 2010 r. w sprawie rodzajów i zakresu dokumentacji medycznej oraz sposobu jej przetwarzania (Dz.U. 2014 poz. 177).
- 4) Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 8 marca 2012 r. w sprawie recept lekarskich. (Dz.U. 2014 poz. 319).

Stan prawny na 9.05.2014 r.

Co powinna zawierać recepta na leki refundowane (Rp.)?

Zgodnie z rozporządzeniem recepta, na której co najmniej jeden z przepisanych leków, środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego, wyrobów medycznych, dla którego wydano decyzję o objęciu refundacją musi zawierać następujące dane:

- 1) dane dotyczące osoby uprawnionej albo świadczeniodawcy, u którego wykonuje zawód osoba uprawniona, które obejmują:
 - a) nazwę albo firmę wynikającą z umowy na wystawianie recept refundowanych zawartej z Narodowym Funduszem Zdrowia;
 - b) adres miejsca udzielania świadczenia zdrowotnego (nazwa miejscowości, ulica, numer domu, numer lokalu, jeżeli nadano), a w przypadku lekarzy wykonujących działalność leczniczą w formie indywidualnej praktyki lekarskiej wyłącznie w miejscu wezwania lub indywidualnej specjalistycznej praktyki lekarskiej wyłącznie w miejscu wezwania – adres miejsca przyjmowania wezwań i miejsca przechowywania dokumentacji medycznej;
 - c) numer telefonu;
 - d) identyfikator stanowiący dziewięć pierwszych cyfr numeru identyfikacyjnego REGON, właściwego dla miejsca udzielania świadczenia zdrowotnego, jeżeli dotyczy
- 2) dane dotyczące pacjenta:
 - a) imię i nazwisko;
 - b) adres (nazwa miejscowości, ulica, numer domu, numer lokalu, jeżeli nadano):
 - miejsca zamieszkania albo
 - miejsca pełnienia służby wojskowej, jeżeli dotyczy, albo
 - miejsca zamieszkania osoby uprawnionej albo siedziby urzędu gminy lub gminnego ośrodka pomocy społecznej – w przypadku świadczeniobiorcy, wobec którego wydano decyzję o prawie do świadczeń albo siedziby świadczeniodawcy, który udzielił świadczenia opieki zdrowotnej – w przypadku osoby bezdomnej;
 - c) wiek – w przypadku pacjenta do lat 18, o ile nie można go ustalić na podstawie numeru PESEL znajdującego się na recepcie;

- d) kod uprawnień dodatkowych pacjenta, jeżeli dotyczy;
 - e) numer poświadczenia – w przypadku korzystania ze świadczeń opieki zdrowotnej na podstawie przepisów o koordynacji, a w razie braku tego poświadczenia – numer dokumentu uprawniającego do korzystania ze świadczeń opieki zdrowotnej na podstawie przepisów o koordynacji wystawionego przez właściwą instytucję zagraniczną;
 - f) numer PESEL – jeżeli dotyczy, a w przypadku dziecka nieposiadającego numeru PESEL lub niemożności ustalenia tego numeru – numer PESEL przedstawiciela ustawowego lub opiekuna faktycznego wraz z adnotacją o zamieszczeniu numeru PESEL osoby innej niż pacjent i podpisem osoby uprawnionej;
 - g) numer paszportu lub innego dokumentu ze zdjęciem potwierdzającego tożsamość – w przypadku cudzoziemca niebędącego osobą uprawnioną do świadczeń opieki zdrowotnej na podstawie przepisów o koordynacji, a w przypadku osoby posiadającej Kartę Polaka – numer Karty Polaka;
- 3) identyfikator płatnika:**
- a) identyfikator oddziału wojewódzkiego Funduszu właściwy dla miejsca zamieszkania świadczeniobiorcy, a w przypadku:
 - braku miejsca zamieszkania świadczeniobiorcy na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej identyfikator oddziału wojewódzkiego Funduszu;
 - osoby bezdomnej – identyfikator oddziału wojewódzkiego Funduszu właściwy dla miejsca zamieszkania osoby uprawnionej albo siedziby świadczeniodawcy, albo
 - b) znak „X” wpisywany jest w przypadku pacjentów nieposiadających dokumentu potwierdzającego prawa do świadczeń opieki zdrowotnej lub pacjentów niebędących osobami uprawnionymi do świadczeń opieki zdrowotnej, albo
 - c) wpisuje się symbol instytucji właściwej dla osoby uprawnionej do świadczeń opieki zdrowotnej na podstawie przepisów o koordynacji;
- 4) dane dotyczące przepisanych leków, środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego, wyrobów medycznych, obejmują:**
- a) nazwę lub nazwę powszechnie stosowaną (międzynarodową) leku albo rodzajową lub handlową nazwę środka spożywczego specjalnego przeznaczenia żywieniowego, wyrobu medycznego lub ich nazwę skróconą, która w jednoznaczny sposób pozwala określić przepisany lek, środek spożywczy specjalnego przeznaczenia żywieniowego, wyrób medyczny;

- b) postać, w jakiej lek, środek spożywczy specjalnego przeznaczenia żywieniowego, wyrób medyczny ma być wydany, jeżeli występuje w obrocie w więcej niż jednej postaci;
- c) dawkę leku, środka spożywczego specjalnego przeznaczenia żywieniowego, wyrobu medycznego, jeżeli lek, środek spożywczy specjalnego przeznaczenia żywieniowego, wyrób medyczny występuje w więcej niż jednej dawce;
- d) ilość leku, środka spożywczego specjalnego przeznaczenia żywieniowego, wyrobu medycznego, a w przypadku leku recepturowego – jego skład lub nazwę mieszaniny składników, która jest używana zwyczajowo w praktyce farmaceutycznej, a w przypadku leku aptecznego – jego nazwę zgodną z Farmakopeą Europejską lub innymi odpowiednimi farmakopeami uznawanymi w państwach członkowskich Unii Europejskiej;

Sposób dawkowania

w przypadku przepisania:

- a) ilości leku, środka spożywczego specjalnego przeznaczenia żywieniowego, wyrobu medycznego, niezbędną pacjentowi do maksymalnie 90-dniowego stosowania wyliczonego na podstawie określonego na recepcie sposobu dawkowania;
- b) leku gotowego dopuszczonego do obrotu na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej, który zawiera w swoim składzie środek odurzający, substancję psychotropową w rozumieniu ustawy o przeciwdziałaniu narkomanii;
- c) leku recepturowego zawierającego w swoim składzie środek odurzający, substancję psychotropową w rozumieniu ustawy o przeciwdziałaniu narkomanii lub substancję zaliczoną do wykazu A substancji bardzo silnie działających, określoną w Farmakopei Polskiej;

Odpłatność – prawidłowe określenie poziomu odpłatności – (zob. „Recepty lekarskie – zasady wystawiania” – Część 1., pyt. 1, 2, 3).

- 5) datę wystawienia recepty;
- 6) datę realizacji recepty „od dnia”, a jeżeli nie dotyczy, wówczas wpisuje się znak „X”;
- 7) dane dotyczące osoby uprawnionej:
 - a) imię i nazwisko;
 - b) numer prawa wykonywania zawodu osoby uprawnionej;
- 8) na recepcie refundowanej, zamieszcza się dodatkowo unikalny numer identyfikujący receptę nadawany przez oddział wojewódzki Narodowego Funduszu Zdrowia.

Na dole recepty zamieszcza się, w formie wydruku, nazwę i adres lub numer REGON podmiotu

drukującego receptę, a w przypadku gdy wydruku dokonuje osoba wystawiająca receptę – zwrot „wydruk własny”.

Podstawa prawna – § 3 ust. 1 i ust. 4, § 4 ust. 1 oraz § 6 Rozporządzenia Ministra Zdrowia w sprawie recepty.

Należy zwrócić uwagę na fakt, iż wszystkie dane powinny zostać naniesione w sposób czytelny, tj. za pomocą pieczętki, nadruku lub naklejki, która jest przymocowana do recepty w taki sposób, że uniemożliwia jej usunięcie bez zniszczenia druku recepty.

Podstawa prawna – § 3 ust. 2 i ust. 3 Rozporządzenia Ministra Zdrowia w sprawie recepty.

Jeżeli recepta jest wystawiona przez osobę uprawnioną, o której mowa w art. 2 pkt 14 lit. c ustawy o refundacji, a więc – lekarza, lekarza dentystę, felczera, starszego felczera posiadającego prawo wykonywania zawodu, który zaprzestał wykonywania zawodu, a z którym Fundusz zawarł umowę upoważniającą do wystawiania recept refundowanych dla wystawiającego, jego małżonka, wstępnych i zstępnych w linii prostej oraz rodzeństwa; dane osoby uprawnionej obejmują:

- 1) imię i nazwisko;
- 2) adres miejsca zamieszkania (nazwa miejscowości, ulica, numer domu, numer lokalu, jeżeli nadano);
- 3) numer telefonu;
- 4) dziewięciocyfrowy numer identyfikacyjny określony w umowie upoważniającej do wystawiania recept na refundowane leki, środki spożywcze specjalnego przeznaczenia żywieniowego, wyroby medyczne, na który składają się:
 - a) dwie pierwsze cyfry o wartości „98”;
 - b) dwie następne cyfry będące identyfikatorem oddziału wojewódzkiego Funduszu, który zawarł umowę upoważniającą do wystawiania recept refundowanych;
 - c) pięć pozostałych cyfr będących numerem ustalonym przez oddział wojewódzki Narodowego Funduszu Zdrowia.

Podstawa prawna – § 4 ust. 2 Rozporządzenia Ministra Zdrowia w sprawie recepty.

Czy w Zintegrowanym Informatorze Pacjenta świadczeniobiorcy mogą sprawdzić, jakie recepty refundowane wystawił dla nich lekarz?

TAK

Pacjenci, którzy uzyskali dostęp do systemu ZIP, mogą po zalogowaniu się uzyskać wiele informacji dotyczących wystawionych dla nich recept refundowanych. Są to m.in.:

- a) data wystawienia / data realizacji;
- b) miejsce realizacji;

- c) lista leków (nazwa handlowa, postać, dawka, producent, opakowanie);
- d) opłatę pacjenta;
- e) koszt refundacji.

W przypadku sprzeczności pacjenci mogą skorzystać z zakładki „zgłoś nieprawidłowość”. W formularzu zgłoszeniowym mogą szczegółowo opisać wszelkie informacje dotyczące zaistniałych niejasności, podając swoje imię i nazwisko, numer telefonu lub adres do korespondencji.

ZIP, czyli Zintegrowany Informator Pacjenta, to ogólnopolski serwis, który zarejestrowanym użytkownikom udostępnia historyczne dane o ich leczeniu i finansowaniu leczenia. Zawarte informacje obejmują okres od 2008 r. i są gromadzone przez Narodowy Fundusz Zdrowia. ZIP składa się z dwóch części: ogólnodostępnej i tej widocznej tylko dla zarejestrowanych użytkowników. Korzystanie z portalu jest całkowicie bezpłatne.

Dzięki serwisowi zalogowany użytkownik ma szybki dostęp do informacji o swoim prawie do świadczeń zdrowotnych. Dodatkowo ma wgląd do danych dotyczących jego leczenia, udzielonych mu świadczeniach oraz o przepisanych lekach. Widoczna jest również informacja o kwotach, które zostały przekazane na sfinansowanie jego leczenia. Czyli dokładniej mówiąc, sprawdzimy, gdzie od 2008 r. leczylimy się i ile zapłacił za to NFZ. Ponadto znajdziemy tutaj wykaz placówek, w których będziemy mogli skorzystać z bezpłatnego leczenia, dzięki zastosowaniu wyszukiwarki lekarzy i przychodni mających kontrakty z NFZ. Zintegrowany Informator Pacjenta pozwala nam śledzić, na jakim etapie jest złożony przez nas wniosek do sanatorium, a także – gdzie i kiedy korzystaliśmy z leczenia uzdrowskiego. Dostęp do systemu jest bezpłatny. Rodzice mogą również w ZIP zakładać konta dla swoich dzieci.

Na dzień dzisiejszy z systemu mogą korzystać:

- 1) osoby ubezpieczone;
- 2) osoby nieubezpieczone uprawnione do świadczeń;
- 3) osoby nieubezpieczone, ale mające prawo do świadczeń w przeszłości;
- 4) osoby ubezpieczające się dobrowolnie.

Źródło: www.nfz.gov.pl, www.zip.nfz.gov.pl

Najczęściej popełniane błędy podczas wystawiania recept na podstawie raportów pokontrolnych NFZ

Oddziały Wojewódzkie Narodowego Funduszu Zdrowia ustawowo zobligowane są do przeprowadzania kontroli w zakresie ordynacji lekarskiej. Poniżej przedstawiamy informację zbiorczą na temat najczęściej popełnianych błędów wynikających z niewłaściwego wystawiania recept czy też

prowadzenia dokumentacji medycznej. Na podstawie wyników kontroli udostępnionych na stronach internetowych Narodowego Funduszu Zdrowia należy zauważyć, iż: w wielu postępowaniach nie stwierdzono żadnych nieprawidłowości w zakresie ordynacji lekarskiej, w pozostałych przypadkach ich wynik był negatywny lub pozytywny ze wskazaniem nieprawidłowości lub uchybień.

W wyniku przeprowadzonych kontroli stwierdzono nieprawidłowości w zakresie:

- 1) **wystawiania recept niezgodnie z przepisami obowiązującymi w okresie kontroli:**
 - a) nieuzasadniona ordynacja leków;
 - b) przepisywanie leków refundowanych niezgodnie z uprawnieniami dodatkowymi pacjentów;
 - c) wystawianie recept z nieoznaczonym poziomem odpłatności (w przypadku gdy lek występuje w wykazach leków refundowanych w co najmniej dwóch odpłatnościach) lub wystawienie recept z błędnym poziomem odpłatności;
 - d) ordynacja leków refundowanych niezgodnie ze wskazaniami refundacyjnymi;
 - e) ordynacja leków refundowanych poza wskazaniami określonymi w ChPL (w przypadku gdy wskazania do refundacji odnoszą się do wskazań rejestracyjnych leku);
 - f) przekroczenie maksymalnej dobowej dawki leku nieodnotowane w dokumentacji medycznej;
 - g) wystawianie przez lekarzy stomatologów recept na własny numer PESEL na leki służące do zaopatrzenia gabinetu (iniekcje znieczulające);
 - h) wystawienie recept na leki refundowane w ilościach przekraczających 3-miesięczne stosowanie;
 - i) wystawianie recept pacjentom w trakcie hospitalizacji na oddziałach szpitalnych;
 - j) ordynowanie leków pacjentom po dacie zgonu;
 - k) wystawianie recept z adnotacją „Pro familia” osobie nieuprawnionej;
 - l) wystawianie recept „in blanco” oraz udostępnianie ich osobom trzecim;
- 2) **nieprawidłowości w zakresie prowadzenia dokumentacji medycznej:**
 - a) niezgodność danych na receptach z dokumentacją medyczną;
 - b) brak diagnozy, rozpoznania choroby, problemu zdrowotnego, urazu, których lek dotyczy – brak potwierdzenia zasadności ordynacji leków;
 - c) brak uzasadnienia choroby przewlekłej w dokumentacji medycznej, na którą dana recepta została wystawiona;
 - d) brak wpisów lub nieczytelne wpisy w dokumentacji medycznej dotyczące porady ambulatoryjnej, wywiadu lekarskiego, wyników badań diagnostycznych, zaordynowanych leków oraz wystawionych recept;
 - e) brak adnotacji o ilości przepisanych leków, sposobie dawkowania;
 - f) braki formalne w dokumentacji medycznej (np. brak numeracji stron oraz danych identyfikujących pacjenta, brak autoryzacji poprawek, brak oznaczenia podmiotu leczniczego itp.);
 - g) brak danych z wywiadu lekarskiego;
 - h) brak daty porady ambulatoryjnej lub wizyty domowej zgodnej z datą wystawionej recepty;
 - i) brak opisu stanu zdrowia;
- 3) **brak dokumentacji medycznej;**
- 4) **wystawienie recept na drukach posiadających numery przyznane innym lekarzom;**
- 5) **wystawianie recept opatrzonych pieczęcią nagłówkową świadczeniodawcy i pieczęcią imienną lekarza, który nie był zatrudniony u świadczeniodawcy w chwili wystawienia recepty;**
- 6) **ordynowanie pacjentom leków refundowanych na receptach z uprawnieniem IB, pomimo że leczeni pacjenci tych uprawnień nie posiadali.**

Źródło: www.nfz.gov.pl

Otrzymano: 2014.07.18 · Zaakceptowano: 2014.08.10

Przedruk z *Pulsu* 2014.4.

<http://www.oil.org.pl/xml/oil/oil68/gazeta/numery/n2014/n201404/n20140416>

Geneza oraz rozwój aptekarstwa i przemysłu chemiczno-farmaceutycznego na Kujawach i Pomorzu Gdańskim do 1919/20 r. Studium wstępne

Wojciech Ślusarczyk

Zakład Historii Medycyny i Pielęgniarstwa, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Adres do korespondencji: Wojciech Ślusarczyk, Zakład Historii Medycyny i Pielęgniarstwa Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Jagiellońska 15, 85-067 Bydgoszcz, e-mail: wojciech.slusarczyk@cm.umk.pl

The genesis and development of pharmacy and chemi-pharmaceutical industry on Kujawy and Pomorze Gdańskie before 1919/1920. The preliminary study

The pharmacies on Kujawy and Pomorze Gdańskie formed much earlier than the chemi-pharmaceutical factories; in 16th century. Working in a guild system, were selling and produced not only medicines but also spices articles and cosmetic materials. Pharmacies were created only in big cities (a maximum of three simultaneously). Their quantity has grown in the 19th century. Then apothecaries had then university degree. The development of chemistry and increased demand for medicines, led to the birth of chemi-pharmaceutical industry. On the Kujawy and Pomorze Gdańskie the first such factories were established in the late 19th century. (There were four factories.) Their production was quite varied, but preparation of medicaments was not their primary function. They are not able to satisfy regional demand for pharmaceuticals. This article is a preliminary study. This subject is not yet developed.

Keywords: pharmacies, history, industry, pharmacy.

© Farm Pol, 2014, 70(10): 556-560

Celem niniejszego artykułu jest próba odpowiedzi na pytanie, w jaki sposób przebiegały geneza oraz rozwój aptekarstwa i przemysłu chemiczno-farmaceutycznego na terenie Kujaw i Pomorza Gdańskiego? Obszar objęty badaniami pokrywa się przy tym z terenem dawnego województwa pomorskiego w granicach z 1 kwietnia 1938 r.¹ Ograniczenie się do powyższego obszaru administracyjnego, mimo umownego charakteru, jest niezbędne między innymi ze względu na

konieczność wstępnego uporządkowania badań. Celowo pominięty został przy tym Gdańsk wraz z okolicznymi powiatami, tworzący od 1920 r. neutralne terytorium o nazwie Wolne Miasto Gdańsk². Powyższe rozumienie tytułowego obszaru uzasadnione jest również tym, że nie powstała dotąd żadna monografia opisująca dzieje aptek i związanych z nimi firm chemiczno-farmaceutycznych, funkcjonujących w jego obrębie do 1919/20 r., czyli do momentu, gdy znalazł się on w granicach odradzającego się wówczas państwa polskiego³. Artykuł niniejszy nie rości sobie pretensji do wyczerpania podejmowanego tematu. Może okazać się jednak przydatny dla badaczy, którzy zajmą się nim w przyszłości.

Na samym początku należy zaznaczyć, że pierwsze apteki w Europie i Polsce, w tym także na Kujawach i Pomorzu Gdańskim, powstały kilkaset lat wcześniej niż chemiczno-farmaceutyczne wytwórnie. Natomiast zanim doszło do wykształcenia się aptek, rozumianych jako stałe punkty sprzedaży i wyrobu leków, mianem tym określano kramy (stragany) prowadzące sprzedaż specyfików, takich jak: olejki, pachnidła, maści, farby oraz korzenie. W drodze ewolucji część z nich przekształciła się w stałe sklepy korzenne, a część w stałe apteki publiczne⁴. O istnieniu dwóch aptekarzy - kramarzy w czternastowiecznym Toruniu pisze Zdzisław Mamela. Twierdzi ona także, że w 1389 r. użyto po raz pierwszy terminu *apteker* na określenie niejakiego Alberta, jako aptekarza posiadającego już stałą aptekę.

Dowodem na to miałby być fakt, że Albert posiadał własny budynek⁵. Zdaniem Mameli apteka Alberta była pierwszą toruńską apteką w naszym tego słowa znaczeniu. Stwierdzenie to należy jednak traktować z dużą ostrożnością. Nie możemy mieć bowiem pewności, czy wspomniany Albert był w rzeczywistości aptekarzem, czy też raczej kupcem korzennym. Istniejący już wówczas podział na apteki i sklepy korzenne nie był bowiem do końca sprecyzowany. Jak już wspomniano, w wyniku rozwoju miast przenośne kramy zostały zastąpione przez stałe miejsca sprzedaży, noszące miano *taberna insitoris*, doprowadziło to do wyodrębnienia się specyficznego zawodu kupieckiego, którego przedstawiciele nazywano „korzennikami” lub „aromatariuszami”. Możemy przyjąć, że na terenie Polski zawód korzennika – aromatariusza wykształcił się ostatecznie w XV w. Prowadzone przez nich sklepy korzenne stanowiły groźną konkurencję dla istniejących już wówczas z rzadka aptek, albowiem asortyment towarów sprzedawanych w aptekach, jak i w sklepach korzennych w znacznej mierze pokrywał się ze sobą. Obecność w sklepach korzennych wielu substancji, traktowanych jako środki lecznicze, doprowadziła z czasem do rozciągnięcia nad nimi kontroli państwowej. Na terenie Polski pierwsza regulacja tego typu została uchwalona na sejmie w Piotrkowie w 1523 r. Czytamy w niej: „Aby doktorzy medycyny corocznie kontrolowali apteki i sklepy korzenne. Ponieważ jest bardzo wielu aromatariuszy, którzy nie mając materiałów potrzebnych do lekarstw zwykli używać jedne zamiast drugich albo sporządzają lekarstwa z materiałów starych i zwiertzałych wskutek czego wiele ludzi może być narażonych na niebezpieczeństwo życia: postanawiamy i zarządzamy, aby doktorzy medycyny w miastach, w których żyją dokładnie kontrolowali w poszczególnych latach apteki i sklepy korzenne, sami aromatariusze zobowiązani byli wszystko im wyłożyć i okazać do kontroli pod karą pozbawienia apteki (...)”. Powyższa regulacja oddzielała sklepy korzenne (*aromatarie*) od aptek (*apothecae*). Sprawa ta wydaje się jednak dość zagmatwana, albowiem ustawa zakładała, że jeśli aromatariusz – korzennik nie zgadzał się na kontrolę, lekarz miał prawo zarządzić zamknięcie jego apteki (*apothecae*). Widzimy więc, że termin ów był wówczas bardzo pojemny. Oznaczać mógł on aptekę w naszym tego słowa rozumieniu, ale także i skład – magazyn oraz sklep korzenny. Mimo że dostrzegano różnicę między sklepem korzennym a apteką, to posiadano problemy ze ścisłym jej wytyczeniem, tym bardziej że w przedsiębiorstwach obu typów wytwarzano i sprzedawano leki, ale także i wina, przyprawy, pachnidła, trucizny czy woskowe świece⁶. Próbuując wyjść z tej

zagmatwaniny, należy zaznaczyć, że apteki z założenia miały wytwarzać i sprzedawać leki, zaś artykuły „korzenne” stanowiły ich poboczną działalność, choć w istocie dość rozwiniętą z racji małego popytu na drogie lekarstwa. Natomiast sklepy korzenne wytwarzały i sprzedawały lekarstwa, niejako przy okazji korzystając z tego, że granica między lekiem a przyprawą – korzeniem była wówczas często trudna do uchwycenia⁷. Wszystko to każe podchodzić z dużą ostrożnością do przytoczonego powyżej stwierdzenia Mameli. Także z terenu Bydgoszczy najwcześniejsze informacje na temat aptekarsko-korzennych kramów pochodzą z przełomu XV i XVI w.⁸

W literaturze przedmiotu przyjmuje się, że apteki w naszym tego słowa znaczeniu wyodrębniły się na badanym obszarze dopiero w XVI w. Ich wspomniana wyżej wielopremiotowość handlowa nie odbiegała od ogólnego trendu panującego w Europie. Należy dodać, że w ówczesnych aptekach wykonywano również (nielegalnie) proste zabiegi medyczne, takie jak opatrywanie ran, nacinanie wrzodów czy lewatywy⁹.

Warunkiem do powstawania aptek była zawsze obecność odpowiedniej ilości ludzi mogących nabywać leki. Na badanym terenie do końca XVIII w. był on spełniany głównie w większych miastach, takich jak: Toruń, Włocławek, Bydgoszcz, Grudziądz i Chojnice. Jednocześnie funkcjonowały w nich maksymalnie trzy apteki¹⁰. W małych miejscowościach apteki zaczęły powstawać dopiero głównie w XIX w. W tym samym czasie w dużych miastach nastąpił wzrost liczby aptek. Był to efekt zwiększenia się liczby ludności Kujaw i Pomorza Gdańskiego, a zarazem przejaw postępu cywilizacyjnego. Na terenie zaboru pruskiego wprowadzono w tym czasie system ubezpieczeń społecznych. Możliwość uzyskania częściowej odpłatności za leki spowodowała, że stały się one dostępne dla ogółu ludności¹¹. Należy przy tym zaznaczyć, że do 1. poł. XIX w. apteki otwierano wyłącznie na podstawie przywilejów nadawanych przez aktualnie panujących władców. Mogły być one dziedziczone lub sprzedawane wraz z apteką. W celu ograniczenia owego proceduru wprowadzono system koncesji. Na terenie zaboru pruskiego koncesję wydawały władze rejencji. Podobne rozwiązanie funkcjonowało również w zaborze rosyjskim. Prowadzenie apteki było więc w omawianym okresie zajęciem częściowo reglamentowanym¹². Wzrost liczby aptek ilustrują **tabele 1 i 2**.

W XVI w. aptekarze na Kujawach i Pomorzu Gdańskim stanowili już wyodrębnioną, choć niewielką grupę zawodową. Nie stworzyli nigdy własnego cechu. Należeli jednak do cechów łączących różne profesje. W XVIII w. zaczęli uwalniać się stopniowo od krępujących zasad cechowych¹³.

Tabela 1. Liczba aptek w większych miastach Kujaw i Pomorza Gdańskiego, od XVI w. do 1919/20 r.

Miasta	Liczba aptek				
	XVI w.	XVII w.	XVIII w.	XIX w.	XX w. do 1919/20 r.
Bydgoszcz	1	1	2	5	6
Chojnice	–	–	2	2	2
Grudziądz	1?	1	2?	4	5
Toruń	3	3	3	5	5
Włocławek	2?	2?	1	2	5

Źródło: Korpalska W. K.: Sześć wieków opieki zdrowotnej w Bydgoszczy, Od miłosiernych uczynków do instytucji zdrowia publicznego. Wyd. 1. Toruń: Wydawnictwo Naukowe UMK w Toruniu, 2008, s. 77–84, 175–178; Proń S.: Musaeum Poloniae Pharmaceuticum. Wyd. 1. Warszawa: PZWL, 1967, s. 538; Kostrzeński L.: Materiały do historii aptek wielkopolskich. Wyd. 1. Warszawa: Nakładem Mag. Farm. Fr. Heroda, 1936, t. 2, s. 31–32, 60–61; Wodyński B., Wachulec B., Ślusarczyk W.: Apteka „Pod Złotym Orłem” w Bydgoszczy. Wyd. 1. Łódź: Wydawnictwo Bez Recepty, 2008, s. 29–39, 37; Mameła Z.: Siedem wieków aptekarstwa toruńskiego. Wyd. 1. Toruń: Regionalny Ośrodek Studiów i Ochrony Środowiska Kulturowego w Toruniu, 1997, s. 29, 95; Karczewski Z., Kubiak W.: Dzieje Włocławka. Wyd. 1. Bydgoszcz: Kujawsko Pomorskie Towarzystwo Kulturalne, 1971, s. 16; Siedlecki B.: Dzieje Aptek Grudziądzkich (1603–1982) Rocznik Grudziądzki, 1992, t. 10, s. 8, 10, 11, 22–23, 33, 35; Gawłowska A.: Powstanie i rozwój aptekarstwa we Włocławku do roku 1939, Praca magisterska napisana w Pracowni Historii Farmacji i Muzeum Katedry Historii Medycyny i Farmacji Akademii Medycznej w Łodzi, Łódź 1997 (maszynopis), s. 10–11, 14–15, 35.

Tabela 2. Tempo wzrostu liczby aptek we wszystkich miastach Kujaw i Pomorza Gdańskiego (tylko teren zaboru pruskiego³³) od XVII w. do 1919/20 r.

Liczba aptek powstałych w okresie		
od XVII w. do 1811 r.	od 1811 r. do 1894 r.	od 1894 r. do 1919/20 r.
17	49	14

Źródło: Archiwum Państwowe w Bydgoszczy (dalej APB), Urząd Wojewódzki Pomorski (dalej UWP) w Toruniu, sygn. 1240, APB, UWP w Toruniu, sygn. 12145; Kostrzeński L.: Materiały do historii aptek wielkopolskich. Wyd. 1. Warszawa: Nakładem Mag. Farm. Fr. Heroda, 1936, 2, s. 60, 68.

Egzaminy zawodowe zaczęły być wówczas przeprowadzane przez ograny szkolnictwa wyższego. W XVIII i XIX w. doszło do wykształcenia się farmacji, jako osobnej nauki. Pruscy aptekarze – farmaceuci zdobywali wykształcenie w dwojaki sposób. Pierwszy z nich polegał na odbyciu praktyki aptecznej, a następnie zdaniu egzaminu przed specjalną komisją, powołaną przez kolegium medyczne urzędujące w stolicy prowincji. Drugi sposób przewidywał odbycie studiów na powstających wydziałach i uczelniach farmaceutycznych. Dzięki pierwszemu rozwiązaniu uzyskiwano tytułu aptekarza II klasy. Droga akademicka dawała zaś tytuł aptekarza I klasy. Aptekarze I klasy mogli otwierać apteki w większych miastach. Dla reszty pozostawała wyłącznie prowincja. W 1854 r. zlikwidowano podział na klasy, wprowadzając obowiązek ukończenia studiów wyższych¹⁴. Z kolei na terenie pokongresowego Królestwa Polskiego, zgodnie z wytycznymi ustawy dla farmaceutów i aptek z 1844 r., w celu uzyskania wyższego wykształcenia farmaceutycznego należało zdobyć wcześniej tytuł pomocnika aptekarskiego, a następnie, po przepracowaniu od trzech lub czterech lat w aptece, odbyć

dwuletnie studia uniwersyteckie, zakończone egzaminem. Jego wynik decydował o otrzymaniu tytułu prowizora farmacji I lub II klasy. Najwyższy stopień zawodowy, czyli tytułu aptekarza¹⁵, prowizor mógł otrzymać po dwóch lub trzech latach pracy na tym stanowisku oraz po zdaniu kolejnych egzaminów. Podobnie i w tym przypadku wynik egzaminu decydował o otrzymaniu tytułu aptekarza I lub II klasy. Tak samo jak w zaborze pruskim, I klasa pozwalała na prowadzenie apteki w mieście dużym. Posiadacze II klasy mogli zaś funkcjonować jedynie na prowincji¹⁶.

Głównym źródłem zaopatrzenia ludności w środki lecznicze do 2. poł. XIX w. były apteki, które przygotowywały je we własnych laboratoriach. W każdej z nich suszono zioła lecznicze, sporządzano preparaty galenowe, wytwarzano proste chemikalia lecznicze, a także leki pochodzenia mineralnego i zwierzęcego. W większych aptekach produkowano też kosmetyki, takie jak pachnidła i mydła¹⁷. Będący efektem rewolucji przemysłowej wzrost liczby mieszkańców miast spowodował jednak, że małe laboratoria apteczne nie były w stanie sprostać zwiększonemu zapotrzebowaniu na lekarstwa. W związku z tym w Europie powstała koncepcja masowej produkcji leków¹⁸. Mogła się ona rozwijać także dzięki stworzeniu w połowie XIX w. pierwszych leków syntetycznych¹⁹. Rozwój przemysłu chemiczno-farmaceutycznego, przede wszystkim we Francji i w Niemczech, przyczynił się do stopniowego ograniczenia dotychczasowych rozmiarów prac w laboratoriach aptecznych; najpierw w dziedzinie surowców mineralnych (nieorganicznych), a na przełomie XIX i XX w. także w innych dziedzinach. Apteki z kolei do wyrobu lekarstw zaczęły używać coraz częściej surowców wytworzonych uprzednio w fabrykach. Pierwszą fabryką chemiczną na ziemiach polskich, której produkty znalazły się w aptekach była Fabryka Płodów Chemicznych w Warszawie, założona w 1823 r. przez Ludwika Hirschmanna i Jana Chryzostoma Kijewskiego²⁰.

Na terenie Kujaw i Pomorza Gdańskiego przed I wojną światową przemysł chemiczno-farmaceutyczny nie odgrywał ważnej roli²¹. W 1920 r. Wojewódzki Urząd Zdrowia (dalej WUZ) w Toruniu stwierdził, że „W Poznańskim widzimy dopiero zaczątki tak ważnego przemysłu. (...) Jedyna fabryka na Pomorzu istniejąca jest w rękach żyda, lecz wyrabia ona tylko maście²².” Cytat ów jest bardzo wymowny. Faktycznie zdecydowana większość wytwórni chemiczno-farmaceutycznych na badanym terenie powstała dopiero w latach dwudziestych i trzydziestych XX w.²³ Przytoczona powyżej opinia była jednak nieco przesadzona. W rzeczywistości na Kujawach

i Pomorza Gdańskim przed 1919/20 r. funkcjonowały cztery wytwórnie chemiczno-farmaceutyczne. Były to:

- Zakłady Chemiczne „Ergasta” w Starogardzie, powstałe w 1894 r.²⁴
- Fabryka Artykułów Leczniczych i Chemicznych Dr Behring i Ska w Bydgoszczy, powstała w 1895 r.²⁵
- Firma Władysława Kurderskiego w Łabiszynie, powstała w 1895 r.²⁶
- Fabryczne Zakłady „Euskol” w Łabiszynie, powstałe przed 1919/20 r.²⁷

Zakłady Chemiczne „Ergasta” w Starogardzie nie należały do Żyda. Firma ta była własnością jej założyciela – polskiego działacza społecznego, Czesława Nagórskiego²⁸. Twórcami i właścicielami Fabryki Artykułów Leczniczych i Chemicznych Dr Behring i Ska byli zaś dr Gutzeit i niejaki Braun²⁹. Nie wiemy jednak nic o Władysławie Kurderskim. Nie znamy też właściciela Fabrycznych Zakładów „Euskol”. Firmy te nie stanowiły dla siebie konkurencji. Posiadały bowiem różne oferty. „Ergasta” produkowała mydła, błyszcz do metali, środki do pieczenia oraz środki farmaceutyczne³⁰. Firma Dr Behring i Ska wytwarzała plastry i opaski lecznicze³¹. Fabryczne Zakłady „Euskol” w Łabiszynie produkowały z kolei brykiety kadzidłane służące do dezynfekcji powietrza oraz leczenia dróg oddechowych³². Z powodu braku źródeł nie znamy niestety oferty firmy Władysława Kurderskiego w Łabiszynie.

Przystępując do pogłębionych badań nad dziejami aptekarstwa i przemysłu chemiczno-farmaceutycznego na Kujawach i Pomorzu Gdańskim, których cezurę końcową stanowi przełom 1919 i 1920 r., musimy pamiętać o tym, że apteki na badanym terenie (podobnie jak na świecie) pojawiły się zdecydowanie wcześniej niż wytwórnie. Wykształciły się one bowiem już w XVI w. Działając w systemie cechowym, sprzedawały i wytwarzały nie tylko lekarstwa, lecz także artykuły korzenno-drogeryjne. Apteki otwierano jedynie w największych miastach. W jednym ośrodku miejskim działały wówczas maksymalnie trzy apteki. Wyrazny wzrost ich liczby nastąpił w XIX w. Dzięki rozwojowi nauki prowadzący je aptekarze byli często już wówczas farmaceutami, posiadającymi dwuletnie wykształcenie uniwersyteckie. Rozwój chemii, a także wzrost zapotrzebowania na lekarstwa, które nastąpiły w XIX w., dały początek przemysłowi chemiczno-farmaceutycznemu. Na badanym terenie pierwsze wytwórnie tego typu powstały dopiero pod koniec XIX w. Wstępne kwerendy pozwoliły ustalić, że do 1919/20 r. istniały zaledwie cztery takie firmy. Ich produkcja była dość zróżnicowana. Wytwarzanie leków nie było jednak nigdy podstawą ich działalności. Na przykład w przypadku Zakładów Chemicznych „Ergasta” w Starogardzie

farmaceutyki stanowiły tylko czwartą część wytwarzanego asortymentu. Wytwórnie te bez wątpienia nie zaspokajały nawet regionalnego zapotrzebowania na środki lecznicze. W związku z tym badane apteki wytwarzały je samodzielnie lub zaopatrywały się w nie w wytwórniach spoza regionu.

Otrzymano: 2014.08.05 · Zaakceptowano: 2014.08.17

Przypisy

1. W dniu 1 kwietnia 1938 r., na mocy ustawy z dnia 12 czerwca 1937 r., do województwa pomorskiego przyłączono część powiatów województwa poznańskiego: bydgoski, bydgoski miejski, inowrocławski, inowrocławski miejski, szubiński oraz część powiatu mogileńskiego, a także powiaty: nieszawski, rypiński, lipnowski i wrocławski, należące wcześniej do województwa warszawskiego. Z województwa pomorskiego wyłączono wówczas powiat działdowski, który wszedł w skład województwa warszawskiego, Mielcarek J.: Podziały terytorialno-administracyjne II Rzeczypospolitej w zakresie administracji zespolonej. Wyd. 1. Warszawa: Wydawnictwo Neriton, 2008: 59.
2. W skład Wolnego Miasta Gdańska wchodziły powiaty miejskie: Gdańsk i Sopot oraz wiejskie: Gdańsk – Niziny, Gdańsk – Wyżyny oraz Wielkie Żuławy., Davies N.: Boże igrzysko. Historia Polski. Wyd. 1. tłum. Tabakowska E., Kraków: Wydawnictwo Znak, 1993, 2: 497.
3. Dzieje aptek gdańskich w okresie od 1399 r. do 1939 r. zostały opracowane przez Aleksandra Drygasa., Drygas A.: Aptekarstwo Gdańskie, 1399-1939, Wyd. 1. Wrocław, Gdańsk: Ossolineum, 1983. Dzieje aptekarstwa i przemysłu chemiczno-farmaceutycznego na tytułowym obszarze w latach 1919/20-1951 opisał autor niniejszego artykułu w swej pracy doktorskiej., Ślusarczyk W.: Dzieje aptekarstwa i przemysłu chemiczno-farmaceutycznego na terenie Kujaw i Pomorza Gdańskiego w latach 1919/20-1951. Praca doktorska napisana pod kierunkiem prof. W. Jastrzębskiego w Instytucie Historii i Stosunków Międzynarodowych Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy, Bydgoszcz 2010 (dostępna w formie maszynopisu). Temat genezy i rozwoju aptekarstwa na Kujawach i Pomorzu Gdańskim do 1919/20 r. został częściowo opisany przez Leonarda Kostrzeńskiego i Hansheinricha Trunza. Ich prace, choć bardzo cenne, posiadają jednak stricte kronikarski charakter., Kostrzeński L.: Materiały do historii aptek wielkopolskich. Wyd. 1. Warszawa: Nakładem Mag. Farm. Fr. Heroda, 1936, 2; Trunz H.: Apotheker und Apotheken in Ost- und Westpreussen 1397-1945. Wyd. 1. Hamburg: Selbstverlag Verein für Familienforschung in Ost- und Westpreussen, 1992, t. 1; Idem, Apotheker und Apotheken in Ost- und Westpreussen 1397-1945. Wyd. 1. Hamburg: Selbstverlag Verein für Familienforschung in Ost- und Westpreussen, 1996, 2. Autorzy pozostałych prac skupiali się na dziejach aptek w wybranym mieście lub nawet na przeszłości jednej, wybranej apteki., Por. Mamelą Z.: Siedem wieków aptekarstwa toruńskiego. Wyd. 1. Toruń: Regionalny Ośrodek Studiów i Ochrony Środowiska Kulturowego w Toruniu, 1997; Drygas A.: Apteka „Pod Złotym Lwem” w Toruniu. Wyd. 1. Łódź: Wydawnictwo Bez Recepty, 2006. Żaden z nich nie podjął jednak nigdy tematu wytwórni chemiczno-farmaceutycznych.
4. Hunter Z.: Z dziejów handlu drogerijnego. Wyd. 1. Warszawa: Biuro Wydawnicze „Chemia”, 1972: s. 8-12.
5. Mamelą Z.: op. cit., s. 18.
6. W aptekach poza lekami sprzedawano także alkohol, wosk, papier, siarkę, proch strzelniczy, mydło, a także sukna i skóry., Korpalska W. K.: Farmacja i farmaceuci w reencji bydgoskiej pod zaborem pruskim. W: Urbank B. Zawód farmaceuty na ziemiach polskich w XIX i XX wieku. Wyd. 1. Warszawa-Katowice: IHN PAN, 2006: 16.
7. Hunter Z.: op. cit., s. 9-12, 15.
8. Korpalska W. K.: Farmacja..., s. 16.
9. Ibidem, s. 16.
10. Siedlecki B.: Dzieje Aptek Grudziądzkich (1603-1982). Rocznik Grudziądzki, 1992, 10: 7.
11. Korpalska W. K.: Farmacja..., s. 29.
12. Więcej o systemie koncesyjnym w: Drygas A.: Kształtowanie się podstaw prawnych aptekarstwa w przekroju dziejowym. Studia nad podstawowymi źródłami do dziejów farmacji europejskiej i polskiej. Wyd. 1. Gdańsk: Akademia Medyczna w Gdańsku, 1995, 2: 18.
13. Korpalska W. K.: Sześć wieków opieki zdrowotnej w Bydgoszczy, Od miłosiernych uczynków do instytucji zdrowia publicznego. Wyd. 1. Toruń: Wydawnictwo Naukowe UMK w Toruniu, 2008: 228.
14. Eadem, Farmacja..., s. 16, 24.

15. Pośród farmaceutów działających na badanym terenie, którzy zdobyli wykształcenie na terenie zaboru rosyjskiego, znajdują się wyłącznie prowizorzy. Polskie źródła z okresu międzywojennego nie uwzględniają ponadto podziału na prowizorów I lub II klasy. Byli oni bowiem wówczas wszyscy równi rangą aptekarzom aprobowanym oraz magistrum farmacji.
16. Więckowska E.: Pracownicy apteczni w Królestwie Polskim na przełomie XIX i XX wieku. W: Urbanek B.: op. cit., s. 105–116.
17. Kikta T.: Przemysł farmaceutyczny w Polsce (1823–1939). Wyd. 2. Warszawa: Wydawnictwo Opolgraf S.A., 2007, s. 15.
18. Drygas A.: Jak „rodził się” i narodził przemysł farmaceutyczny? *Apothecaria Bydgosiana. Studia z Dziejów Farmacji i Medycyny*, 2006, 2: 54.
19. Idem: Rozwój nauki o leku i jego wpływ na rozwój terapii. W: Brzeziński T. *Historia medycyny*. Wyd. 3. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2000: 361–365.
20. Kikta T.: op. cit., s. 15–16.
21. Werner S., *Przemysł na Pomorzu i jego przyszłość*. Wyd. 1. Poznań: Wydawnictwo Fischer i Majewski, 1935, s. 150; Kamosiński S.: *Przemiany w strukturze przemysłu wielkopolskiego w latach 1919–1939*. Wyd. 1. Poznań: Wydawnictwo Poznańskie, 2008: 28.
22. *Archiwum Państwowe w Bydgoszczy*, Urząd Wojewódzki Pomorski w Toruniu, sygn. 12119.
23. Kikta T.: op. cit., s. 300–303, 305, 307–310, 314, 316, 319, 321, 324, 329, 331–341, 347; Por. Ślusarczyk W., *Przemysł chemiczno-farmaceutyczny w Bydgoszczy w latach 1920–1951*. *Kwartalnik Historii Kultury Materialnej*, nr 3/2012, s. 489–495.
24. Kikta T.: op. cit., s. 308.
25. *Ibidem*, s. 302.
26. *Ibidem*, s. 323.
27. *Fabryka Euskołu w Łabiszynie*, Poznań 1920, s. 2.
28. Kikta T.: op. cit., s. 150.
29. *Ibidem*, s. 129.
30. *Ibidem*, s. 150.
31. *Ibidem*, s. 129.
32. *Fabryka.....*, s. 3.
33. Nie posiadamy niestety tak dokładnych danych odnoszących się do terenu zaboru rosyjskiego.

Program wykładów z chemii fizycznej (farmacji fizycznej) dla studentów 2. roku farmacji jako wynik 34-letniej praktyki

Tadeusz Władysław Hermann

Katedra Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Adres do korespondencji: Tadeusz Władysław Hermann, emerytowany kierownik Katedry i Zakładu Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki w latach 1980–2007, Uniwersytet im. Karola Marcinkowskiego, ul. Święcickiego 6, 60-780 Poznań, email: hermann@ump.edu.pl

Wykłady z chemii fizycznej nie mogą przekraczać 30 godzin. Nieuwzględnione w wykładach, ważne dla studentów farmacji, tematy mogą być ujęte w 15 godzinach seminariów. Nie przedstawiam tutaj tematyki seminariów, która w Poznaniu opierała się na programie krakowskim, niezapomnianego mistrza, także mojego idola i kolegi, prof. dr Adama Danka, autora najlepszego podręcznika chemii fizycznej dla studentów farmacji, który osiągnął 5 wydań (1982).

Podaję tutaj program wykładów z chemii fizycznej, który jest moim własnym opracowaniem. Prowadziłem wykłady z chemii fizycznej na poznańskim wydziale farmaceutycznym w latach 1980–2007, które kontynuuję w języku angielskim, od roku 2005 do chwili obecnej dla studentów angielskojęzycznych.

Chemia fizyczna i/lub farmacja fizyczna zajmuje się zastosowaniem metod fizycznych do badania układów chemicznych (farmaceutycznych). Układy te mogą być badane mikroskopowo lub makroskopowo. Mikroskopowy punkt widzenia dotyczy zastosowania pojęcia cząsteczek (molekuł). Makroskopowe podejście do globalnych właściwości materii (np. objętości, ciśnienia, składu) nie uwzględnia interpretacji zjawisk na poziomie wyłącznie molekularnym. Chemię fizyczną można podzielić na cztery główne działy: termodynamikę, chemię kwantową, mechanikę statystyczną i kinetykę.

Termodynamika w moich wykładach jest postrzegana jako nauka makroskopowa, która bada zależności między różnymi właściwościami równowagowymi układu z uwzględnieniem przede wszystkim efektów cieplnych.

Tematyka termodynamiki dla studentów farmacji jest następująca:

1. Termodynamika
 - 1.1. Podstawowe pojęcia termodynamiczne
 - 1.2. Pierwsza zasada termodynamiki
 - 1.2.1. Praca i ciepło
 - 1.2.2. Energia wewnętrzna i entalpia
 - 1.2.3. Pojemność cieplna
 - 1.2.4. Entalpia reakcji chemicznej
 - 1.2.5. Zmiana entalpii wraz z temperaturą, prawa Kirchhoffa
 - 1.3. Druga zasada termodynamiki
 - 1.4. Trzecia zasada termodynamiki
 - 1.5. Entalpia swobodna
 - 1.4.1. Entalpia swobodna reakcji chemicznej
 - 1.4.2. Zmiana entalpii swobodnej wraz ze składem układu
 - 1.5. Definicja i właściwości stałej równowagi reakcji
 - 1.6. Zależność stałej równowagi od warunków
 - 1.6.1. Wpływ temperatury
 - 1.6.2. Wpływ ciśnienia
 - 1.7. Potencjał chemiczny
 - 1.7.1. Potencjał chemiczny gazów

Zastosowanie mechaniki kwantowej do budowy atomów, wiązań atomowych i spektroskopii jest przedmiotem chemii kwantowej. Chemia kwantowa nie jest tematem moich wykładów, ponieważ studenci mogą zapoznać się z tymi zagadnieniami podczas zajęć z chemii ogólnej i nieorganicznej, na które program przewiduje więcej godzin. Wyjątkiem jest spektroskopia, która należy do mojego kursu.

Mechanika statystyczna daje wgląd w wyjaśnienie zasad termodynamiki i pozwala na obliczenie

makroskopowych właściwości termodynamicznych z właściwości molekularnych składników układu. Ta wiedza jest zbyt specjalistyczna i nie powinna być wymagana od przeciętnego farmaceuty i dlatego nie stanowi tematu moich wykładów.

Natomiast kinetyka jest podstawową gałęzią wiedzy farmaceuty. Wykładam ją na podstawie zagadnienia trwałości leków i losów leków w ustroju (farmakokinetyki).

Tematyka kinetyki jest następująca:

1. Kinetyka chemiczna i farmakokinetyka
 - 2.1. Kinetyka chemiczna
 - 2.1.1. Szybkość reakcji (procesu)
 - 2.1.2. Kinetyka zerowego rzędu
 - 2.1.3. Kinetyka pierwszego rzędu
 - 2.1.4. Kinetyka drugiego rzędu
 - 2.1.5. Wpływ temperatury na szybkość reakcji
 - 2.2. Elementy farmakokinetyki
 - 2.2.1. Definicja kompartmentu i modele farmakokinetyczne
 - 2.2.2. Farmakokinetyka jednorazowej dawki
 - 2.2.2.1. Otwarty model jednokompartamentowy
 - 2.2.2.1.1. Szybka jednorazowa dawka dożylna
 - 2.2.2.1.1.1. Stężenie leku we krwi jako funkcja czasu
 - 2.2.2.1.1.2. Ilość leku wyeliminowana z moczem jako funkcja czasu
 - 2.2.2.1.2. Jednorazowa dawka pozanaczyniowa
 - 2.2.2.1.2.1. Stężenie leku we krwi jako funkcja czasu
 - 2.2.2.1.2.2. Ilość leku wyeliminowana z moczem jako funkcja czasu
- 2.3. Mechanizm reakcji enzymatycznych Michaelisa-Menten

Trzeci i ostatni rozdział moich wykładów to spektroskopia, których program jest następujący:

3. Przejścia elektronowe i fotochemia
 - 3.1. Widma widzialne (VIS) i nadfioletowe (UV)
 - 3.1.1. Charakterystyczne rodzaje przejść elektronowych
 - 3.1.2. Rola absorpcji światła w procesie widzenia
 - 3.2. Wyprowadzenie prawa Beera-Lamberta
 - 3.3. Skręcalność właściwa i dichroizm kołowy
 - 3.4. Widma emisyjne
 - 3.4.1. Fluorescencja
 - 3.4.2. Fosforescencja
 - 3.4.3. Lasery
 - 3.5. Fotochemia
 - 3.5.1. Wydajność kwantowa
 - 3.6. Widma oscylacyjne
 - 3.6.1. Widma w podczerwieni (IR)
 - 3.7. Widma rotacyjne
 - 3.7.1. Widmo Ramana
4. Rezonans magnetyczny
 - 4.1. Podstawy rezonansu magnetycznego
 - 4.2. Informacje na podstawie widma NMR
 - 4.2.1. Przesunięcie chemiczne
 - 4.2.2. Obrazowanie magnetycznego rezonansu (MRI)
 - 4.3. Informacje na podstawie widma EPR
 - 4.3.1. Wartość parametru g
 - 4.3.2. Rozszczepienie struktury linii

Otrzymano: 2014.08.15 · Zaakceptowano: 2014.08.19

Piśmiennictwo

1. Atkins P., Julio de Paula: Elements of physical chemistry. 4 wyd. Oxford University Press, Oxford 2013.
2. Martin A.: Physical pharmacy. 4 wyd. Lea & Febiger, Philadelphia, London 1993.
3. Danek A.: Chemia fizyczna. Podręcznik dla studentów farmacji. 5 wyd. PZWL, Warszawa 1982.
4. Pigoń K., Ruziewicz Z.: Chemia fizyczna. PWN, Warszawa 2005.
5. Sobczyk L., Kiszka A.: Chemia fizyczna dla przyrodników. PWN, Warszawa 1982.
6. Chemia fizyczna (red. T.W. Hermann). Podręcznik dla studentów farmacji i analityki medycznej. WL PZWL, Warszawa 1999.
7. Chemia fizyczna (red. T.W. Hermann). Podręcznik dla studentów farmacji i analityki medycznej. WL PZWL, Warszawa 2007.

Rozmowa z mgr. inż. Zdzisławem Mroczkiem – byłym, wieloletnim dyrektorem ds. produkcji i rozwoju w Polfie Warszawa

Maja Szczepańska, Marzena Szczucińska

Studenckie Koło Naukowe ISPE, Katedra i Zakład Farmacji Stosowanej, Gdański Uniwersytet Medyczny
(opiekun koła: prof. Małgorzata Sznitowska)

Proszę nam powiedzieć jak się zaczęła Pana przygoda z przemysłem farmaceutycznym?

Pracę w przemyśle farmaceutycznym rozpocząłem w 1968 r., czyli prawie 50 lat temu, w Warszawskich Zakładach Farmaceutycznych. Z wykształcenia jestem mgr. inż. chemii ze specjalnością technologia środków leczniczych. Specjalność więc miałem dostosowaną do tego zawodu. Zacząłem pracę jako tzw. „mistrz” (nadzorca) robotników na syntezie substancji czynnych. Wówczas w tym dziale syntetyzowanych było kilkanaście preparatów, na różną skalę. Po dwóch latach zostałem przeniesiony do laboratorium badawczego. W tamtych czasach praca na produkcji to było pewnego rodzaju wyróżnienie, natomiast laboratorium to było coś mniej ambitnego. Po jakimś czasie, z różnych przyczyn, m.in. natury politycznej, musiałem zmienić pracę, ale wróciłem do przemysłu farmaceutycznego mniej więcej po połowie roku. Jakiś czas pracowałem w przedsiębiorstwie doświadczalnym, które mieściło się na ulicy Barskiej, obecnie jest tam zakład badawczy Warszawskich Zakładów Farmaceutycznych. W 1974 r. przedsiębiorstwo to połączyło się z Warszawskimi Zakładami, a ja zostałem tam najpierw zastępcą kierownika, a potem szefem Zakładu Badawczo-Wdrożeniowego. W zakładzie tym pracowałem do 1985 r. i w tymże roku zostałem powołany na stanowisko zastępcy dyrektora, a potem dyrektora ds. produkcji i rozwoju w Warszawskich Zakładach Farmaceutycznych. Na tym stanowisku pracowałem do czasu odejścia na emeryturę, tzn. do końca 2002 r. Następnie przez jakiś czas byłem doradcą w spółce Sanfarm (powołanej przez Warszawską Polfę), a w 2004 r., kiedy wygasła umowa o zakazie konkurencji, zostałem zatrudniony w charakterze konsultanta w firmie M + W Process Industries mieszczącej się w Gdańsku. Firma zajmuje się projektowaniem instalacji



wytwórni w obszarze life-science. Pracuję tam do dziś jako konsultant przy projektach farmaceutycznych, większość uwag i opinii załatwiam za pośrednictwem telefonu lub internetu.

Jak przed transformacją ustrojową przebiegał w Polsce proces rejestracji leków?

Nie jestem tego pewien, ale to był chyba system narzucony przez Radę Wzajemnej Pomocy Gospodarczej i wynikał z Ustawy o środkach farmaceutycznych i aptekach z 1951 r. Wymogi dotyczące produktów leczniczych przy rejestracji były chyba

ustalane w każdym państwie oddzielnie. W Polsce zajmowało się tym oczywiście Ministerstwo Zdrowia, przy pomocy Komisji Rejestracji Leków, jako instytucji opiniodawczej, oraz Instytutu Leków. Wówczas wszystkie zakłady przemysłu farmaceutycznego w Polsce były państwowe. Było ich 15 i tworzyły Zjednoczenie Polfa. Przy czym 14 z nich produkowało leki, a 1 opakowania do leków (w Bolesławcu). Wniosek na rejestrację leków składało się w organizacji, tzn. do „Zjednoczenia”, które miało bardzo duże uprawnienia. „Zjednoczenie” mogło ingerować w zakładzie właściwie we wszystko. Na przykład mogło podejmować decyzję o przeniesieniu produkcji z jednego zakładu do drugiego. Dokumentacja rejestracyjna składała się praktycznie rzecz biorąc z informacji o składzie tego produktu i wymagań jakościowych określanych na podstawie Farmakopei Polskiej. Nie było więc szczególnych badań i wymagań, jeśli chodzi np. o badania kliniczne. Zgodnie z ustawami z 1987 r. oraz z 1991 r. do rejestracji należało przedstawić wyniki badań laboratoryjnych oraz „w razie potrzeby” – klinicznych, a warto dodać, że do połowy lat dziewięćdziesiątych takie potrzeby pojawiały się dość rzadko przy rejestracji w kraju. Wobec tego dokumentacje nie zawierały często danych o badaniach równoważności biologicznej. Wszystkie dokumenty składało się do zjednoczenia i to ono już dalej pertraktowało z Ministerstwem Zdrowia o wpisanie produktu do rejestru. Istniał taki akt prawny, którego początki biorą się jeszcze od prezydenta Ignacego Mościckiego. To on wprowadził ten system chyba w 1937 r., jeśli mnie pamięć nie myli. Był to mianowicie Urzędowy Spis Leków, który ukazywał się w Dzienniku Ustaw raz do roku, a w nim wpisany był każdy produkt leczniczy – wówczas „środek farmaceutyczny”. Na marginesie, istnieje nawet dość zabawna historia dotycząca terminu „środki farmaceutyczne” stosowanego w aktach prawnych do 2001 r. Podczas dyskusji dotyczącej zmiany Prawa farmaceutycznego pamiętam, że padło to pytanie: „Skąd się wzięła ta nazwa – środki farmaceutyczne?”. Więc ja, uczestnicząc w spotkaniu, powiedziałem, że wzięła się z rosyjskiego „фармацевтические средства”. Wtedy natychmiast nazwę tę zmieniono i od tego momentu były już „produkty lecznicze”, co moim zdaniem także nie jest najszcześniejszym rozwiązaniem, ponieważ to powinno się nazywać po prostu „leki”. Ale w języku angielskim używa się „medicinal products”, więc zostało takie tłumaczenie.

Urzędowy spis leków w 1938 r. zawierał ok. 400 pozycji, więc proszę sobie wyobrazić, jak to wygląda w stosunku do dzisiejszych czasów. Nie wiem, ile leków zarejestrowano obecnie w Polsce, ale w Niemczech przed wejściem obecnej dyrektywy

było zarejestrowanych 80 tysięcy produktów. W latach 80. XX w. postanowiono zmienić Prawo farmaceutyczne, doprowadzając je do większej spójności z tym co działo się na Zachodzie. Pamiętam, że w tym czasie, a może nawet jeszcze trochę wcześniej, odbyły się międzynarodowe działania, skutkujące przystąpieniem Polski w charakterze obserwatora do PIC – *Pharmaceutical Inspection Convention*. Organizacja ta, istniejąca do dziś, gromadzi inspektorów farmaceutycznych. Ta konwencja później częściowo się przekształciła (obecnie jest to PIC/S – *Pharmaceutical Inspection Convention Scheme*), a na jej szkieletcie powstał dyrektoriat ds. jakości leków (EDQM), który wydaje Farmakopeę Europejską. PIC/S obecnie sporo publikuje i są to zawsze bardzo szczegółowe informacje dotyczące np. przeprowadzenia inspekcji izolatora, wytwórni gazów medycznych itp. Mniej więcej w tym samym czasie zaczęły się ukazywać już ogólnoeuropejskie przepisy GMP. Pamiętam, że dostałem kopię – egzemplarz zrobiony na powielaczu („przodek” kserokopiarki). Dokument był nawet trudny do przeczytania, bo odbitka była słabszej jakości. Wtedy to po raz pierwszy w życiu zobaczyłem przepisy GMP, trochę różniące się od tych obecnych.

Poza wymaganiami jakości, skuteczności i bezpieczeństwa oraz zasadami GMP istniały jeszcze dwa czynniki ograniczające możliwość rejestracji: tzw. Data Exclusivity i przepisy prawa patentowego. Data Exclusivity obecnie oznacza, że lek generyczny może być zarejestrowany dopiero w 8 lat po pierwszej rejestracji leku referencyjnego, a wprowadzony na rynek najwcześniej po 10 latach. Wtedy w Polsce był taki przepis, który mówił, że muszą upłynąć 3 lata od zarejestrowania w kraju leku oryginalnego, aby można było zarejestrować generyk. Ale to nie było tłumaczone względami ochrony własności intelektualnej, lecz było motywowane tym, że musi upłynąć jakiś czas, byśmy byli przekonani, że lek w ogóle warto „powielić”, naśladować. Ten 3-letni okres przetrwał w naszym kraju bardzo długo, bo praktycznie do wstąpienia do UE, czyli do 2004 r.

Gdyby mógł nam Pan jeszcze bardziej przybliżyć kwestię Prawa patentowego i Prawa farmaceutycznego w szerokim pojęciu, jak przedstawiało się ono w tamtych czasach?

W Polsce wówczas obowiązywało takie samo Prawo patentowe jak w Związku Radzieckim. Chroniona była tylko metoda wytwarzania, a nie sam produkt. Czyli nie można było opatentować substancji czynnej. Patent był chroniony przez 15 lat od daty zgłoszenia, obecnie jest to lat 20. Wystarczyło więc wynaleźć inną metodę wytwarzania, opatentować ją i swobodnie można było

daną substancję lub lek produkować i sprzedawać w Polsce oraz na wszystkich obszarach, które miały podobne przepisy patentowe. W 1990 r. premier Tadeusz Mazowiecki podpisał ze Stanami Zjednoczonymi traktat handlowy, który skutkowało zmianą w 1992 r. Prawa wynalazczego, a dostosowanie do standardów światowych również ograniczyło swobodę rejestracji. Jeśli natomiast chodzi o GMP, to w zasadzie nie było przepisów prawnych, czy jakichś specjalnych wskazówek. Trzeba było stosować się do Farmakopei Polskiej, w której były podstawowe wymagania dotyczące np. utrzymania jałowości itp. Wymagania te nie były dostosowane po procesów przemysłowych. Na przykład w przypadku wody do iniekcji nie sposób było zgodnie z monografią farmakopealną kontrolować jej jakość w procesie produkcji. Warszawskie Zakłady były największym w Polsce producentem leków jałowych, więc ten problem był dla nas istotny. Nie było wtedy metod badania jakości wody on-line. To trochę zaczęło się zmieniać pod koniec lat 80. Gdy zostałem dyrektorem ds. produkcji i rozwoju, to jednym z pierwszych moich zadań był zakup instalacji do wytwarzania wody. Ta woda, którą już potem wytwarzaliśmy była zgodna z ówczesnymi wymaganiami Farmakopei Europejskiej – badane było pH i przewodnictwo on-line. Oczywiście były nawiewy laminarne nad miejscami, w których rozdozowywane były np. produkty sterylne, ale nikt tego nie walał, nie sprawdzał, czy te filtry rzeczywiście działają. Wymóg GMP wtedy nie istniał.

Jakie były wówczas wymagania dotyczące ubioru i przygotowania pracowników?

Pewne wymagania były, ale oczywiście nieakceptowalne obecnie. Obowiązywał fartuch, jakieś nakrycie głowy, maseczki nie były już specjalnie wymagane. Z tym zagadnieniem zaczęliśmy się stykać pod koniec lat 80., ale konkretne działania w tym kierunku prowadzono dopiero od 1992 r. Wtedy firmy farmaceutyczne utworzyły własną organizację o dość luźnym charakterze i nazwie Klub Dyrektorów. Szefowie tej organizacji zjeżdżali się od czasu do czasu, przeważnie raz na kwartał. Zostało mi wtedy powierzone przez nich zadanie dotyczące wdrażania GMP, chociaż mogłem pomagać tylko w uświadamianiu. Powołaliśmy wtedy nieformalny zespół ds. wdrażania GMP, którego członkami byli przedstawiciele różnych przedsiębiorstw farmaceutycznych. Docelowo spotykaliśmy się dwa razy do roku i nasze zjazdy miały charakter techniczny. Spotkania te były początkowo dość kameralne, jednak po pewnym czasie standardem była frekwencja około 150 osób. Wygłaszano referaty, dyskutowano. Prowadziłem te spotkania aż do emerytury,

a pałeczkę przejął po mnie kolega Jurek Galka z Krakowa. Po pewnym czasie firmy wykazywały coraz mniejszą chęć uczestnictwa w tych spotkaniach, ponieważ nie chciały się dzielić wiedzą i zdradzać swoich interesów, a więc trudno było już o takie publiczne wystąpienia. W każdym razie to była taka forma, która bardzo ludzi zainteresowała. W tym czasie został także wydany podręcznik GMP. Poruszone zostały w nim głównie te problemy, które najbardziej firmy „boliły”. Najistotniejsze stało się nawet nie to, by produkować dobre produkty, ale by spełniać wymagania i móc wejść do UE. Razem z panią Barbarą Kawalko-Myślińską wydaliśmy kilkanaście broszurek. Bardzo żałuję, że ich nie zbierałem, gdyż teraz są one praktycznie niedostępne. Pomocny był fakt, że Polfa Warszawska uzyskała wtedy licencję na wytwarzanie niektórych produktów z Sanofi i przyjeżdżał często specjalista ds. jakości z tej firmy, który kontrolował system wytwarzania tych produktów u nas.

Czy były jakieś dodatkowe organy, które kontrolowały wdrażanie GMP?

W związku z tym, że trzeba było zmienić strukturę produkcji, instalację, kupować nowy sprzęt, głównym problemem przy wdrażaniu GMP były pieniądze, i to w obcej walucie. Zawarto pewną umowę z władzami państwa. Wówczas eksport do Rosji leków był ogromny i tymi lekami płacono za gaz. Część zysków zwracana była firmom w postaci twardej waluty, za którą można było kupić sprzęt.

A skąd zdobywało się maszyny i inne wyposażenie?

Wszystko było importowane z Zachodu, głównie z Niemiec, Włoch, Szwajcarii i Francji, ponieważ w kraju nikt tego nie wytwarzał. Nie było tak jak teraz, gdy w Polsce jest kilka firm, które wytwarzają sprzęt spełniający wymagania GMP (choć często budowany z części kupowanych od zagranicznych dostawców).

Jak dokonywano wyboru przy zakupie sprzętu? Czy były jakieś przetargi?

To już zależało indywidualnie od firmy. Nie było jeszcze wtedy ustawy o zamówieniach publicznych. U nas w firmie zbierano oferty, które były następnie przedstawiane Radzie Technicznej, składającej się z dwóch dyrektorów: dyrektora ds. technicznych i przewodniczącego Rady, którym wówczas byłem właśnie ja. Na posiedzenia Rady Technicznej zapraszano wybitnych ekspertów z firmy. Omawiano i oceniano te oferty pod względem technicznym i ekonomicznym, punktowano i tworzone rankingi. Ostateczną decyzję podejmował dyrektor naczelny.

Jak by Pan porównał wyposażenie z początku lat 90. z tym obecnym?

Z pewnością pojawiło się więcej automatyki. Jestem obecnie konsultantem w firmie budującej fabryki i mniej więcej wiem, co się robi. W tamtych czasach nie było w ogóle systemu sterylizacji gazowej, który obecnie jest bardzo powszechnie stosowany (sterylizacja gazowym nadtlenkiem wodoru), np. do transferu materiałów do strefy A. W ten sposób sterylizowane są także izolatory.

Wiemy, że jest Pan specjalistą od Prawa farmaceutycznego. Czy mógłby Pan powiedzieć, jakie zmiany zaszły od lat 90.?

Ostatni raz zajmowałem się prawem w 2010 r. Byłem wtedy zaproszony do zespołu powołanego przez panią minister Ewę Kopacz. Napisałyśmy Prawo farmaceutyczne od nowa, ale trafiło to do „kosza”. Prawo farmaceutyczne zostało zmienione przez sejm kontraktowy w 1991 r., ale sejm nie zmienił w gruncie rzeczy systemu rejestracji wprowadzonego ustawą z 1987 r. Nie było Urzędu Rejestracyjnego tylko nadal była to Komisja Rejestracji. Zmiana pełna, zgodnie z wymaganiami Unii, miała miejsce w momencie, kiedy ukazała się dyrektywa 2001/83. Został powołany zespół w Ministerstwie Zdrowia, którego byłem członkiem, m.in. razem z panią Marią Głowniak, panią Barbarą Myślińską, panem Waldemarem Zielińskim. Zespół był kierowany przez ówczesnego wiceministra zdrowia pana Krzysztofa Tronczyńskiego. By to prawo dostosować do dyrektywy, wprowadzono m.in. nowe pojęcia i definicje, takie jak: produkt leczniczy, substancja czynna. W tym czasie, czyli w latach 2001–2002, znaleźliśmy treść traktatu akcesyjnego do Unii Europejskiej. Przewidywał on, że wszystkie dokumentacje rejestracyjne zostaną dostosowane do wymogów unijnych. Dostaliśmy na to okres przejściowy 7 lat od momentu podpisania tego traktatu. To było nazwane jako „update” (harmonizacja) tej dokumentacji. Dla firm rodziło to mnóstwo kłopotu i wydatków, bo trzeba było dla niektórych produktów przeprowadzić badania równoważności biologicznej. Innym państwom: Słowenii, Węgrom Czechosłowacji nie narzucono takiego okresu przejściowego, natomiast państwa bałtyckie otrzymały tylko 5-letni okres.

Dlaczego tak było, że Czesi, Węgrzy od razu weszli do Unii, ich produkty zostały od razu uznane, a polskie nie?

W tych państwach była inna organizacja rejestracji i Unia to widziała. Brytyjcy specjaliści rezydowali już na początku lat 90. i pomagali Czechom rozwijać agencję rejestracyjną. Węgrzy w ogóle mieli trochę inne podejście do przemysłu farmaceutycznego niż Polacy. Widziałem węgierskie wytwórnie

gdzieś pod koniec lat 80. i to było coś zupełnie innego niż w Polsce. Węgrzy traktowali ten przemysł jako narodowy, priorytetowy i dlatego był na wysokim poziomie, tak że od nich nie oczekiwano zmian wymagających okresu przejściowego. Muszę powiedzieć, że koledzy mieli do mnie pretensje, dlatego że ja o ten dłuższy okres przejściowy zabiegałem. Zarzucano mi, że skoro Czesi go nie dostali, to i my jakoś byśmy sobie poradzili. W traktacie pierwotnie było wymaganie, że już do momentu wejścia do Unii, czyli przez 3 lata, mamy doprowadzić dokumentację do porządku. Jak się później okazało, nam ten okres by nie wystarczył, co skutkowało tym, że Unia nałożyłaby kary na Polskę. Taka kara to czasem kilkadziesiąt tysięcy euro za każdy dzień zwłoki. Wydawało mi się, że uczciwie było powiedzieć, że my po prostu nie damy rady w tym terminie (do 2004 r.) tego zrobić i potrzebujemy okresu przejściowego.

Dlaczego Polfa Warszawa zwlekała do ostatniej chwili z prywatyzacją?

Warszawska Polfa była firmą państwową, działała na zasadzie przedsiębiorstwa państwowego i została sprywatyzowana w 2004 r. Stała się spółką akcyjną i przeszła na prawo handlowe. Firma nie prywatyzowała się dlatego, że nie było to konieczne. Na liście 500 największych firm w Polsce byliśmy zawsze w czołówce, a raz na 2 miejscu, pod względem zysku. Szybko dokonywaliśmy zmian, żeby firma odpowiadała wymaganiom GMP, robiliśmy duże inwestycje. Zbudowaliśmy swoją filię na Rzeszowszczyźnie – Sanfarm w Nowej Dębie, do której przenieśliśmy produkcję stałej doustnej postaci leku. Zlikwidowaliśmy w fabryce wydział syntezy przenosząc do nowej firmy Ipochem (spółka z Instytutem Przemysłu Organicznego). Wydawało się, że nie jest potrzebna nam prywatyzacja, ale funkcjonowanie w tej formie nie było dłużej możliwe ze względów prawnych. Firma, już jako spółka akcyjna, została włączona do Polskiego Holdingu Farmaceutycznego. Oceniam ten pomysł jako absurdalny, bo to właściwie zahamowało rozwój Polfy Warszawa. Ostatnią niesprywatyzowaną do dziś firmą są Tarchomińskie Zakłady Farmaceutyczne w Warszawie.

Jakimi kryteriami kierował się Pan, jako dyrektor do spraw produkcji i rozwoju, wprowadzając nowe produkty lecznicze na rynek?

Muszę przyznać, że kryteria wyboru były dość prymitywne. Mieliśmy pewne ograniczenia, jak *data exclusivity* i ochrona patentowa. Miałem znajomego, który co roku dostarczał mi listę produktów, których patenty wygasną w następnym roku albo w niedalekiej przyszłości. Ważne było, żeby być

pierwszym na rynku w Polsce. Trzeba było wybierać produkty, które przede wszystkim pasują do profilu wytwarzania w firmie i dostatecznie wcześniej przygotować produkt, tak, żeby jak wygasną patenty można było lek od razu na rynek wprowadzić. Był przypadek, kiedy przygotowałem produkt niepasujący w pełni do profilu wytworni. Była to inicjatywa prof. Stanisława Janickiego z Katedry Farmacji Stosowanej Akademii Medycznej w Gdańsku, z którym współpracowaliśmy ściśle przez wiele lat. Właściwie to mogę powiedzieć, że byliśmy przyjaciółmi. W Katedrze profesora wykonano całą część laboratoryjną, a myśmy dokonali rozwoju skali półtechnicznej i uruchomiliśmy produkcję. Był to Plofed, produkt anestetyczny, który wytwarza się w postaci emulsji do wstrzykiwań. Niezwykle surowe wymogi dotyczące wielkości cząstek emulsji wywołały konieczność zainstalowania specjalnego homogenizatora i linii do formulacji tego produktu, zupełnie nowej dla firmy. To była bardzo kosztowna „zabawa”, ale firma się na to zdobyła i chyba dobrze

sobie radzi w tej chwili. Do dziś uważam, że w Polsce w ogóle nie ma kapitału, który byłby zdolny wygenerować produkty oryginalne (innowacyjne). Polskie firmy mogą inwestować w rozwój takich leków tylko do pewnego etapu, ale by zakończyć badania potrzebne są astronomiczne środki. Firma nieposiadająca takich funduszy może co najwyżej sprzedać „rokującą” cząstkę leku z dużym zyskiem.

Dziękujemy za wspomnienia i spostrzeżenia, za działania – jakże ważne z perspektywy czasu. Życzymy Panu wielu spokojnych lat oraz czerpania radości z rozwoju działań, które Pan zapoczątkował.

Otrzymano: 2014.08.11 · Zaakceptowano: 2014.08.16

Redakcja dziękuje Pani prof. dr hab. Małgorzacie Sznitowskiej za udostępnienie materiału

Działania niepożądane leków w obrębie jamy ustnej

Alicja Wieczorek, Dariusz Chlubek, Violetta Dziedziejko

Katedra Biochemii i Chemii Medycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie

Adres do korespondencji: Violetta Dziedziejko, Katedra Biochemii i Chemii Medycznej PUM, Al. Powst. Wlkp. 72, 70-111 Szczecin, e-mail: viola@pum.edu.pl

Side effects of drugs in the oral cavity · Adverse drug reactions are unwanted effects of pharmacological treatment. They are often present in mouth and associated structures. There is an increasing number of medications associated with xerostomia and gingival overgrowth. Xerostomia caused by diuretics, antidepressants, anticholinergics can cause oral discomfort (difficulties in chewing, swallowing, tasting or speaking). Xerostomia is now being recognized as an important risk factor for dental diseases. Treatment may include the use of salivary substitutes, salivary stimulants and possible elimination of drugs having anticholinergic effects. Gingival overgrowth is an adverse drug reaction caused by anticonvulsants (phenytoin), immunosuppressants (cyclosporine) or calcium channel blockers (mainly nifedipine) and other drugs. Pathogenic mechanism that mediates gingival overgrowth remains undefined despite intense clinical and laboratory investigation. Gingival overgrowth is a significant problem for dentists. Treatment should include improving oral hygiene and finding alternative drug therapies that can help reduce the impact of this unwanted effect.

Keywords: xerostomia, gingival overgrowth, calcium channel blockers, anticonvulsants, immunosuppressants.

© Farm Pol, 2014, 70(10): 568–571

Dzięki postępowi medycyny ludzie żyją dłużej, w lepszym zdrowiu fizycznym i psychicznym. Zawdzięczamy to między innymi szczegółowemu poznaniu procesów chorobowych oraz lekom [1]. Konsekwencjami stosowania leków, poza pożądanym efektem terapeutycznym, może być występowanie różnego rodzaju powikłań. Część z nich występuje w czasie prawidłowo prowadzonej terapii, inne należą do powikłań, które wynikają z nieprawidłowego stosowania leków [2]. Niepożądane działanie leku to każde niezamierzone

niekorzystne działanie, które występuje u ludzi pod wpływem stosowania dawek zalecanych w celach profilaktycznych, diagnostycznych czy terapeutycznych [2].

Najczęściej występującymi objawami niepożądanymi leków w obrębie jamy ustnej są kserostomia i przerost dziąseł [3].

Kserostomia

Ślina odgrywa istotną rolę w zdrowiu jamy ustnej. Pełni funkcję ochronną dzięki płynnej konsystencji i zawartości glikoprotein. Zwilża ona pokarm, ułatwiając przeżuwanie, formowanie i polykanie kęsa pokarmowego. Ponadto ogranicza kolonizację bakterii na powierzchni zębów i błony śluzowej w wyniku działania enzymów: lizozymu, laktoferryiny i sialoperoksydazy oraz utrzymuje równowagę kwasowo-zasadową, neutralizując kwasy produkowane przez bakterie próchnicotwórcze i te zawarte w pokarmach [4]. Regularne stosowanie leków może mieć ogromny wpływ na prawidłowe funkcjonowanie gruczołów ślinowych oraz szereg efektów ubocznych manifestujących się w jamie ustnej. Do najczęściej występujących działań niepożądanych zalicza się m.in. zmniejszone wydzielanie śliny, powodujące kserostomię (suchość jamy ustnej) [5, 6].

Pacjenci cierpiący na suchość jamy ustnej skarżą się dodatkowo na zaburzenia polykania (dysfagia), zaburzenia smaku, zaburzenia mowy, uczucie pieczenia i swędzenia jamy ustnej, ból na drażniące pokarmy (owoce, gorące napoje, tytoń, alkohol), halitozę (brzydki zapach z ust). Pacjenci, którzy noszą protezy mogą mieć problemy z ich użytkowaniem ze

względem na utratę przyczepności płyty uzupełnienia protetycznego lub z częstszym występowaniem stanu zapalnego błony śluzowej [7]. Ponadto w badaniach Villa i Abati wykazano, iż pacjenci z kserostomią muszą trzy razy częściej popijać łyżeczkę pokarmową w porównaniu z pacjentami niecierpiącymi na to schorzenie i około pięć razy częściej występują u nich zmiany chorobowe w jamie ustnej [7]. Należą do nich m.in. nadwrażliwość zębów na zmiany temperatury, wzrost częstotliwości i poziomu zaważania procesów próchnicowych, zapalenie dziąseł i błony śluzowej jamy ustnej, a także zakażenia grzybami *Candida albicans* [8].

Głównymi przyczynami kserostomii są: 1) leki (moczopędne, antydepresyjne, antyhistaminowe, antycholinergiczne, hormonalne, narkotyczne leki przeciwbólowe i inne), 2) promieniowanie rtg (radioterapia z powodu nowotworów twarzoczaszki i szyi), 3) wiek (często dotyczy kobiet w wieku 50–70 lat, w okresie menopauzy lub po menopauzie), 4) choroby gruczołów ślinowych (zespół Sjögrena, kamica, guzy) [8].

Kserostomia polekowa ma charakter odwracalny i często po zaprzestaniu kuracji lekami ją wywołującymi suchość w jamie ustnej ustępuje. Powodują ją przede wszystkim leki działające na układ вегетatywny, o działaniu cholinolitycznym. Są to na przykład: skopolamina, atropina i homatropina, ale także bromek ipratropium – wziewny lek rozkurczający oskrzela. Działanie hamujące wydzielanie śliny wykazują również β_2 -adrenomimetyki, podawane w astmie i przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc (tj. salbutamol, salmeterol i fenoterol). Suchość jamy ustnej wywołują też leki działające na ośrodkowy układ nerwowy, jak: anksjolityki – pochodne benzodiazepiny (diazepam, nitrazepam), neuroleptyki – chlorpromazyna i haloperidol, a w szczególności trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne – amitryptylina i imipramina [9]. Na kserostomię polekową cierpią także pacjenci po zażyciu perindoprylu i kaptoprylu, hydrochlortiazydu, ketotifenu, prometazyny, klemastyny, morfiny i jej pochodnych, budesonidu, tetracykliny, interferonu czy interleukiny-2 [9] (tabela 1). Wyżej wymienione leki to najczęstsze z dużej grupy preparatów (może być ich nawet 400), które mogą wywołać suchość jamy ustnej [5].

Polekowy przerost dziąseł

Przerost dziąseł charakteryzuje się wzrostem objętości w wymiarze pionowym, jak i poziomym dziąsła brzeżnego i brodawki dziąsłowej [10]. Klinicznie można zaobserwować postać łagodną, obejmującą 1/3 wysokości korony zębów, bądź duży przerost przykrywający ponad połowę korony zęba. Schorzenie w swej cięższej postaci prowadzić może

Tabela 1. Kategorie i przykłady leków mogących wywołać kserostomię

Kategoria leków	Przykład
Trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne	Amitryptylina
Leki udrożniające górne drogi oddechowe	Pseudoefedryna
Leki przeciwmigrenowe	Rizatriptan
Inhibitory pompy protonowej	Omeprazol
Opioidy	Morfina
Leki rozszerzające oskrzela	Tiotropium
Leki moczopędne	Furosemid
Leki antycholinergiczne	Oksybutynina
Antagoniści receptorów α_1 -adrenergicznych	Terazosyna
Neuroleptyki	Fenotiazyna, Lit
Selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny (SSRI)	Fluoksetyna
Retinoidy	Izotretynoina
Leki przeciwhistaminowe H1	Chlorfenamina
Leki przeciwhistaminowe H2	Cymetydyna
Inhibitory wychwytu zwrotnego dopaminy	Bupropion
Agoniści presynaptycznych receptorów α_2 -adrenergicznych	Moksonidyna
Inhibitory konwertazy angiotensyny	Lizynopryl
Inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny i noradrenaliny (SNRI)	Reboksetyna
Środki hamujące apetyt	Fenfluramina
Cytostatyki	5-fluorouracyl
Leki przeciw HIV	Didanozyna

do trudności w utrzymywaniu higieny jamy ustnej, rozwoju próchnicy spowodowanej kumulacją płytki nazębnej, upośledzenia funkcji mowy i żucia, a także często stanowi problem natury estetycznej [10–14].

Wzrost objętości dziąseł może być objawem długotrwałego stosowania leków. Polekowy przerost dziąseł (*drug-induced gingival overgrowth*, DIGO) może być efektem ubocznym stosowania jednego z trzech grup leków: blokerów kanałów wapniowych (np. diltiazem, werapamil, nifedypina), leków przeciwpadaczkowych (fenytoina i jej pochodne) oraz leków immunosupresyjnych (cyklosporyna A) [10, 12, 13, 15]. Przerosty pojawiają się zazwyczaj około 3 miesięcy po rozpoczęciu terapii i manifestują się jako przerost brodawek międzyzębowych [10, 13]. Występują z różną częstością, w zależności od stosowanego leku. Zmienność ta wynikać może również z wieku pacjenta i uwarunkowań miejscowych. Częściej występuje u dzieci i nastolatków, głównie dotyczy dziąsła zębów przednich, zazwyczaj od strony policzkowej, rzadziej od językowej czy podniebiennej [12, 16].

Jednym z czynników wywołujących DIGO może być predyspozycja osobnicza mająca podłoże genetyczne [11, 12]. Badania wykazały, że rosnące stężenia leków, ale także te same stężenia dla różnych kultur komórek, wpływają na zmienność proliferacji fibroblastów dziąsłowych [12]. Leki powodujące

przerost dziąseł są metabolizowane przez enzymy cytochromu P450 [11, 12]. Geny kodujące te enzymy wykazują znaczny polimorfizm, który również może przyczynić się do zróżnicowanej odpowiedzi proliferacyjnej na zastosowane leki [12]. Zmienność cytochromu P450 może być czynnikiem ryzyka polekowego przerostu dziąseł [1].

Jednym z markerów genetycznych, który został przebadany w kontekście występowania polekowego przerostu dziąseł jest układ HLA (*human leukocyte antigens*) [11]. W trakcie badań wykazano, iż pacjenci, u których występuje HLA-DR1 zyskują pewien stopień ochrony przed rozwojem polekowego przerostu dziąseł w porównaniu z pacjentami z HLA-DR2 [12].

Przerost dziąseł spowodowany blokerami kanału wapniowego

Blokery kanałów wapniowych (*calcium channel blockers*, CCB) stosowane w medycynie jako leki antyarytmiczne, hipotensyjne i zapobiegające dusznicy bolesnej wywierają działanie na kanały wapniowe zlokalizowane z błonie plazmatycznej komórek [16–19]. Leki, w oparciu o ich strukturę chemiczną, mogą być podzielone na podgrupy: pochodne dihydropirydyny (np. amlodypina, felodypina, isradypina, nikardypina, nifedypina), pochodne fenyloalkiloaminy (werapamil), pochodne benzotiazepiny (diltiazem), pochodne cynaryzyny (flunaryzyna) czy chlorowodorek bepridyli [16]. Do tej pory nie zanotowano przerostu dziąseł wywołanego flunaryzyną czy chlorowodorkiem bepridyli, ale to niepożądane działanie wystąpiło u 15–83% pacjentów stosujących nifedypinę, 21% pacjentów przyjmujących diltiazem i u około 4% osób zażywających werapamil [13, 14, 17].

Klinicznie DIGO indukowane blokerami kanałów wapniowych pojawia się po ok. 9 miesiącach od wdrożenia terapii i manifestuje się przerostem brodawek międzyzębowych, zasłaniających korony nawet na całej wysokości, zazwyczaj przy zębach przednich i raczej od strony wargowej, a nie językowej [13, 17]. Histologicznie przerost po nifedypinie przedstawia się jako zgrubienie warstwy kolczystej nabłonka, hiperkeratoza łagodnego lub średniego stopnia, zwłóknienie błony podstawnej i proliferacja fibroblastów. Możliwe, że kluczowe znaczenie w patogenezie DIGO może mieć ilość i skład macierzy pozakomórkowej [12, 17]. Zarówno cyklosporyna, jak i nifedypina zmieniają metabolizm 3H-glikozaminy, która łączy się z glikozaminoglikanami w macierzy pozakomórkowej, a to zwiększa odkładanie się proteoglikanów i może prowadzić do przerostu [12, 17]. Działanie nifedypiny i innych CCB polegające na blokowaniu kanału błonowego dla Ca²⁺, może blokować przejście komórek

w apoptozę, a w konsekwencji prowadzić do przerostu tkanki [12]. Nie zanotowano natomiast przypadków występowania przerostów indukowanych CCB u bezzębnych pacjentów [17]. Warto wspomnieć, iż CCB mogą być stosowane wraz z cyklosporyną A. Badania wykazały, że przerost dziąseł podczas terapii skojarzonej jest bardziej nasilony w porównaniu z terapią jedynie cyklosporyną A [11, 13, 17, 20].

Przerost dziąseł spowodowany fenytoiną

Fenytoina jest wykorzystywana do kontrolowania napadów padaczkowych u pacjentów z epilepsją od momentu jej wprowadzenia przez Merritt i Putnam w 1938 r. Po roku od jej zastosowania pojawiły się pierwsze wzmianki w literaturze łączące fenytoinę z przerostem dziąseł. Skuteczność w walce z zaburzeniami drgawkowymi, dostępność i niski koszt spowodowały jej szerokie zastosowanie, a tym samym coraz częstsze doniesienia w literaturze o efektach ubocznych w postaci DIGO [17].

W przeroście dziąseł indukowanym fenytoiną brodawki dziąsłowe są powiększone, mogą nawet zasłaniać korony zębów. Badania kliniczne dowiodły, że wzmożona higiena jamy ustnej zmniejsza nasilenie zmian rozrostowych, lecz usunięcie płytki bakteryjnej nie zapobiega rozwojowi tych zmian [18]. Ponadto nie wykazano zależności między płcią i pochodzeniem etnicznym a występowaniem przerostu dziąseł [17].

Istnieją doniesienia o przeroście dziąseł indukowanym fenytoiną, który pojawił się przed wyrżnięciem zębów mlecznych i opóźnił ząbkowanie. Co ciekawe, rzadko, ale zaobserwowano przerost dziąseł u pacjentów bezzębnych lub pod przeszłymi uzupełnieniami stałymi [17]. Odnotowano też nieprawidłowości w budowie korzeni zębów po stosowaniu fenytoiny. Wady obejmują skrócenie korzeni, ich resorpcję oraz zwiększone odkładanie cementu. Mechanizm powstawania tych zaburzeń jest niejasny, ale może być związany z hamowaniem metabolizmu witaminy D bądź z produkcją hormonu przytarczyc [5].

Fenytoina pobudza fibroblasty dziąsłowe o wysokiej aktywności do syntezy kolagenu, obniża aktywność kolagenazy w tkankach dziąsłowych, prowadząc do zachwiania równowagi metabolizmu tkanki łącznej [12, 16].

Przerost dziąseł spowodowany cyklosporyną

Cyklosporyna A należy do leków immunosupresyjnych. Zapobiega odrzucaniu przeszczepionych organów poprzez wybiórcze hamowanie proliferacji limfocytów T, blokowanie aktywacji makrofagów

oraz zapobieganie wytwarzania IL-1 na powierzchni komórek T-pomocniczych [17, 19, 21].

Pacjenci cierpiący na DIGO spowodowane cyklosporyną skarżą się na trudności w mowie i jedzeniu. Przerośnięta tkanka dziąsłowa jest miękka, zaczerwieniona, bardzo wrażliwa na dotyk i silnie krwawiąca przy dotyku zgłębnikiem [14, 17]. Stwierdzono związek między obecnością płytki bakteryjnej a nasileniem przerostu dziąseł [17, 19]. Zaobserwowano, że podczas przyjmowania roztworu cyklosporyny przerost dziąseł pojawiał się szybciej i obszerniej niż podczas zażywania kapsułek. Stwierdzono wyższe stężenie cyklosporyny w ślinie u pacjentów przyjmujących cyklosporynę w formie płynnej, aniżeli w kapsułkach [11]. Nadziej napawają badania wykonane na przełomie 2007 r. i 2008 r., które wykazały, że występowanie i nasilenie przerostu dziąseł po stosowaniu takrolimusu i sirolimusu jest mniejsze w porównaniu z cyklosporyną A [22]. Lekiem, który w najmniejszym stopniu nasilał przerost dziąseł był sirolimus.

Leczenie DIGO powinno obejmować przede wszystkim rozważenie zmiany leku, na taki, który nie będzie wywoływał przerostu dziąseł [12, 17]. A także higienizację (m.in. częste wizyty kontrolne u stomatologa, regularne usuwanie osadów, kamienia nad- i poddziąsłowego, usuwanie nawisów wypełnień, płukanie jamy ustnej roztworem chlorheksydyny) i resekcyjne leczenie chirurgiczne (gingiwektomię) [10, 12, 17, 18]. Choć w przypadku tego drugiego należy pamiętać o możliwości nawrotów w sytuacji dalszego stosowania leku [12].

Podsumowanie

Coraz częściej lekarz stomatolog może być lekarzem pierwszego kontaktu, który obserwując i badając jamę ustną, skieruje pacjenta na dalsze badania lub do lekarza specjalisty. Ponadto jako pierwszy może zauważyć zmiany w jamie ustnej będące reakcją na stosowaną terapię lekową. Mechanizm powstawania efektów ubocznych leków nie jest do końca poznany. Wiadomo, że zarówno kserostomia, jak i przerost dziąseł są ściśle powiązane z przyjmowaniem leku – przerwanie farmakoterapii powoduje cofnięcie zmian, jej ponowienie nawrót. Dlatego w niektórych przypadkach warto rozważyć zmianę leku (np. fenytoinę zastąpić nowszą generacją leków). Przerost indukowany lekami jest uciążliwym,

ale niezagrażającym życiu efektem ubocznym [12]. Dlatego ważne jest, aby wzmoczyć w tej sytuacji higienę, która zmniejszy nasilenie przerostu i spowoduje poprawę jakości życia pacjenta. W przypadku niezadowolającej poprawy należy rozważyć leczenie chirurgiczne (gingiwektomię).

Otrzymano: 2014.09.04 · Zaakceptowano: 2014.09.21

Piśmiennictwo

- Seymour R.A.: Effects of medications on the periodontal tissues in health and disease. *Periodontol.* 2000. 2006, 40: 120–129.
- Wielka-Hojeńska A., Łapiński Ł.: Niepożądane działania leków – rodzaje, podział, przyczyny i skutki ekonomiczne. *Farm Pol.* 2010, 66: 275–288.
- Domingues R.S., Ferraz B.F., Greggi S.L., Rezende M.L., Passanezi E., Sant'Ana A.C.: Influence of combined oral contraceptives on the periodontal condition. *J Appl Oral Sci.* 2012, 20: 253–259.
- Hopcraft M.S., Tan C.: Xerostomia: an update for clinicians. *Aust Dent J.* 2010, 55: 238–244.
- Seymour R.A., Rudralingham M.: Oral and dental adverse drug reactions. *Periodontol.* 2000. 2008, 46: 9–26.
- Eveson J.W.: Xerostomia. *Periodontol.* 2000. 2008, 48: 85–91.
- Villa A., Abati S.: Risk factors and symptoms associated with xerostomia: a cross-sectional study. *Aust Dent J.* 2011, 56: 290–295.
- Paul-Stalmaszczyk M.: Zaburzenia w wydzielaniu śliny. W: Piątowska D.: *Zarys kariologii.* Med Tour Press International Wydawnictwo Medyczne, Warszawa 2002, 91–92.
- Guzik Ł., Kamysz E.: Kserostomia – więcej niż suchość w jamie ustnej. *Farm Pol.* 2009, 65: 411–414.
- Lipska W., Galecka-Wanatowicz D., Chomyszyn-Gajewska M.: Przerostowe zapalenie dziąseł – opis przypadków. *Implantoprotetyka.* 2009, tom X, nr 4: 44–47.
- Seymour R.A., Ellis J.S., Thomason J.M.: Risk factors for drug-induced gingival overgrowth. *J Clin Periodontol.* 2000, 27: 217–223.
- Kowalski J.: Lekopochodny przerost dziąseł – przegląd literatury. *Nowa Stomatologia.* 2010, 4: 180–182.
- Kaur G., Verhamme K.M., Dieleman J.P., Vanrolleghem A., van Soest E.M., Stricker B.H., Sturkenboom M.C.: Association between calcium channel blockers and gingival hyperplasia. *J Clin Periodontol.* 2010, 37: 625–630.
- Marshall R.I., Bartold P.M.: A clinical review of drug-induced gingival overgrowths. *Aust Dent J.* 1999, 44: 219–232.
- Bondon-Guitton E., Bagheri H., Montastruc J.L.: Drug-induced gingival overgrowth: a study in the French Pharmacovigilance Database. *J Clin Periodontol.* 2012, 39: 513–518.
- Rees T.D.: Drugs and oral disorders. *Periodontol.* 2000. 1998, 18: 21–36.
- Hallmon W.W., Rossmann J.A.: The role of drugs in the pathogenesis of gingival overgrowth. A collective review of current concepts. *Periodontol.* 2000. 1999, 21: 176–196.
- Camargo P.M., Melnick P.R., Pirih F.Q.M., Lagos R., Takei H.H.: Treatment of drug-induced gingival enlargement: aesthetic and functional considerations. *Periodontol.* 2000. 2001, 27: 131–138.
- Banach J.: Choroby dziąseł modyfikowane przez leki. W: Jańczuk Z., Banach J.: *Choroby błony śluzowej jamy ustnej i przyzębia.* Wyd. III. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2004: 82–83.
- Thomason J.M., Seymour R.A., Ellis J.S.: Risk factors for gingival overgrowth in patients medicated with ciclosporin in the absence of calcium channel blockers. *J Clin Periodontol.* 2005, 32: 273–279.
- Alani A., Seymour R.: Systemic medication and the inflammatory cascade. *Periodontol.* 2000. 2014, 64: 198–210.
- Cota L.O., Aquino D.R., Franco G.C., Cortelli J.R., Cortelli S.C., Costa F.O.: Gingival overgrowth in subjects under immunosuppressive regimens based on cyclosporine, tacrolimus, or sirolimus. *J Clin Periodontol.* 2010, 37: 894–902.

Wykorzystanie biomarkerów apoptozy w profilaktyce schorzeń neurodegeneracyjnych

Anna Strug¹, Martyna Średniawa¹, Maciej Gawlik²

¹ Studentka Oddziału Analityki Medycznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum

² Katedra i Zakład Toksykologii, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum

Adres do korespondencji: Maciej Gawlik, Katedra i Zakład Toksykologii, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków, e-mail: mfgawlik@cyf-kr.edu.pl

The use of biomarkers of apoptosis in the prevention of neurodegenerative diseases

Apoptosis, the process of programmed cell death occurs physiologically and determines quantity of cells in the human body. It may occur by several mechanisms, however the most important are intrinsic and extrinsic pathways. Both pathways activate caspase cascade, which directly leads to cell death. Apoptosis is regulated by pro-apoptotic (Bax, Bak, Bid) and anti-apoptotic proteins (IAPs, Bcl-2, Bcl-xl), which activity is balanced in homeostasis conditions. Increased pro-apoptotic activity in nervous system is the reason of neurodegenerative diseases such as Alzheimer Disease (AD) or Parkinson Disease (PD). They lead to physical and intellectual disability and mainly affect the elderly people. Due to the fact that population is ageing it is essential to understand the mechanisms of disease progression and improvement the diagnostics. Detection of apoptosis biomarkers or changes in balance between pro-apoptotic and anti-apoptotic proteins may accelerate implementation of the prevention and treatment of neurodegenerative diseases, delay the symptoms and improve quality of patients lives.

Keywords: apoptosis, biological markers, neurodegenerative diseases, Alzheimer Disease, Parkinson Disease.

© Farm Pol, 2014, 70(10): 572-578

Wstęp

Schorzenia neurodegeneracyjne, takie jak choroba Alzheimera czy choroba Parkinsona, to postępujące choroby układu nerwowego, w których podstawowym zjawiskiem jest utrata komórek nerwowych, głównie na drodze apoptozy. Objawy związane są z postępującą neurodegeneracją i ich charakter zależy od tego, który obszar układu nerwowego został objęty procesem patologicznym.

Choroby neurodegeneracyjne stanowią jedno z większych zagrożeń dla godnego i samodzielniego życia osób starszych. Problem ten staje się coraz

bardziej aktualny ze względu na fakt, że społeczeństwo Europy i świata się starzeje. Zasadne więc wydaje się wprowadzenie działań profilaktycznych, które mogłyby przyczynić się do zmniejszenia ryzyka zapadania na wcześniej wspomniane schorzenia, ale również opóźnienia ich występowania. Jednym z takich działań może być wykorzystanie biomarkerów apoptozy, jako wskaźników podstawowego procesu patologicznego odpowiedzialnego za neurodegenerację. Narzędzie to w dalszej kolejności może posłużyć do poszukiwania skutecznej terapii dla tych chorób.

W pracy omówiony został proces apoptozy, mechanizmy jego indukcji oraz czynniki wpływające na jego regulację. Szczególną uwagę poświęcono udziałowi apoptozy w rozwoju chorób neurodegeneracyjnych, a w szczególności biomarkerom tego procesu. Omówienie poparto przykładami choroby Alzheimera i Parkinsona.

Apoptoza i mechanizmy jej indukcji

Apoptoza, czyli zaprogramowana śmierć komórki, jest procesem zachodzącym fizjologicznie w organizmie człowieka. Polega na usuwaniu z organizmu komórek, które są niepotrzebne, uszkodzone lub szkodliwe. Apoptoza spełnia ważną rolę w procesie embriogenezy, odnowy, regeneracji oraz inwolucji narządów i eliminowaniu komórek [1].

W stanie homeostazy procesy wytwarzania i utraty komórek równoważą się – w efekcie ich liczba się nie zmienia. Zwiększona odporność komórek na apoptozę może być przyczyną rozwoju chorób nowotworowych lub autoimmunizacyjnych, natomiast nadmierna aktywność apoptotyczna, prowadząca do rozległej śmierci komórek predysponuje do wystąpienia ostrej niewydolności

narządów lub rozwoju przewlekłych chorób degeneracyjnych [2].

Do objawów morfologicznych apoptozy komórki zaliczamy kondensację chromatyny jądrowej, obkurczenie i fragmentację jądra, kondensację cytoplazmy, w końcowym etapie tworzenie się ciałek apoptotycznych [3].

Proces apoptozy może zachodzić na dwóch drogach, które łączą wspólny mechanizm – aktywacja enzymów zwanych kaspazami, która zapoczątkowuje ich kaskadę.

Pierwsza z dróg indukcji apoptozy to droga zewnątrzpochodna, zwana inaczej receptorową. Do jej aktywacji konieczna jest obecność na komórkach receptora, do którego przyłączają się białkowe ligandy. Receptor posiada tzw. domeny śmierci, które umożliwiają agregację i aktywację prokaspazy 8, która następnie pobudza efektorową kaspazę 3.

Drugą możliwością indukcji apoptozy jest droga wewnątrzpochodna, czyli inaczej mitochondrialna. Zachodzi ona poprzez zwiększenie przepuszczalności błony mitochondrialnej przy udziale kaskady kaspaz. Jej aktywacja jest zależna od równowagi między białkami pro- i antyapoptotycznymi. Nadmiar białek proapoptotycznych gromadzących się na zewnątrz błony mitochondrialnej powoduje powstanie w niej porów, przez które do cytoplazmy dostają się AIFs (*apoptosis inducing factor*) oraz cytochrom c. Cytochrom c łączy się z białkiem Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor 1*) indukującym apoptozę oraz prokaspazą 9, aktywując kaspazę 9, a następnie kaspazy efektorowe. Przewaga białek antyapoptotycznych na zewnętrznej błonie mitochondrium zapobiega ucieczce do cytozolu czynników aktywujących apoptozę i dzięki temu komórka jest przed nią chroniona [1, 3, 4].

Regulacja procesu apoptozy

Apoptoza jest procesem regulowanym przez szereg różnorodnych białek, o działaniu zarówno pro-, jak i antyapoptotycznym. Spośród tej grupy zasadniczą rolę odgrywa rodzina białek Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) oraz białko p53, jak również liczna grupa białek z rodziny inhibitorów apoptozy – IAPs (*inhibitors of apoptosis proteins*). Na uwagę zasługują tutaj również kaspazy, które pomimo że nie pełnią w apoptozie roli regulacyjnej, stanowią podstawowy element inicjujący programowaną śmierć komórki. Białka te w dalszej części traktowane są jako biomarkery apoptozy, ze względu na ich bezdyskusyjny wkład w przebieg tego procesu [5].

Kaspazy

Na dzień dzisiejszy znanych jest 14 enzymów z rodziny kaspaz. Są one oznaczane kolejnymi cyframi. Możemy wśród nich wyróżnić kaspazy

inicjatorowe i efektorowe. Pierwsze z nich z reguły rozpoczynają proces apoptozy. Zaliczamy tutaj m.in. kaspazę 8, 9 i 10. Natomiast do kaspaz efektorowych zaliczamy m.in. kaspazę 3, 6 i 7. Indukcja kaspaz w procesie apoptozy ma charakter kaskadowy – aktywacja kaspaz inicjatorowych automatycznie indukuje pobudzenie kaspaz wykonawczych, których działanie prowadzi do destrukcji elementów komórkowych i utworzenia ciałek apoptotycznych [6, 7].

Kaspazy to proteazy cysteinowe, których rola polega na hydrolizie wiązań peptydowych po reszcie kwasu asparaginowego w obrębie kilku rodzajów sekwencji aminokwasowych. Obecne są w cytoplazmie prawie wszystkich komórek w postaci nieaktywnych proenzymów, chociaż należy wspomnieć, że nawet w takiej formie wykazują one pewną aktywność enzymatyczną. Ich aktywacja następuje w wyniku dwóch zachodzących po sobie reakcji enzymatycznych. Pierwsza z nich polega na podziale łańcucha polipeptydowego proenzymu na łańcuch długi i krótki, po którym następuje odcięcie domeny N-końcowej. Podczas drugiej reakcji dochodzi do agregacji dwóch łańcuchów krótkich i dwóch łańcuchów długich, w wyniku czego powstaje aktywny tetramer, posiadający dwa miejsca katalityczne. Agregacja jest możliwa po interakcji dwóch rodzajów sekwencji, które są zawarte w prodomenach kaspaz. Wyróżniamy tutaj domeny efektorowe śmierci – DED (*death effector domain*), występujące w prokaspazie 8 i 10, oraz domeny rekrutacji kaspaz, które zawarte są w prokaspazach: 1, 2, 4, 5 i 9. Aktywacja kaspaz może zachodzić również na skutek proteolizy zależnej od innych kaspaz (mechanizm dodatniego sprzężenia zwrotnego) bądź też w wyniku działania innych enzymów, tj. granzym B lub AIF [6, 7].

Inhibitory apoptozy (IAPs)

Rodzina białek hamujących apoptozę zapobiega śmierci komórki poprzez wiązanie i dezaktywację kaspaz, ale także poprzez tworzenie kompleksów z innymi białkami biorącymi udział w apoptozie, przez co prowadzą do zakłóceń w przekazywaniu sygnału apoptotycznego. Działanie IAPs opiera się głównie na bezpośrednim wiązaniu prokaspazy 3 i 7, co zapobiega ich proteolizie oraz na dezaktywacji inicjatorowej kaspazy 9. Rodzina inhibitorów apoptozy może również działać na zasadzie ligaz ubikwitynowych, które prowadzą do degradacji kaspaz.

IAPs są polipeptydami, które posiadają dwa charakterystyczne motywy sekwencyjne: domenę BIR (*baculoviral IAP-repeat*), znajdującą się w N-końcu oraz palec cynkowy RZF (*Really Interesting New Gene (RING) zinc finger*), zlokalizowany w C-końcu. Domena ta wykazuje aktywność

ligazy E3 ubikwityna-białko. O przynależności do grupy inhibitorów apoptozy decyduje domena BIR. Część białek z grupy IAP wykazuje dodatkową zdolność do zakończenia podziałów komórkowych (surwiwina i białko BRUCE) [5, 8].

Dotychczas u człowieka stwierdzono obecność ośmiu białek IAP, które ze względu na homologię domen BIR i obecność lub brak RZF podzielono na trzy klasy:

- I klasa: XIAP (*X-chromosome binding IAP*), cIAP1 i cIAP2 (*cellular IAP1 i IAP2*), liwina i ILP-2 (*IAP-like protein 2*);
- II klasa: NAIP (*neuronal apoptosis inhibitory protein*);
- III klasa: surwiwina i białko BRUCE.

Cechą charakterystyczną I klasy białek z rodziny IAPs jest obecność domeny RZF. Białka XIAP, cIAP1, cIAP2 cechuje obecność trzech domen BIR, natomiast liwina i ILP2 posiadają tylko jedną domenę BIR [8].

XIAP wykazuje zdolność hamowania inicjatorowej kaspazy 9 oraz kaspaz wykonawczych. Dodatkowo jego domena BIR-2 hamuje aktywność kaspaz 3 i 7. Białko XIAP może również hamować apoptozę w mechanizmie niezależnym od wiązania kaspaz, który zachodzi przy udziale czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (*nuclear factor kappa B*), który warunkuje ekspresję licznych genów antyapoptotycznych.

cIAP1 i cIAP2 hamują aktywność kaspazy 3 i 7. Mogą również wiązać się z TRAF-1 i TRAF-2 (*TNF receptor associated factor*) – białkami adaptorowymi wiążącymi się do TNF-R, i w ten sposób hamować apoptozę na poziomie receptorów błonowych. Efektem jest brak proteolizy prokaspazy 8. Podobnie jak XIAP hamują apoptozę w mechanizmie uzależnionym od NF- κ B [5, 8].

Liwina wykazuje zdolność do hamowania apoptozy na dwóch drogach – receptorowej i mitochondrialnej, poprzez blokowanie kaspazy 3 i 7. Hamuje również aktywność kaspazy 9.

ILP-2 w warunkach *in vitro* hamuje apoptozę poprzez oddziaływanie z kaspazą 9 lub białkiem Bax (*Bcl-2-associated X protein*).

Do II klasy zaliczamy tylko białko NAIP, którego aktywacja jest warunkiem koniecznym do zniesienia aktywności kaspaz efektorowych, uaktywnionych przez prozapalną kaspazę inicjatorową.

Do III klasy IAP zaliczamy dwa białka – surwiwinę i BRUCE. Ich domeny BIR są podobne do domen, jakie występują m.in. u muszek i nicieni, gdzie białka hamujące apoptozę odgrywają bardzo istotną rolę przy kończeniu podziałów komórkowych. Stąd też wniosek, że domena BIR zlokalizowana w IAPs klasy III w mniejszym stopniu niż w białkach klasy I hamuje apoptozę, natomiast wykazuje dosyć znaczny wpływ na podziały komórkowe i odpowiada za ich regulację [8].

Surwiwina hamuje proces apoptozy poprzez dezaktywację kaspaz inicjatorowych i efektorowych, ale wykazuje ona również zdolność regulacji apoptozy niezależnej od kaspaz. Cechą charakterystyczną tego białka jest obecność przy C-końcu motywu α -helikalnego, który reaguje z mikrotubuliną. Właściwość ta umożliwia, poprzez wiązanie się z mikrotubulami wrzeciona mitotycznego, unieczynnić apoptozę zależną od mitochondriów. Surwiwina zapobiega również translokacji białka AIF, którego funkcją jest fragmentacja DNA niezależna od kaspaz. Obok zdolności do hamowania apoptozy surwiwina może również regulować podziały komórkowe, w zależności od zmieniającej się podczas mitozy lokalizacji tego białka [8, 9].

Białko BRUCE wykazuje działanie antyapoptyczne poprzez hamowanie aktywności kaspaz. Jednak działa ono przede wszystkim jako chimeryczny enzym E2/E3, który warunkuje ubikwitynację oraz degradację w proteasomach białek, tj. białko Smac/DIABLO (*second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP-binding protein with low PI*), proteaza serynowa HtrA2/Omi (*high temperature requirement protein A2*) i kaspaza 9. Tak jak już wcześniej wspomniano, odgrywa ono również istotną rolę w utrzymaniu żywotności komórek [8].

Białka z rodziny Bcl-2

Białka Bcl-2 pełnią główną rolę w regulacji apoptozy i dlatego też mogą być z powodzeniem stosowane jako markery dla rozwoju tego procesu.

Wśród rodziny białek Bcl-2 wyróżnia się trzy podrodziny. Pierwsza z nich to podrodzina Bcl-2 (np. Bcl-2, Bcl-xl (*Bcl-extra large*), Bcl-xs, A1), która stanowi grupę inhibitorów apoptozy (z wyjątkiem Bcl-xs). Kolejne dwie podrodziny: Bax (Bax, Bak (*Bcl-2-antagonist/killer*), Bok (*Bcl-2 related ovarian killer*) oraz BH3 (Bad (*Bcl-2-associated death promoter*), Bik (*Bcl-2 interaction killer*), Bid (*BH3 interacting domain death agonist*) pełnią funkcję inicjatorów procesu naturalnej śmierci komórki [2].

Za najsilniejszego inhibitora apoptozy uważa się białko Bcl-2, natomiast najlepiej opisanym promotorem tego procesu jest białko Bax. Aktywność drugiego z nich jest znacznie uzależniona od czynnika transkrypcyjnego p53, jednak nie zawsze aktywność tego genu warunkuje proces apoptozy przy udziale białka Bax [10] (**rycina 1**).

Podczas indukcji apoptozy białka te przemieszczają się do zewnętrznej błony mitochondrialnej, gdzie biorą udział w wytworzeniu wielkiego kanału, zwanego porą zmiany przepuszczalności – PTP (*permeability transition pore complex*), przez który do przestrzeni międzybłonowej dostaje się woda i jony, co w konsekwencji prowadzi do pęknięcia w zewnętrznej błonie mitochondrialnej i uwolnienia

białek proapoptotycznych. Ich rola w procesie apoptozy polega również na regulacji uwalniania cytochromu c i AIF z mitochondriów [7].

Białko p53

Białko p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym, którego rola polega na indukcji lub hamowaniu ekspresji wielu genów. Do genów aktywowanych przez ten czynnik zalicza się m.in. *bax* oraz gen kodujący białko Fas (*TNF receptor superfamily member*), natomiast przykładem genu, którego ekspresja jest hamowana przy udziale białka p53 może być gen *bcl-2* [7, 10].

Czynnik ten sprawuje kontrolę nad istotnymi dla życia komórki funkcjami, tj. podziały komórkowe, indukcja apoptozy czy też aktywacja genów, odpowiedzialnych za naprawę DNA. Białko p53 może występować zarówno w formie aktywnej, jak i nieaktywnej. Czynnik ten, nazywany również „strażnikiem genomu”, tworzy w komórce dimery i tetramery. W prawidłowych warunkach, tj. w komórkach nieuszkodzonych, niestymulowanych do apoptozy, poziom p53 jest niski, natomiast może znacznie wzrosnąć np. w wyniku uszkodzenia DNA [7, 11, 12].

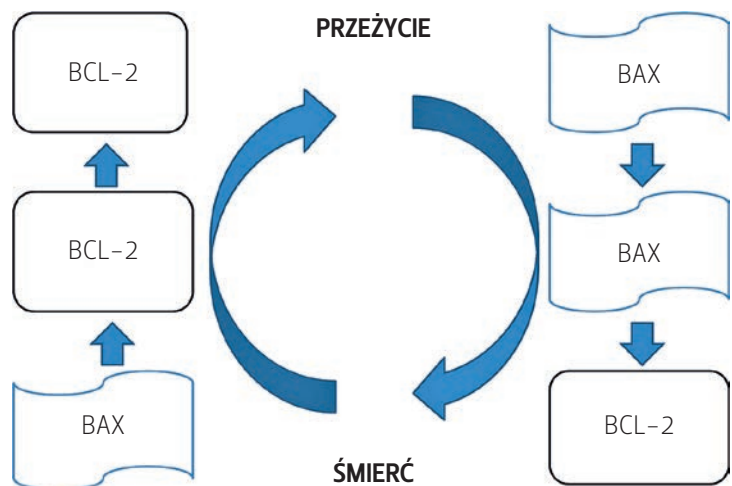
Jedną z hipotez funkcjonowania białka p53 zakłada, że przy niewielkim wzroście jego stężenia pojawiają się dimery, które aktywują geny odpowiedzialne za zatrzymanie cyklu i reparacji DNA, co w konsekwencji prowadzi do zahamowania cyklu komórkowego. Brak naprawy DNA skutkuje dalszym wzrostem stężenia p53 i tworzeniem oprócz dimerów, również tetramerów tego białka, które wiążą się z koaktywatorami. Białko p53 wiąże się również bezpośrednio w miejscach uszkodzonego DNA. Wyżej wymienione postacie białka p53 indukują transkrypcję białek proapoptotycznych, co prowadzi do „włączenia” apoptozy i eliminacji komórek z uszkodzonym materiałem genetycznym [7, 11 12].

Choroby neurodegeneracyjne i wpływ apoptozy na ich patogenezę

Choroba Alzheimer

Choroba Alzheimer jest jedną z poważniejszych chorób wieku starczego, na świecie cierpi na nią ok. 20 milionów osób, najczęściej po 65 roku życia. Ze względu na zauważalne starzenie się społeczeństwa liczba chorych może podwajać się w ciągu 5 lat. Najważniejszym czynnikiem ryzyka choroby jest wiek. Szacuje się, że dotyka ona 5% ludzi w wieku 65-74 lat, 20% w wieku 74-80 lat i 33-50% powyżej 90 roku życia [13, 14].

Do najważniejszych objawów choroby Alzheimer należy stopniowa utrata pamięci i towarzyszące jej zaburzenia funkcji poznawczych (upośledzenie



Rycina 1. Białka regulujące proces apoptozy

myślenia, zrozumienia, mowy, liczenia, orientacji przestrzennej, niezdolność do wykonywania prostych czynności życia codziennego). Chorobie towarzyszą także objawy psychiatryczne oraz zaburzenia zachowania (depresja, lęk, urojenia, pobudzenie, agresja słowna i fizyczna, zmiany osobowości). Dochodzi również do utraty masy ciała, upośledzenia odporności, a co za tym idzie – zwiększonego ryzyka infekcji, w szczególności układu oddechowego. W miarę rozwoju choroby zaburzenia prowadzą do niesamodzielności i całkowitego uzależnienia od innych osób, rodziny i opiekunów [13, 15].

Choroba Alzheimer jest schorzeniem neurodegeneracyjnym, przebiegającym z tworzeniem położonych zewnątrzkomórkowo blaszek starczych, wewnątrzkomórkowym zwyrodnieniem włóknikowym neuronów, zanikiem synaps i neuronów oraz z powstaniem odczynu zapalnego [14].

Najważniejszą rolę w patomechanizmie rozwoju choroby przypisuje się nadmiernemu powstawaniu białka β -amyloidu ($A\beta$) i odkładaniu się w postaci blaszek, co wynika z nierównowagi w procesach powstawania i usuwania $A\beta$ z komórki. Amyloid β stanowi rdzeń blaszki, oprócz niego w skład blaszki wchodzi inne białka. Wokół rdzenia gromadzą się dystroficzne neuryty, reaktywne astrocyty i komórki mikrogleju, świadczące o toczącym się procesie zapalnym. Komórki te mogą być również dodatkowym źródłem białka prekursorowego amyloidu APP (*amyloid precursor protein*) oraz cytokin prozapalnych, wolnych rodników czy tlenu azotu, które działają cytotoksycznie, uszkadzając błony komórkowe. $A\beta$ powstaje z białka prekursorowego amyloidu w procesie proteolizy, przy udziale sekretaz. Produktem cięcia APP przez α - i γ -sekretazy są związki nieamyloidogenne, natomiast jeśli proteoliza zachodzi przy udziale β -sekretazy, to powstają cząsteczki $A\beta$, przy czym najbardziej toksyczny jest $A\beta_{42}$. Jest przyczyną

uszkodzenia synaps, zaburzeń homeostazy wapnia, powstawania wolnych rodników oraz indukcji apoptozy komórek nerwowych, wokół których się gromadzi [13, 14, 16] (**rycina 2**).

Istotną rolę w patogenezie choroby Alzheimera przypisuje się również białku tau. Jest to fosfoproteina wiążąca mikrotubule MAP (*microtubule-associated protein*), której głównym zadaniem jest składanie i stabilizacja mikrotubul, co ma znaczenie w prawidłowym funkcjonowaniu cytoszkieletu. Do enzymów odpowiadających za regulację fosforylacji białka tau należą kinazy i fosfatazy. W wyniku zaburzenia równowagi między nimi dochodzi do jego hiperfosforylacji, co powoduje zmniejszenie powinowactwa do mikrotubul i braku stabilizacji cytoszkieletu. Hiperfosforylowane białko tau nie może być katabolizowane w komórce i odkłada się wewnątrzkomórkowo w postaci splotów wewnątrzneuronalnych NFT (*neurofibrillary tangles*) [17, 18].

Nadmierne gromadzenie się złożeń białek w postaci blaszek A β oraz splotów wewnątrzneuronalnych białka tau nasila wydzielanie reaktywnych form tlenu i czynników prozapalnych, przyczynia się do aktywacji apoptozy komórek nerwowych, co prowadzi do wtórnej neurodegeneracji.

Apoptoza w chorobie Alzheimera zachodzi na obu omówionych wcześniej szlakach, przy czym uważa się, że droga mitochondrialna spełnia większą rolę w patogenezie. Zaangażowane w ten proces są białka proapoptotyczne z rodziny Bcl-2 oraz białko p53. Zwiększając przepuszczalność błony mitochondrialnej, prowadzą do uwolnienia czynników zapoczątkowujących kaskadę kaspaz, indukując w ten sposób śmierć komórki. Na funkcje

energetyczne komórki wpływają także bezpośrednio A β oraz białko tau. A β hamuje aktywność kompleksu IV łańcucha oddechowego, natomiast białko tau powoduje zaburzenie funkcji mikrotubul. Fizjologicznym zadaniem mikrotubul jest transport mitochondriów w miejsca o zwiększonym zapotrzebowaniu energetycznym, czyli do obszarów synaptycznych. Białko tau zmniejsza więc przebieżność synaptyczną. Według badaczy białka szoku cieplnego Hsps (*heat shock proteins*) mogą mieć działanie ochronne na mitochondria, poprzez zmniejszenie wpływu A β na łańcuch oddechowy, a także poprzez zmniejszenie agregacji białka tau [14].

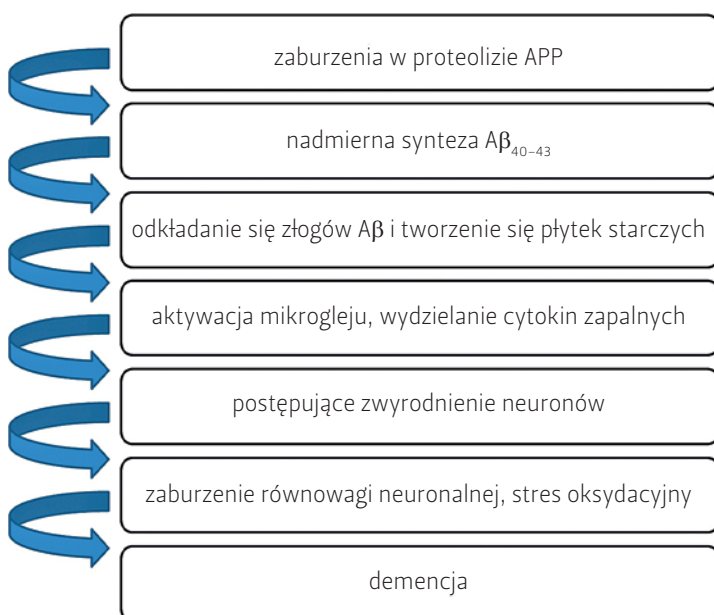
Choroba Parkinsona

Choroba Parkinsona jest schorzeniem neurodegeneracyjnym dotyczącym 2–3% populacji po 65 roku życia. W jej przebiegu możemy wyróżnić charakterystyczne zmiany morfologiczne w postaci zwyrodnienia neuronów dopaminergicznych, w części zbitej istoty czarnej oraz neuronów monoaminergicznych w pniu mózgu. Drugą zmianą morfologiczną charakterystyczną dla tego schorzenia jest obecność w cytoplazmie neuronów, tzw. ciał Lewy'ego (okrągłe wtręty zawierające m.in. białka, takie jak: parkina, ubikwityna, α -synukleina).

Objawy choroby Parkinsona są wynikiem obniżenia poziomu dopaminy w obrębie prążkownia oraz zaburzenia równowagi pomiędzy różnymi układami neuroprzekazników. Do najbardziej charakterystycznych objawów klinicznych zalicza się: sztywność mięśni, drżenie spoczynkowe, bradykinezę oraz zaburzenia postawy ciała [14, 16].

Do ważnych czynników prowadzących do uszkodzenia neuronów dopaminergicznych w chorobie Parkinsona należy zaliczyć: zaburzenie homeostazy jonów Ca⁺⁺, agregacja białka synukleiny, stres oksydacyjny oraz upośledzenie funkcji mitochondriów. Wszystkie te procesy prowadzą w konsekwencji do ekscytotoksyczności, apoptozy i autofagii. Stąd też wniosek, że proces apoptozy odgrywa kluczową rolę w procesie neurodegeneracji w chorobie Parkinsona [14, 19].

Jednym ze wspomnianych już wcześniej czynników prowadzących do apoptozy jest nadmiar jonów Ca⁺⁺ w komórce. Ich zbyt wysokie stężenie może w sposób bezpośredni lub pośredni aktywować transkrypcję tzw. „genów śmierci”, jak również wiele enzymów, m.in. fosfolipazę A₂, syntazę tlenu azotu oraz szereg proteaz i kinaz białkowych zależnych od wapnia. Udowodniono, że w tym przypadku uszkodzenie komórek nerwowych zachodzi głównie na drodze ekscytotoksyczności, zachodzącej za pośrednictwem receptora NMDA (*N-methyl-D-aspartate receptor*) układu glutaminianergicznego, który charakteryzuje się wysoką przewodnością dla jonów wapnia [14].



Rycina 2. Prawdopodobna kolejność zmian zachodzących w chorobie Alzheimera

W patogenezie choroby Parkinsona istotną rolę odgrywają również agregaty α -synukleiny, które stanowią główny składnik ciał Lewy'ego. Związane są one głównie z postacią rodzinną tego schorzenia. α -Synukleina w stężeniu fizjologicznym, wykazuje działanie ochronne na neurony, chroniąc je przed działaniem czynników szkodliwych, takich jak: stres oksydacyjny czy hipoksja. Prawidłowa postać tego białka zmniejsza aktywność kaspazy 3 zależnej od białka p53, natomiast różnego rodzaju toksyny znoszą jej właściwości antyapoptotyczne. Wysokie stężenie α -synukleiny, które może być wynikiem nadmiernej ekspresji lub mutacji genu, wpływa cytotoksycznie na komórki nerwowe poprzez wpływ na białka z rodziny Bcl-2 oraz produkcję tlenu azotu. Mutacja punktowa w genie kodującym białko α -synukleinę powoduje rzadką postać rodzinną choroby Parkinsona, PARK 1, natomiast podwojenie lub potrójenie locus genu kodującego to białko jest przyczyną innej dominującej, dziedzicznej postaci rodzinnej choroby Parkinsona, PARK 4. α -Synukleina prowadzi również do zaburzenia homeostazy wapnia w komórkach, co w sposób pośredni lub bezpośredni może aktywować proces apoptozy w neuronach [14, 16, 20, 21].

Zwyrodnienie neuronów dopaminergicznych w chorobie Parkinsona jest również wynikiem upośledzenia funkcji mitochondriów. Wśród czynników uszkadzających te organelle komórkowe wyróżnić można toksyny blokujące łańcuch oddechowy oraz czynniki indukujące stres oksydacyjny. Ich działanie prowadzi do zaburzenia produkcji energii w komórce. Najczęściej dochodzi tutaj do upośledzenia działania pompy sodowo-potasowej, czego skutkiem jest obniżenie potencjału transbłonowego i zwiększenie przepuszczalności błon mitochondrialnych oraz uwolnienie do cytoplazmy aktywatorów apoptozy [14, 22].

Wadliwe funkcjonowanie łańcucha oddechowego mitochondrium prowadzi także do nadmiernego wytwarzania reaktywnych form tlenu, które przy osłabionej ochronie antyoksydacyjnej mogą uszkadzać białka, lipidy i DNA, dokonując nieodwracalnych zmian zarówno w ich strukturze molekularnej, jak i w funkcjach biologicznych. Neurony w porównaniu z innymi komórkami są znacznie bardziej narażone na neurodegeneracyjne działanie stresu oksydacyjnego. Składa się na to kilka przyczyn, m.in. tkanka mózgowa zużywa więcej tlenu niż inne narządy, mózg charakteryzuje się mniejszą aktywnością enzymów antyoksydacyjnych w porównaniu z innymi tkankami, czy też fakt, że neurony posiadają dużą liczbę mitochondriów zlokalizowanych blisko błony komórkowej. W związku z tym, że mitochondrialny łańcuch oddechowy stanowi główne źródło ROS (*reactive oxygen species*), to właśnie te struktury komórkowe są najbardziej

narażone na oksydacyjne uszkodzenia. W warunkach chorobowych mechanizmy odpowiedzialne za usuwanie wolnych rodników (antyutleniające, zmiatacze wolnych rodników) są niewydolne i nie są w stanie ochronić komórek nerwowych przed ich szkodliwym działaniem. Stres oksydacyjny może oddziaływać na przekazywanie sygnałów w komórce poprzez szlak JNK (*c-Jun N-terminal kinases*), przez co indukuje apoptozę w neuronach dopaminergicznych. Końcowym elementem kaskady sygnałowej JNK jest białko c-JUN, które pod wpływem fosforylacji na skutek stresu oksydacyjnego aktywuje transkrypcję genów kodujących białka proapoptotyczne. Do modulatorów aktywności kaskady sygnałowej JNK zalicza się m.in. parkinę, kinazę PINK1 (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN) induced putative kinase 1*) oraz α -synukleinę. Są to białka, których mutacje stwierdzono w rodzinnych postaciach choroby Parkinsona [14, 21, 22, 23].

Czynnikiem warunkującym rozwój choroby Parkinsona może być również mutacja genu parkiny. Jest to najczęstsza przyczyna parkinsonizmu uwarunkowanego genetycznie. Parkina jest enzymem katalizującym reakcje znakowania ubikwityną białek o nieprawidłowej strukturze, przeznaczonych do zniszczenia. Na aktywność parkiny mają wpływ defekty łańcucha mitochondrialnego, jak również stopień jej fosforylacji, który zależy od nasilenia stresu oksydacyjnego w komórce. W warunkach prawidłowych enzym ten pełni rolę ochronną w stosunku do komórek nerwowych, natomiast mutacje jego genu prowadzą do zaburzenia funkcji enzymu. Dochodzi do formowania agregatów białkowych, dysfunkcji komórki i w konsekwencji jej śmierci, również na drodze apoptozy. Około połowa przypadków wcześniej ujawniającego się Parkinsonizmu, dziedzicznego w sposób recesywny, spowodowana jest mutacjami genu PARK 2 (mutacje typu utraty funkcji), który koduje ubikwitynową ligazę parkiny – E3, wchodzącą w skład systemu ubikwityna-proteasom [14, 21].

W parkinsonizmie wywołanym np. przez MPTP (*1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine*) stwierdza się zwiększoną aktywność polimerazy PARP (*poly ADP-ribose polymerase*) i okazuje się, że to właśnie ten enzym odgrywa główną rolę w indukcji procesu apoptozy, niezależnego od kaspaz, do którego dochodzi na skutek uszkodzenia DNA w mechanizmie ekscytotoksyczności lub stresu oksydacyjnego [14].

Podsumowanie

Niezaprzeczanym dowodem na udział apoptozy w patogenezie chorób Alzheimer'a i Parkinsona jest stwierdzenie u osób chorych obecności

biomarkerów tego procesu. U chorych na chorobę Alzheimera wykryto nagromadzenie aktywnej kaspazy 3 (końcowego efektora apoptozy) oraz białka Bim (*Bcl-2 interacting mediator of cell death*), z rodziny Bcl-2. Natomiast u osób z chorobą Parkinsona w części zbitej istoty czarnej stwierdzono znacznie zwiększoną aktywność kaspazy 3 oraz kaspazy 8 w porównaniu z osobami zdrowymi. W przebiegu tej choroby obserwujemy również znaczne obniżenie się poziomu antyapoptotycznego białka Bcl-2, natomiast ponad trzykrotnie zwiększa się ilość proapoptotycznego białka Bax [14].

Biomarkery apoptozy mogą posłużyć do wczesnego wykrywania zmian zwyrodnieniowych neuronów u osób cierpiących na choroby neurodegeneracyjne. Stanowią one narzędzie, które może okazać się skuteczne w hamowaniu ich rozwoju i w konsekwencji złagodzeniu objawów. W celu wykrycia biomarkerów apoptozy stosuje się m.in. metodę immunoenzymatyczną oraz cytometrię przepływową z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych [6].

Opisane w pracy choroby zwyrodnieniowe, pomimo że zostały odkryte ponad 100 lat temu, w dalszym ciągu uważane są za nieuleczalne. W związku z tym, że prowadzą do pełnego inwalidztwa i wymuszają zaangażowanie innych osób w opiekę nad chorymi, choroby te przyjmują wymiar społeczny. Istotne jest więc szczegółowe poznanie przyczyn i mechanizmów ich powstawania, co wpłynie na rozwój metod diagnostycznych służących do ich wykrywania i różnicowania, a także pomoże w doborze skutecznej terapii [13, 14].

Otrzymano: 2014.07.23 · Zaakceptowano: 2014.08.16

Piśmiennictwo

- Smolewski P., Grzybowska O.: Regulacja procesu apoptozy komórek w celach terapeutycznych – dotychczasowe doświadczenia i perspektywy rozwoju. *Acta Haematol Pol* 2002, 33: 393–401.
- Rupniewska Z., Bojarska-Junak A.: Apoptoza: Przepuszczalność błony mitochondrialnej i rola pełniona przez białka z rodziny Bcl-2. *Postepy Hig Med Dosw.* 2004, 58: 538–547.
- Stępień A., Izdebska M., Grzanka A.: Rodzaje śmierci komórki. *Postepy Hig Med Dosw.* 2007, 61: 420–428.
- Kopaczewska M., Kopaczewski B.: Apoptoza – genetycznie zaprogramowana śmierć komórki. *Now Lek* 2004, 73(5): 389–392.
- Grzybowska-Izydorczyk O., Smoleński P.: Białka inhibitorowe apoptozy z rodziny inhibitorów apoptozy (IAP) i ich antagoniści: rola biologiczna oraz potencjalne znaczenie w karcinogenezie i celowanej terapii przeciwnowotworowej. *Acta Haematol Pol* 2009, 40(3): 593–612.
- Rudnicka K. W., Szczęsna E., Miszczyk E., Mikołajczyk-Chmiela M.: Apoptoza i autofagia – mechanizmy i metody detekcji. *PBK*, 2011, 38(2): 247–265.
- Kawiak J., Zabel M.: *Seminaria z cytofizjologii. Podręcznik dla studentów medycyny, weterynarii i biologii.* Wyd. Medyczne URBAN & PARTNER, Wrocław 2002.
- Grzybowska-Izydorczyk O., Smoleński P.: Białka inhibitorowe apoptozy z rodziny inhibitorów apoptozy (IAP) i ich antagoniści: rola biologiczna oraz potencjalne znaczenie w karcinogenezie i celowanej terapii przeciwnowotworowej. *Acta Haematol Pol* 2009, 40(3): 593–612.
- Karczmarek-Borowska B., Zmorzyński Sz., Filip A.: Biologiczna rola surwiwiny. *Współczesna Onkol* 2008, 12(10): 437–440.
- Sznarkowska A., Olszewski R., Zawacka-Pankau J.: Farmakologiczna aktywacja supresora nowotworu, natywnego białka p53 jako obiecująca strategia zwalczania nowotworów. *Postepy Hig Med Dosw* 2010, 64: 396–407.
- Wyrobiec G., Rokicki W., Stęplewska K., Kasperczyk J., Stępień-Wyrobiec J., Sabat D., Helewski K.: Białko p53 w niedrobnokomórkowych rakach płuc. *Kardiologia i Torakochirurgia Polska* 2011, 8(1): 77–82.
- Zawacka-Pankau J., Małeńczyk K., Szewarkowska A.: Struktura i regulacja białka p53 w komórce – implikacja w terapii przeciwnowotworowej. *Postepy Hig Med Dosw.* 2010, 64: 78–86.
- Kubis A. M., Janusz M.: Choroba Alzheimera – nowe możliwości terapeutyczne oraz stosowane modele eksperymentalne. *Postepy Hig Med Dosw.* 2008, 62: 372–392.
- Kozubski W., Dorszewska J.: *Apoptoza w chorobach ośrodkowego układu nerwowego.* Wyd. Czelej, Lublin 2008.
- Grabowska-Fudala B., Jaracz K., Smelkowska A., Pniwska J., Buczkowska M.: Obciążenie osób sprawujących opiekę nad osobami z chorobą Alzheimera. Wyniki wstępne. *Now Lek* 2013, 82(2): 25–30.
- Szwed A., Miłowska K.: Rola białek w chorobach neurodegeneracyjnych. *Postepy Hig Med. Dosw* 2012, 66: 187–195.
- Mondragón-Rodríguez S., Perry G., Zhu X., Moreira P. I., Acevedo-Aquino M. C., Williams S.: Phosphorylation of Tau Protein as the Link between Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Connectivity Failure: Implications for Alzheimer's Disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2013: 940603.
- Mondragón-Rodríguez S., Perry G., Zhu X., Boehm J.: Amyloid Beta and Tau Proteins as Therapeutic Targets for Alzheimer's Disease Treatment: Rethinking the Current Strategy. *Int J Alzheimers Dis.* 2012; 2012: 630182.
- Levy O. A., Malagelada C., Greene L. A.: Cell death pathways in Parkinson's disease: proximal triggers, distal effectors and final steps. *Apoptosis* 2009, 14(4): 478–500.
- Kaźmierczak A., Adamczyk A., Benigna-Strosznajder J.: Znaczenie zewnątrzkomórkowej α -synukleiny w molekularnych mechanizmach śmierci komórek. *Postepy Hig Med Dosw.* 2013, 67: 1047–1057.
- Yasuda T., Mochizuki H.: The regulatory role of α -synuclein and parkin in neuronal cell apoptosis; possible implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *Apoptosis*, 2010, 15(11): 1312–21.
- Subramaniam S. R., Chesselet M. F.: Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, 2013, 106–107: 17–32.
- Karpińska A., Gromadzka G.: Stres oksydacyjny i naturalne mechanizmy antyoksydacyjne – znaczenie w procesie neurodegeneracji. Od mechanizmów molekularnych do strategii terapeutycznych. *Postepy Hig Med Dosw.* 2013, 67: 43–53.

Repozycjonowanie leków, czyli jak przekuć porażkę w sukces

Marta Szumilak, Andrzej Stańczak

Zakład Farmacji Szpitalnej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Adres do korespondencji: Marta Szumilak, Wydział Farmaceutyczny UM w Łodzi, Zakład Farmacji Szpitalnej, ul. Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź, e-mail: marta.szumilak@umed.lodz.pl

Wstęp

Poszukiwanie nowych produktów leczniczych jest procesem kosztownym i długotrwałym, trwającym średnio około 14 lat i obciążonym bardzo wysokim ryzykiem niepowodzenia, sięgającym nawet 95% [1]. Szacuje się, że nakłady finansowe poniesione przez firmy farmaceutyczne w trakcie badań rozwojowych nad nowym lekiem innowacyjnym wynoszą obecnie od 800 milionów do 1 miliarda dolarów, z obserwowaną od końca lat 90. tendencją wzrostową [2, 3]. Jednak ani zwiększone nakłady finansowe, ani zastosowanie zaawansowanych technik badawczych nie przekładają się na wzrost ilości oryginalnych produktów leczniczych wprowadzonych na rynek farmaceutyków. W 2010 r. dopuszczono ich zaledwie 21, o 5 mniej niż w 2009 r. [4]. Przyczyn takiej sytuacji upatruje się w konserwatywnym podejściu do procesu odkrywania nowych produktów leczniczych, opierającym się na długim, kosztownym i bardzo ryzykownym procesie identyfikowania celu molekularnego, odgrywającego kluczową rolę w patofizjologii danego schorzenia, a następnie próbach odnalezienia cząsteczki oddziałującej z tymże celem. Takie działania skutkowały w latach 2008–2009 przerwaniem prac w III fazie badań klinicznych nad 55 potencjalnymi kandydatami na nowy lek, wydłużając listę związków, odrzuconych na różnych etapach prac rozwojowych [5]. Powodów niepowodzenia upatruje się także w braku systematycznego, równoległego poszukiwania i oceny dodatkowych punktów uchwytu dla nowych lub obecnych na rynku związków biologicznie aktywnych, co sprzyja poglądom, że niezbędne staje się zastosowanie nowych strategii odkrywania produktów leczniczych, które przyniosłyby wymierne efekty w dużo krótszym czasie i przy mniejszych nakładach finansowych [6].

Drug repositioning, how to transform defeat into success · Drug discovery is a very expensive and long-lasting process. An alternative drug research is exploring new uses of well-known medicines. Therefore many of existing drugs and compounds failed in clinical studies are screened and tested again.

Drug repositioning (also called drug repurposing, drug re-tasking drug re-profiling) is the identification and development of new uses for existing or drugs that have been discontinued in clinical trials. The idea has become a subject of great interest of pharmaceutical companies, and consequently drug repositioning has been transformed from serendipitous process into rational, knowledge-based exhaustive exploration of all possible repositioning opportunities for existing or abandoned agents. Apart from experimental approaches based mainly on high throughput screening, computational methods of drug repositioning are prevailing in putting innovative hypotheses and searching for new therapies in even the most complex areas of medicine. The modern methods of drug repositioning draw upon network analysis of biomedical data, analysis of structural similarity of drugs and similarity of molecular targets. The combination of bioinformatics and cheminformatics approaches is also very common. It is much cheaper and less risky than *de novo* drug design.

Keywords: drug repositioning, drugs discovery, side-effects of drugs, virtual screening, new indication for drugs.

© Farm Pol, 2014, 70(10): 579–587

Istotną rolę odgrywa tutaj repozycjonowanie leków (*repositioning*), które polega na odnalezieniu nowego wskazania terapeutycznego dla związków obecnych na rynku lub dla substancji biologicznie czynnych, które były już poddane badaniom klinicznym, ale z różnych powodów nie przeszły pomyślnie procesu wprowadzenia ich na rynek. Ponowne wdrożenie w cykl badawczo-rozwojowy związków, które przeszły pomyślnie kilka kluczowych etapów, tj. poznana jest ich aktywność

farmakologiczna, profil farmakokinetyczny czy toksyczność, pozwala niezwykle przyspieszyć proces dopuszczania ich do obrotu [7].

Duże zainteresowanie repozycjonowaniem leków pojawiło się na początku lat 90. XX w. jako odpowiedź na ciągle utrzymujący się na wysokim poziomie wskaźnik niepowodzeń we wprowadzaniu do lecznictwa nowych związków biologicznie czynnych. Nie jest to zatem pojęcie nowe. Jednak należy podkreślić, że obecnie całkowicie zmieniło się podejście do tego zagadnienia, ponieważ często przypadkowe odkrycia wyewoluowały w systematyczny, oparty na wiedzy, racjonalny system poszukiwania nowych zastosowań terapeutycznych dla „starych” leków. Repozycjonowanie stało się nieodłączną częścią zarządzania cyklem życia produktu, pochłaniającą od 10% do 50% kosztów ponoszonych przez działy R&D (dział badawczo-rozwojowy, *Research and Development*) firm farmaceutycznych, które, w obliczu znacznych i bardzo drogiego niepowodzeń w zakresie wprowadzania na rynek nowych cząsteczek, musiały poszukać innych rozwiązań pozwalających na maksymalizację zysków przy minimalizacji wydatków [8]. Co ciekawe, zaczęły powstawać również firmy, które specjalizują się w repozycjonowaniu leków [9]. Warto także zauważyć, że wiele bardzo dobrze sprzedających się leków (*blockbusters*) zostało wprowadzonych na rynek dzięki przypadkowemu odkryciu ich właściwości terapeutycznych, niebranych pod uwagę w badaniach klinicznych dla oryginalnego wskazania [10]. Daty zatwierdzenia nowych wskazań pokazują, że najbardziej spektakularne przykłady repozycjonowania miały miejsce jeszcze przed usystematyzowaniem tego procesu, co nastąpiło około 2006 r. Klasyczne przykłady obejmują minoxidil, wstępnie testowany na nadciśnienie, a wprowadzony na rynek jako lek na porost włosów (1988 r.), sildenafil testowany na dusznicę bolesną, a wprowadzony jako lek na impotencję (2005 r.) czy thalidomide, pierwotnie zarejestrowany na poranne mdłości, a repozycjonowany jako lek na szpiczaka mnogiego (2003 r.), pomimo jego teratogenności, która doprowadziła do wycofania go z obrotu [11, 12]. Możliwe że jest jeszcze zbyt wcześnie, żeby ocenić najnowsze projekty oparte na systematycznym repozycjonowaniu, ze względu na wymagania czasowe takich procesów lub z powodu wyczerpania oczywistych kandydatów do repozycjonowania. Warto również zauważyć, że najnowsze przykłady repozycjonowania, to cząsteczki zatwierdzone we wskazaniach, takich jak: przedwczesny wytrysk czy łysienie, które reprezentują niszę na rynku farmaceutycznym [11, 13, 14].

Pomimo licznych sukcesów (tabela 1), także proces repozycjonowania może zakończyć się

niepowodzeniem. Wynika on zarówno z braku oczekiwanej aktywności w nowym wskazaniu, np. bevacizumab, który mimo swej aktywności przeciwnowotworowej w innych typach nowotworów, okazał się nieskuteczny w leczeniu raka żołądka, jak i niedostatecznego rozważenia wszystkich zagrożeń wynikających z natury poddawanej repozycjonowaniu substancji czynnej [15]. Przykładowo, działania niepożądane akceptowane dla leku stosowanego w leczeniu nowotworów, mogą się okazać niedopuszczalne w leczeniu nadciśnienia [16].

Repozycjonowanie leków ma wiele zalet, zarówno z punktu widzenia firm farmaceutycznych, jak i pacjentów. Skracza czas wprowadzenia leku na rynek z 10–17 do 3–12 lat, ze względu na możliwość pominięcia czasochłonnych badań farmakokinetycznych czy procesu optymalizacji cząsteczki wiodącej, a co za tym idzie – istotnie zmniejsza także koszty tego procesu [10]. Ponadto charakteryzuje się istotnie zwiększonym prawdopodobieństwem odniesienia sukcesu w porównaniu z poszukiwaniem leków *de novo*. Ogromny potencjał repozycjonowania tkwi w bibliotekach leków, które z różnych powodów (niedostateczna aktywność w pierwotnym wskazaniu, źle dobrana grupa pacjentów do badania klinicznego czy niedopasowanie do *portfolio* firmy) nie zostały wprowadzone do lecznictwa, a wykazują cechy podobieństwa do leku. Z punktu widzenia pacjenta, zwłaszcza cierpiącego na chorobę rzadką bądź nieuleczalną, repozycjonowanie to nieporównanie większa szansa na efektywną, bezpieczniejszą i często tańszą terapię [24, 25].

Serendipity czy systematyczne poszukiwanie nowych wskazań?

Historycznie repozycjonowanie wyrosło z przypadkowych odkryć różnych kierunków działań leków w późnych fazach badań klinicznych lub po wprowadzeniu na rynek [24]. Z założenia jest ono oparte na hipotezie, że spoglądając od nowa i organizując ponownie naszą wiedzę o lekach, ich mechanizmie działania czy chorobach, możemy odnaleźć nowe wskazania i bardziej skuteczne terapie [6]. W procesie repozycjonowania punktem wyjścia może być sam lek, receptor będący istotnym elementem patogenezы innej choroby, ścieżka sygnałowa, którą lek moduluje, działania niepożądane towarzyszące terapii, a nawet sama choroba, na którą do tej pory leku nie ma [16].

W procesie racjonalizowania i systematyzowania repozycjonowania wyłoniono dwie podstawowe strategie poszukiwania nowych wskazań dla już istniejących leków:

Tabela 1. Wybrane przykłady leków repositionowanych

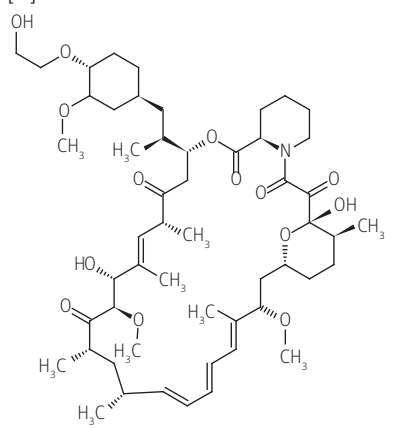
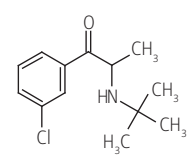
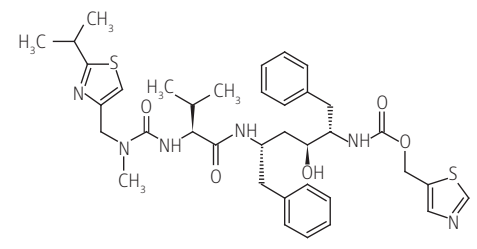
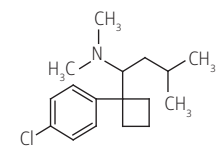
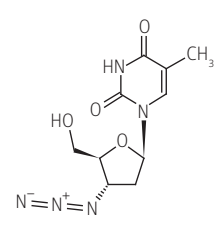
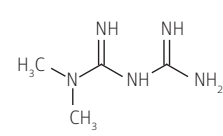
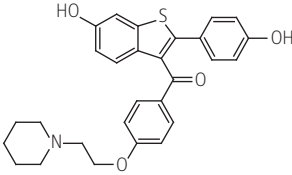
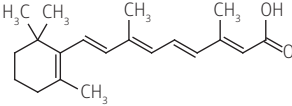
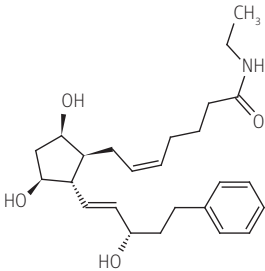
Nazwa leku / Wzór strukturalny	Oryginalne wskazanie	Nowe wskazanie
<p>Everolimus [17]</p> 	immunosupresja	leczenie guzów neuroendokrynych trzustki
<p>Bupropion [18]</p> 	depresja	uzależnienie od nikotyny
<p>Ritonavir [19]</p> 	AIDS	nowotwory
<p>Sibutramine [10]</p> 	depresja	otyłość
<p>Lamivudine [20]</p> 	nowotwory	AIDS
<p>Metformin [21]</p> 	cukrzyca	prewencja chorób nowotworowych

Tabela 1. Wybrane przykłady leków repozycjonowanych (cd.)

Nazwa leku / Wzór strukturalny	Oryginalne wskazanie	Nowe wskazanie
<p>Raloxifene [10]</p> 	rak piersi i prostaty	osteoporoza
<p>Isotretinoiin [22]</p> 	trądzik	ostra białaczka promielocytowa
<p>Bimatoprost [23]</p> 	zaćma	porost rzęs

- strategię *on-target* – polegającą na zastosowaniu leku o znanym mechanizmie działania w nowym wskazaniu, nowej jednostce chorobowej odmiennie od tej, w której był pierwotnie zarejestrowany bądź skupieniu się na kandydatach na leki, które nie przeszły pomyślnie II i III fazy badań klinicznych, ale udowodniono ich bezpieczeństwo stosowania u ludzi [24–26]. Za przykład może tu posłużyć duloxetine, która jako SNRI (inhibitor wychwytu zwrotnego serotoniny i noradrenaliny, *Serotonin Norepinephrine Reuptake Inhibitor*) pierwotnie była testowana w leczeniu depresji. Po tym, jak wykazano, że zwiększenie stężenia 5-HT (5-hydroksytryptamina, *Serotoninum*) i NA (noradrenalina, *Norepinephrinum*) w odcinku krzyżowym rdzenia kręgowego prowadzi do zwiększenia napięcia mięśni cewki moczowej, została ona zarejestrowana w leczeniu wysiłkowego nietrzymania moczu [16];
- strategię *off-target*, czyli odkrywanie nowych mechanizmów działania, nieopisanych jeszcze dla danej molekuly, która wywodzi się z założenia, że wiele leków działa poprzez modulację wielu punktów uchwytu [24–26]. Łamie ona panujące przez lata przekonanie, że najlepsze leki to takie, które działają selektywnie tylko na jeden cel molekularny (teoria klucza i zamka). Wywodzi się z rosnącej wiedzy na temat złożoności

molekularnej chorób i podstaw działania leków, ujawniającej daleko bardziej skomplikowany obraz zjawiska, którego wypadkową jest efekt farmakologiczny. Okazuje się bowiem, że wiele leków wykazuje swoją aktywność terapeutyczną, oddziałując na wiele celów molekularnych. Zjawisko to nosi nazwę polifarmakologii, która łamie paradygmat „jedna choroba, jeden cel molekularny, jeden lek” [27]. Używając przeniósni, można powiedzieć, że istnieje wiele kluczy pasujących do jednego zamka, ale też jeden klucz może otworzyć wiele zamków, co daje podstawy do poszukiwania nowych wskazań dla znanych leków [28].

Systematyczne podejście do repozycjonowania leków wydaje się bardziej rozsądne i dające znacznie lepsze i wyczerpujące wyniki. Pośród metod eksperymentalnych wyróżnia się technologie oparte na badaniach przesiewowych *in vitro*, popularnie nazywanych skринingiem wysokoprzepustowym (*High-Throughput Screening*, HTS), które są wykorzystywane w celu zidentyfikowania nowych celów (*targetów*) molekularnych (receptorów, enzymów, kanałów jonowych, białek transportowych) dla leków już dopuszczonych do obrotu, poszukiwania związków biologicznie aktywnych wywołujących pożądane zmiany w fenotypie komórek, np. inhibicję proliferacji, czy analizy ekspresji genów w celu zidentyfikowania związków mających

podobny profil ekspresji co leki wykorzystywane w leczeniu danej choroby lub przeciwny do tej choroby [29–32]. Ze względu na ekspansywny rozwój bio- i chemoinformatyki dających ciekawe i skuteczne narzędzia służące wyczerpującej identyfikacji wszystkich możliwości repozycjonowania dla większości leków w oparciu o dostępne źródła danych, obok metod *in vitro* i *in vivo*, dominują metody komputerowo wspomaganego repozycjonowania. W dostępnej literaturze można odnaleźć niezliczoną ilość pomysłów i metod repozycjonowania leków, od eksploracji różnorodnych baz danych, po wysublimowane metody biologii molekularnej [9]. Metody te mogą opierać się na analizie właściwości fizykochemicznych i farmakologicznych leku (*drug-centric*) lub znajomości procesów patofizjologicznych leżących u podstaw różnorodnych jednostek chorobowych (*disease-centric*). Jednak większość stosowanych strategii czerpie zarówno z wiedzy na temat leków, jak i chorób [33].

Komputerowo wspomagane repozycjonowanie leków

Eksploracja danych biomedycznych

Nieodłączną częścią nowoczesnych badań naukowych jest analiza danych doświadczalnych zebranych w różnorodnych bazach, umożliwiającą stawianie innowacyjnych hipotez i poszukiwanie nowoczesnych rozwiązań terapeutycznych. Metodologia opierająca się na eksploracji danych jest szeroko używanym narzędziem uzyskiwania nowej wiedzy poprzez wysokosprawny skrining danych chemicznych, biomedycznych oraz informacji z zakresu genetyki i biologii molekularnej, generowanych przez przemysł i ośrodki naukowe [34]. Także literatura naukowa może być rozważana jako niewyczerpane źródło wiedzy biomedycznej [35]. Jednak systematyczna analiza tak licznych informacji zawartych w tekstach naukowych wymaga zastosowania specjalnych narzędzi, które ułatwią poszukiwanie interesujących nas danych, pozwolą na lepsze zrozumienie mechanizmów leżących u podstaw wielu chorób, a także łatwiejsze monitorowanie obszarów medycyny, gdzie możliwe jest tworzenie nowych szans terapeutycznych [36, 37].

Interesującym przykładem metodologii generowania nowych hipotez poprzez szukanie powiązań między pozornie niezwiązanymi ze sobą faktami są odkrycia na bazie literatury (*Literature-Based Discovery*, LBD [38]). LBD opiera się na założeniu, że dwa pozornie niezwiązane ze sobą pojęcia A i B mogą być ze sobą powiązane, jeśli oba są powiązane z trzecim pojęciem C. Ten typ wnioskowania, nazywany modelem ABC, po raz pierwszy zastosowany przez D.R. Swansona, zaowocował odkryciem istotnej roli oleju rybiego w terapii choroby Raynauda [35].

Przykładem nowoczesnego systemu eksploracji danych biomedycznych jest platforma COSS – *Clinical Outcome Search Space™*, stworzona przez firmę Biovista. Czerpie ona dane biomedyczne na temat chorób, związków biologicznie aktywnych, notowanych działań niepożądanych, celów molekularnych czy ścieżek sygnałowych z różnorodnych baz danych, m.in. z bazy PubMed. Stosując zaawansowane algorytmy wnioskowania, poszukuje korelacji i często ukrytych powiązań, które pozwalają generować informacje na temat domniemanego mechanizmu działania leków, nowych wskazań czy potencjalnych działań niepożądanych [36].

Pomysły i kierunki repozycjonowania można także czerpać z analizy elektronicznej dokumentacji medycznej (EDM) (*Electronic Health Records*, EHRs), czyli zbioru danych przechowującego indywidualną bądź zbiorczą dokumentację medyczną. Zawiera ona dane ogromnej populacji pacjentów, zbierane w długim okresie. Wgląd w setki tysięcy obserwacji klinicznych pozwala na głębsze zrozumienie mechanizmów oddziaływania leków na pacjentów poprzez obserwowanie zmian w diagnozach, progresji choroby czy wynikach badań laboratoryjnych. Analiza tych danych pozwala także na detekcję nowych, niepożądanych działań leków. Ma to ogromny wpływ na proces odkrywania nowych wskazań dla już istniejących produktów leczniczych, efektywniejszą terapię i poprawienie profilu bezpieczeństwa leków [39].

Efektywnym narzędziem repozycjonowania jest także retrospektywna analiza danych z badań klinicznych. W przeszłości badania kliniczne nad nowym lekiem zakończone niepowodzeniem prowadziły najczęściej do odłożenia go na półkę i istotnego zwiększania ogólnych kosztów, jakie ponosiła firma chcąc wprowadzić lek na rynek. Liczne przykłady wskazują, że niepowodzenie w badaniach klinicznych niekoniecznie musi oznaczać zaprzestanie wielu lat badań nad daną substancją czynną. Nieoczekiwane przez badaczy efekty potencjalnego leku mogą być bowiem początkiem prób jego wdrożenia w nowym wskazaniu. Ponowna, szczegółowa analiza danych, inne spojrzenie na wyniki badań mogą prowadzić do zaskakujących wniosków, pozwalających na wykorzystanie potencjału badanej substancji czynnej na innym polu terapeutycznym. Przykładem tego może być lamivudine, której nie udało się wprowadzić na rynek jako leku przeciwnowotworowego, a w efekcie została zarejestrowana w leczeniu AIDS (zespół nabytego niedoboru odporności, *Acquired Immunodeficiency Syndrome* lub *Acquired Immune Deficiency Syndrome*) [40].

Analiza podobieństwa chemicznego leków

Struktura i właściwości fizykochemiczne związków są bez wątpienia powiązane z ich aktywnością

biologiczną. Zatem leki można repozycjonować, analizując ich podobieństwo chemiczne. Naukową podstawą tej strategii jest znany powszechnie QSAR (ilościowa zależność pomiędzy strukturą a aktywnością, *Quantitative Structure-Activity Relationship*). Polega ona na eksponowaniu zestawu cech chemicznych dla każdej substancji biologicznie czynnej w określonej grupie i tworzenie na tej podstawie sieci podobieństw. Chociaż nie zawsze podobne strukturalnie molekuly zachowują się tak samo w układach biologicznych, to, wnioskując w oparciu o proste podobieństwo chemiczne lub poszukując szczególnych cech biologicznych tych związków wynikających z podobieństwa strukturalnego, można wydajnie metodami obliczeniowymi repozycjonować leki [41].

Inna metoda, zaproponowana przez M. J. Keisera, polega na scharakteryzowaniu celu molekularnego poprzez zestaw znanych, wiążących się z nim ligandów. Wyznaczając sumę strukturalnego podobieństwa pomiędzy kandydatem na lek a znanymi ligandami, można ocenić teoretyczny związek między docelowym miejscem działania a substancją aktywną. Wyznaczone w ten sposób możliwości interakcji pomiędzy nowym potencjalnym ligandem a poddawanym analizie punktem uchwytu wymagają dalszej weryfikacji w badaniach *in vitro* i na modelach zwierzęcych [42].

Słabym punktem metod opierających się na analizie struktur chemicznych może być niska jakość tychże struktur. Ponadto należy mieć na uwadze, że efekt terapeutyczny leku nie może być przewidywany tylko na podstawie jego budowy chemicznej, ponieważ w układach biologicznych zazwyczaj podlega on kompleksowym i często trudnym do przewidzenia zmianom metabolicznym i farmakokinetycznym [6].

Analiza podobieństw aktywności molekularnej

Inną strategią, która odgrywa istotną rolę w racjonalnym repozycjonowaniu leków jest komputerowa analiza podobieństw profili molekularnych. Bazuje ona na danych eksperymentalnych pochodzących z badania ekspresji genów metodą mikromacierzy i polega na tworzeniu profili ekspresji genów, występujących np. w liniach komórek nowotworowych *in vitro*, poddawanych działaniu określonych substancji czynnych, w różnych stężeniach. Są to swoiste podpisy aktywności molekularnej tych związków, zebrane w bazie cMAP (mapa połączeń, *Connectivity Map*). W ten sposób można także uzyskiwać dane o zmianach ekspresji genów występujących w określonych jednostkach chorobowych. Zestawianie tych informacji i analiza podobieństw profili może służyć jako podstawa do wyznaczania powiązań leków między sobą.

Ciekawym przykładem ilustrującym ten rodzaj poszukiwań w obszarze repozycjonowania jest metoda *Mode of Action by NeTwoRk Analysis* (MANTRA), opracowana przez F. Iorio, oparta na analizie profili ekspresji genów w komórkach eksponowanych na różne substancje biologicznie aktywne, pozwalająca na przewidywanie mechanizmu działania leku i poszukiwania na tej podstawie nowych wskaźników. Dzięki tej metodzie prawidłowo przewidziano mechanizm działania dziewięciu związków przeciwnowotworowych oraz zweryfikowano nieoczekiwane podobieństwo inhibitorów cyklozależnej kinazy 2 i inhibitorów topoizomerazy. Ponadto odkryto, że fasudil, będący inhibitorem kinazy Rho, może być repozycjonowany jako induktor komórkowej autofagii, co stwarza możliwość zastosowania go w chorobach neurodegeneracyjnych [31].

Innym sposobem wykorzystywania cMAP do repozycjonowania leków jest bezpośrednie porównywanie profili aktywności molekularnej leków z profilami charakterystycznymi dla określonych jednostek chorobowych. Poszukuje się związków biologicznie aktywnych, dla których obserwowana jest silna ujemna korelacja pomiędzy profilami aktywności molekularnej, wywołanych ich działaniem, a profilem ekspresji genów charakterystycznym dla choroby, co pozwala na ustalenie powiązań terapeutycznych pomiędzy lekami i chorobami nawet wówczas, gdy mechanizm działania leku czy jego cel molekularny nie są do końca poznane. G. Wei i wsp. z powodzeniem zastosowali tę metodę do zidentyfikowania zdolności modulowania oporności na glikokortykosteroidy w ostrej białaczce szpikowej przez inhibitor mTOR (kinaza serynowo-treoninowa, *mammalian target of rapamycin*), jakim jest sirolimus [43].

Metodyka ta ma swoje słabe punkty, bazuje bowiem na danych o ekspresji genów pochodzących z izolowanych linii komórkowych, które mogą nie odzwierciedlać prawidłowo aktywności biologicznej związków w organizmie jako całości. Ponadto nie bierze się tu pod uwagę, że leki podlegają licznym transformacjom metabolicznym *in vivo* i czasem ich metabolity odpowiadają za aktywność terapeutyczną. Nie mniej istotny jest fakt, że liczne choroby mają niezwykle złożoną patogenezę, której nie może reprezentować pojedynczy „podpis” aktywności molekularnej [6].

Dokowanie molekularne

Dokowanie molekularne, powszechnie wykorzystywane w projektowaniu leków, może również być narzędziem repozycjonowania. Metoda ta pozwala przewidywać sposoby wiązania oraz powinowactwo ligandu do miejsca wiążącego receptora białkowego, co umożliwi prognozowanie także interakcji między nowymi celami molekularnymi

a znanymi już lekami. Ograniczenia tej metody wynikają z potrzeby dysponowania trójwymiarowymi strukturami, zarówno związku będącego ligandem, jak i receptora, czyli celu molekularnego. Obecnie struktury wielu istotnych biologicznie białek nie są do końca poznane, np. całe rodziny receptorów sprzężonych z białkiem G (GPCRs, *protein-coupled receptors*), które stanowią atrakcyjny cel molekularny wielu leków wprowadzonych do lecznictwa. Pułapkę mogą stanowić także wyniki fałszywie dodatnie, będące efektem nieprawidłowo przeprowadzonego modelowania oddziaływań na poziomie atomowym i błędów w strukturach receptorów [6].

Analiza działań niepożądanych

Ciekawą metodologią repozycjonowania leków jest metoda *Drug Repositioning based on the Side Effectome* (DRoSEf). Opiera się ona na koncepcji, że działania niepożądane i wskazania dla danego leku są mierzalną, behawioralną i fizjologiczną zmianą pojawiającą się w odpowiedzi na leczenie danym lekiem. Jeśli leczenie daną substancją czynną i sama choroba dają podobne objawy niepożądane, wskazywać to może, że podstawą występowania działań niepożądanych i objawów choroby jest ten sam mechanizm (MOA mechanizm działania, *mechanism-of-action*). A zatem działania niepożądane mogą służyć, jako marker fenotypowy dla danej choroby. Przykładowo infekcje cytomegalowirusem są sygnałem osłabionego układu immunologicznego. Leki osłabiające układ odpornościowy używane są w celu zapobiegania odrzutom przeszczepów. Z tego wynika, że leki które w liście działań niepożądanych mają zwiększone ryzyko infekcji cytomegalowirusem, mogą być dobrymi kandydatami do leczenia pacjentów z przeszczepami. Przykładem takiego leku jest methotrexate, lek przeciwnowotworowy używany poza wskazaniami (*off label use*) w transplantologii [44].

Repozycjonowanie szansą dla pacjentów cierpiących na choroby sieroce

Choroby sieroce (leki stosowane w rzadkich chorobach genetycznych, *orphan drugs*) dotyczą ok 5–7% populacji. W porównaniu do takich chorób, jak cukrzyca czy miażdżycy reprezentują mały rynek dla przemysłu farmaceutycznego, długo zaniedbywany i niedoceniany [45]. Ponieważ przewidywany poziom sprzedaży produktów leczniczych umożliwiających terapię rzadkich chorób jest niski, firmom farmaceutycznym nie oplaca się opracowywać nowych sposobów diagnozowania i leczenia takich schorzeń. Status leku sierociego jest zarezerwowany dla leków, które są stosowane w leczeniu bardzo rzadkich chorób, gdzie pełny

program badań klinicznych nie zawsze jest możliwy ze względu na ograniczoną populację chorych na daną chorobę, więc badania tych leków nie zawsze mogą spełnić rygorystyczne wymagania wobec pozostałych leków. Z drugiej strony, ze względu na brak innych skutecznych terapii w tych jednostkach chorobowych i ich bardzo poważny przebieg, leki te są pożądane na rynku. Obecnie uważa się, że choroby sieroce stanowią atrakcyjną niszę dla firm farmaceutycznych. Służy temu ogłoszony w 1983 r. w USA „Orphan Drug Act”, którego celem było stworzenie dogodnych warunków do prowadzenia badań i rozwoju leków sierocych, stosowanych w leczeniu rzadkich chorób. Od tego czasu wprowadzono do lecznictwa 400 leków leczących choroby rzadkie [46]. Liczne udogodnienia, np. odrębny okres wyłączności obrotu na rynku, zmniejszenie lub zwolnienie z opłat rejestracyjnych, doradztwo ze strony organów rejestrujących leki, granty państwowe i ulgi podatkowe powiązane z kosztami poniesionymi na prace badawczo-rozwojowe (USA), ścieżki przyspieszonego dopuszczania do obrotu, automatyczny dostęp do procedury rejestracji centralnej, stanowią zachętę dla firm i sponsorów [47]. Ponadto leki sieroce generują znaczne dochody, mimo niewielkiego rynku. Jednym z najbardziej spektakularnych przykładów leku repozycjonowanego do leczenia chorób sierocych jest imatinib, zarejestrowany aż w siedmiu wskazaniach onkologicznych mających status chorób sierocych [48].

Repozycjonowanie a ochrona własności intelektualnej

Niektóre duże firmy farmaceutyczne są nie do końca przekonane, co do wartości repozycjonowania jako szansy na zwiększenie zysków i zwrot kosztów poniesionych na badania [49]. Średni czas wyłączności nowego leku na rynku dramatycznie się skrócił, z ponad 10 lat w latach 70. XX w. do mniej niż dwóch w latach 90., a dodatkowe wskazanie przedłuża go tylko o rok [47]. Poza tym, uzyskanie ochrony patentowej na dodatkowe wskazanie jest problematyczne, nawet wówczas, kiedy wyjaśniony jest szczegółowo nowy mechanizm działania. Dużo łatwiej o patent, gdy nowo odkryta ścieżka lek-cel molekularny-choroba jest unikalna. Należy jednak pamiętać, że gdy wygasa już ochrona patentowa wynikająca z pierwotnego wskazania, a na rynku dostępne są leki generyczne, nawet patent na dodatkowe wskazanie nie daje gwarancji, że lekarze nie będą stosować tańszych generyków *off label* i w ten sposób uszczuplać zysków firmy [49]. Innym problemem jest brak ekspertów, którzy w fachowy i rzetelny sposób potrafiliby rozstrzygnąć wszelkie niejasności w zakresie formalnych aspektów

ochrony własności intelektualnej i przemysłowej w obszarze repozycjonowania leków [50].

Podsumowanie

Repozycjonowanie leków stanowi odmienną strategię poszukiwania nowych terapii, dużo tańszą i obciążoną mniejszym ryzykiem niepowodzenia niż poszukiwanie leków *de novo*. Kluczem do sukcesu repozycjonowanego leku jest pewność, że nowe wskazanie będzie zaspokajało całkowicie odmienne potrzeby zdrowotne pacjentów i nie będzie stanowić konkurencji dla wskazania pierwotnego. Ten sposób poszukiwania wartościowych leków niesie ze sobą dużo korzyści, zarówno dla firm farmaceutycznych, jak i dla pacjentów, zwłaszcza cierpiących na choroby rzadkie lub zaniechane. Otwiera ponownie drzwi rynku farmaceutycznego dla wielu substancji biologicznie czynnych, które z różnych powodów nigdy nie miałyby szansy być ponownie stosowane w terapii, tak jak np. thalidomide. Nowoczesne repozycjonowanie to systematyczny, oparty na wiedzy proces, który korzysta z dobrodziejstw nowoczesnej bio- i chemoinformatyki, choć wymaga również badań *in vitro* i *in vivo*. Nie zawsze kończy się sukcesem, ale na pewno jest przyszłością i szansą zarówno dla rynku farmaceutycznego, jak i dla pacjentów.

Otrzymano: 2014.08.04 · Zaakceptowano: 2014.08.15

Piśmiennictwo

1. U.S. Department of Health & Human Services, National Institutes of Health. Rescuing and Repurposing Drugs. <http://www.ncats.nih.gov/research/reengineering/rescue-repurpose/rescue-repurpose.html> (stan z 29.12.2013).
2. Adams C.P., Brantner V.V.: Estimating the cost of new drug development: Is it really 802 million dollars? *Health Aff.* 2006, 25: 420–28.
3. DiMasi J.A., Hansen R.W., Grabowski H.G.: The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J. Health Econ.* 2003, 22: 151–85.
4. Rybiński K.: Raport zespołu ekspertów Uczelni Vistula w Warszawie. Lider projektu: Raport go global! Polish Pharma. Raport o innowacyjności polskiego sektora farmaceutyczno-medycznego. <http://headmaster.pl/wp-content/uploads/polpharma-1.pdf> (stan z 29.12.2013).
5. Jarvis L.M.: Teaching an old drug new tricks. *Chem. Eng. News* 2006, 84: 54–5.
6. Dudley J.T., Deshpande T., Butte A.J.: Exploiting drug-disease relationships for computational drug repositioning. *Brief Bioinform.* 2011, 12: 303–11.
7. Cavalla D.: Retrospective clinical analysis for drug rescue: for new indications or stratified patient groups. *Drug Discov. Today* 2012, 17: 104–9.
8. Reilly T., Yost N.: Drug repositioning. *Res. Dev. Strat. Drug Discov.* 2006, 2: 10–2.
9. Sanseau P.: Computational methods for drug repurposing. *Brief Bioinform.* 2011, 12: 301–2.
10. Ashburn T.T., Thor K.B.: Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2004, 3: 673–83.
11. Novac N.: Challenges and opportunities of drug repositioning. *Trends Pharmacol. Sci.* 2013, 34: 267–72.
12. Ladizinski B., Shannon E.J., Sanches M.R., Levis W.R.: Thalidomide and analogues: potential for immunomodulation of inflammatory

and neoplastic dermatologic disorders. *J. Drugs Dermatol.* 2010, 9: 814–26.

13. McMahon C.G.: Dapoxetine: a new option in the medical management of premature ejaculation. *Ther. Adv. Urol.* 2012, 4: 233–51.
14. Khidhir K.G., Woodward D.F., Farjo N.P. et al.: The prostamide-related glaucoma therapy, bimatoprost, offers a novel approach for treating scalp alopecias. *FASEB J.* 2013, 27: 557–67.
15. Kang H., Kauh J.S.: Chemotherapy in the treatment of metastatic gastric cancer: is there a global standard? *Curr. Treat. Options Oncol.* 2011, 12: 96–106.
16. Li Y.Y., Jones S.J.M.: Drug repositioning for personalized medicine. *Genome Med.* 2012, 4: 27–41.
17. McCook A.: FDA Okays Everolimus for Rare Type of Pancreatic Cancer. http://www.medscape.com/viewarticle/742274?src=stan_z28.01.2014.
18. FDA Center for Drug Evaluation and Research. Approval package for Wellbutrin Tablets. http://www.fda.gov/cder/foi/nda/96/018644a_s010_s012_s013pdf (stan z 29.01.2014).
19. Batchu R.B., Gruzdyn O.V., Bryant C.S. et al.: Ritonavir Mediated Induction of Apoptosis in Pancreatic Cancer Occurs via the RB/E2F-1 and AKT Pathways. *Pharmaceuticals* 2014, 7: 46–57.
20. Broder S.: The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic. *Antiviral Res.* 2010, 85: 1–18.
21. Quinn B.J., Kitagawa H., Memmott R.M. et al.: Repositioning metformin for cancer prevention and treatment. *Trends Endocrin. Met.* 2013, 24: 470–80.
22. Warrell Jr R.P., Frankel S.R., Miller Jr W.H.: Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with tretinoin (all-trans-retinoic acid). *NEJM* 1991, 324: 1385–93.
23. Cohen J.L.: Enhancing the growth of natural eyelashes: the mechanism of bimatoprost-induced eyelash growth. *Dermatologic Surgery* 2010, 36: 1361–71.
24. Sekhon B.S.: Repositioning drugs and biologics: Retargeting old/existing drugs for potential new therapeutic applications. *J. Pharm. Educ. Res.* 2013, 4: 1–15.
25. Liu Z., Fang H., Reagan K. et al.: In silico drug repositioning – what we need to know. *Drug Discov. Today* 2013, 18: 110–15.
26. Sardana D., Zhu C., Zhang M. et al.: Drug repositioning for orphan diseases. *Brief Bioinform.* 2011, 12: 346–56.
27. Hopkins A.L.: Drug repositioning for orphan diseases. *Nat. Biotechnol.* 2007, 25: 1110–11.
28. Yildirim M.A., Goh K.I., Cusick M.E. et al.: Drug-target network. *Nat. Biotechnol.* 2007, 25: 1119–26.
29. Brehmer D., Greff Z., Godl K. et al.: Cellular targets of gefitinib. *Cancer Res.* 2005, 65: 379–82.
30. Iljin K., Ketola K., Vainio P. et al.: High-throughput cell-based screening of 4910 known drugs and drug-like small molecules identifies disulfiram as an inhibitor of prostate cancer cell growth. *Clin. Cancer Res.* 2009, 15: 6070–78.
31. Iorio F., Bosotti R., Scacheri E. et al.: Discovery of drug mode of action and drug repositioning from transcriptional responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010, 107: 14621–26.
32. Lamb J., Crawford E.D., Peck D. et al.: The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. *Science* 2006, 313: 1929–35.
33. Paper W.: Knowledge-based drug repositioning to drive R&D productivity. <http://thomsonreuters.com/business-unit/science/sector/pdf/knowledge-based-drug-repositioning-to-drive-rd-productivity.pdf> (stan z 18.01.2014).
34. Yang Y., Adelstein J., Kassis A.I.: Target discovery from data mining approaches. *Drug Discov. Today* 2009, 14: 147–54.
35. Andronis Ch., Lekka E., Deftereos S.N. et al.: Literature analysis for systematic drug repurposing: a case study from Biovista. *Drug Discov. Today: Ther. Strateg.* 2011, 8: 103–8.
36. Spasic I., Ananiadou S., McNaught J., Kuma A.: Text mining and ontologies in biomedicine: making sense of raw text. *Brief Bioinform.* 2005, 6: 239–51.
37. Agarwal P., Searls D.B.: Can literature analysis identify innovation drivers in drug discovery? *Nat. Rev. Drug Discov.* 2009, 8: 865–78.
38. Weeber M.J., Kors A., Mons B.: Online tools to support literature-based discovery in the life sciences. *Brief Bioinform.* 2005, 6: 277–86.
39. Yao L., Zhang Y., Li Y. et al.: Electronic health records: Implications for drug discovery. *Drug Discov. Today* 2011, 16: 594–9.
40. Wiens M., Etminan M., Gill S.S., Takkouche B.: Effects of antihypertensive drug treatments on fracture outcomes: a meta-analysis of observational studies. *J. Intern. Med.* 2006, 260: 350–62.
41. Eckert H., Bajorath J.: Molecular similarity analysis in virtual screening: foundations, limitations and novel approaches. *Drug Discov. Today* 2007, 12: 225–33.
42. Keiser M.J., Setola V., Irwin J.J. et al.: Predicting new molecular targets for known drugs. *Nature* 2009, 462: 175–8.

43. Wei G., Twomey D., Lamb J. et al.: Gene expression-based chemical genomics identifies rapamycin as a modulator of MCL1 and glucocorticoid resistance. *Cancer Cell* 2006, 10: 331–42.
44. Yang L., Agarwal P.: Systematic drug repositioning based on clinical side effects. *Plos One* 2011, 6: 28025–9.
45. Melnikova I.: Rare diseases and orphan drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2012, 11: 267–8.
46. America's biopharmaceutical research companies, Rare diseases. A report of orphan drugs in the pipeline. http://www.phrma.org/sites/default/files/pdf/Rare_Diseases_2013.pdf (stan z 24.01.2014).
47. Bochenek T.: *Nowiny Lekarskie* 2013, 82: 338–42.
48. Novartis Pharmaceuticals Corporation. GLEEVEC (imatinib mesylate) tablets for oral use. http://www.pharma.us.novartis.com/product/pi/pdf/gleevec_tabs.pdf, 22. 01. 2014 r. (stan z 22.01.2014).
49. Agres T.: New life for old drugs. *Drug Discovery & Development*, <http://www.ddmag.com/articles/2011/07/new-life-old-drugs> (stan z 29.01.2014).
50. Oprea T.I., Bauman J.E., Bologna C.G. et al.: Drug repurposing from an academic perspective. *Drug Discov Today: Ther. Strateg.* 2011, 8: 61–9.