

Józef Prandota



Wybrane zagadnienia z pediatrii i farmakologii klinicznej

**Prace naukowo-badawcze
Wyższej Szkoły Medycznej LZDZ w Legnicy**



Wydanie sfinansowano z Europejskiego Funduszu Społecznego i budżetu państwa w ramach projektu "Studia pomostowe dla dolnośląskich pielęgniarek" realizowanego w latach 2006-2008 w Wyższej Szkole Medycznej LZDZ w Legnicy

JÓZEF PRANDOTA

**WYBRANE ZAGADNIENIA
Z PEDIATRII**

I

FARMAKOLOGII KLINICZNEJ

Seria: Prace naukowo - badawcze

Informacja o autorze:

Prof. zw. dr hab. nauk medycznych
Profesor Wyższej Szkoły Medycznej LZDZ w Legnicy
59-220 Legnica, ul. Chłapowskiego 13
Kierownik Katedry i Zakładu Pediatrii Społecznej
Wydziału Zdrowia Publicznego
Akademii Medycznej
Im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

ISBN: 978-83-925633-9-6

**WYŻSZA SZKOŁA MEDYCZNA LZDZ w LEGNICY
LEGNICA 2008**

Drukarnia: Zakład Poligraficzny Kazimierz Pakulski Legnica

SPIS TREŚCI

Przedmowa	7
1. SIDS (sudden infant death syndrome). Postępy w wyjaśnianiu przyczyn nagłej śmierci łóżeczkowej niemowląt	13
1.1 Wstęp	14
1.2 Infekcje wirusowe i bakteryjne	15
1.3 Wpływ palenia papierosów	17
1.4 Zmiany zapalne układu oddechowego i przewodu pokarmowego	18
1.5 Nieprawidłowości w ośrodkowym układzie nerwowym	21
1.6 Przewlekłe niedotlenienie organizmu	23
1.7 Zaburzenia metaboliczne	29
1.7.1. Obniżona aktywność karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej	29
1.7.2. Ważna rola przysadkowego polipeptydu aktywującego cyklazę adenylową (PACAP) oraz wazoaktywnego peptydu jelitowego *VIP) w kontrolowaniu homeostazy organizmu	33
1.7.3. Wtórne podwyższenie ekspresji RNA, stężenia i aktywności CYP2C	35
1.7.4. Wrodzony niedobór i/lub ewentualna supresja dehydrogenazy acylo~S-CoA	38
1.8 Szczepienie DTP	40
1.9 Nieprawidłowości genetyczne	41
1.10 Podsumowanie	43
1.11 Piśmiennictwo	47
Tabela 1. Ekspresja genów indukowanych przez hipoksję	51
Tabela 2. Czynniki zmniejszające aktywność enzymu PEPCK	51
Tabela 3. Czynniki zwiększające aktywność PEPCK	52
Tabela 4. Reakcje na iniekcje różnych typów szczepionki DTP u myszy	52
Tabela 5. Zmiany w narządach, badaniach laboratoryjnych i funkcji patofizjologicznej po podaniu szczepionki DTP i endotoksyny u myszy	53
Rycina 1. Glukoneogeneza i gliceroneogeneza	54
Rycina 2. Przepływ trójglicerydów (TG) i kwasów tłuszczowych (FA) między wątrobą a tkanką tłuszczową w cyklu FA-TG dla podtrzymania dużej szybkości przemiany tłuszczów we krwi	55
Rycina 3. Uproszczony proces gliceroneogenezy w adipocytach i jego regulacja przez karboksykinazę fosfoenolopirogronianową cytozolu komórkowego (PEPCK-C)	57

2. Powikłania ze strony układu moczowego po podaniu pełnokomórkowej szczepionki DTP u dzieci z osłabioną odpornością	59
2.1 Wstęp	60
2.2 Pacjenci i metody	62
2.3 Wyniki	63
2.4 Dyskusja	65
2.5 Szczepienie DTP i spowodowana nim produkcja cytokin prozapalnych i przeciwzapalnych	66
2.6 UTI i/lub odmiedniczkowe zapalenie nerek	67
2.7 Steroidowrażliwy zespół nerczycowy	68
2.8 Atopowe zapalenie skóry	71
2.9 Podsumowanie	73
2.10 Piśmiennictwo	76
Tabela 1. Dane kliniczne i laboratoryjne dzieci z chorobami układu moczowego ujawnionymi po szczepieniu DTP	78
Tabela 2. Reakcje na iniekcje różnych typów szczepionki DTP u myszy	81
Tabela 3. Sekwencja procesów biochemicznych obserwowanych po podaniu pełnokomórkowej szczepionki DTP u myszy	81
Tabela 4. Zmiany biochemiczne stwierdzone po podaniu różnych dawek szczepionki DTP lub jej składników u myszy	82
Tabela 5. Zmiany w narządach, badaniach laboratoryjnych i funkcji patofizjologicznej po podaniu szczepionki DTP i endotoksyny u myszy	83
3. Postępy w leczeniu. Zastosowanie farmakogenetyki w gastroenterologii klinicznej i hepatologii u dorosłych i dzieci	84
3.1 Wstęp	85
3.2 Białkowy transporter leków – glikoproteina P (gp-P)	87
3.3 Wchłanianie leków z przewodu pokarmowego	88
3.4 Zapalenie błony śluzowej ściany jelita grubego	90
3.5 Choroby wątroby	91
3.6 Sok grapefruitowy a stosowanie leków	91
3.7 S-metylotransferaza tiopuryny (TPMT)	93
3.7.1. Polimorfizmy TPMT	95
3.7.2. Objawy niepożądane leków spowodowane polimorfizmami TPMT	98
3.8 CYP2D6	98
3.9 CYP2C19	99
3.9.1. Preparaty ziołowe	101
3.9.2. Refluks żołądkowo-przetykowy	102
3.10 CYP3A	102

3.11	Dehydrogenaza dihydropirymidyny (DPD)	104
3.12	Urydynodifosfoglukuronozyltransferazy (UGTs)	104
3.12.1.	Choroby wątroby	106
3.13	Zespół drażliwego jelita	107
3.14	Polimorfizmy interleukin i zmieniona ekspresja genów a skuteczność leczenia	108
14.1.	Wrzodziejące zapalenie jelita grubego	108
3.15	Martwicze zapalenie błony śluzowej jelita cienkiego u niemowląt (Enterocolitis necroticans, NEC)	110
3.16	Wirusowe zapalenie wątroby	111
3.17	Piśmiennictwo	113
	Tabela 1. Charakterystyka specyficznych dróg metabolicznych różnych leków	116
	Tabela 2. Leki będące substratami podlegającymi transportowi przez gp-P	117
	Tabela 3. Przykłady interakcji gp-P z lekami i produktami naturalnymi	118
	Tabela 4. Ważne klinicznie transportery leków	119
	Tabela 5. Leki wykazujące interakcję z sokiem grapefruitowym, prawdopodobnie wykazujące taką interakcję oraz nie wykazujące interakcji z sokiem grapefruitowym	120
4.	Informacja o autorze	121

Motta:

Łatwiej jest uczyć się faktów niż oceniać, co one znaczą, i jak poprzez fakty, które znamy dojść do tych, które chcemy poznać.

John Stuart Mill (1867)

Dostrzeżenie tego, co znajduje się przed nosem wymaga stałej walki.

George Orwell

PRZEDMOWA

SIDS. Przewlekłe niedotlenienie, infekcje wirusowe, toksyny bakteryjne i stany zapalne są najbardziej prawdopodobnymi przyczynami śmierci łóżeczkowej niemowląt (sudden infant death syndrome, SIDS).

Badania autopsyjne wykazały zwiększenie gęstości makrofagów i komórek eozynofilnych w płucach, którym towarzyszyło zwiększenie liczby limfocytów T i B. Około 20% zwiększenie mięśniówki w ścianie drobnych naczyń tętniczych płuc, ilości komórek mięśni gładkich w drogach oddechowych prowadzące do ich zwężenia, a także podwyższenie stężenia hemoglobiny płodowej i erytropoetyny we krwi, wskazują na przewlekłe niedotlenienie tych dzieci przed śmiercią.

U ofiar SIDS, podczas przewlekłego niedotlenienia i infekcji/stanu zapalnego uwalniane były duże ilości cytokin prozapalnych, które przy zaburzeniu homeostazy w organizmie stanowiły potencjalne źródło czynników uszkadzających tkanki. Cytokiny te powodowały supresję ekspresji genów wielu enzymów cytochromu P450 i/lub innych i aktywności enzymów, zaburzając w ten sposób metabolizm wielu ważnych substancji endogennych, jak steroidy, witaminy rozpuszczalne w tłuszczach, prostaglandyny, leukotrieny, tromboksany, i substancji egzogennych.

Aktywacja leukocytów wielojądrazastych obojętnochłonnych przez TNF- α i inne cytokiny prozapalne powstające podczas przewlekłego niedotlenienia oraz stanu zapalnego (TNF- α , IL-1 i IL-6), powodowała zwiększenie produkcji aktywnych rodników tlenowych (ROS, reactive oxygen species), w reakcji m.in. na generowany w nadmiarze z błony komórek obumarłych kwas arachidonowy (AA). Niedotlenienie organizmu, zwiększenie stężenia żelaza, podwyższenie aktywności wątrobowego CYP2C9, określanego jako źródło ROS, oraz kumulacja nikotyny w tkankach tych dzieci narażonych na bierne palenie

rodziców, także powodowały nasilenie produkcji ROS. Interakcja ROS z tlenkiem azotu (NO) mogła powodować nasilenie generacji nadtlenu azotu, silnego utleniacza odgrywającego ważną rolę w patogenezie zgonu osób z zespołem zaburzeń oddychania.

Cytokiny prozapalne, ROS, AA oraz NO, powodowały także supresję wielu CYP450 i innych enzymów, m.in. karboksykinazy fosfoenolopirogronianu (PEPCK), istotnej dla metabolizmu kwasów tłuszczowych (KT) w czasie glukoneogenezy i gliceroneogenezy. Niedobór PEPCK stwierdzony u ofiar SIDS, spowodowany także hipowitaminową A, zwiększał poziom KT we krwi z powodu upośledzenia w adipocytach ich re-estryfikacji do triacylglicerolu. Z kolei, nadmiar KT we krwi przyczyniał się do powstania zespołu metabolicznego, charakterystycznego dla wczesnej fazy cukrzycy typu 2.

Obrzęk płuc i krwawe wybroczyny często stwierdzane u ofiar SIDS mogły być wynikiem tzw. zespołu zwiększonej przepuszczalności naczyń krwionośnych spowodowanego przewlekłym niedotlenieniem i uwalnianiem mediatorów zapalnych IL-1 β i IL-6, a także przeciążeniem układu krążenia i oddechowego związanego ze zwężeniem dróg oddechowych i drobnych naczyń tętniczych w płucach.

Niedotlenienie ofiar SIDS zwiększało także produkcję czynnika hipoksji (HIF-1 α), stymulującego wydzielanie różnych czynników wzrostu przez komórki śródbłonna naczyń, oraz podkliniczne procesy zapalne toczące się w różnych częściach ośrodkowego układu nerwowego, prowadząc do gliozy pnia mózgu i zaburzenia wydzielania neuromediatorów ważnych dla snu i czuwania. Zmiany te mogły powodować zaburzenia homeostatycznej kontroli reakcji sercowo-naczyniowych i głębokości snu ofiar SIDS, które w połączeniu ze skutkami działania nikotyny oraz nieprawidłowościami genetycznymi, np. polimorfizmem genu IL-10, były przyczyną zgonu.

Ostatnio ukazała się praca Patersona i wsp. (JAMA, 2006, 296, 2124-

2132) bardzo reklamowana w USA przez stację telewizyjną CNN, wykazująca że ofiary SIDS mają zmniejszone wiązanie serotoniny w niektórych jądrach mózgu, co jest istotne dla prawidłowego snu i oddychania. Wyniki tych badań są zgodne z własnymi wyjaśnieniami mechanizmów patofizjologicznych SIDS przedstawionymi w tej pracy.

Szczepienie DTP. Już w 1967 r. Wilson stwierdził, że w niektórych przypadkach podanie szczepionki było powodem skrócenia okresu inkubacji pewnych chorób lub zmieniało skrycie przebiegające infekcje/zapalenie w choroby manifestujące się klinicznie. Warunkiem wstępnym takiego zbiegu okoliczności była infekcja o przebiegu podklinicznym lub bezobjawowa kolonizacja bakteryjna w organizmie. Na przykład, w USA w grupie 64 591 dzieci, które otrzymały szczepienie DTP obserwowano 158 epizodów inwazyjnych zakażeń bakteryjnych, co daje częstość występowania takich powikłań poszczepiennych w liczbie 394 infekcji na 100 tys. osób.

Badania własne przedstawiają choroby układu moczowego, które ujawniły się u 13 niemowląt i małych dzieci hospitalizowanych w okresie ostatnich 24 lat w Oddziale Nefrologicznym szpitala im. Korczaka we Wrocławiu po podaniu pełnokomórkowej szczepionki DTP. Przy przyjęciu do szpitala, u analizowanych dzieci stwierdzano infekcję/stan zapalny górnych dróg oddechowych, atopowe zapalenie skóry, oraz/lub skrycie przebiegające zakażenie/zapalenie układu moczowego lub steroidowrażliwy zespół nerczycowy (ZN). Można przypuszczać, że pałeczki krztuśca obecne w pełnokomórkowej szczepionce DTP, działając jako bodziec immunologiczny nadmierny dla danego dziecka, wywołały objawy chorobowe przypominające reakcję organizmu na wyzwolone monokiny prozapalne, jak IL-1 β , TNF- α , i IL-6. Taką koncepcję potwierdzają badania *in vitro* wskazujące, że pałeczki

krztuśca szczepionki DTP powodowały znamienne większą produkcję tych cytokin niż szczepionka acelularna lub zawierająca tylko DT.

Zaburzenia odporności komórkowej stwierdzone w zakażeniu układu moczowego (zwiększenie stężenia IL-1 α , antagonisty receptora IL-1, IL-6 i IL-8 w surowicy i/lub moczu), ZN (zwiększenie IL-2, IFN- γ , TNF- α , i spadek lub zwiększenie IL-4, zależnie od rodzaju badanych komórek), i w atopowym zapaleniu skóry (zmniejszenie produkcji IFN- γ i zwiększenie IL-4), sugerują, że podobne przewlekłe, podklinicznie przebiegające nieprawidłowości spowodowane przez cytokiny w trakcie chorób ujawnionych u naszych dzieci, w połączeniu z tymi zmianami wyzwolonymi podaniem szczepionki DTP, były odpowiedzialne za patomechanizmy obserwowanych zmian chorobowych.

Badania na zwierzętach wykazały zależne od dawki oraz czasu ekspozycji znamienne zwiększenie ekspresji mRNA wątrobowego IL-1, IL-6, i TNF, oraz znaczne zmniejszenie ekspresji mRNA i aktywności izoenzymów CYP450 w wątrobie, po podaniu pełnokomórkowej szczepionki DTP. Szczepionka powodowała duże zwiększenie poziomu IFN- γ , które występowało równocześnie z maksymalnym obniżeniem stężenia wątrobowych enzymów CYP450, a także zwiększenie ekspresji mRNA indukowanej syntazy tlenu azotu, uważanej przez niektórych autorów za przyczynę supresji enzymów CYP450. Również polimorfizm genetyczny interleukin, zwłaszcza wariantów konstelacji TNF- α i IL-6, może u niektórych niemowląt z zakażeniem, obniżeniem stężenia IFN- γ , lub niedoborem receptora IFN- γ , stanowić predyspozycję do wystąpienia, bardziej intensywnej niż zazwyczaj, reakcji zapalnej w nerkach po podaniu szczepionki.

Farmakogenetyka. Już w latach 1960-tych stwierdzono, że 1 na 3500 osób rasy kaukaskiej („białej”) jest homozygotą dla genu kodującego atypową postać enzymu butyrylocholinesterazy, która nie może hydrolizować sukcyńlocholinę

(leku zwiotczającego mięśnie), co powoduje przedłużenie porażenia mięśni szkieletowych i utrzymywanie się bezdechu spowodowane przez ten lek u chorych poddawanych operacji. Czasami stwierdza się też duże różnice w wielkości skutecznych dawek leków u poszczególnych chorych. Optymalne dawki dobowe, np. warfaryny mogą się różnić nawet 20-krotnie, a w przypadku propranololu różnice te mogą być nawet 40-krotne. Efekty farmakogenetyczne obejmują nie tylko różnice w skuteczności działania leków, lecz także podatność do występowania objawów niepożądanych.

W 1959 r. Vogel wprowadził termin farmakogenetyka dla opisania genetycznie uwarunkowanych zmian w reakcji organizmu na leki. Farmakogenetyka łączy różnice w strukturze genu z farmakologicznymi różnicami w farmakokinetyce oraz farmakodynamice leków. Klinicznie ważne przykłady obejmują status acetylatora, cytochromy P450 2D6, 2C9, 2C19, polimorfizmy cytochromu P450 2D6, 2C9, 2C19, niedobór metylotransferazy tiopuryny, nieprawidłowości receptorów, oraz choroby autoimmunologiczne z powstawaniem autoprzeciwciał skierowanych przeciwko niektórym enzymom cytochromu P450. Polimorfizmy genetyczne występują w postaci dużych zmian strukturalnych włączając usunięcie genu, zdwojenie lub translokację genu, lecz najczęstszym jest polimorfizm pojedynczego nukleotydu ze zmienioną, wtrąconą lub usuniętą sekwencją jednego nukleotydu prawdopodobnie w reakcji na składniki diety i/lub inne czynnik(i) środowiskowe.

Postępy farmakogenetyki w zakresie gastroenterologii i hepatologii klinicznej mają istotne znaczenie dla skuteczności leczenia i minimalizowania toksyczności leków. Testy farmakogenetyczne wykonywane za pomocą fenotypowania lub nowoczesnego genotypowania są prostą i szybką metodą określenia profilu farmakogenetycznego chorego. Firmy farmaceutyczne produkują obecnie zestawy diagnostyczne wykrywające cechy genetyczne i podatność na choroby, które pozwalają także wybrać właściwe leczenie oraz

sprzyjają indywidualizacji farmakoterapii. Na przykład, test na oznaczenie aktywności metylotransferazy tiopuryny, jest pomocny przy ustalaniu dawek 6-merkaptopuryny, azatiopryny (prolek) i tioguaniny stosowanych, m.in. w leczeniu zapalenia błony śluzowej jelita grubego, nowotworów, autoimmunologicznego zapalenia wątroby.

Mimo trudnych, nowoczesnych zagadnień poruszanych w tym skrypcie, mam nadzieję, że spotka się on z zainteresowaniem studentów, ponieważ przedstawiana w nich tematyka reprezentuje postępy aktualnej wiedzy medycznej i w wielu przypadkach odpowiada na często zadawane pytanie – dlaczego?. Zaspokajanie ciekawości intelektualnej jest zaś bardzo ważne w życiu każdego człowieka, nie tylko profesjonalnie związanego z medycyną.

Legnica, styczeń 2008 r.

Prof. zw. dr hab. n. med. Józef Prandota

1.

SIDS (*sudden infant death syndrome*)

**POSTĘPY W WYJAŚNIANIU PRZYCZYN NAGŁEJ ŚMIERCI
ŁÓŻECZKOWEJ NIEMOWLĄT**

1.1 Wstęp

W krajach rozwiniętych nagła śmierć łóžeczkowa niemowląt jest jedną z najczęstszych przyczyn zgonów niemowląt w wieku od 1 tygodnia do 12 miesięcy. Analiza przyczyn śmierci 2529 dzieci w 1998 r. w USA wykazała, że SIDS jest trzecią główną przyczyną śmiertelności niemowląt (8.9%), po wadach wrodzonych (22%) i noworodkach z małą masą urodzeniową (14%). Do większości zgonów dochodziło u dzieci między 2 a 4 miesiącem życia w nocy i wczesnych godzinach rannych, co może wskazywać na udział rytmu dobowego w patomechanizmie tych zgonów. Do czynników ryzyka wystąpienia tego zespołu należą: spanie na brzuchu, przegrzanie dziecka, płeć męska, wiek od 2 do 4 miesięcy, wcześniactwo, niska urodzeniowa masa ciała, słaba opieka prenatalna, niski status socjalny i ekonomiczny rodziny, młody wiek rodziców, niski poziom ich wykształcenia, krótki odstęp czasu między ciążami, ciąża mnoga, zażywanie narkotyków przez kobietę ciężarną, miesiące zimowe, ekspozycja na dym tytoniowy w czasie ciąży i po urodzeniu. U około 70-80% ofiar SIDS, zgon poprzedzała łagodna infekcja wirusowa lub bakteryjna. W wielu przypadkach rodzice konsultowali dziecko u lekarza w ostatnich tygodniach przed śmiercią, podając w wywiadzie objawy infekcji górnych dróg oddechowych oraz stany zapalne błony śluzowej nosa, gardła, i kaszel. Rozpoznanie tego zespołu zwykle ustala się na podstawie wykluczenia innych przyczyn nagłej śmierci, ponieważ objawy chorobowe lub zmiany patologiczne stwierdzane podczas autopsji nie są charakterystyczne. Ważnymi czynnikami sprzyjającymi SIDS są spanie dziecka na brzuszku oraz ekspozycja na dym tytoniowy. Od chwili wszczęcia kampanii na rzecz spania niemowląt na plecach, odsetek zgonów w Anglii i Walii zmniejszył się z 49% w 1980 r. do 25% w 1999 r.

Wielu autorów uważa SIDS za reakcję patofizjologiczną organizmu na toksyny bakteryjne, wirusy oraz/lub skutki działania dymu tytoniowego we

wczesnym okresie wieku rozwojowego, gdy reakcje obronne organizmu są mniej skuteczne w neutralizowaniu skutków działania mediatorów zapalnych. Podczas autopsji, u większości ofiar SIDS stwierdzono infekcje mieszane dwóch lub więcej bakterii i wirusów, lecz zarazki te nie powodowały inwazyjnej choroby bakteryjnej, ponieważ większość z nich nie miała właściwości letalnych. Niedawno, Krous i wsp. stwierdzili nawet, że w analizowanej przez nich grupie ofiar SIDS, zarówno odsetek dodatnich posiewów pobranych z górnych dróg oddechowych (80 vs. 89%, odpowiednio) jak i zmiany zapalne stwierdzone w tchawicy i płucach tych dzieci, były podobne jak w grupie kontrolnej.

Celem pracy było przedstawienie zmian patologicznych stwierdzanych u ofiar SIDS podczas autopsji i wyjaśnienie ewentualnych patomechanizmów, które mogły być ich przyczyną, zwłaszcza w przypadkach przebiegających z infekcją wirusową/ bakteryjną i/lub stanem zapalnym poprzedzającymi zgon. Szereg powiązanych ze sobą zaburzeń procesów biochemicznych towarzyszących tym zmianom i przewlekłemu niedotlenieniu powodowało wystąpienie nieodwracalnych zmian anatomicznych u tych dzieci, oraz rozwój nieprawidłowości metabolicznych charakterystycznych dla wczesnej fazy cukrzycy typu 2. Ekspozycja wielu ofiar SIDS na działanie nikotyny oraz często stwierdzane zaburzenia genetyczne nakładały się na te zmiany prowadząc w efekcie do zgonu.

1.2 Infekcje wirusowe i bakteryjne

Dane patologiczne, epidemiologiczne oraz fizjologiczne wskazują, że u wielu ofiar SIDS, zakażenia wirusowe są ważnym czynnikiem inicjującym wystąpienie nagłego niedotlenienia i zgonu, częściej w populacjach skłonnych do zapadania na infekcje. U tych dzieci stwierdzono zakażenie adenowirusami, wirusami RS (*respiratory syncytial*) (u 10% zakażonych wirusem RS występują

objawy bezdechu), enterowirusami i parwowirusem B19, wirusami grypy, rhinowirusami, cytomegalowirusem, wirusem Coxsackie B3, oraz wirusami Ebstein-Barra. Zakażeniom wirusowym towarzyszyło znamienne zwiększenie liczby limfocytów T, leukocytów i makrofagów w mięśniu serca ofiar SIDS. W miesiącach zimowych obserwowano więcej zgonów, przy czym epidemiom zakażenia wirusem grypy A towarzyszyła większa liczba przypadków SIDS. W udokumentowaniu zakażenia wirusowego ważne jest zastosowanie nowoczesnych molekularnych metod biologicznych, np. PCR (*polymerase chain reaction*) zwłaszcza, gdy konwencjonalne badanie histologiczne tkanek było ujemne.

W posiewie z górnych dróg oddechowych ofiar SIDS stwierdzano także liczne i różne gatunki bakterii, zwłaszcza Gram ujemnej *E.coli*, zawierających endotoksynę będącą silnym stymulatorem produkcji cytokin prozapalnych IL-1, IL-6, TNF- α oraz IFN- γ . Badania wykazały znamienne korelację między poziomami endotoksyny we krwi a objawami stanu zapalnego, a wysokie stężenia endotoksyny we krwi stwierdzane w niektórych chorobach były przyczyną wstrząsu septycznego i śmierci. Wiele bakterii Gram dodatnich stwierdzonych u ofiar SIDS miało cechy toksykogenne i wytwarzało superantygeny, np. gronkowiec złocisty mogący powodować zaburzenia w organizmie charakterystyczne dla wstrząsu septycznego nawet bez objawów endotoksemii. U wielu ofiar SIDS stwierdzono m.in. cechy ostrej inwolucji grasicy, często obserwowane podczas ostrej infekcji. W niektórych przypadkach wykazano istnienie związku między SIDS a zakażeniem *H. pylori*, ponieważ w żołądku, tchawicy i płucach dużego odsetka tych dzieci stwierdzono geny *zarazka*, *ureC* i *cagA*. Zakażenie *H. pylori* ułatwiał odpływ żołądkowo-przełykowy, często stwierdzany u ofiar SIDS. W wyniku stanu zapalnego w tych narządach spowodowanego przez poriny będące częścią struktury komórki *H. pylori*, dochodziło do zwiększenia poziomu wielu cytokin IL-1 β , TNF- α , IL-6

i IL-8 aktywujących leukocyty wielojądrzaste obojętnochłonne i wyzwalających kaskadę towarzyszących temu procesów biochemicznych, które modulowały reakcje zapalne i immunologiczne. Podobnie zmiany zapalne stwierdzono również w zakażeniach *Pneumocystis carinii*, oraz chlamydiami, także uważanymi za przyczyny SIDS. Należy podkreślić, że zdolność do produkcji cytokin prozapalnych stwierdza się już we wczesnym dzieciństwie. Są one wydzielane przez obwodowe komórki mononuklearne niemowlęcia i makrofagi krwi pępowinowej w reakcji na wiele wirusów i bakterii, a w płynach organizmu oraz tkankach ofiar SIDS stwierdzono obecność IL-1, IL-6, oraz TNF- α .

1.3 Wpływ palenia papierosów

W tkance płucnej oraz w płynie z worka osierdziowego ofiar SIDS wykazano znamienne wyższe stężenia kotyniny (składnik dymu tytoniowego) w porównaniu z kontrolą. Ekspozycja tych dzieci na dym tytoniowy zwiększała wrażliwość organizmu na infekcje wirusowe. W badaniach na modelu doświadczalnym nikotyna nasilała letalne działanie toksyn bakteryjnych indukując procesy zapalne i aktywując różne mediatory zapalne, m.in. IL-6 i IL-8. Substancje chemiczne znajdujące się w dymie tytoniowym powodowały zwiększone wiązanie się bakterii patogennych z komórkami nabłonka jamy ustnej, prawdopodobnie poprzez zmianę jego właściwości elektrostatycznych. Po zainfekowaniu gronkowcem złocistym komórek nabłonka jamy ustnej i ekspozycji na dym tytoniowy stwierdzono w nich zwiększoną ilość ciał smołowatych. Porównując reakcje zapalne osób palących i niepalących po podaniu toksyny-1 zespołu wstrząsu toksycznego (TSST-1, *toxic shock syndrome toxin-1*) oraz LPS (lipopolisacharyd, składnik błony komórkowej bakterii), stwierdzono, że niepalący mieli znacznie wyższe wyjściowe poziomy IL-6, IFN i IL-10 w surowicy niż palący. U niepalących, po podaniu LPS podwyższenie stężenia IFN było większe, podobnie jak zwyżka stężenia IL-10

po TSST-1 i LPS, niż u osób palących. Wskazuje to, że ekspozycja na dym tytoniowy mogła zwiększać podatność ofiar SIDS na zakażenia wirusowe i bakteryjne, zaś niższy poziom cytokiny przeciwzapalnej IL-10 w surowicy mógł upośledzać siły obronne organizmu. Powyższe rozumowanie potwierdzają wyniki badań na zwierzętach, ponieważ podanie IL-10 zmniejszało działanie letalne toksyn gronkowca złocistego. Nikotyna zwiększała także uwalnianie cytokiny prozapalnej IL-1 β i prostaglandyny E₂ (PGE₂) z monocytów stymulowanych przez endotoksynę, oraz powodowała zależne od dawki zwiększenie uwalniania cytotoksycznych aktywnych rodników tlenowych (*reactive oxygen species*, ROS) z leukocytów wielojądrzastych, odgrywających ważną rolę w patogenezie chorób sercowo-naczyniowych, płuc, oraz nowotworowych.

1.4 Zmiany zapalne układu oddechowego i przewodu pokarmowego

W śluzówce nosogardzieli, tchawicy, oraz dwunastnicy ofiar SIDS stwierdzono objawy stymulacji immunologicznej, m.in. zwiększoną liczbę komórek IgM i zmniejszenie liczby komórek IgA oraz IgM (ściana tchawicy) oraz znamienne większą liczbę komórek IgA (błona śluzowa dwunastnicy), w porównaniu ze zmarłymi bez objawów infekcji. W mięszu migdałków podniebiennych wykazano znamienne większą całkowitą liczbę komórek IgG przypadających na mm² powierzchni migdałka, oraz immunocytów IgA. Duże różnice stwierdzono także w ilości komórek plazmatycznych IgG we wszystkich 4 kompartmentach migdałków, zaś liczba komórek IgA w okolicy międzypęcherzykowej oraz w centrum rozrodczym migdałków ofiar SIDS była znamienne większa niż w grupie kontrolnej.

W mięszu płuc i w świetle pęcherzyków płucnych ofiar SIDS stwierdzono znamienne większą gęstość aktywowanych makrofagów, trzy razy więcej komórek kwasochłonnych, którym towarzyszyły zwiększone liczby

limfocytów T i B, a także więcej mastocytów w tkance okołoskrzelowej, w porównaniu z kontrolą. Powyższe zmiany są zgodne z wykazaniem u tych dzieci podwyższonego poziomu pseudo- β -tryptazy, obojętnej proteazy produkowanej głównie przez mastocyty, będącej mediatorem prozapalnym, a także zwiększonym uwalnianiem substancji czynnych oraz większą degranulacją tych komórek u rodzin ofiar SIDS. Pomędzy zwiększonymi liczbami eozynofili, limfocytów B i limfocytów T stwierdzono także statystycznie znamienne zależności. Poziomy immunoglobulin IgG i IgM w tkance płucnej były również podwyższone. Wszystkie te nieprawidłowości wskazują na obecność procesów zapalnych w tchawicy, oskrzelach, a także w tkance płucnej ofiar SIDS z udziałem limfocytów (*lymphocytic interstitial pneumonitis*).

U 70-90% ofiar SIDS badania autopsyjne wykazały obecność wybroczyn krwotocznych (*petechiae*), a często także obrzęk płuc o różnym nasileniu. Zmiany te mogły być spowodowane zwiększoną przepuszczalnością kapilarów naczyńowych towarzyszącą przewlekłemu niedotlenieniu, infekcji i stanowi zapalnemu, uwalnianiu mediatorów zapalenia, a także utrzymującemu się przeciążeniu układu krążenia i oddechowego. Przemawia za tym fakt, że w warunkach przewlekłego niedotlenienia, IL-2 zwiększała przepuszczalność naczyń krwionośnych w sposób zależny od dawki powodując wystąpienie tzw. zespołu zwiększonej przepuszczalności naczyń (VLS, *vascular leak syndrome*). Dodatkowo, IFN- α mógł nasilać działanie IL-2 (także w sposób zależny od dawki) powodując powstanie obrzęku wokół naczyń krwionośnych i pojawienie się płynu w pęcherzykach płucnych, co zwiększało ilość wody w płucach, dając podczas autopsji obraz zastoju krwi i obrzęku płuc.

Badanie składu surfaktantu uzyskanego z popłuczyn płuc ofiar SIDS wykazały zmniejszone proporcje fosfatydylocholiny (lecytyna) i znamienne wyższe lizofosfatydylocholiny oraz sfingomieliny w porównaniu z kontrolą.

Należy podkreślić, że podobne zmiany we wzajemnych proporcjach stwierdzono także podczas metabolizmu lipidów komórkowych po stymulacji leukocytów wielojądrzastych przez TNF- α . Cytokina ta stymulowała uwalnianie AA z neutrofilii (a także innych komórek) i pobudzała produkcję endogennego niezestryfikowanego AA, zmniejszając ilość komórkowego fosfatydyloinozytolu, fosfatydylocholinylu i fosfatydyloetanolaniny (kefalina), i zwiększając ilość odpowiednich lizofosfolipidów. Również IL-1, podobnie jak TNF- α , wywierała zależne od dawki działanie pobudzające uwalnianie AA oraz metabolizm komórkowy fosfolipidów. Nieprawidłowości składu surfaktantu stwierdzane u ofiar SIDS, spowodowane prawdopodobnie przez uwalniane mediatory zapalne, mogły nasilać procesy zapalne w płucach upośledzając rozprężanie się pęcherzyków płucnych i wymianę powietrza. Należy też dodać, że wiele nienasyconych kwasów tłuszczowych, w tym AA, wywierało działanie hamujące kompetytywnie (np. CYP2C9) i niekompetytywnie (np. CYP3A4, 2D6, UGT?) aktywność enzymów mikrosomalnych CYP450 i innych w wątrobie, a także zmniejszało stężenie tych enzymów poprzez wiązanie się z cząsteczką hemu.

W wystąpieniu zmian zapalnych dróg oddechowych duży udział mógł także mieć odpływ żołądkowo-przełykowy, często stwierdzany u ofiar SIDS, ponieważ pory znajdujące się w błonie podstawnej nabłonka oskrzeli (osoba dorosła ma 863 pory/mm² o średnicy 0,75-3,85 μ m) ułatwiały infiltrację komórek immunologicznych i zapalnych, a także pasaż cząsteczek pokarmu z żołądka do tkanki mezenchymalnej wokół przełyku i z powrotem do nabłonka bez naruszenia ciągłości błony podstawnej, przyczyniając się do zapoczątkowania i/lub nasilenia procesów zapalnych tej okolicy.

1.5 Nieprawidłowości w ośrodkowym układzie nerwowym

Badanie *postmortem* płynu mózgowo-rdzeniowego ofiar SIDS wykazało szybkie pojawianie się w nim pleocytozy komórek jednojądrzastych, na które składały się limfocyty (60-70%) oraz makrofagi (20-40%). Zmiany te mogły być spowodowane obecnością znacznych ilości substancji prozapalnych w płynie mózgowo-rdzeniowym i mózgu, jak IL-6, IFN- α (stwierdzony w neuronach rdzenia przedłużonego), oraz nadmierną ekspresją IL-1 β (w neuronach jąder grzbietowego i łukowatego nerwu błędnego), świadczących o przewlekłym niedotlenieniu i ewentualnie podklinicznym stanie zapalnym opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu. Przemawia za tym wykazanie znacznie podwyższonego poziomu czynnika wzrostu śródbłonna naczyń krwionośnych w płynie mózgowo-rdzeniowym (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) ofiar SIDS, ponieważ ma on działanie prozapalne powodujące migrację leukocytów do zapalnie zmienionych tkanek. Obecność VEGF w płynie mózgowo-rdzeniowym ofiar SIDS świadczy też o niedotlenieniu mózgu, gdyż gen VEGF jest bardzo wrażliwy na zmiany ciśnienia parcjalnego tlenu w tkankach. Ekspresja genu VEGF, podobnie jak IL-6, oraz syntazy-2 NO była stymulowana przez czynnik indukujący hipoksji 1 α (HIF-1 α , *hypoxia-induced factor 1 α*) powstający w mózgu w warunkach przewlekłego niedotlenienia, który np. w doświadczalnym niedokrwieniu mózgu osiągał największe stężenie po 8 godzinach, a następnie znikał równoległe z VEGF.

Przewlekłe niedotlenienie oraz podkliniczne procesy zapalne w ośrodkowym układzie nerwowym ofiar SIDS mogły mieć wpływ na opóźnienie dojrzewania mózgu, tj. dynamiki i zakresu mielinizacji, rozwoju synaps, a także progresji astroglizy pnia mózgu, stwierdzanych podczas autopsji. Wykazano też korelację pomiędzy liczbą papierosów wypalanych przez matkę w okresie ciąży a nasileniem gliozy w jądrze oliwkowatym dolnym ofiar SIDS. Być może, w tych procesach brał udział także VEGF, ponieważ np.

w skórze czynnik ten prawdopodobnie wraz z niedotlenieniem i stanem zapalnym przyczyniał się do zwłóknienia tkanki w miejscu rozwijającego się keloidu. U ofiar SIDS z prawidłową masą ciała stwierdzono również znaczną redukcję całkowitej liczby neuronów neokortykalnych i objętości neuronu w porównaniu z kontrolą, a także zmniejszenie objętości i liczby neuronów w grzbietowym jądrze motorycznym nerwu błędnego, odgrywających ważną rolę w kontroli pracy serca i oddychania (pień mózgu) oraz czuwania (pień mózgu i *neocortex*). Ofiary SIDS miały także znacznie większą ilość mRNA receptora glutamatergicznego N-metylo-D-asparginianu w jądrach rdzenia przedłużonego, biorącego udział w kontroli pracy serca i oddychania, a także śmierci komórek poprzez mechanizmy pobudzająco-toksyczne. Powyższe nieprawidłowości mogły być przyczyną zaburzenia homeostatycznej kontroli reakcji sercowo-naczyniowych i czuwania, sprzyjając wystąpieniu SIDS. Przemawia za tym wykazanie korelacji pomiędzy poziomami cytokin prozapalnych IL-1 β i TNF w mózgu a skłonnością do zasypiania oraz stwierdzenie specyficznej dla SIDS ujemnej korelacji między gęstością gliozy w jądrze grzbietowym nerwu błędnego rdzenia przedłużonego a częstością występowania bezdechów w czasie snu. Należy jednak podkreślić, że VEGF może prawdopodobnie wywierać także korzystne działanie neurotroficzne i neuroprotektoryjne, ponieważ neurony kory mózgu poddane jego działaniu w sposób zależny od dawki znamienne zwiększały swoją wielkość i liczbę powstających neurytów, niezależnie od jego regulującego wpływu na wzrost i rozwój naczyń krwionośnych.

U ofiar SIDS, zaburzenia snu i wynikający stąd stres, a także stres spowodowany niedotlenieniem organizmu mogły powodować zwiększenie produkcji adrenaliny, któremu zwykle towarzyszy nasilenie produkcji cytokiny prozapalnej IL-6. Podczas autopsji, w ośrodkowym układzie nerwowym ofiar SIDS ze zmianami zapalnymi w narządach, stwierdzono podwyższone poziomy

IL-6 zbliżone do stężeń wykazanych u dzieci zmarłych z powodu posocznicy bakteryjnej. Przypuszcza się, że znamienne większe stężenia IL-6 w płynie mózgowo-rdzeniowym ofiar SIDS były spowodowane immunologicznym pobudzeniem tkanek górnych dróg oddechowych manifestującym się znamienne większą liczbą immunocytów IgA stwierdzonych w śluzówce krtani oraz bardziej nasiloną ekspresją HLA-DR tej tkanki. Ważność patofizjologiczną generowania IL-6 potwierdza fakt, że w płynie mózgowo-rdzeniowym chorych z zakażeniem ośrodkowego układu nerwowego również stwierdzono wysokie stężenia tej cytokiny, uznając to za przyczynę wstrząsu septycznego.

W czasie infekcji i procesów zapalnych dochodzi do podwyższenia stężenia we krwi IL-1, IL-6, TNF- α oraz IFN- γ . TNF- α i IL-1 działają na ośrodkowy układ nerwowy powodując wystąpienie gorączki, złego samopoczucia, oraz drżenia i dlatego nazywane są endogennymi pirogenami. Wprawdzie u ofiar SIDS zazwyczaj nie obserwowano wysokiej gorączki, lecz u ich rodzeństwa temperatura skóry w czasie snu była podwyższona, co wskazuje na różnice w regulowaniu temperatury w porównaniu ze zdrowymi dziećmi. Być może, brak gorączki u ofiar SIDS był spowodowany generowaniem w nadmiarze kwasów 11,12-, oraz 14,15-epoksyekoizatrienoanowych, będących metabolitami kwasu arachidonowego (AA), które wywierały zależne od dawki działanie przeciwgorączkowe, nie wpływając przy tym na prawidłową ciepłotę ciała. Wreszcie, należy też podkreślić, że podkliniczne stany zapalne toczące się w różnych partiach tkanki mózgowej mogły wywierać działanie hamujące aktywność wielu enzymów CYP450, zarówno w mózgu, jak i wątrobie.

1.6 Przewlekłe niedotlenienie organizmu

U ofiar SIDS stwierdzono hiperplazję układu komórek neuroendokrynych (KN), ponieważ badania rozmieszczenia i gęstości

występowania tych komórek reaktywnych immunologicznie w stosunku do bombezyny (liczba komórek/mm²) oraz ciałek neuroepitelialnych, a także wielkości tych ostatnich w skrawkach płuc, wykazały znamienne zwiększenie w porównaniu z kontrolą. Ponieważ KN są uważane za chemoreceptory układu oddechowego wrażliwe na niedotlenienie organizmu (po urodzeniu stwierdza się je w dużych ilościach, a w kolejnych tygodniach życia stopniowo zanikają), spekulowano, że przyczyną zmian gęstości i wielkości tych komórek w płucach, a także autonomicznej regulacji oddychania, mogło być przewlekłe niedotlenienie i/lub opóźnienie rozwojowe ofiar SIDS.

Powyższe zmiany morfologiczne są zgodne ze stwierdzeniem znamienne wyższych poziomów hemoglobiny płodowej (HbF, *fetal hemoglobin*) w pełnej krwi ofiar SIDS w wieku od 2 do 6 miesięcy, w porównaniu z kontrolą. Dalsze badania wykazały, że synteza HbF ulegała zwiększeniu pomiędzy 42 a 49 tygodniem od zapłodnienia. Ponieważ stężenia karboksyhemoglobiny we krwi ofiar SIDS nie wykazały różnicy w porównaniu z kontrolą, można przypuszczać, że podwyższenie HbF było reakcją obronną organizmu na przewlekłe niedotlenienie, gdyż ma ona większe powinowactwo do tlenu niż HbA (P₅₀ dla HbA wynosi 26 mmHg, podczas gdy dla HbF = 20 mmHg, co umożliwia pobieranie tlenu w obrębie łożyska od HbA). Z drugiej jednak strony, duże powinowactwo HbF do tlenu utrudniało jego dysocjację w tkankach i w pierwszych miesiącach życia (a więc u ofiar SIDS) mogło przyczynić się do przewlekłego niedotlenienia organizmu. Należy podkreślić, że HbF powstająca pod koniec pierwszego trymestru ciąży, jest zbudowana z łańcuchów $\alpha_2 \gamma_2$ (prawidłowa HbA składa się z łańcuchów $\alpha_2 \beta_2$), natomiast podjednostka β , której synteza rozpoczyna się w trzecim trymestrze ciąży, zastępuje całkowicie łańcuch γ kilka tygodni po porodzie. Zarówno czas występowania tych zmian, jak i okres czasu, który upłynął od chwili zapłodnienia gdy synteza HbF uległa zwiększeniu, są zgodne z wiekiem

większości ofiar SIDS. Niedawne badania wykazały, że dzieci te mają znamienne podwyższone stężenie VEGF w płynie mózgowo-rdzeniowym, co także wskazuje na niedotlenienie tkanek, ponieważ ekspresja genu VEGF ulega zwiększeniu pod wpływem zmian ciśnienia parcjalnego tlenu w tkankach i powstającego wówczas HIF-1.

Powyższe nieprawidłowości dokumentujące przewlekłe niedotlenienie ofiar SIDS są zgodne z wynikami badań morfometrycznych dróg oddechowych, które wykazały znamienne większą proporcję mięśni gładkich w porównaniu z kontrolą (grubość ściany lub nabłonka były podobne), co mogło być przyczyną ich zwężenia i wynikających stąd nieprawidłowości w prawidłowym funkcjonowaniu układu oddechowego. Zmiany te mogły być wynikiem niedotlenienia i działania cytokin prozapalnych IL-1 β (cytokina ta działa pośrednio poprzez płytkowy czynnik wzrostu (PDGF, *platelet-derived growth factor*) i IL-6, powodujących hiperplazję i hipertrofię mięśni gładkich dróg oddechowych. Ważną rolę w tych procesach mogła także odgrywać angiotensyna II (oraz PDGF-BB), która indukowała zarówno przerost komórek mięśni gładkich jak i ekspresję HIF-1 α (podjednostki HIF-1), ulegającej następnie kumulacji w niedotlenionych płucach.

W małych tętniczkach płucnych ofiar SIDS z wybroczynami na narządach wewnętrznych (takie wybroczyny ma do 80% ofiar) również stwierdzono większą o 20% więcej komórek mięśni gładkich niż u dzieci zmarłych bez wybroczyn ($p < 0,05$), a także zwiększenie grubości mięśniówki naczyń tętniczych u niektórych dzieci, zaś we krwi stężenia kortyzolu były znamienne wyższe (25 vs 9 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$, $p < 0,005$). [NB. ostatnie badania nie wykazały zmian w grubości mięśniówki małych tętniczek skrawków płuc pobranych ze szczytu prawego górnego płata u ofiar SIDS w porównaniu z kontrolą]. Podobnie jak w drogach oddechowych, zwiększenie grubości mięśni gładkich w tętnicach płucnych mogło być markerem przewlekłej hipowentylacji

prowadzącej do niedotlenienia i infekcji, stwierdzanych także w warunkach doświadczalnych. PDGF-B będący silnym mitogenem naczyniowym aktywowanym przy udziale podjednostki p50 czynnika jądrowego-kappa B (NF-kappa B), jest prawdopodobnie również odpowiedzialny za nasiloną proliferację komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych płuc u tych dzieci z niedotlenieniem tkanek. Nie można także wykluczyć działania proliferacyjnego wytwarzanych u ofiar SIDS w zwiększonych ilościach metabolitów AA, kwasów epoksykoozatrienowych (EETs), na komórki mezangialne i mięśni gładkich naczyń krwionośnych oraz na komórki nabłonka naczyń płucnych (poprzez PDGF-B i/lub nabłonkowy czynnik wzrostu), mimo dotychczas znanej specyficzności regionalnej ich wpływu jedynie na naczynia nerek. Niedawne badania wykazały, że AA znamienne zwiększał także wzrost komórek oraz wczesną ekspresję genu mRNA w fibroblastach, poprzez nasilenie produkcji PGE₂ aktywującej kinazę białka C.

W badaniach doświadczalnych, hipoksja lub hipoksja ze stanem zapalnym powodowały zarówno supresję ilości wątrobowego CYP450 i niektórych jego izoenzymów (np. CYP1A1/1A2), jak i pobudzenie innych (np. CYP3A6) oraz ich mRNA, m.in. poprzez IL-1 β , IFN- γ , IL-2, oraz erytropoetynę. Niedotlenienie było także przyczyną modulacji ekspresji mediatorów zapalnych w różnych typach komórek, np. w monocytach dochodziło do znamiennego zwiększenia ekspresji mRNA antagonisty receptora cytokiny prozapalnej IL-1, i równoczesnego zwiększenia, chociaż w mniejszym stopniu, ekspresji i uwalniania mRNA IL-1 α oraz IL-1 β . U szczurów z fenotypem niskiej odporności na niedotlenienie dochodziło do zwiększenia aktywności i czasami całkowitej ilości CYP1A1, 1A2, 2C8, 3A1, i 2E1, zaś szczury z wysoką odpornością na hipoksję miały podwyższoną aktywność katalityczną izoenzymów CYP1A2, 2C6 i 2B1. Stwierdzono też, że u szczurów z fenotypem niskiej odporności na hipoksję, poziom kortykosteronu w osoczu

był znamienne większy niż u zwierząt z wysoką odpornością, z towarzyszącym zwiększeniem aktywności CYP3A. Wyniki tych badań są zbieżne ze stwierdzeniem u ofiar SIDS znamienego zwiększenia aktywności CYP2C9 w mikrosomach wątroby oraz podwyższenia poziomu kortyzolu we krwi, co może potwierdzać niedotlenienie organizmu tych dzieci.

W wątrobie ofiar SIDS, zwłaszcza w pierwszym miesiącu życia, stwierdzono wyższe stężenia żelaza nie pochodzącego z hemu, w porównaniu z kontrolą (mediana 296 vs. 105 mikrogramów żelaza/g wątroby, odpowiednio). Było to prawdopodobnie spowodowane powstaniem ognisk erytropoezy wątrobowej indukowanych przez erytropoetykę stymulowaną przez HIF-1 powstający w warunkach niedotlenienia. Stężenie żelaza zmniejszało się z wiekiem rozwojowym wykazując jednak zbieżność z wiekiem dzieci, w którym dochodziło do największej częstości zgonów. Duże nagromadzenie żelaza w niektórych narządach ofiar SIDS może wyjaśniać zmniejszoną odporność tych niemowląt na infekcje, a także nasiloną produkcję ROS uszkadzających tkanki. Nadmiar żelaza w organizmie mógł także powodować supresję aktywności izoenzymów cytochromu P450, np. CYP1A1 na poziomie transkrypcyjnym, w związku z aktywacją NF-kappa B niezbędną dla wywarcia działania hamującego aktywność enzymów CYP450 przez TNF- α . Dodatkowo, wiązanie generowanego w organizmie NO z żelazem hemu mogło powodować powstanie kompleksów, tzw. adduktów NO-P450, które także nieodwracalnie hamują katalityczną aktywność izoenzymów CYP. Wreszcie, nadmiar żelaza nie pochodzącego z hemu stwierdzany w wątrobie i nadnerczach ofiar SIDS mógł być powodem szybszego zużycia powstającego NO poprzez jego wiązanie, osłabiając w ten sposób ochronne działanie antyoksydacyjne NO, zabezpieczające tkanki przed cytotoksycznym działaniem ROS.

Należy podkreślić, że hipoksja mogła także zwiększać ekspresję genów cytokin prozapalnych IL-1 α oraz IL-8 w komórkach śródbłonna naczyń

krwionośnych ofiar SIDS, promując ekspresję, m.in. cząsteczek adhezji leukocytów na ścianach naczyń. LPS otoczek komórek bakteryjnych mógł aktywować geny hipoksji w makrofagach, takie jak transporter glukozy 1 (*glucose transporter 1*) oraz VEGF, zwiększając poziom mRNA HIF- α do wartości stwierdzanych w stanach niedotlenienia. Z drugiej strony, TNF- α oraz NO hamowały stabilizację powstającego HIF-1 α , prawdopodobnie poprzez generowanie ROS ($O_2^{\cdot -}$). Z praktyki klinicznej wiadomo, że u chorych na przewlekłą obturacyjną chorobę płuc, niedokrwienne uszkodzenie mózgu, i stan przedzruciawkowy, niedotlenienie tkanek powodowało również znaczne miejscowe zwiększenie produkcji TNF- α oraz IL-1, a także przyspieszenie generacji TNF- α w makrofagach pęcherzyków płucnych, oraz monocytach i makrofagach krwi obwodowej stymulowanych przez LPS. Sam TNF- α słabo stymulował produkcję i uwalnianie ROS przez leukocyty, lecz w obecności LPS znacznie zwiększał takie działanie w ogniskach zapalnych z mikroorganizmami. Warto dodać, że interakcja ROS z NO mogła powodować powstawanie nadtlenu azotu (N_2O_2), silnego utleniacza odgrywającego ważną rolę w patogenezie zgonu osób z zespołem zaburzeń oddychania. Wreszcie, niedotlenienie mogło przyczyniać się do zgonu ofiar SIDS, ponieważ powstający w tych warunkach HIF-1 α powoduje apoptozę komórek śródbłonka naczyń krwionośnych hamując cykl komórkowy na poziomie fazy G0/G1 (tabela 1).

W reakcjach zapalnych dochodzi do wielu interakcji cytokin z mediatorami pochodzącymi z lipidów. Podczas stymulacji komórki przez TNF- α generowany jest AA, który wywiera główny wpływ na reakcje tej komórki zwiększając produkcję ROS, uwalniając enzymy z ziarnistości komórkowych, zwiększając przyleganie komórki do ściany naczyń krwionośnych i uszkodzenie śródbłonka, oraz hamując migrację komórek. Synergistyczne zwiększenie produkcji ROS przez leukocyty obojętnochłonne

poddane działaniu TNF- α było spowodowane nie tylko działaniem AA, lecz także innych n-6 oraz n-3 wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA, *polyunsaturated fatty acids*), jak kwas ikozapentaenowy (EPA), dokozaheksaenowy (DHA), oraz czynników stymulujących. Należy podkreślić, że ROS powstałe podczas hipoksji i stanów zapalnych powodowały supresję enzymów wątrobowych CYP450 poprzez zmniejszenie zarówno całkowitej ilości P450 jak i aktywności poszczególnych izoenzymów. W stanach zapalnych spowodowanych infekcją wirusową i/lub bakteryjną, rekrutacja i aktywacja leukocytów obojętnochłonnych, której towarzyszy powstawanie ROS, przyczyniała się więc nie tylko do uszkodzenia tkanek, lecz także zaburzała procesy biochemiczne w ustroju.

1.7 Zaburzenia metaboliczne

1.7.1 Obniżona aktywność karboksykinazy fosfoenolpirogonianowej

U ofiar SIDS stwierdzono znamienne obniżenie aktywności karboksykinazy fosfoenolpirogonianowej (PEPCK, *phosphoenolpyruvate carboxykinase; EC 4.1.1.32*) w wątrobie w porównaniu z kontrolą, świadczące o upośledzeniu glukoneogenezy i gliceroneogenezy. W skrócie, glukoneogeneza jest procesem metabolicznym, w którym glukoza powstaje z niewęglowodanowych substratów metabolicznych, takich jak pirogonian, mleczan, lub aminokwasy, głównie alanina. Proces ten zachodzący głównie w wątrobie i nerkach jest niezbędny do produkcji glukozy podczas głodzenia, gdy magazyny glukozy są wyczerpane. Kluczowym etapem glukoneogenezy jest powstanie fosfoenolpirogonianu ze szczawiooctanu, katalizowane przez PEPCK w cyklu Krebsa (ryc. 1, 2 i 3). Reakcja ta omija termodynamicznie niekorzystny proces przekształcania pirogonianu w fosfoenolpirogonian przez kinazę

pirogronianową. Uważa się, że aktywność enzymu PEPCK jest czynnikiem ograniczającym szybkość procesu glukoneogenezy wątrobowej i nerkowej oraz gliceroneogenezy w adipocytach tkanki tłuszczowej, ponieważ katalizuje szereg reakcji biochemicznych przebiegających na skrzyżowaniu wielu podstawowych dróg metabolicznych, a jego niedobór/brak może mieć nieprzewidywalny wpływ na kumulację specyficznych metabolitów tych procesów w organizmie dziecka. Gliceroneogeneza w wątrobie i tkance tłuszczowej jest skróconą wersją glukoneogenezy, w której także z prekursorów niewęglowodanowych jak mleczan, pirogronian i alanina pod wpływem PEPCK powstaje glicerolo-3-fosforan (G3P) zamiast glukozy. Następnie, G3P bierze udział w re-estryfikacji kwasów tłuszczowych powstających podczas lipolizy z triacylglicerolu (TG) (w warunkach prawidłowych tą drogą około 65-70% FFA podlega z powrotem re-estryfikacji do TG). Jako swój substrat, PEPCK zużywa szczawiooctan powstający w cyklu kwasu trójkarboksylowego. Celem gliceroneogenezy jest regulacja uwalniania niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych (FFA, *free fatty acids*) poprzez cykl FFA-triglicerydy (TG). Ponieważ tkanka tłuszczowa nie zawiera kinazy glicerolu, wolny glicerol powstający podczas lipolizy nie może być użyty do syntezy TG. Zamiast tej reakcji, w przypadku ograniczonej podaży glukozy, FFA uwalniane z TG są z powrotem re-estryfikowane do TG poprzez G3P syntetyzowany z pirogronianu drogą gliceroneogenezy. Gdyby nie było re-estryfikacji, 1 mol glicerolu przypadałby na 3 mole FFA uwalniane w procesie lipolizy z 1 mola TG, natomiast przy prawidłowej re-estryfikacji w procesie gliceroneogenezy, ta proporcja wynosi mniej niż 3 mole FFA na 1 mol glicerolu. Tak więc, całkowita szybkość uwalniania FFA zależy od stanu równowagi między lipolizą a re-estryfikacją, i ma na celu zapobieganie nadmiernemu uwalnianiu niezestryfikowanych FFA, które mają działanie ketogenne. Należy podkreślić, że utrzymywanie się podwyższonego poziomu FFA w surowicy może spowodować wystąpienie oporności na insulinę i rozwój

cukrzycy typu 2.

Supresja aktywności PEPCK u wielu ofiar SIDS mogła być spowodowana, przynajmniej częściowo, niedoborem witaminy A, ponieważ w wątrobie niemowląt zmarłych z tego powodu w wieku do 1 m.ż. stwierdzono bardzo niskie stężenia witaminy A (mediana 4 μg wit A/g tkanki w porównaniu ze 100 $\mu\text{g}/\text{g}$ w 12 mies. życia), a niedobór tej witaminy jest zaliczany do czynników ryzyka wystąpienia SIDS. W tabeli 1 przedstawiono czynniki powodujące supresję aktywności PEPCK. Aktywność PEPCK jest kontrolowana poprzez zmiany szybkości transkrypcji genu tego enzymu pod wpływem różnych czynników hormonalnych i dietetycznych ulegając zwiększeniu podczas głodzenia i przy diecie nie zawierającej węglowodanów, pod wpływem glikokortykosteroidów i hormonu tarczycowego (w wątrobie), nasyconych i nie zmetabolizowanych kwasów tłuszczowych (w adipocytach), i zmniejszeniu pod wpływem insuliny, glikokortykosteroidów (w adipocytach), glukozy, NO (w hepatocytach) (tabela 2 i 3). Myszy z brakiem tego enzymu ginęły w ciągu 2-3 dni po urodzeniu, natomiast zwierzęta pozbawione co najmniej 90% całkowitej ilości PEPCK, lub zupełnie pozbawione enzymu wątrobowego, przeżywały, i mimo 24-godzinnej głodzenia były normoglikemiczne. U myszy pozbawionych wątrobowego PEPCK, w wyniku głodzenia dochodziło do stłuszczenia wątroby pomimo wzmożonej stymulacji szeregu genów kodujących enzymy utleniające FFA. W procesie gliceroneogenezy, szybkość reakcji biochemicznej kontrolowanej przez PEPCK zależy od aktywności cytozolowej formy enzymu, PEPCK-C (u człowieka stosunek cytozolowej do mitochondrialnej formy enzymu wynosi 50:50). Opisano przypadek niedoboru PEPCK-C u 2 ¹⁰/₁₂-letniego chłopca z ciężką hipoglikemią, utrzymującą się od okresu niemowlęcego. Poziomy izoformy wątrobowej fosfatazy glukozy-6-fosforanu, fruktozy-1,6-dwufosfatazy oraz karboksylazy pirogronianu były u niego prawidłowe, podobnie jak całkowita aktywność wątrobowej

mitochondrialnej formy PEPCK. Autopsja wykazała ciężki zanik mózgu, atrofię nerwu wzrokowego, oraz nacieki tłuszczowe w wątrobie i nerkach. Z piśmiennictwa wiadomo, że przy obniżonej aktywności PEPCK dochodzi do podwyższenia poziomu FFA w surowicy i zmniejszenia ilości magazynowanych TG, co w skrajnych przypadkach powodowało wystąpienie zespołu metabolicznego z zaburzeniami biochemicznymi charakterystycznymi dla wczesnej fazy cukrzycy typu 2. Biorąc te dane pod uwagę, u ofiar SIDS nasilona gliceroneogeneza odbywająca się w adipocytach tkanki tłuszczowej oraz w wątrobie miała więc istotne znaczenie dla zwiększenia odbywającej się po lipolizie przemiany FFA z powrotem w TG pod wpływem PEPCK-C (rycina 1). Przewlekły niedobór PEPCK u ofiar SIDS mógł więc powodować upośledzenie gliceroneogenezy, zwiększając uwalnianie FFA z tkanki tłuszczowej do krwi, co z kolei mogło prowadzić do zmniejszenia lub braku wrażliwości organizmu na insulinę, sprzyjając rozwojowi cukrzycy typu 2. Podobnie jak u zmarłego dziecka z niedoborem PEPCK-C, u ofiar SIDS także stwierdzono stłuszczenie wątroby oraz czasami hipoglikemię, nieprawidłowości charakterystyczne dla tych zaburzeń biochemicznych, chociaż mimo niedoboru PEPCK będącego enzymem kluczowym zarówno dla glukoneogenezy jak i gliceroneogenezy, zawartość glikogenu w wątrobie, jak również stężenie glukozy w płynie szklistym oka były niezmienione, co może wskazywać, że powyższe zmiany kompensacyjne procesów metabolicznych były jeszcze, przynajmniej częściowo, skuteczne.

Należy podkreślić, że cytokiny prozapalne TNF- α oraz IL-1 generowane w zwiększonych ilościach u ofiar SIDS pobudzały uwalnianie AA z neutrofilii i innych komórek, który podobnie jak i inne FFA, poprzez ROS wywierał działanie hamujące aktywność i stężenie wielu enzymów CYP450. Warto też dodać, że hipowitaminoza A stwierdzana u niektórych ofiar SIDS mogła sprzyjać zwiększonej syntezie NO w komórkach mięśni gładkich naczyń

krwionośnych i innych, stymulowanej także przez IL-1 β TNF- α i IFN- γ , zwiększając tym samym ewentualne działanie supresyjne NO nie tylko na transkrypcję genu PEPCK w hepatocytach, lecz także wiele enzymów CYP450.

1.7.2 Ważna rola przysadkowego polipeptydu aktywującego cyklazę adenylową (PACAP) oraz wazoaktywnego peptydu jelitowego (VIP) w kontrolowaniu homeostazy organizmu

U niektórych ofiar SIDS, zaburzenia funkcji organizmu prowadzące do zgonu mogą być nasilane przez nieprawidłową funkcję PACAP (*pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*) oraz VIP (*vasoactive intestinal peptide*) odgrywających ważną rolę w regulacji homeostazy układu immunologicznego, termicznej, sercowo-naczyniowej, oraz przemiany węglowodanów i lipidów organizmu. VIP i strukturalnie podobny PACAP należą do nadrodziny hormonów sekretyna/glukagon, są produkowane przez komórki limfoidalne, i mają szerokie spektrum działania immunologicznego poprzez różne specyficzne receptory wyrażone w wielu komórkach immunokompetentnych.

PACAP jest neuropeptydem obecnym w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym i podobnie jak PEPCK, bierze udział w procesach glukoneogenezy oraz gliceroneogenezy poprzez zwiększenie wewnątrzkomórkowego cAMP. W adipocytach, PACAP wykazywał dwojake działanie, zarówno kataboliczne jak i anaboliczne, w zależności od stężenia insuliny, która skutecznie hamowała metabolizm triglicerydów nasilany przez ten enzym, w sposób zależny od 3-kinazy fosfatydyloinozytolu i fosfodiesterazy 3. Przypuszcza się, że PACAP i katecholaminy β -adrenergiczne indukują lipolizę krótko po jedzeniu i w czasie głodzenia, gdy poziomy insuliny są niskie, zaś przy wyższych stężeniach insuliny nasilają magazynowanie triglicerydów.

PACAP indukował też aktywację kinazy białkowej A, oraz nasilał zarówno wydzielanie insuliny, jak i wychwyt glukozy w adipocytach spowodowany przez insulinę, wykazując w ten sposób działanie przeciwcukrzycowe zarówno w typie 2 cukrzycy, jak w nietolerancji glukozy, na poziomie dwóch ważnych etapów metabolizmu glukozy.

VIP i PEPCK powodowały także zmniejszenie produkcji wielu cytokin prozapalnych na poziomie transkrypcjonalnym, jak TNF- α , IL-1 β , IL-6 (poprzez zahamowanie translokacji jądrowego p65 i wiązania NF-kappa B-DNA) oraz NO, a także indukowały zmianę reakcji immunologicznej w makrofagach z typu Th1 (IFN- γ , IL-2) na Th2 (IL-4, IL-5) dzięki stymulacji ekspresji B7.2. Oba te wielofunkcyjne neuropeptydy hamowały też produkcję cytokiny prozapalnej IL-12 (w sposób zależny od dawki) oraz IFN- γ w makrofagach myszy z endotoksemią LPS i zwiększały wytwarzanie cytokiny przeciwzapalnej IL-10 *in vitro* oraz *in vivo*. Ważność praktyczną działania immunomodulującego PACAP podkreśla fakt zastosowania tego enzymu i jego analogów w leczeniu ostrych i przewlekłych stanów zapalnych oraz chorób autoimmunologicznych.

Wreszcie, należy podkreślić, że PACAP wywierał także działanie neuroprotektoryjne zapobiegając degeneracji neuronów mózdzku poprzez zahamowanie aktywacji 3-kaspazy i fragmentacji DNA powodowanej przez ROS. Trzeba też dodać, że badania na myszach z brakiem PACAP wykazały znamienne zmniejszoną reakcję układu oddechowego tych zwierząt na stan hipoksji i hiperkapni w postaci przedłużonego bezdechu poprzedzającego wystąpienie bloku przedsionkowo-komorowego w sercu. Biorąc powyższe informacje pod uwagę można przypuszczać, że mutacje w genie PACAP oraz VIP mogą mieć istotny wpływ na zaburzenia oddychania, funkcję serca, ośrodkowego układu nerwowego, nasilenie procesów zapalnych, a także zaburzenia metaboliczne stwierdzane u ofiar SIDS.

1.7.3. Wtórne podwyższenie ekspresji RNA, stężenia i aktywności CYP2C

W pierwszych miesiącach po urodzeniu dochodzi do szybkiego zwiększenia ilości i aktywności wielu enzymów cytochromu P450 w wątrobie. U ofiar SIDS, Treluyer i wsp. zbadali poziom całkowitej ilości wątrobowego CYP450 oraz izoform CYP1A2, CYP2E1, CYP4A, CYP3A i CYP2C, stwierdzając, że chociaż całkowita ilość wątrobowego CYP450 była podobna jak w grupie kontrolnej, stężenie CYP2C było znamienne wyższe z powodu nagromadzenia RNA kodującego tę izoformę enzymu. Ilość RNA kodującego poszczególne izoenzymy CYP2C była także znamienne większa, tj. CYP2C9 było 4,4 razy więcej niż w grupie kontrolnej, zaś 2C8 i 2C18 odpowiednio 2,5 oraz 2,3 razy więcej. Autorzy postulowali, że nadmierna ekspresja CYP2C powodowała zwiększoną produkcję kwasów epoksyeikozatrienoanowych z AA, które rozszerzały mięśnie gładkie naczyń krwionośnych w wielu narządach, prowadząc do zaburzenia regulacji hemodynamicznej i przepływu krwi, i w efekcie przyczyniając się do zgonu tych dzieci. Z drugiej strony wiadomo jednak, że CYP2C9 stanowi także funkcjonalnie znaczące źródło powstawania ROS, co także mogło mieć wpływ na zmiany napięcia ścian naczyń krwionośnych i zaburzenia homeostazy, a niedawno wykazano, że anion ponadtlenkowy i nadtlenek wodoru powstające w warunkach niedotlenienia (a więc tak jak u ofiar SIDS), odgrywają ważną rolę w skurczu naczyń krwionośnych płuc.

Treluyer i wsp. stwierdzili, że znaczna aktywacja ekspresji genu CYP2C u ofiar SIDS mogła być spowodowana niespecyficzną stymulacją transkrypcji tego genu towarzyszącą infekcji wirusowej przebiegającej z uwalnianiem IFN- α i innych cytokin, ponieważ w wątrobie ofiar SIDS (słabiej w płucach i nerkach) wykazano znamienne podwyższenie poziomu MxA,

będącego markerem IFN- α oraz Fas, białka przezłonowego z rodziny TNF/czynnika wzrostu neuronów. Należy dodać, że zwiększona aktywacja ekspresji genu CYP2C mogła być także reakcją obronną ofiar SIDS na stymulację produkcji AA z neutrofilii przez produkowane w nadmiarze cytokiny prozapalne, IL-1, a zwłaszcza TNF- α . Co więcej, wydaje się, że mogła to powodować również długotrwała stymulacja kortyzolem oraz przewlekłe narażenie tych dzieci na wdychanie dymu tytoniowego, ponieważ we krwi ofiar SIDS z wybroczynami na narządach wewnętrznych stwierdzono znacznie podwyższone poziomy kortyzolu, a w tkankach wysokie stężenia nikotyny. Za stymulacją kortyzolem transkrypcji genu CYP2C przemawiają także wyniki badania metabolizmu AA, będącego endogennym substratem CYP2C, które wykazały u tych dzieci znamienne zwiększenie produkcji kwasu 14,15-, i 11,12-dihydroksyepoksyekoatrienowego [diHETE] oraz HETE1 (przypuszczalnie 15-HETE) towarzyszące zwiększonemu stężeniu CYP2C8 i 2C9 w mikrosomach wątroby, a wiadomo, że regiony promotora genów CYP2C8 i 2C9 zawierają zgodne sekwencje dla elementów reakcji glikokortykosteroidów. Należy też podkreślić ważną rolę w tym procesie przewlekłego niedotlenienia ofiar SIDS, ponieważ na modelu nabłonka rogówki poddanego hipoksji stwierdzono znamienne i selektywną stymulację syntezy eikozanoidu prozapalnego 12(R)-HETE z AA.

Mimo iż cytokiny prozapalne powodują supresję produkcji i działania czynnika hiperpolaryzacyjnego śródbłonka naczyń krwionośnych (EDHF, *endothelium-derived hyperpolarizing factor*), m.in. poprzez przewlekłe generowanie NO i iNOS, nasilonej ekspresji CYP2C towarzyszyło rozszerzenie tętnic wieńcowych serca pośredniczone przez EDHF. Badania wykazały, że to właśnie EDHF jest enzymem CYP2C (CYP2C8/34 i 2C9) zwiększającym produkcję kwasu 11,12-epoksyekoatrienoanowego (11,12-EET) i będącym zarazem syntazą EDHF, regulującym przepływ krwi, chociaż nie we wszystkich

obszarach naczyniowych u osób zdrowych. W doświadczalnym niedokrwieniu/niedotlenieniu serca (taka sytuacja może mieć miejsce u ofiar SIDS) regioizomer 11,12-EET wywierał korzystne działanie biologiczne znacznie poprawiające kurczliwość mięśnia sercowego.

Badania na zwierzętach wykazały, że w przeciwieństwie do innych łożysk naczyniowych, EETs działały silnie kurcząco na małe tętniczki płucne, natomiast u szczurów z doświadczalnym ostrym zapaleniem płuc wywołanym przez bakterie z grupy *Pseudomonas*, zarówno produkcja EETs i 20-HETE w mikrosomach płuc, jak i ich działanie kurczące małe tętnice płucne ulegały znamiennej zmniejszeniu w porównaniu z kontrolą. Okazało się też, że EETs powstające z AA w wyniku działania CYP2C9 i 2C8 mają działanie przeciwzapalne manifestujące się zmniejszeniem produkcji naczyniowej cząsteczki adhezyjnej-1 (VCAM-1, *vascular adhesion molecule-1*), selektyny E, i międzykomórkowej cząsteczki adhezyjnej-1 (ICAM-1, *intercellular adhesion molecule-1*) w komórkach śródbłonna i hamowaniem przylegania leukocytów do ścian naczyń krwionośnych, nasilanych przez cytokiny prozapalne. Ponieważ w wielu tkankach ofiar SIDS stwierdza się podkliniczny stan zapalny, można przypuszczać, że zwiększenie ekspresji CYP2C powodujące wzrost produkcji EETs u tych dzieci (mimo zmniejszonej przez hipoksję ekspresji enzymu CYP2J2 również biorącego udział w metabolizmie AA), podobnie jak upośledzenie obkurczania się małych naczyń tętniczych w zapalnie zmienionych płucach, a także w warunkach niedotlenienia organizmu, są prawdopodobnie mechanizmami obronnymi organizmu mającymi na celu przeciwdziałanie procesom zapalnym i ewentualnemu wystąpieniu nadciśnienia płucnego.

Podsumowując, znamienne wyrównawcze zwiększenie ekspresji i aktywności izoenzymu CYP2C8/9 stwierdzone w wątrobie ofiar SIDS było prawdopodobnie niezbędne dla intensyfikacji metabolizmu AA do kwasów EETs i diHETEs. Przewlekłe niedotlenienie oraz podkliniczne procesy zapalne

toczące się u tych dzieci także mogły sprzyjać zwiększonemu metabolizmowi AA. Za takimi przyczynami zwiększonej ilości CYP2C u ofiar SIDS przemawia fakt, że CYP2C8 (główna konstytutywna epoksygenaza AA) i CYP2C9 (ważna epoksygenaza kwasu linolowego) odgrywają ważną rolę w utrzymaniu homeostazy w wątrobie. Powstające w nadmiarze EETs i diHETEs mające regiospecyficzne działanie rozszerzające lub zwężające mięśnie gładkie naczyń krwionośnych w wielu narządach, a także wywierające działanie przeciwzapalne, mogły mieć istotny wpływ na regulację hemodynamiczną przepływu krwi oraz przebieg procesów zapalnych u ofiar SIDS.

1.7.4. Wrodzony niedobór i/lub ewentualna supresja dehydrogenazy acylo~S-CoA

U ofiar SIDS, częstość występowania mitochondrialnych zaburzeń utleniania KT ocenia się na około 5%. Wrodzony niedobór dehydrogenazy acylo~S-CoA swoistej wobec kwasów tłuszczowych (KT) o średniej długości łańcucha (MCADD, *medium chain acyl-Co dehydrogenase deficiency*) powodował poważne zakłócenia w metabolizmie KT. Badania składu KT wątroby, mięśni szkieletowych i serca pobrane od chorych zmarłych z powodu defektów β -oksydacji, tj. MCADD, MADD (*multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency*), oraz VLCADD (*very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency*) wykazały zwiększenie ilości pośrednich metabolitów procesu utleniania nienasyconych KT, tj. kwasu 4-dekanowego 10:1 (n-6), 5-dodekanowego 12:1 (n-7), 5-tetradekanowego 14:1 (n-9), 5,8-tetradekadienowego 14:2 (n-6), i 7,10-heksadekadienowego 16:2 (n-6). Frakcjonowanie lipidów na różne klasy wykazało, że powyższe metabolity pośrednie KT były obecne tylko we frakcji triglicerydów, natomiast nie znaleziono ich we frakcji WKT lub fosfolipidów analizowanych tkanek. Autorzy

sugerowali, że produkty pośrednie utleniania nienasyconych KT ulegające akumulacji w przebiegu MCADD, MADD, i VLCADD były transportowane do retikulum endoplazmatycznego w celu estryfikacji do neutralnych glicerolipidów. Ponieważ u około 15% niemowląt, które były rodzeństwem dzieci z zaburzeniami mitochondrialnego utleniania KT również stwierdzono występowanie takich nieprawidłowości, wydaje się, że są one częstsze niż przypuszczano, lecz ich wykrycie wymaga analizy frakcji triglicerydów w celu znalezienia metabolitów pośrednich, lub bezpośredniego oznaczenia w próbkach krwi, jak np. kwas dodekanowy (laurynowy). U ofiar SIDS w wieku 1 do 6 miesięcy stwierdzono też znacznie niższe w porównaniu z kontrolą poziomy kwasu dwuhomo-gamma linolenowego (kwas 8,11,14-ikozatrienowy), będącego prekursorem prostaglandyn grupy 1 oraz arachidonianu, a także statystycznie znamiennej związek pomiędzy poziomami kwasu dokozapentaenowego (kwas klupanodonowy) a wiekiem tych dzieci i zawartością żelaza w wątrobie.

W wątrobie niektórych ofiar SIDS stwierdzono rozlane mikropęcherzykowe zmiany tłuszczowe trudne do odróżnienia od nieprawidłowości opisanych w zespole Reye'a. Analiza składu KT wątrobowych triglicerydów w zespole Reye'a, odzwierciedlających, podobnie jak u ofiar SIDS, zaburzoną funkcję mitochondriów komórkowych, wykazała nieprawidłowości profilu surowiczego wielu nienasyconych KT. Stwierdzono znaczne podwyższenie poziomu różnych wielonienasyconych KT odzwierciedlające znaczną aktywność desaturazy delta 9, delta 6, delta 5, i delta 4, i aktywnego wydłużania i/lub transferu acylu z lipidu do lipidu, oraz znamienne zmniejszenie poziomu kwasu palmitynowego (16:0) i innych nasyconych kwasów tłuszczowych. Biorąc pod uwagę powyższe dane, nie można wykluczyć, że u niektórych genetycznie predysponowanych ofiar SIDS, infekcje wirusowe/bakteryjne i/lub stany zapalne przebiegające z nieprawidłowościami cytokin prozapalnych i przeciwzapalnych także miały

swój udział w supresji enzymów biorących udział w mitochondrialnej β -oksydacji kwasów tłuszczowych.

1.8 Szczepienie DTP

Od udokumentowania w 1979 r. zgonu 4 niemowląt w ciągu 24 godzin po szczepieniu DTP, w następnych latach opisano kolejne przypadki SIDS, których przyczynę wiązano z podaniem tej szczepionki. Istnienie takiego związku stwierdzano zwłaszcza w przypadkach niemowląt o masie urodzeniowej ciała powyżej 2500 g, zmarłych w pierwszych trzech dniach po szczepieniu w porównaniu z tymi, które zmarły po upływie 30 dni od dnia szczepienia. Badania przeprowadzone we Francji uznały szczepienie DTP za czynnik ryzyka SIDS, natomiast u 5 hiszpańskich ofiar SIDS metodą meta-analizy wykluczono możliwość takiej zależności. Obecnie wydaje się jednak, że taki związek istnieje, ponieważ u myszy podanie szczepionki DTP lub LPS powodowało znaczne zwiększenie masy wątroby i śledziony (u myszy reagujących i nie reagujących na endotoksynę) utrzymujące się przez 7 do 14 dni (DTP) lub śledziony obecne przez 3 do 7 dni u zwierząt reagujących na LPS. Po upływie 8 do 12 godzin od podania DTP wykazano też zależne od dawki szczepionki i czasu znamienne obniżenie ekspresji mRNA i poziomów enzymów CYP450 (CYP1A2 i 2E1) wraz z przedłużeniem o 50% czasu snu po podaniu heksobarbitalu, utrzymującym się przez 7 dni, a także wieloogniskowe histologiczne zmiany zapalne z martwicą hepatocytów po szczepionce DTP, i brak tych zmian po podaniu LPS (tabela 4 i 5). Obniżenie poziomów izoenzymów CYP450 poprzedzało 3-, do 6-krotne zwiększenie ekspresji mRNA IL-6, IL-1 i TNF ze szczytem po upływie 1-2 godzin, oraz znaczne podwyższenie ekspresji mRNA indukcyjnej syntazy NO, której najwyższy poziom obserwowano po 4 godzinach. Szczepionka DTP i podanie toksyny krztuścowej powodowały także znamienne zwiększenie produkcji IFN

przebiegające równolegle z obniżeniem poziomów enzymów CYP450. Spadek aktywności wątrobowego CYP450 i supresja metabolizmu leków obserwowane po podaniu pełnokomórkowej szczepionki DTP były zgodne zarówno ze zmniejszaniem się tego działania po iniekcjach zmutowanej szczepionki pełnokomórkowej, jak i brakiem takiego działania po podaniu szczepionki acelularnej. Podobnym zmianom podlegał czas snu zwierząt doświadczalnych po podaniu heksobarbitalu, w odróżnieniu od poziomów IL-6 w surowicy zwierząt, które po zastosowaniu zmutowanych szczepionek ulegały obniżeniu. Badania własne wykazały również, że u niektórych niemowląt i małych dzieci szczepienie DTP powodowało ujawnienie skrycie przebiegających chorób układu moczowego, m.in. zespołu nerczykowego, ostrej niewydolności nerek. Okazało się też, że toksyna krztuśca wpływała nie tylko na reakcje immunologiczne organizmu powodując proliferację limfocytów, lecz także sprawiała, że stymulowane przez nią monocyty i limfocyty zwiększały produkcję i uwalnianie cytokin prozapalnych TNF- α , IL-6, i IL-1 β . Podanie szczepionki powodowało także znamienne zwiększenie stężenia haptoglobiny (białko ostrej fazy) w surowicy dzieci, w sposób zależny od czasu i dawki szczepionki, przy czym kluczową rolę odgrywał w tym receptor p55 TNF- α . Należy dodać, że neurologiczne objawy uboczne obserwowane czasami po podaniu pełnokomórkowej szczepionki krztuśca są przypuszczalnie związane z aktywacją IL-1 β , a także jej składników sygnalizacyjnych, w ośrodkowym układzie nerwowym.

1.9 Nieprawidłowości genetyczne

W 1987 r. opisano zgon bliźniąt, który nastąpił po upływie 2 do 3 godzin od szczepienia DTP, co może wskazywać na genetyczne podłoże SIDS. Badania genetyczne grupy ofiar SIDS wykazały, że 70% analizowanych niemowląt było nosicielami allelu genu IL-10-592*A, będącej cytokiną przeciwzapalną,

w porównaniu z kontrolą ($p < 0,007$). Wskazuje to, że w wielu przypadkach przyczyną SIDS były genetycznie zdeterminowane zaburzenia równowagi w reakcji organizmu na obecność mikroflory bakteryjnej/wirusowej i niedotlenienia w generowaniu cytokin prozapalnych i przeciwzapalnych, na niekorzyść tych ostatnich. Przemawiają za tym niedawne badania, w których po zastosowaniu toksyny gronkowcowej (TG) i LPS, reakcje zapalne we krwi rodziców ofiar SIDS oceniane na podstawie poziomu produkowanych cytokin IL-1, IL-6, IL-10, TNF oraz IFN, były znamienne wyższe w porównaniu z grupą kontrolną. Analiza niewielkiej grupy rodziców ($n = 10$), u których wykonano pilotowe badania genotypowe, wykazała polimorfizm IFN u 40% tych dawców (3/3) w porównaniu z 15,4 % oraz 0% innych dawców.

Badania przeprowadzone u 257 ofiar SIDS wykazały także obecność wariacji w I nadmiernie różnorodnym regionie (HVR-I, *hypervariable region-I*) oraz 9 różnych mutacji punktowych w regionach kodujących mitochondrialnego DNA (mtDNA). Stwierdzono istnienie zależności pomiędzy wysoką liczbą substytucji HVR-I a potencjalnie patogennymi mutacjami punktowymi mtDNA w regionach kodujących. Średnia liczba substytucji w HVR-I była największa w grupie ofiar SIDS zmarłych z powodu infekcji w porównaniu z kontrolą ($p < 0,005$), co wskazuje, że zwiększone poziomy substytucji w tym regionie mogą być wskaźnikiem niestabilności mtDNA, zaś mutacje mtDNA mogły odgrywać ważną rolę u niektórych ofiar SIDS. Mimo iż dalsze badania wykazały, że wszystkie te substytucje w HVR-I u ofiar SIDS miały charakter dziedziczny, należy podkreślić, że ROS generowane w dużych ilościach u tych dzieci mają właściwości utleniające i nitrozujące różne substraty w sposób zależny od dawki i czasu, m.in. metylotransferazę 0^6 -metyloguaniny DNA, będącą enzymem naprawiającym DNA. Może to mieć istotny wpływ na zmiany w budowie i składzie DNA oraz dynamikę tych nieprawidłowości zachodzących u ofiar SIDS.

Ponieważ niedobór PEPCK ma istotne znaczenie w patomechanizmie SIDS, nie można u tych dzieci wykluczyć wrodzonych lub nabytych polimorfizmów allelu genu zarówno tego enzymu, jak i innych, biorących udział w glukoneogenezie, gliceroneogenezie oraz cyklu Krebsa (np. dekarboksylazy szczawiooctanu, kinazy pirogronianu). Mogą one być spowodowane działaniem ROS obficie produkowanych u ofiar SIDS, tym bardziej, że powstający równocześnie NO nie pozwala na regenerację zmutowanego DNA. Polimorfizm allelu genu PEPCK mógłby ograniczać szybkość wymienionych procesów biochemicznych w porównaniu z typem dzikim allelu. Przemawia za tym wykrycie u ofiar SIDS wielu rzadkich polimorfizmów genu glukokinazy biorącej udział w metabolizmie glukozy.

U ofiar SIDS stwierdzono też znamiennej zależność między występowaniem infekcji przed zgonem a obecnością częściowej delecji składnika C4A lub C4B dopełniacza, przy czym u niemowląt z infekcjami częstość występowania tych delecji była większa niż w grupie kontrolnej. Wykazano także, że ofiary SIDS miały niedobór matczynych przeciwciał IgG przeciwko rdzeniowi (*core*) endotoksyny (IgG EndoCAb), zaś stężenia wczesnej IgM EndoCAb były znamiennej wyższe w porównaniu z grupą kontrolną, co wskazywało na stymulację immunologiczną, a także powodowało większą podatność tych dzieci na infekcje i cięższy ich przebieg.

1.10 Podsumowanie

U ofiar SIDS, infekcje wirusowe/bakteryjne i stany zapalne oraz przewlekłe niedotlenienie mogły znamiennej zwiększać produkcję cytokin prozapalnych i powodować zaburzenia równowagi w uwalnianych ilościach, na niekorzyść cytokin przeciwzapalnych. Cytokiny prozapalne stymulowały leukocyty wielojądrzaste obojętnochłonne, które uwalniały nadmierne ilości AA oraz ROS. Zwiększone ilości uwalnianego AA mogły być powodem wtórnego

wyrównawczego zwiększenia w wątrobie produkcji CYP2C8 i 2C9 biorących udział w metabolizmie AA do kwasów EET i HETE, wywierających działanie kurczące naczynia krwionośne płuc i przeciwzapalne. Wrodzone lub nabyte niedobory PEPCCK, kluczowego enzymu w procesach glukoneogenezy i gliceroneogenezy, oraz ewentualnie PACAP i dehydrogenazy acylo-S-CoA, były prawdopodobnie powodem upośledzenia re-estryfikacji kwasów tłuszczowych, co wraz z nadmierną produkcją AA i jego metabolitów oraz ewentualną ich akumulacją prowadziło do zaburzeń biochemicznych obserwowanych we wczesnej fazie cukrzycy typu 2. Wreszcie, produkowane w nadmiarze cytokiny prozapalne, ROS (generowane także przez dym tytoniowy i CYP2C8/9) oraz AA i inne nienasycone kwasy tłuszczowe, mogły powodować supresję wielu CYP450 i innych enzymów biorących udział w metabolizmie wielu substancji endogennych, jak kortykosteroidy, witaminy rozpuszczalne w tłuszczach, prostaglandyny, tromboksany oraz substancji egzogennych, upośledzając prawidłowe funkcjonowanie organizmu. Wszystkie te nieprawidłowości oraz przewlekłe niedotlenienie generujące powstanie HIF-1 α powodującego apoptozę komórek, a także szereg nieprawidłowości genetycznych stwierdzonych u tych dzieci, np. alleli genu IL-10-592*A, oraz ewentualnych mutacji genów PACAP i VIP, mogły w efekcie przyczynić się do zgonu ofiar SIDS.

Przewlekłe niedotlenienie, infekcje wirusowe, toksyny bakteryjne i stany zapalne są najbardziej prawdopodobnymi przyczynami śmierci łożeczkowej niemowląt (*sudden infant death syndrome*, SIDS). Badania autopsyjne wykazały zwiększenie gęstości makrofagów i komórek eozynofilnych w płucach, którym towarzyszyło zwiększenie liczby limfocytów T i B. Podwyższone poziomy immunoglobulin, oraz około 20% zwiększenie mięśniówki w ścianie drobnych naczyń tętniczych płuc, ilości komórek mięśni gładkich w drogach oddechowych prowadzące do ich zwężenia, a także podwyższenie stężenia

hemoglobiny płodowej i erytropoetyny we krwi, wskazują na przewlekłe niedotlenienie tych dzieci przed śmiercią. Badania wykazały też pobudzenie immunologiczne śluzówki ściany tchawicy, dwunastnicy, migdałków podniebiennych, oraz krążący we krwi interferon. Niskie, prawidłowe lub podwyższone poziomy kortyzolu w surowicy, towarzyszące temu wybroczyny na organach wewnętrznych, brak matczyńskich przeciwciał IgG przeciwko endotoksynie (EndoCAb) i pobudzone wczesne IgM EndoCAb, częściowe delecje genu C4, a także częsty polimorfizm cytokiny przeciwzapalnej, IL-10, mogły być odpowiedzialne za nadmierne reakcje organizmu na zazwyczaj niegroźne infekcje. U ofiar SIDS, podczas przewlekłego niedotlenienia i infekcji/stanu zapalnego uwalniane były duże ilości cytokin prozapalnych, które przy niedoborze np. IL-10, stanowiły potencjalne źródło czynników uszkadzających tkanki. Cytokiny te powodowały supresję wielu genów enzymów cytochromu P450 i/lub innych ze specjalnym wpływem na poziomy mRNA, ekspresję białka, i aktywność enzymów, wpływając w ten sposób na metabolizm szeregu endogennych substancji lipofilnych, takich jak steroidy, witaminy rozpuszczalne w tłuszczach, prostaglandyny, leukotrieny, tromboksany, i substancji eozegennych. Aktywacja leukocytów wielojądrzastych obojętnochnonnych przez TNF- α i inne cytokiny prozapalne powstające podczas przewlekłego niedotlenienia oraz stanu zapalnego (TNF- α , IL-1 i IL-6), powodowała zwiększenie produkcji aktywnych rodników tlenowych (ART), w reakcji m.in. na generowany w nadmiarze kwas arachidonowy (AA). Niedotlenienie organizmu, zwiększenie stężenia żelaza, podwyższenie aktywności wątrobowego CYP2C9 określanego jako źródło funkcjonalne ART, oraz kumulacja nikotyny w tkankach tych dzieci, także powodowały nasilenie produkcji ART. Interakcja ART z tlenkiem azotu (NO) mogła powodować nasilenie generacji nadtlenu azotu, silnego utleniacza odgrywającego ważną rolę w patogenezie zgonu osób z zespołem zaburzeń

oddychania. Cytokiny prozapalne, ART, AA oraz NO, powodowały także supresję wielu CYP450 i innych enzymów, m.in. karboksykinazy fosfoenolopirogronianu (PEPCK), istotnej w metabolizmie kwasów tłuszczowych (KT) podczas glukoneogenezy i gliceroneogenezy. Niedobór PEPCK stwierdzony u ofiar SIDS (spowodowany także hipowitaminozą A), a także ewentualne nasilenie lipolizy triglicerydów adipocytów przez PACAP, zwiększały poziom KT we krwi z powodu upośledzenia ich re-estryfikacji do triacylglicerolu w adipocytach. Z kolei, nadmiar KT przyczyniał się do powstania zaburzeń metabolicznych, charakterystycznych dla wczesnej fazy cukrzycy typu 2. Było to przypuszczalnie powodem wtórnego, wyrównawczego zwiększenia ekspresji i aktywności izoenzymu CYP2C8/9 przyspieszającego metabolizm AA. Obrzęk płuc i krwawe wybroczyny często stwierdzane u ofiar SIDS mogły być wynikiem tzw. zespołu zwiększonej przepuszczalności naczyń krwionośnych spowodowanego przewlekłym niedotlenieniem i uwalnianiem mediatorów zapalnych IL-1 β i IL-6, a także przeciążeniem układu krążenia i oddechowego związanego ze zwężeniem dróg oddechowych i drobnych naczyń tętniczych płuc. Niedotlenienie ofiar SIDS zwiększało także produkcję HIF-1 α , stymulującego wydzielanie różnych czynników wzrostu przez komórki śródbłonna naczyń, oraz nasilenie podklinicznych procesów zapalnych w ośrodkowym układzie nerwowym, być może nasilanymi także przez mutacje genów PACAP i VIP, prowadziły do gliozy pnia mózgu oraz zaburzeń wydzielania neuromediatorów ważnych dla zasypiania i czuwania. Zmiany te mogły powodować zaburzenia homeostatycznej kontroli reakcji sercowo-naczyniowych i głębokości snu ofiar SIDS, które w połączeniu ze skutkami działania nikotyny oraz nieprawidłowościami genetycznymi były przyczyną zgonu ofiar SIDS.

1.11 Piśmiennictwo

1. Gordon AE, Al Madani O, Weir DM, i wsp. Cortisol levels and control of inflammatory responses to toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1): the prevalence of night-time death in sudden infant death syndrome (SIDS). *FEMS Immunol. Med Microbiol.* 1999;25:199-206.
2. Byard RW, Krous HF. Sudden infant death syndrome: overview and update. *Pediatr Dev Pathol.* 2003;6:112-127.
3. Siarakas S, Brown AJ, Murrell WG. Immunological evidence for a bacterial toxin aetiology in sudden infant death syndrome. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1999;25:37-50.
4. Raza MW, Blackwell CC. Sudden infant death syndrome, virus infections and cytokines. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1999;25:85-96.
5. Valdes-Dapena M, Hummeler K. Sudden unexplained deaths in infants: Viral infections as causative factors. *J Pediatr.* 1963;63:398-401.
6. Krous HF, Nadeau JM, Silva PD, Blackbourne BD. A comparison of respiratory symptoms and inflammation in sudden infant death syndrome and in accidental or inflicted infant death. *Am J Forensic Med Pathol.* 2003;24:1-8.
7. Crawley BA, Morris DB, Drucker DB, i wsp. Endotoxin in blood and tissue in the sudden infant death syndrome. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1999;25:131-135.
8. Forsyth KD. Immune and inflammatory responses in sudden infant death syndrome. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1999;25:79-83.
9. McMartin KI, Platt MS, Hackman R, i wsp. Lung tissue concentrations of nicotine in sudden infant death syndrome (SIDS). *J Pediatr.* 2002;140:205-209.
10. Raza MW, Essery SD, Elton RA, i wsp. Exposure to cigarette smoke, a major risk factor for sudden infant death syndrome: Effects of cigarette smoke on inflammatory responses to viral infection and bacterial toxins. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1999;25:145-154.
11. Gordon AE, El Ahmer OP, Chan R, i wsp. Why is smoking a risk factor for sudden infant death syndrome?. *Child Care Health Dev.* 2002;28 (Suppl.1):23-25.
12. Howat WJ, Moore IE, Judd M, Roche WR. Pulmonary immunopathology of sudden infant death syndrome. *Lancet.* 1994;343:1390-1392.

13. Bouska I, Klir P, Dvorak L. Histochemistry and immunochemistry of the lung in sudden infant death. *Soud Lek.* 1997;42:48-52.
14. Elliot J, Vullermin P, Carroll N, i wsp. Increased airway smooth muscle in sudden infant death syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160:313-316.
15. Berry PJ. Pathological findings in SIDS. *J Clin Pathol.* 1992;45 (Suppl.):11-16.
16. Naeye RL, Fisher R, Rubin HR, Demers LM. Selected hormone levels in victims of the sudden infant death syndrome. *Pediatrics.* 1980;65:1134-1136.
17. Williams A, Vawter G, Reid L. Increased muscularity of the pulmonary circulation in victims of sudden infant death syndrome. *Pediatrics.* 1979;63:18-23.
18. Kadhim H, Kahn A, Sebire G. Distinct cytokine profile in SIDS brain: a common denominator of a multifactorial syndrome?. *Neurology.* 2003;61:1256-1259.
19. Stanimirovic D, Satoh K. Inflammatory mediators of cerebral endothelium: a role of ischemic brain inflammation. *Brain Pathol.* 2000;10:113-126.
20. Storm H, Nylander G, Saugstad OD. The amount of brainstem gliosis in sudden infant death syndrome (SIDS) victims correlates with maternal cigarette smoking during pregnancy. *Acta Paediatr.* 1999;88:13-18.
21. Blood-Siegfried J. Sudden infant death syndrome. A toxic response. *AACN Clinical Issues* 2000;11:300-308.
22. Treluyer JM, Benech H, Colin I, i wsp. Ontogenesis of CYP2C-dependent arachidonic acid metabolism in the human liver: relationship with sudden infant death syndrome. *Pediatr Res.* 2000;47:677-683.
23. Perry GW, Vargas-Cuba R, Vertes RP. Fetal hemoglobin levels in sudden infant death syndrome. *Arch Pathol Lab Med.* 1997;121:1048-1054.
24. De S, Zelazny ET, Souhrada JF, Souhrada M. Interleukin-1 beta stimulates the proliferation of cultured airway smooth muscle cells via platelet -derived growth factor. *Am J Resp Cell Mol Biol.* 1993;9:645-651.
25. De S, Zelazny ET, Souhrada JF, Souhrada M. IL-1 beta and IL-6 induce hyperplasia and hypertrophy of cultured guinea airway smooth muscle cells. *J Appl Physiol.* 1995;78:1555-1563.
26. Sturner WQ, Susa JB. Sudden infant death and liver phosphoenolpyruvate carboxykinase analysis. *Forensic Sci Int.*

- 1980;16:19-28.
27. Beale EG, Hammer RE, Antoine B, i wsp. Glyceroneogenesis comes of age. *FASEB J.*, 2002;16:1695-1696.
 28. Forest C, Tordjman J, Glorian M, i wsp. Fatty acid recycling in adipocytes: a role for glyceroneogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Biochem Soc Trans.* 2003;31:1125-1129.
 29. Scribner KB, McGrane MM. RNA polymerase II association with the phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) promoter is reduced in vitamin A-deficient mice. *J Nutr.* 2003;133:4112-4117.
 30. Shin DJ, Odom DP, Scribner KB, i wsp. Retinoid regulation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase in liver. *Mol Cell Endocrinol.* 2002;195:39-54.
 31. Ghoshal S, Pasham S, Odom DP, i wsp. Vitamin A depletion is associated with low phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA levels during late fetal development and at birth in mice. *J Nutr.* 2003;133:2131-2136.
 32. Vidnes J, Sovik O. Gluconeogenesis in infancy and childhood. III. Deficiency of the extramitochondrial form of hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase in a case of persistent neonatal hypoglycaemia. *Acta Paediatr Scand.* 1976;65:307-312.
 33. Treluyer JM, Gueret G, Cheron G, i wsp. Developmental expression of CYP2C and CYP2C-dependent activities in the human liver: in-vivo/in-vitro correlation and inducibility. *Pharmacogenetics.* 1997;7:441-452.
 34. Treluyer JM, Cheron G, Sonnier M, Cresteil T. Cytochrome P-450 expression in sudden infant death syndrome. *Biochem Pharmacol.* 1996;52:497-504.
 35. Bernier RH, Frank JA Jr, Dondero TJ Jr, Turner P. Diphtheria-tetanus toxoids-pertussis vaccination and sudden infant deaths in Tennessee. *J Pediatr.* 1982;101:419-421.
 36. Ansher SS, Thompson W, Bridgewater J, i wsp. Pertussis toxin-induced alterations of murine hepatic drug metabolism following administration of diphtheria and tetanus toxoids and pertussis vaccine adsorbed. *Infect Immun.* 1993;61:4240-4247.
 37. Ansher SS, Thompson W. Modulation of hepatic mRNA levels after administration of lipopolysaccharide and diphtheria and tetanus toxoids and pertussis vaccine (DTP) vaccine to mice. *Hepatology.* 1994;20:984-991.
 38. Fantuzzi G, Sironi M, Delgado R, i wsp. Depression of liver metabolism and induction of cytokine release by diphtheria and tetanus toxoids and

- pertussis vaccines: role of Bordetella pertussis cells in toxicity. *Infect Immun.* 1994;62:29-32.
39. Blood-Siegfried J, Crabb E, Takeshita S, i wsp. Monokine production following in vitro stimulation of the THP-1 human monocytic cell line with pertussis vaccine components. *J Clin Immunol.* 1998;18:81-88.
40. Summers AM, Summers CW, Drucker DB, i wsp. Association of IL-10 genotype with sudden infant death syndrome. *Hum Immunol.* 2000;61:1270-1273.

Tabela 1. Ekspresja genów indukowanych przez hipoksję

Erytropoetyna
IL-1
IL-6
IL-8
Syntaza-2 tlenku azotu
Dekarboksylaza ornityny, heksokinaza 2,
Fosfofruktokinaza L, kinaza-1 fosfoglyceranu,
Kinaza M pirogronianu, transporter-1, -3 glukozy,
Dehydrogenaza A mleczanu, dehydrogenaza gliceraldehydo-3-fosforanu
Czynnik wzrostu-2 insulino-podobny, enolaza 1,
Aldolaza A, C, kinaza 3 adenylanu
Czynnik transformujący wzrostu β_3
Czynnik wzrostu śródbłónka naczyń krwionośnych (VEGF),
Receptor FLT-1 VEGF

Tabela 2. Czynniki zmniejszające aktywność enzymu PEPCK

Czynnik
Aktywne rodniki tlenowe
Niedobór witaminy A
Adenovirus E1A
Endotoksyna E. coli
TNF
IL-1 β
IL-6
Czynnik jądrowy I
NF-kappa B
Naskórkowy czynnik wzrostu
Glikokortykosteroidy (w białej tkance tłuszczowej)
Tlenek azotu (nipradilol, beta-bloker, uwalniający NO, który aktywuje cyklazę guanylową)
ATF3 (członek rodziny białek ATF/cAMP reagujących na element wiązania)
Insulina
Lit

Tabela 3. Czynniki zwiększające aktywność PEPCK

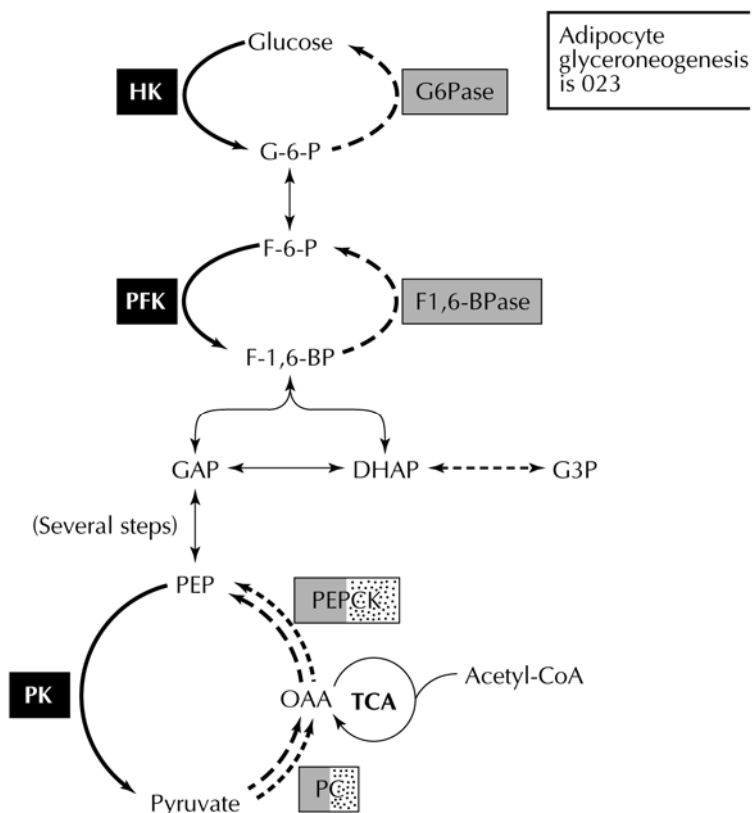
<p>Wielonienasycone i nie zmetabolizowane kwasy tłuszczowe (np. kwas dokozaheksaenowy, olejowy)</p> <p>Agoniści β-adrenergików (izoprenalina, noradrenalina)</p> <p>Kwas retinoinowy (wszystkie-trans lub 9-cis)</p> <p>Glikokortykosteroidy (w wątrobie) (np. deksametazon)</p> <p>Hormony tarczycy</p> <p>Glukagon (poprzez cAMP i kinazę białka)</p> <p>PPARγ2 (czynnik transkrypcyjny specyficzny dla adipocytów)</p> <p>Jon żelazawy (oraz Ca$^{2+}$)</p> <p>Witamina C (działanie antyoksydacyjne)</p>
--

Tabela 4. Reakcje na iniekcje różnych typów szczepionki DTP u myszy

Typy szczepionki DTP	Reakcje organizmu myszy na podanie szczepionek DTP
Szczepionki DTP tzw. "dzikiego typu"	Zwiększenie o 50% stężenia mikrosomalnego CYP450, wysoki poziom IL-6, przedłużenie czasu snu po heksobarbitalu.
Szczepionka pełnokomórkowa zmutowana	Zmniejszenie o 30% stężenia mikrosomalnego CYP450 z towarzyszącymi zmianami czasu snu po heksobarbitalu.
Szczepionka acelularna zmutowana	Bez wpływu na metabolizm leków w wątrobie, czas snu po heksobarbitalu lub poziom IL-6.

Tabela 5. Zmiany w narządach, badaniach laboratoryjnych i funkcji patofizjologicznej po podaniu szczepionki DTP i endotoksyny u myszy

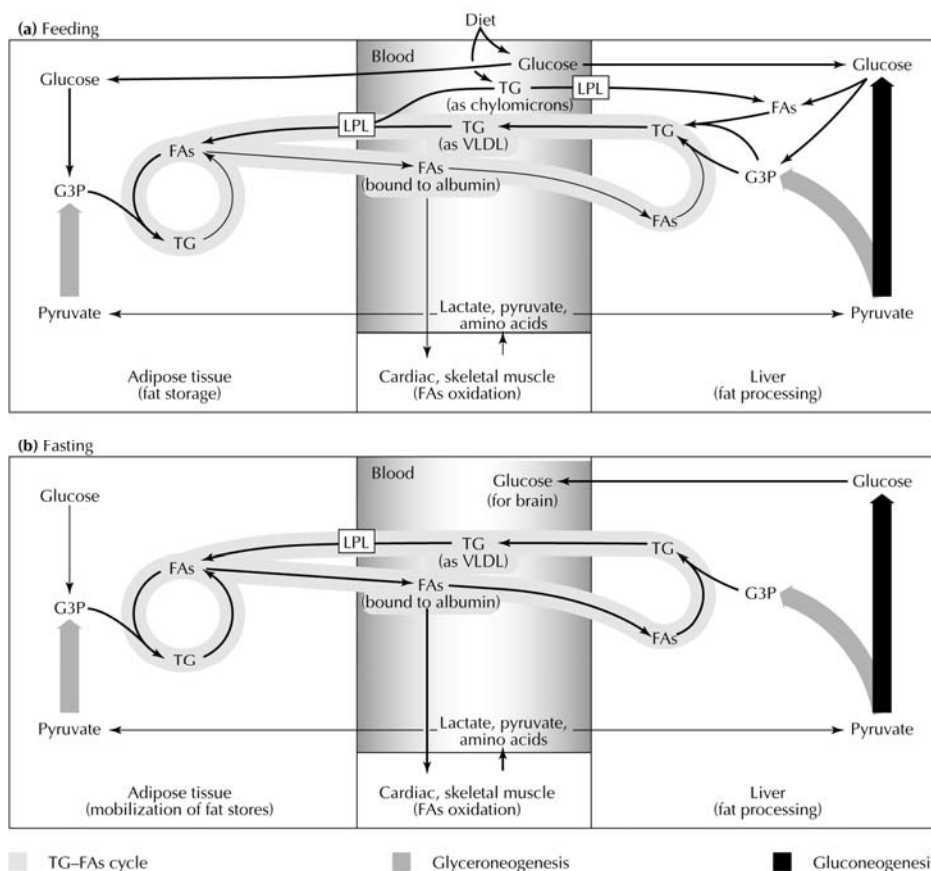
Pojedyncza dawka 0,5 ml szczepionki DTP przedłużała sen myszy po heksobarbitalu o 1,6-1,8 razy powyżej wartości zwierząt kontrolnych zarówno u myszy reagujących (ER), jak i nie reagujących (NR) na endotoksynę (ER lub NR) i działanie to utrzymywało się przez 7 dni.
Po podaniu szczepionki DTP stężenie wątrobowego CYP450 obniżyło się o 30-40%.
Masa śledziony i wątroby myszy ER i NR były znacznie zwiększone przez 7 do 14 dni po podaniu szczepionki, a badanie histopatologiczne wykazało wieloogniskowy stan zapalny w tych narządach i martwicę komórek wątrobowych.
Po podaniu szczepionki DTP oraz LPS (lipopolisacharyd) poziomy IL-6, IL-2 i TNF u myszy były znacznie podwyższone, przy czym u myszy NR zmiany te były mniejsze.
Monocyty krwi obwodowej u niemowląt szczepionych DTP produkowały IL-2, IL-5 i IFN- γ , zaś komórki śledziony produkowały IL-5.



Rycina 1. Glukoneogeneza i glicerogeneza.

Glukoneogeneza (strzałki przerywane) i gliceroneogeneza (drobniejsze przerywane strzałki) są procesami anabolicznymi, które odwracają przepływ węgla z drogi katabolicznej, tj. glikolizy (strzałki jednolite). Te dwie drogi anaboliczne mają wiele wspólnych etapów z procesem glikolizy, ponieważ większość tych reakcji jest łatwo odwracalna. Jednak 3 reakcje kontrolowane przez kinazy (HK – heksokinaza; PFK – fosfofruktokinaza; PK – kinaza pirogronianowa) są nieodwracalne i wymagają oddzielnych enzymów dla glukoneogenezy (PC, karboksylazy pirogronianu; PEPCK; F1,6Bpazy, fruktozo-1,6-dwufosfatazy; i G6Pazy, glukozy-6-fosfatazy) i gliceroneogenezy (PC, PEPCK). Gliceroneogeneza, skrócona wersja glukoneogenezy, generuje G3P zamiast glukozy. PEPCK wykorzystuje szczawiooctan, produkt pośredni cyklu kwasu trójkarboksylowego (Krebsa), jako swój substrat. Usunięcie produktu pośredniego cyklu Krebsa nazywa się kataplerozą, stąd PEPCK jest kataplerotykiem (choć może także być anaplerotykiem, ponieważ reakcja tego enzymu jest łatwo odwracalna). I na odwrót, PC jest głównym enzymem

anaplerotycznym, ponieważ generuje szczawiooctan. Są dwa izoenzymy PEPCK kodowane przez oddzielne geny jądrowe: PEPCK-C – forma cytozolowa, PEPCK-M – forma mitochondrialna. W wątrobie (i w tkance tłuszczowej) stosunek PEPCK-C/PEPCK-M wynosi 95:5 u gryzoni i 50:50 u człowieka.



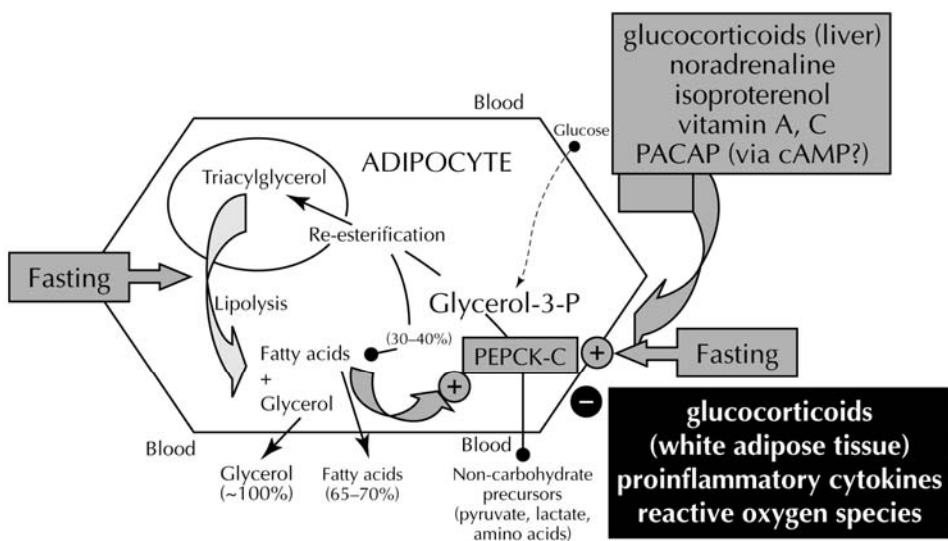
Rycina 2. Przepływ trójglicerydów (TG) i kwasów tłuszczowych (FA) między wątrobą a tkanką tłuszczową w cyklu FA-TG dla podtrzymania dużej szybkości przemiany tłuszczów we krwi.

To zapewnia ciągłą dostawę FA dla tkanek, które utleniają FA jako materiał energetyczny (zwłaszcza mięsień serca i mięśnie szkieletowe). Grube strzałki reprezentują główne drogi przepływu jonów węgla po jedzeniu i w warunkach lipolitycznych (na czczo, po wysiłku, w cukrzycy).

(a) Po jedzeniu, podczas i bezpośrednio po wchłonięciu pokarmu, zarówno glukoza jak i TG są użyte jako materiał energetyczny zaś nadmiar jest odkładany

głównie jako TG w tkance tłuszczowej. W tym czasie wątroba generuje TG *de novo* i odkłada je w postaci VLDL (lipoproteiny o bardzo małej gęstości) gotowe do zużycia. Lipaza lipoproteinowa (LPL) uwalnia FA, które przechodzą do adipocytów, gdzie są estryfikowane i odkładane jako TG. Mimo iż zapasy TG ulegają zwiększeniu, podczas lipolizy FA ciągle uwalniają się do krwi. Tkanki zużywające FA jako paliwo mogą je wykorzystywać w miarę potrzeby, reszta w wątrobie ulega przemianie do VLDL. Po jedzeniu, glukoza jest źródłem jonów węgla niezbędnych dla syntezy G3P zarówno w wątrobie jak i tkance tłuszczowej.

(b) W czasie głodzenia (lipoliza), gdy energia musi być zapewniona przez TG tkanki tłuszczowej, uwalnianie FA z magazynów TG jest przyspieszane przez lipazę pod wpływem hormonów. FA są jednak uwalniane przez zużywające je tkanki raczej w nadmiarze niż w ilościach niezbędnych. Wątroba nadal przekazuje nadmiar FA do tkanki tłuszczowej poprzez VLDL. Mimo iż ten proces cykliczny wymaga pewnego wydatku energetycznego, zużywa on zaledwie około 5% energii zawartej w FA i nadal zachowuje FA nie użyte do utlenienia. W warunkach lipolitycznych, gliceroneogeneza odbywająca się zarówno w wątrobie jak i tkance tłuszczowej dostarcza G3P z prekursorów nie węglowodanowych (mleczan, pirogronian, aminokwasy).



Rycina 3. Uproszczony proces gliceroneogenezy w adipocytach i jego regulacja przez karboksykinazę fosfoenolopirogronianową cytozolu komórkowego (PEPCK-C).

Podczas głodzenia, około 30% kwasów tłuszczowych powstających w wyniku lipolizy ulega reestryfikacji do triacylglicerolu, zaś powstający glicerol jest niemal całkowicie uwalniany do krążenia. Proces reestryfikacji wymaga zsyntetyzowania glicerolo-3-fosforanu (Glicerol-3-P) z prekursorów niewęglowodanowych, jak pirogronian, mleczan, lub niektóre aminokwasy, np. alanina. Skutki wpływu głodzenia i tiazolidynodionów (leki stosowane w cukrzycy typu 2, np. rozyglitazon) na ten cykl przedstawione są na rycinie. Znaki "+" oznaczają pobudzenie, natomiast znaki "-" oznaczają hamowanie. Ten proces metaboliczny określany jest jako gliceroneogeneza. Kluczowym enzymem tego procesu jest PEPCK-C, którego aktywność zwiększa się w czasie głodzenia, pod wpływem agonistów β -adrenergicznych (noradrenalina, izoprenalina), kwasów cis- i trans-retinoinowych, nienasyconych kwasów tłuszczowych, i tiazolidynodionów, natomiast ulega zmniejszeniu pod wpływem glikokortykosteroidów, glukozy, oraz insuliny. Te działania regulacyjne są wywierane, przynajmniej częściowo, na poziomie szybkości transkrypcji genu PEPCK-C.

tłumaczenia podanych na rycinach określeń angielskich w celu ich wymiany na język polski:

pyruvate -- pirogronian
several steps -- kilka reakcji chemicznych
Adipocyte glyceroneogenesis is 023 - gliceroneogeneza adipocytów
przedstawiona na ryc. z cyklem Krebsa (czyli tej 023)
feeding -- po jedzeniu
adipose tissue (fat storage) -- tkanka tłuszczowa (magazyn tłuszczu)
bound to albumin (związany z albuminą)
as chylomicrons --- jako chylomikrony
lactate, pyruvate, amino acids -- mleczan, pirogronian, aminokwasy
cardiac, skeletal muscle (FAs oxidation) -- mięsień serca, mięsień szkieletowy
(utlenianie kwasów tłuszczowych)
liver fat processing --- przemiana tłuszczu w wątrobie
fasting -- na czczo
adipose tissue (mobilization of fat stores) -- tkanka tłuszczowa (mobilizacja magazynów tłuszczowych)
glucose (for brain) - glukoza (dla mózgu)
adipocyte - adipocyt

non-carbohydrate precursors -- prekursorzy niewęglowodanowe
glucocorticoids (liver), noradrenaline, isoproterenol, vitamin A, C, PACAP (via cAMP?) -- glikokortykosteroidy (wątroba), noradrenalina, izoproterenol, witamina A, witamina C, PACAP (poprzez cAMP?)
glucocorticoids (white adipose tissue), proinflammatory cytokines, reactive oxygen species -- glikokortykosteroidy (biała tkanka tłuszczowa), cytokiny prozapalne, wolne rodniki tlenowe
lipolysis --- lipoliza

2.

**POWIKŁANIA ZE STRONY UKŁADU MOCZOWEGO PO
PODANIU
PEŁNOKOMÓRKOWEJ SZCZEPIONKI DTP
U DZIECI Z OSŁABIONĄ ODPORNOŚCIĄ**

2.1 Wstęp

Już w 1967 r. Wilson twierdził, że w niektórych przypadkach szczepienie było powodem skrócenia okresu inkubacji pewnych chorób lub zmieniło skrycie przebiegające infekcje/zapalenie w choroby manifestujące się klinicznie. Warunkiem wstępnym takiego zbiegu okoliczności była infekcja o przebiegu podklinicznym lub bezobjawowa kolonizacja bakteryjna w organizmie. W grupie 64 591 dzieci, które otrzymały szczepienie DTP, Griffin i wsp. obserwowali 158 epizodów inwazyjnych zakażeń bakteryjnych, co daje częstość występowania takich powikłań poszczepiennych w liczbie 394 infekcji na 100 tys. osób. Osiem spośród tych 158 infekcji wystąpiło w pierwszych 7 dniach po podaniu szczepionki, zaś w grupie obejmującej 35 dzieci powikłanie poszczepienne obserwowano w okresie 28 dni od daty szczepienia. W innej badanej populacji obejmującej 218 tys. dzieci w wieku od 1 do 24 miesięcy życia (368 tys. immunizacji DTP) obserwowano 424 potwierdzone przypadki chorób neurologicznych, podczas gdy w dużej grupie 22 505 dzieci, które otrzymały acelularną szczepionkę DTaP, opisano wystąpienie 153 poważnych niepożądanych odczynów poszczepiennych, w tym także 7 przypadków zespołu nagłej śmierci (SIDS). Caro-Paton i wsp. stwierdzili nawet statystycznie znamiennej związek między immunizacją DTP w okresie 30 dni poprzedzających szczepienie a wystąpieniem SIDS. Wykazano też znaczną różnicę w stanie klinicznym dzieci w wieku poniżej 3 miesięcy szczepionych i zmarłych na SIDS a stanem dzieci kontrolnych. Badania na zwierzętach oraz u ludzi wykazały również, że szczepienie DTP zwiększało ryzyko wystąpienia alergii i czasami towarzyszących jej chorób układu oddechowego u dzieci starszych i w okresie dojrzewania, a także było powodem wystąpienia reumatoidalnego zapalenia stawów i zapalenia naczyń krwionośnych o podłożu immunologicznym przebiegających ze wstrząsem sercowo-naczyniowym, oraz uogólnionego guzkowatego zapalenia tętnic (po

szczepieniu DT). Ciężkie niepożądane odczyny poszczepienne pojawiały się u dzieci zwłaszcza w stanach zaburzonej odporności spowodowanej m.in. niedoborem dla receptora IFN- γ .

W Polsce, pierwsze szczepienie DTP jest zalecane u niemowląt w wieku 2-3 miesięcy, a następne 3 dawki podaje się w odstępach 6-tygodniowych, dawkę przypominającą wstrzykuje się w wieku 19-24 miesięcy, a dalsze dawki DT podaje się u starszych dzieci w 6 i 14 roku życia. W okresie ostatnich 24 lat obserwowaliśmy 13 dzieci w wieku od 3 do 65 miesięcy, hospitalizowanych z powodu burzliwych objawów chorobowych układu moczowego, które ujawniły się w kilka godzin do 10 dni od pierwszego lub kolejnego szczepienia DTP. Analiza zaburzeń odporności komórkowej, które wystąpiły podczas podklinicznego przebiegu niektórych z tych chorób, tj. zakażenia układu moczowego (UTI), odmiedniczkowego zapalenia nerek, steroido-wrażliwego zespołu nerczycowego (ZN), oraz atopowego zapalenia skóry (AD, *atopic dermatitis*), może sugerować, że u podstaw patomechanizmu wystąpienia tych zmian chorobowych oraz ujawnienia się towarzyszących im objawów klinicznych leżą nieprawidłowości wydzielania cytokin przez limfocyty T pomocnicze, wiele innych leukocytów, a nawet komórek nie pochodzących z układu hematopoetycznego, na które nałożyły się nieregularności w wydzielaniu cytokin spowodowane bodźcem stresowym i immunologicznym po szczepieniu DTP. W badaniach doświadczalnych podanie szczepionki DTP lub jej składników powodowało także zahamowanie aktywności wielu izoenzymów wątrobowego cytochromu P450 (CYP450) i innych, zmiany morfologiczne i histopatologiczne wątroby i śledziony, oraz zaburzenia procesów biochemicznych i fizjopatologicznych organizmu.

Celem pracy była analiza zmian chorobowych stwierdzonych u niemowląt i małych dzieci w świetle zaburzeń równowagi cytokin w tych chorobach oraz nieprawidłowości stwierdzanych u zwierząt doświadczalnych,

które mogą odzwierciedlać przypuszczalne patomechanizmy odpowiedzialne za ujawnienie się u tych pacjentów chorób układu moczowego po podaniu pełnokomórkowej szczepionki DTP.

2.2 Pacjenci i metody

Analizowana populacja chorych składała się z 13 dzieci w wieku od 3 do 65 miesięcy (7 chłopców, 6 dziewczynek), hospitalizowanych w szpitalu dziecięcym im. J. Korczaka we Wrocławiu w ciągu 24 lat z powodu różnych objawów klinicznych manifestujących się w kilka godzin do kilkunastu dni po pierwszym lub kolejnym szczepieniu DTP (tabela 1).

Zakażenie układu moczowego (UTI, *urinary tract infection*) rozpoznano na podstawie stwierdzenia znamiennego wzrostu bakterii ($> 10^5$ kom/ml) z obecnością lub bez ropomoczu (> 5 leukocytów w polu widzenia) w świeżo i sterylnie pobranej próbce moczu ze środkowego strumienia. U niektórych chorych UTI przebiegało z wysoką gorączką ($> 38^\circ\text{C}$). Rozpoznanie odmiedniczkowego zapalenia nerek postawiono na podstawie wywiadu, badania klinicznego chorego, badania usg, urografii i/lub cystografii mikcyjnej. Kryteria diagnostyczne ustalone przez International Study on Kidney Diseases in Children służyły za podstawę do rozpoznania steroidowrażliwego ZN. W pierwszej lub drugiej dobie hospitalizacji, u wszystkich dzieci wykonano standardowe badanie usg w pozycji leżącej na plecach oraz na brzuchu, a w niektórych przypadkach wykonano cystoureterografię w celu wykrycia odpływu (-ów) pęcherzowo-moczowodowych (VUR, *vesico-ureteral reflux*). Uzasadnieniem wykonania tego badania były: wywiad, stan chorego, odchylenia w badaniu fizycznym chorego, oraz wyniki badań laboratoryjnych i usg (np. poszerzenie kielichów miedniczek nerkowych). Przy przyjęciu, ciśnienie tętnicze krwi, stan nawodnienia chorego (oceniany klinicznie i analizą hematokrytu), i funkcja nerek (stężenie mocznika we krwi, kreatyniny w surowicy, Cl_{kr}) były u chorych prawidłowe, z wyjątkiem pacjentów 3 i 12,

którzy mieli wyniki badań laboratoryjnych charakterystyczne dla ostrej niewydolności nerek (ARF, *acute renal failure*).

Wszystkie dzieci otrzymały szczepionkę DTP firmy Biomed, S.A., Kraków, nr. rejestr. R/0037) zawierającą 25 Lf toksoidu błonicy, 10 BU anatoksyny tężcowej, i 20 miliardów pałeczek *B. pertussis* (kultura półsyntetyczna z podłożem Cohen-Wheeler) zabitych za pomocą formaldehydu, zaabsorbowanych na 0.7 mg wodorotlenku glinu; jako środek konserwujący dodano tiomersal w ilości 0.01%, oraz uzupełniono roztworem izotonicznego chlorku sodu do 0.5 ml. Taki skład szczepionki jest zgodny z wymaganiami WHO. Analiza 1334 dzieci, które otrzymały 2530 dawek tej szczepionki wykazała, że tylko u jednego dziecka z AD i infekcją górnych dróg oddechowych wystąpił niepożądany odczyn poszczepienny manifestujący się urosepsą.

2.3 Wyniki

W tabeli 1 przedstawiono istotne dane z wywiadu chorego dziecka, odchylenia od normy stwierdzone badaniem fizycznym przy przyjęciu do szpitala, charakterystyczne objawy kliniczne, oraz niektóre wyniki badań laboratoryjnych. Ośmioro spośród 13 dzieci było niemowlętami w wieku od 3 do 7 miesięcy (5 chłopców, 3 dziewczynki), a 4 dzieci miało 20 do 24 miesięcy. Czwooro spośród analizowanych dzieci miało obniżoną punktację Apgar przy urodzeniu, 6 miało objawy skórne charakterystyczne dla atopowego zapalenia skóry (AD, *atopic dermatitis*), u 2 dzieci stwierdzono ropne zapalenie migdałków, a 8 dzieci miało różne objawy chorobowe, które występowały już od 3 tygodni do kilku miesięcy przed hospitalizacją (chorzy 3, 5, i 8, mieli objawy kliniczne ze strony układu moczowego już 2 do 5 miesięcy przed przyjęciem do szpitala, a chory 13 był w trakcie remisji zespołu nerczycowego i nie otrzymywał prednizonu.

Prawie wszystkie dzieci miały UTI i ropomocz. U chorego 7, UTI i ropomocz wystąpiły 6 dni po pierwszym szczepieniu DTP, u 5 chorych objawy kliniczne choroby układu moczowego wystąpiły po 2 szczepieniu, natomiast u pozostałych chorych schorzenie dróg moczowych ujawniło się po 3 lub 4 dawce DTP. U chorego 13 z ZN i AD, nasilony białkomocz pojawił się po 5 szczepieniu DTP, a w ciągu następných dni wystąpiły wszystkie charakterystyczne objawy kliniczne i wskaźniki biochemiczne nawrotu ZN.

U 8 spośród 13 dzieci objawy chorobowe wystąpiły po 2 do 8,5 h od podania szczepionki, zaś u pozostałych chorych manifestacja kliniczna chorób układu moczowego ujawniła się po 4 do 10 dniach. U chorych 1 do 11, objawy chorobowe były bardzo burzliwe, z cechami wstrząsu. U dzieci 1 do 5, w cystoureterografii mikcyjnej stwierdzono odpływ (-y) pęcherzowo-moczowodowy, mimo niezbyt nasilonego ropomoczu.

Większość chorych miała wyniki badań laboratoryjnych wskazujące na toczący się zaawansowany proces zapalny, który nasilił się po szczepieniu DTP (8/13 dzieci miało podwyższone OB, 4/13 oraz 2/13 dzieci miały, odpowiednio, podwyższoną leukocytozę i/lub zwiększoną liczbę płytek krwi, zaś u 3 spośród 13 dzieci stwierdzono podwyższone stężenie białka C-reaktywnego w surowicy. Chory 9 miał znaczne nieprawidłowości immunologiczne: fagocytoza 67% (n = 90-100%), limfocyty T wczesne 38% (n = 25-40), limfocyty T późne 65% (n = 70-80), limfocyty B 34% (n = 20-30%), całkowita liczba limfocytów T 1099 kom/mm³ (n = 1350-5915), całkowita liczba limfocytów B 575 kom/mm³ (n = 550-1690).

Chory 3 był uderzająco błądy przy przyjęciu do szpitala, a jego wyniki badań laboratoryjnych były charakterystyczne dla ARF (mocznik krwi 88 mg/dl, kreatynina w surowicy 101,7 μmol/l), która rozwinęła się w przebiegu OZN (potwierzonego w urografii) oraz obustronnego VUR. Po 7 dniach leczenia, białkomocz, krwinkomocz, oraz ropomocz pyuria ustąpiły, a C_{kr} zwiększył się z

30 to 41 ml/min. Po następnych 3 tygodniach leczenia wyniki badań laboratoryjnych chorego i ciśnienie tętnicze krwi uległy normalizacji i dziecko wypisano ze szpitala.

U chorej 12, w 4 dniu po szczepieniu DTP stwierdzono skąpomocz, i po upływie kolejnych 3 dni dziecko zostało przyjęte do szpitala. Stan ogólny dziewczynki był zły, ciśnienie tętnicze krwi wynosiło 130/95 mmHg, a objawy kliniczne i wyniki badań laboratoryjnych były charakterystyczne dla ZN przebiegającego z niewydolnością nerek. W biopsji nerki stwierdzono zmiany histopatologiczne charakterystyczne dla ZN typu *minimal change* lub *glomerulonephritis proliferativa* w fazie zdrowienia. Po 7 dniach leczenia prednizonem białkomocz ustąpił i wycofały się objawy niewydolności nerek. W 6 tygodniu leczenia wyniki badań biochemicznych dziewczynki uległy normalizacji, a po 9 tygodniach hospitalizacji dziecko wypisano w stanie ogólnym dobrym do domu.

2.4 Dyskusja

U naszych chorych, pierwsze lub kolejne szczepienie DTP ujawniło skrycie przebiegające UTI z lub bez VUR, odmiedniczkowe zapalenie nerek, czasami powikłane ARF, i/lub ZN. Czworo dzieci po urodzeniu miało obniżoną punktację Apgar, u niektórych objawy kliniczne chorób układu moczowego manifestowały się już 2 do 5 miesięcy przed hospitalizacją, kilkoro otrzymało szczepienie w czasie infekcji górnych dróg oddechowych, a wielu chorych miało objawy AD. U prawie wszystkich dzieci, badanie ogólne moczu przy przyjęciu wykazało UTI i ropomocz. Ujawnienie chorób układu moczowego po szczepieniu może mieć charakter przypadkowy, jednak związek czasowy między tymi wydarzeniami w wysokim stopniu przemawia za tym, że były one spowodowane mechanizmami immunologicznymi towarzyszącymi podaniu szczepionki, zwłaszcza że spowodowane przez cytokiny nieprawidłowości

funkcji limfocytów, monocytów, i innych komórek zwykle towarzyszą opisanym u naszych chorych zmianom chorobowym, a także szczepieniu DTP.

2.5 Szczepienie DTP i spowodowana nim produkcja cytokin pozapalnych i przeciwzapalnych

Patofizjologia ciężkich niepożądanych odczynów poszczeniennych czasami obserwowanych po podaniu pełnokomórkowej szczepionki DTP nie jest dotychczas wyjaśniona. Proponowano, że powodem tych nieprawidłowości była aktywna toksyna krztuśca wchodząca w skład szczepionki. Na modelach zwierzęcych, duże dawki toksyny krztuśca powodowały hiperinsulinemię i hipoglikemię oraz leukocytozę z przewagą limfocytów. W ostrej fazie, u 56 dzieci mających takie ciężkie odczyny po immunizacji DTP, obserwowano leukocytozę z neutrofilią w porównaniu z wynikami badania wykonanego miesiąc później. Ponieważ cytokiny odgrywają główną rolę w pośredniczeniu procesów zapalnych w różnych jednostkach chorobowych, a także są czynnikami niszczącymi tkanki jeśli ich produkcja nie jest kontrolowana, wydaje się, że mogą one być przyczyną tych nieprawidłowości. Wiadomo, że produkcja cytokin immunoregulacyjnych IL-2, IFN- γ , i TNF- β składa się na typ 1 (T_H1) reakcji cytokin, a cytokiny IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, i IL-13 stanowią typ 2 (T_H2) reakcji cytokinowej. Blood-Siegfried i wsp. sugerowali, że pełnokomórkowy zarazek krztuśca znajdujący się w szczepionce DTP może spowodować wystąpienie objawów przypominających reakcję organizmu na krążące monokiny prozapalne, jak IL-1 β , TNF- α , and IL-6, i stwierdzili, że *in vitro* szczepionka pełnokomórkowa spowodowała znamienne większą produkcję tych cytokin niż forma acelularna lub tylko szczepionka DT. Wprawdzie endotoksyna zarazka *pertussis* była głównym czynnikiem pobudzającym IL-6, sugerowano, że inne składniki *B. pertussis* także brały udział w produkcji tej cytokiny przez monocyty. W innych badaniach, u niemowląt otrzymujących szczepionkę pełnokomórkową, scharakteryzowano

stymulowane przez antygen komórki monocytoidalne krwi obwodowej wykazując zwiększoną produkcję IFN- γ (która hamuje wzrost komórek T_H2) oraz IL-2, niską do minimalnej produkcję IL-5, i brak wytwarzania IL-4. Przed szczepieniem DTP, u dzieci obserwowano brak cytokin typu Th2 i niskie poziomy konstytywnego IFN- γ .

Badania na myszach wykazały zróżnicowane reakcje organizmu zwierząt w zależności od typu podawanych szczepionek DTP (tabela 2). Podanie różnych dawek szczepionki pełnokomórkowej DTP lub jej składników powodowało wiele zmian morfologicznych i histopatologicznych w wątrobie i śledzionie zwierząt, a także szereg zaburzeń biochemicznych i zmian procesów fizjopatologicznych, z których niektóre utrzymywały się przez 2 tygodnie od czasu podania szczepionki DTP (tabele 3-5).

2.6 UTI i/lub odmiedniczkowe zapalenie nerek

Wszystkie analizowane dzieci chorowały na skrycie przebiegające UTI, VUR i/lub odmiedniczkowe zapalenie nerek. Badania wykazały zwiększone stężenie IL-6 i IL-8 w surowicy i moczu u dzieci i dorosłych z UTI i bezobjawowym bakteriomoczem. W ostrej fazie UTI, u tych chorych, u których później dochodziło do wystąpienia przewlekłego odmiedniczkowego zapalenia nerek, stężenie IL-6 w surowicy ulegało znamiennej podwyższeniu w porównaniu z chorymi u których w badaniu scyntygraficznym nie stwierdzono uszkodzenia nerek w chwili ustalenia diagnozy. Dodatkowo, inne badania wykazały, że u dzieci z UTI przebiegającym z gorączką i odmiedniczkowym zapaleniem nerek, stężenia IL-6 and IL-8 w moczu były znacznie podwyższone (podobnie jak IL-1 α i IL-1ra, antagonisty receptora IL-1) w porównaniu z kontrolą, i wykazywały statystycznie znamiennej korelację z liczbą krwinek białych wydalonych z moczem, przy czym wyższe wartości IL-8 obserwowano u dzieci w wieku poniżej 1 roku życia z odmiedniczkowym

zapaleniem nerek. Nasilenie reakcji wydalania IL-8 z moczem było związane z produkcją hemolizyny, będącej czynnikiem wirulencji bakterii *E. coli*. Dane te wskazują, że IL-6 and IL-8 mogą być mediatorami stanu zapalnego u dzieci gorączkujących z UTI. Sugerowano także, że nieprawidłowa produkcja IL-6 ma swój udział w patogenezie różnych chorób, m.in. kłębkowego zapalenia nerek (typu *mesangialis proliferativa*), reumatoidalnego zapalenia stawów, i wielu chorób autoimmunologicznych. Ta cytokina tzw. "ostrej fazy" (znana także jako IFN- β_2) jest produkowana we wczesnym okresie procesu zapalnego przez fibroblasty, monocyty, i inne komórki (krótco po IL-1 i TNF- α) i ma wiele właściwości prozapalnych (np. wpływa na dojrzewanie i aktywację neutrofilów, oraz zwiększoną ekspresję IL-1 i TNF- α). Z kolei, proteiny leukocytów mogą powodować degradację białek tkanki łącznej i brać udział w innych procesach, włącznie z reakcjami zapalnymi. Ta aktywność biosyntetyczna neutrofilów powinna być brana pod uwagę jako ważne źródło cytokin w ostrej infekcji, ponieważ komórki te obejmują do 70% puli krążących leukocytów. Inna wymieniona wyżej cytokina, IL-8, jest produkowana przez makrofagi (wraz z IL-1, IL-6, i TNF- α) oraz przez komórki śródbłonka wkrótce po zapoczątkowaniu zakażenia lub uszkodzeniu tkanki, i stwierdzono, że neutrofile mają także wpływ na produkcję IL-8, a w odpowiednich warunkach potrafią syntetyzować także inne chemokiny. Należy też dodać, że powodem nadmiernej nasilonej reakcji zapalnej ze strony nerek może być konstelacja genetycznych wariantów TNF- α i IL-6, czasami prowadząca do wystąpienia objawów ARF, zwłaszcza u niemowląt z infekcją.

2.7 Steroidowrażliwy zespół nerczycowy

Udział w patofizjologii ZN przypisywano różnym cytokinom. Ten zespół chorobowy jest często związany z objawami alergicznymi, jak AD, astma oskrzelowa, alergiczne zapalenie błony śluzowej nosa, pokrzywka alergiczna,

egzema, gorączka sienna, uczulenie po zetknięciu z sumakiem jadowitym, nadwrażliwością na pyłki, oraz podwyższeniem poziomu surowiczego IgE i IL-4, z IgE wykazującą korelację ze stężeniem IL-4, a także nasileniem białkomoczu wykazującym korelację ze stężeniem IL-4. Nawrót ZN jest często poprzedzony bodźcami immunologicznymi, włączając infekcje wirusowe, szczepienia (DTP/hepatitis B), i uządleniem pszczoły, które pobudzają uczulone limfocyty do produkcji różnych wysoce aktywnych cytokin powodujących zaburzenia równowagi krążących czynników humoralnych. W supernatantach kultur komórek limfocytów T CD4⁺ otrzymanych od dzieci z ZN w wieku od 2 do 9 lat (w tym wieku reakcja immunologiczna jest ściśle zależna od aktywności grasicy) i stymulowanych przez autologiczne monocyty prezentujące toksoid błoniczy, Stachowski i wsp. stwierdzili zmniejszenie syntezy IL-2, IL-10, i IFN- γ , w porównaniu z dziećmi zdrowymi. Inni autorzy, badając chorych w wieku od 2 do 15 lat, także opisali: a) zwiększenie liczby i funkcji komórek T_H1 produkujących duże ilości IL-2 i IFN- γ , podczas gdy poziomy IL-8 były obniżone, b) podwyższone stężenia IL-2, IL-4 i IFN- γ , c) lub stwierdzili zmniejszone uwalnianie IL-10 przez monocyty. W surowicy chorych na ZN stwierdzono także znaczne zwiększenie poziomu TNF- α . Zaburzenia te mogą mieć poważne konsekwencje kliniczne, ponieważ np. IL-2 pobudza produkcję IFN- γ i TNF- β , co wywołuje aktywację monocytów, neutrofilii, i komórek NK (*natural killer*), zaś IL-10 hamuje produkcję cytokin prozapalnych przez zaktywowane monocyty/makrofagi i wywiera silny wpływ stymulujący na limfocyty B, zwłaszcza w odniesieniu do produkcji przeciwciał. Co więcej, IFN- γ promuje reakcje komórek T_H1 i hamuje reakcje T_H2, a ich przygotowanie i aktywacja makrofagów prowadzi do zwiększenia produkcji cytokin prozapalnych w odpowiedzi na wiele bodźców. Z kolei, długotrwała remisja ZN może mieć związek ze zwiększoną produkcją cytokin T_H2 hamujących wpływ cytokin wytwarzanych przez komórki T_H1 i komórki cytotoksyczne. Falus i wsp.

sugerowali, że miejscowe zaburzenia równowagi we wzajemnych proporcjach IL-1, IL-6, i TNF- α mogą w różnych patologicznych przypadkach wpływać na wrażliwość limfocytów, monocytów i hepatocytów jako komórek docelowych dla glikokortykosteroidów. Cytokiny prozapalne IL-1, IL-6, i TNF- α powodują zwiększenie wiązania glikokortykosteroidów w liniach komórkowych limfoidalnych, monocytoidalnych i typu wątrobiaka, znamienne zwiększając poziom receptorów glikokortykosteroidów. Badania Ramireza i wsp. wykazały, że ekspozycja oczyszczonych komórek CD4⁺ szczura na glikokortykosteroidy promowała reakcję komórkową T_H2 (tj. zwiększenie poziomu mRNA IL-4, IL-10, i IL-13) i hamowała odpowiedź komórkową T_H1 (synteza IFN- γ i TNF- α były zmniejszone). Co więcej, okazało się, że IL-4 znacznie nasilała działanie deksametazonu, zaś produkcja IL-2 mogła być zahamowana przez nadmiar IL-4 i IL-10. Można więc sugerować, że przewlekłe narażenie chorego na przedłużone zakażenie UTI i stan zapalny towarzyszący AD może czasami prowadzić do poważnego zaburzenia równowagi T_H1/T_H2 w organizmie i spowodować zmniejszenie poziomu endogennych kortykosteroidów w związku ze zwiększonym zapotrzebowaniem i przyspieszonym metabolizmem tych ważnych substancji endogennych, w efekcie ujawniając ZN u osób predysponowanych genetycznie. Powyższa argumentacja może być wsparta przez fakt, że wiele uwalnianych cytokin zapalnych hamuje ekspresję genu cytochromu P450 będącego głównym enzymem metabolizującym ksenobiotyki, a także innych enzymów, związaną ze specyficznym wpływem na poziomy mRNA, ekspresję białka, i aktywność enzymów, wpływając w ten sposób na metabolizm wielu endogennych substancji lipofilnych, jak steroidy, witaminy rozpuszczalne w tłuszczach, prostaglandyny, leukotrieny, tromboksany, hormon wzrostu, i inne.

2.8 Atopowe zapalenie skóry

Ekspozycja na bodźce mikrobiologiczne w okresie wczesnego dzieciństwa może mieć wpływ na zapoczątkowanie i ujawnienie choroby atopowej. U prawie wszystkich noworodków komórki T_H2 reagują na powszechnie obecne alergeny środowiskowe wytwarzając cytokiny IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, oraz IL-13, a także dominującą wysoką produkcją IL-10. U dzieci z genotypem atopowym, ta skłonność reakcji immunologicznej organizmu do pobudzania komórek T_H2 może być bardziej wyrażona i dłużej trwająca. We wczesnym okresie życia wynika to ze zmniejszonej zdolności do produkcji IFN- γ przez komórki T_H1 , która jest o wiele słabsza w komórkach T płodu niż u dorosłych i zwiększa się progresywnie od urodzenia do 5 roku życia, gdy dochodzi do wytworzenia odporności komórkowej T specyficznej dla alergenu, raczej we wzorzec T_H1 charakterystyczny dla osób dorosłych niż w typ T_H2 występujący u większości dzieci. Obniżony poziom IFN- γ i zwiększona produkcja IL-4 stwierdzane u osób z atopią mogą mieć wpływ na zwiększenie syntezy IgE i eozynofilię charakterystycznych dla tego schorzenia. I odwrotnie, osoby bez zmian atopowych reagują głównie typem T_H1 reakcji immunologicznej cechującej się produkcją IFN- γ hamującego wzrost komórek T_H2 . Należy podkreślić, że zwiększona produkcja IL-4 stwierdzona u chorych z AD może także wskazywać na przedłużające się procesy zapalne i immunologiczne w organizmie tych chorych, ponieważ cytokina ta ma zdolność supresji wielu reakcji prozapalnych monocytów, jak wydzielanie IL-1 β , TNF- α , i - β , IL-6, oraz IFN- γ .

W AD, ekspresja reakcji immunologicznej typu T_H2 skierowanej przeciwko antygenom znajdującym się w otaczającym środowisku jest uznawana za pierwszorzędową przyczynę stanu zapalnego towarzyszącego alergii. Okazało się, że podanie DTP lub szczepionki tężcowej zwiększało ryzyko wystąpienia alergii i często związanych z nią stanów chorobowych ze

strony układu oddechowego u małych dzieci i młodzieży w okresie dojrzewania. W wieku niemowlęcym cechą charakterystyczną fenotypu atopowego jest zmniejszona zdolność do reakcji na antygeny szczepionki, a także alergeny środowiskowe. To upośledzenie, najbardziej wyrażone dla IFN- γ , ma charakter przejściowy, lecz może spowodować długotrwałe zaburzenie równowagi w reakcjach pamięci komórek T pomocniczych na alergeny. Prescott i wsp. ocenili reakcje proliferacyjne i cytokinowe komórek mononuklearnych na specyficzne alergeny oraz TT (*tetanus toxin*, toksynę tężca) w próbkach krwi od niemowląt z atopią i bez atopii pobieranych co 6 miesięcy od urodzenia do wieku 2 lat. Próbkę pobrane po urodzeniu od 18 niemowląt z atopią i 13 niemowląt bez atopii wykazały niski poziom reakcji specyficznych dla alergenu ukierunkowanych na komórki T_{H2}, wraz z niską towarzyszącą produkcją specyficznego IFN- γ . W grupie dzieci z atopią, reakcje typu T_{H2} u noworodków były znacznie słabsze dla IL-4, IL-6, IL-10, i IL-13 niż w grupie dzieci bez atopii. W pierwszym roku życia u dzieci bez atopii dochodziło do szybkiej supresji reakcji komórek T_{H2}, natomiast u dzieci z atopią dochodziło do ustalenia reakcji typowej dla dzieci atopowych, związanej z upośledzoną produkcją IFN- γ przez noworodki. Uważa się, że kontynuacja w wieku niemowlęcym płodowych reakcji typu T_{H2} specyficznych dla alergenu jest określoną cechą fazy induktywnej choroby atopowej, i jest związana ze zmniejszoną zdolnością produkcji IFN- γ (cytokina T_{H1}) przez noworodki z atopią. Okazało się także, że komórki mononuklearne krwi obwodowej uzyskane od 6-latków z atopią produkowały wyższe poziomy cytokin T_{H1} i T_{H2} po ekspozycji na antygeny roztoczy kurzu domowego i fitohemaglutyninę (mitogen). Niedawno doniesiono, że w skórze chorych na AD dominują typy reakcji T_{H0}/T_{H2}, zaś w surowicy tych chorych wykryto wysokie poziomy rozpuszczalnego CD30, które wykazywały korelację z aktywnością choroby. Ponieważ CD30 jest członkiem rodziny receptora TNF preferencyjnie

wyrażonego przez komórki T produkujące cytokiny typu T_H2 , może to wskazywać, że nadmierna sygnalizacja prowadzi do zwiększonej produkcji mediatorów prozapalnych wywołując przewlekłe reakcje alergiczno-zapalne i uszkodzenie tkanek u tych chorych.

Kurenko-Deptuch i wsp. w listopadowym numerze *Pediiatrii Polskiej* (2004 r.) przedstawili historie choroby 3 dzieci z uogólnionym zakażeniem szczepionkowym prątkiem BCG, którego przyczyną wg autorek mógł być niedobór receptora dla $IFN-\gamma$. Analiza opisanych przypadków wskazuje jednak, że wszystkie dzieci otrzymały także w bliskim odstępie czasu szczepienie DTP, co w świetle powyższych rozważań może także sugerować udział zmian morfologicznych (np. hepatosplenomegalia stwierdzana u pacjentek 2 i 3), histochemicznych, biochemicznych i fizjopatologicznych w organizmie myszy towarzyszących szczepieniu DTP w ujawnieniu i długotrwałym przebiegu klinicznym zakażenia prątkiem BCG u tych dzieci, który nie ulegał szybkiej biodegradacji, zwiększając tym samym odporność komórkową osób szczepionych. Wprawdzie w przypadku 1 opisanym przez autorki ocena poziomu swoistych przeciwciał poszczepiennych, po 2-krotnym szczepieniu przeciwko błonicy i tężcowi, wykazała brak jego ochronnego stężenia, wiadomo jednak, że największe niepożądane odczyny poszczepienne są spowodowane przez składnik krztuścowy pełnokomórkowej szczepionki DTP.

2.9 Podsumowanie

Szczepienia profilaktyczne mogą czasami skracać okres inkubacji niektórych chorób i/lub zmieniać skrycie przebiegającą infekcję/zapalenie w chorobę manifestującą się klinicznie. Cytokiny prozapalne i przeciwzapalne odgrywają ważną rolę w dynamice rozwoju procesu zapalnego w różnych chorobach i mogą uszkadzać tkanki, jeśli ich produkcja w organizmie nie jest zrównowazona. Analiza piśmiennictwa dotycząca zaburzeń równowagi cytokin

w chorobach układu moczowego wskazuje, że mogą być one odpowiedzialne za ujawnienie się tych chorób u naszych pacjentów po podaniu pełnokomórkowej szczepionki DTP. Przy przyjęciu do szpitala u dzieci stwierdzono bowiem infekcję/stan zapalny górnych dróg oddechowych, atopowe zapalenie skóry, oraz/lub skrycie przebiegające zakażenie/zapalenie układu moczowego lub steroidowrażliwy zespół nerczycowy (ZN). Można przypuszczać, że pałeczki krztuśca obecne w szczepionce DTP, działając jako nadmierny bodziec prozapalny, wywołały objawy chorobowe przypominające reakcję organizmu na wyzwolone cytokiny prozapalne, jak IL-1 β , TNF- α , and IL-6. Przemawiają za tym badania *in vitro* które wykazały, że pałeczki krztuśca szczepionki DTP powodowały znamienne większą produkcję tych cytokin niż szczepionka acelularna lub zawierająca tylko DT. Zaburzenia odporności komórkowej stwierdzane w zakażeniu układu moczowego (zwiększenie stężenia IL-1 α , antagonisty receptora IL-1, IL-6, i IL-8 w surowicy i/lub moczu), ZN (zwiększenie IL-2, IFN- γ , TNF- α , i spadek lub zwiększenie IL-4, zależnie od rodzaju badanych komórek), i w atopowym zapaleniu skóry (zmniejszenie produkcji IFN- γ i zwiększenie IL-4), sugerują, że podobne przewlekłe, przebiegające podklinicznie nieprawidłowości spowodowane przez cytokiny w przebiegu chorób ujawnionych u badanych dzieci, w połączeniu z tymi wyzwolonymi podaniem szczepionki DTP, były odpowiedzialne za patomechanizmy obserwowanych zmian chorobowych. Przemawiają za tym także badania na zwierzętach, które wykazały zależne od dawki oraz czasu ekspozycji znamienne zwiększenie ekspresji mRNA wątrobowego IL-1, IL-6, i TNF, oraz znaczne zmniejszenie ekspresji mRNA i aktywności izoenzymów CYP450 w wątrobie po podaniu pełnokomórkowej szczepionki DTP. Szczepionka powodowała duże zwiększenie poziomu IFN- γ , które występowało równocześnie z maksymalnym obniżeniem stężenia wątrobowych enzymów CYP450, a także zwiększenie ekspresji mRNA indukowanej syntazy tlenu

azotu, uważanej przez niektórych autorów za przyczynę supresji enzymów CYP450. Również polimorfizm genetyczny interleukin, zwłaszcza wariantów konstelacji TNF- α i IL-6, może u niektórych niemowląt z zakażeniem, obniżeniem stężenia IFN- γ , lub niedoborem receptora IFN- γ , stanowić predyspozycję do bardziej intensywnej niż zazwyczaj reakcji zapalnej w nerkach po podaniu szczepionki. Powyższe patomechanizmy mogą być także być odpowiedzialne za niektóre przypadki zespołu nagłej śmierci niemowląt (SIDS).

2.10 Piśmiennictwo

1. Wilson G. S.: Indirect effects: provocation disease. [w:] *The Hazards of Immunization*. The Athlone Press, London, England, 1967, 265-280.
2. Griffin M. R. i in.: No increased risk for invasive bacterial infection found following diphtheria-tetanus-pertussis immunization. *Pediatrics* 1992, 89, 640-642.
3. Gale J. L. i in.: Risk of serious acute neurological illness after immunization with diphtheria-tetanus-pertussis vaccine. A population-based case-control study. *JAMA* 1994, 271, 37-41.
4. Hurwitz E. L., Morgenstern H.: Effects of diphtheria-tetanus-pertussis or tetanus vaccination on allergies and allergy-related respiratory symptoms among children and adolescents in the United States. *J. Manipulative Physiol. Ther.* 2000, 23, 81-90.
5. Wiersbitzky S., Bruns R., Niendorf A.: Pediatric vaccination advice: reactive arthritis and immuno-vasculitis with cardiovascular shock following triple prophylactic vaccination (diphtheria-pertussis-tetanus). *Kinderarztl. Prax.* 1990, 58, 547-549.
6. Domula E., Petter O.: Panarteritis nodosa after diphtheria-tetanus vaccination and influence of gluten containing nutritive factors. *Z. Haut. Geschelchtskr.* 1970, 45, 655-661.
7. Wolska-Kuśnierz B. i in.: Ciężkie niepożądane odczyny poszczepienne po zastosowaniu szczepionek zawierających żywe drobnoustroje u dzieci z pierwotnymi niedoborami odporności. *Ped. Pol.* 2004, 79, 865-871.
8. Kurenko-Deptuch M., Bernatowska E., Zwolska Z.: Niedobór receptora dla interferonu gamma u trojga pacjentów z uogólnionym zakażeniem szczepionkowym prątkiem BCG. *Ped. Pol.* 2004, 79, 872-877.
9. Torbicka E., Lagergard T., Trollfors B.: Serum antibodies to the components of diphtheria-tetanus-pertussis vaccine in Polish children related to vaccination status. *Infection* 1995, 23, 212-215.
10. Ansher S., Thompson W.: Modulation of hepatic mRNA levels after administration of lipopolysaccharide and diphtheria and tetanus toxoids and pertussis vaccine adsorbed (DTP vaccine) to mice. *Infect. Immunol.* 1994, 20, 984-991.
11. Fantuzzi G. i in.: Depression of liver metabolism and induction of cytokine release by diphtheria and tetanus toxoids and pretussis vaccines: role of *Bordetella pertussis* cells in toxicity. *Infect. Immun.* 1994, 62, 29-32.

12. Ansher S. i in.: Pertussis toxin-induced alterations of murine hepatic drug metabolism following administration of diphtheria and tetanus toxoids and pertussis vaccine adsorbed. *Infect. Immun.* 1993, 61, 4240-4247.
13. Ansher S. i in.: Role of endotoxin in alterations of hepatic drug metabolism by diphtheria and tetanus toxoids and pertussis vaccine adsorbed. *Infect. Immun.* 1992, 60, 3790-3798.
14. Adonajło A. i in.: Reakcje na podanie szczepionki i odpowiedź serologiczna na składnik krztuścowy szczepionek błonica-tężec-koklusz (DiTePer) u dzieci. *Przegl. Epidemiol.* 1972, 26, 453-464.
15. Blumberg D. A. i in.: Severe reactions associated with diphtheria-tetanus-pertussis vaccine: detailed study of children with seizures, hypotonic-hyporesponsive episodes, high fevers, and persistent crying. *Pediatrics* 1993, 91, 1158-1165.
16. Blood-Siegfried J. i in.: Monokine production following in vitro stimulation of the THP-1 human monocytic cell line with pertussis vaccine components. *J. Clin. Immunol.* 1998, 18, 81-88.
17. Ausiello C. M. i in.: Vaccine- and antigen-dependent type 1 and type 2 cytokine induction after primary vaccination of infants with whole-cell or acellular pertussis vaccines. *Infect. Immunol.* 1997, 65, 2168-2174.
18. Stachowski J. i in.: Th1/Th2 balance and CD45-positive T cell subsets in primary nephrotic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* 2000, 14, 779-785.
19. Falus A., Biro J., Rakasz E.: Cytokine networks and corticosteroid receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1995, 762, 71-77.
20. Rakasz E. i in.: Modulation of glucocorticosteroid binding in human lymphoid, monocytoid and hepatoma cell lines by inflammatory cytokines interleukin (IL)-1 beta, IL-6 and tumor necrosis factor (TNF)-alpha. *Scand. J. Immunol.* 1993, 37, 684-689.
21. Jujo K. i in.: Decreased interferon gamma and increased interleukin-4 production in atopic dermatitis promotes IgE synthesis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1992, 90, 323-331.
22. Loyer P. i in.: Interleukin 4 inhibits the production of some acute-phase proteins by human hepatocytes in primary culture. *FEBS Lett.* 1993, 336, 215-220.
23. Lukacs N. W.: Migration of helper T-lymphocytes subsets into inflamed tissues. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000, 106, 264-269.

Tabela 1. Dane kliniczne i laboratoryjne dzieci z chorobami układu moczowego ujawnionymi po szczepieniu DTP

Lp.	Wiek (mies.) Płeć	Wywiad/ wyniki badania fizycznego	Dawka DTP; Czas od podania szczepionki do wystąpienia objawów klinicznych (h)	Objawy chorobowe przed hospitalizacją	Dane laboratoryjne, badanie usg, cystoureterografia
1	3, M	Przed miesiącem też miał syncopę	III; 5	Syncopę, tachykardia	OB 50/1h, UTI, pyuria, VUR bilateralis
2	3, M	9 pkt Apgar, niepokój 3 tyg. przed przyjęciem, dermatitis atopica	II; 8,5	Dysuria, niepokój, płacz, krzyżowanie nóg, temp. 38°C, otitis media dx., urethritis, rhinoph.	OB 21/1h, CRP 40.7 mg/l, leukocytoza $22.3 \times 10^9/l$, płytki krwi $536 \times 10^9/l$, K^+ w surowicy 5,89 mmol/L, UTI, ropomocz
3	4, M	od 2 miesięcy dysuria; dermatitis atopica	II; 4 dni	wymioty, temp. 39°C, brązowy mocz	ARF (C_{kr} 30 ml/min), UTI, pyelonephritis, VUR bilateralis, RR 160/100 mmHg, Hb 0,93 mmol/l, leukocytoza $16,2 \times 10^9/L$, pyuria,

KLINICZNEJ”

					erythrocyturia
4	4, F	9 pkt Apgar, od pierwszego mieś. życia słabsze napięcie mięśni prawej połowy ciała	II; 2	Obrzęki nóg, dysuria, temp. 38°C, niepokój, sinica od 2 tyg. życia podczas rehabilitacji metodą Vojty	OB 15/1h, Hb 1,66 mmol/l, leukocytoza 16,8 x 10 ⁹ /l, płytki krwi 487 x 10 ⁹ /l, CRP 44,6 mg/l, IgG 0,69 gm/l (n = 1,9 - 8,6); IgM <0,17 gm/l (n = 0,25 - 1,2 g/L), UTI, ropomocz
5	5, F	w 2 miesiącu życia UTI i pyuria	III; kilka	wymioty, temp. 40°C	OB 25/1h, UTI, VUR sinistra, ropomocz
6	5, F	8 pkt Apgar	II; 10 dni	gorączka, dysuria, niepokój	OB 5/1h, K ⁺ w surowicy 5,88 mmol/l, VUR bilateralis, pyelon and ureter duplex dx., UTI, ropomocz
7	5, M	dermatitis atopica	I; 6 dni	zielone, wodniste stolce ze śluzem	OB 7/1h, UTI, pyuria
8	7, M	dermatitis atopica, w 3 miesiącu życia UTI	III; 4,5	temp. 38.9°C, niepokój, stękanie, urethritis, rhinoph., otitis media dx.	OB 20/1h, CRP 28,8 mg/l, leukocytoza 15,7 x 10 ⁹ /l, K ⁺ w surowicy 4,01 mmol/l,

					UTI, ropomocz
9	20, F	8 pkt Apgar	II; kilka	temp. 38°C, pharyngitis	OB 37/1h, UTI, ropomocz
10	21, M	tonsillitis purulenta 2 razy w ostatnim miesiącu	IV; kilka	obrzęk kończyn dolnych, ascites	OB 90/1h, UTI, ropomocz
11	21, F	tonsillitis purulenta	IV; 3	senność, sinica wokół ust	OB 15/1h, UTI, ropomocz
12	24, F	dermatitis atopica	IV; 4 dni	skąpomocz, uogólnione obrzęki	ZN przebiegając y z ARF, ropomocz
13	65, M	ZN, dermatitis atopica	V; 7 dni	pharyngitis	Białkomocz przy przyjęciu 2,1gm/l, potem objawy typowe dla ZN

UTI, *urinary tract infection*, zakażenie układu moczowego

VUR, *refluxus vesicoureteralis*

ZN, steroidowrażliwy zespół nerczycowy

ARF, *acute renal failure*, ostra niewydolność nerek

GLN, *glomerulonephritis*

CRP, *C-reactive protein*, białko C-reaktywne

Tabela 2. Reakcje na iniekcje różnych typów szczepionki DTP u myszy

Typy szczepionki DTP	Reakcje organizmu myszy na podanie szczepionek DTP
Szczepionki DTP tzw. "dzikiego typu"	Zwiększenie o 50% stężenia mikrosomalnego CYP450, wysoki poziom IL-6, przedłużenie czasu snu po heksobarbitalu.
Szczepionka pełnokomórkowa zmutowana	Zmniejszenie o 30% stężenia mikrosomalnego CYP450 z towarzyszącymi zmianami czasu snu po heksobarbitalu.
Szczepionka acelularna zmutowana	Bez wpływu na metabolizm leków w wątrobie, czas snu po heksobarbitalu lub poziom IL-6.

Tabela 3. Sekwencja procesów biochemicznych obserwowanych po podaniu pełnokomórkowej szczepionki DTP u myszy

Czas po podaniu szczepionki DTP	Zmiany biochemiczne stwierdzone u myszy
Po 1-2 h od podania szczepionki	3-6-krotne zwiększenie ekspresji mRNA IL-1, IL-6 i TNF
Po 4 h	Zwiększenie ekspresji mRNA indukowanej syntazy NO
Po 8-12 h	Zmniejszenie ekspresji mRNA wątrobowych izoenzymów CYP1A2, 2E1

Tabela 4. Zmiany biochemiczne stwierdzone po podaniu różnych dawek szczepionki DTP lub jej składników u myszy

<p>Szczepienie DTP spowodowało zależne od dawki i czasu podania zmiany w stężeniu enzymów CYP450 metabolizujących leki w wątrobie, tj. po 7 dniach od podania PT (toksyna krztuśca), razem DT (toksoidy krztuśca i tężca) lub acelularnej absorbowanej szczepionki krztuśca (AP) stężenie enzymów CYP450 obniżyło się o ponad 50% w porównaniu z wartościami wyjściowymi.</p>
<p>Dla wywołania powyższego działania niezbędne było podanie: 125 ng PT, lub 16 ng PT razem z APD.</p>
<p>Zmianom stężenia enzymów wątrobowego CYP450 towarzyszyła zwiększona aktywność reduktazy chinonu, bez zmiany poziomów IL-6 lub TNF.</p>
<p>Endotoksyna spowodowała zmiany metabolizmu wątrobowego leków w ciągu 24 h od podania, przy czym ustąpiły one po 7 dniach.</p> <p>Szczepionka DTP i PT spowodowały znaczne pobudzenie produkcji IFN-γ, które wystąpiło równocześnie z największym obniżeniem stężenia enzymów wątrobowego CYP450.</p>

Tabela 5. Zmiany w narządach, badaniach laboratoryjnych i funkcji patofizjologicznej po podaniu szczepionki DTP i endotoksyny u myszy

<p>Pojedyncza dawka 0,5 ml szczepionki DTP przedłużała sen myszy po heksobarbitalu o 1,6-1,8 razy powyżej wartości zwierząt kontrolnych zarówno u myszy reagujących jak i nie reagujących na endotoksynę (ER lub NR) i działanie to utrzymywało się przez 7 dni.</p>
<p>Po podaniu szczepionki DTP stężenie wątrobowego CYP450 obniżyło się o 30-40%.</p>
<p>Masa śledziony i wątroby myszy ER i NR były znacznie zwiększone przez 7 do 14 dni po podaniu szczepionki, a badanie histopatologiczne wykazało wieloogniskowy stan zapalny w tych narządach i martwicę komórek wątrobowych.</p>
<p>Po podaniu szczepionki DTP oraz LPS (lipopolisacharyd) poziomy IL-6, IL-2 i TNF u myszy były znacznie podwyższone, przy czym u myszy NR zmiany te były mniejsze.</p>
<p>Monocyty krwi obwodowej u niemowląt szczepionych DTP produkowały IL-2, IL-5 i IFN-γ, zaś komórki śledziony produkowały IL-5.</p>

3.

**POSTĘPY W LECZENIU.
ZASTOSOWANIE FARMAKOGENETYKI
W GASTROENTEROLOGII KLINICZNEJ I HEPATOLOGII U
DOROSŁYCH I DZIECI**

3.1 Wstęp

U niektórych chorych, różnice w reakcjach farmakodynamicznych na wiele leków mogą odzwierciedlać polimorfizmy genów kodujących białka transportowe, receptorów leków, punktów uchwytu leków, oraz produktów genu, których aktywność odgrywa ważną rolę w postępie choroby. Oprócz korzystnych skutków działania leków, czasem obserwuje się także poważne objawy niepożądane, które np. w 1994 r. wystąpiły w USA u ponad 2 milionów chorych, będąc przyczyną około 100 tys. zgonów. Wprowadzenie osiągnięć farmakogenetyki do praktyki klinicznej pozwoli na zwiększenie skuteczności leków, zmniejszenie liczby i nasilenia objawów niepożądanych towarzyszących stosowaniu leków o niskim wskaźniku terapeutycznym, a także wybranie optymalnych leków i dawek w danej chorobie i u poszczególnych chorych.

W zastosowaniu technologii genetycznej istnieją jednak obiektywne przeszkody, m.in. fakt, że efekt działania leku może też odzwierciedlać działanie kilku enzymów metabolizujących go, transporterów i receptorów docelowych, przy czym niektóre z nich mogą być polimorficzne. Większość szlaków metabolicznych podlega też wpływom różnych czynników niegenetycznych, jak wiek chorego, dieta, choroba, interakcje leków. Tak więc, w badaniach populacyjnych zależność między danym genotypem a reakcją na lek niekoniecznie musi w pełni odzwierciedlać wyniki testu przewidującego reakcję chorego (tab. 1, wg 8).

Ograniczenia klinicznego wykorzystania genotypu mogą być przezwyciężone dzięki oznaczeniu fenotypu chorego odzwierciedlającego aktualną aktywność enzymów docelowych. Większość enzymów i transporterów leków, z wyjątkiem S-metylotransferazy tiopuryny (TPMT), jest jednak nieobecna we krwi lub tkankach łatwo dostępnych do badania. Z tego powodu określenie fenotypu może się wiązać z podaniem próbnej dawki leku lub wykonaniem biopsji tkanki. W wielu przypadkach przydatne może być także

monitorowanie stężenia leku lub jego metabolitów w osoczu. Pozwala to na uzyskanie bardziej wiarygodnych danych niż jednorazowe podanie dawki leku specyficznego dla danego enzymu, ponieważ większość leków jest metabolizowanych wieloma ścieżkami metabolicznymi. Obecnie różnice w aktywności różnych enzymów metabolizujących leki można wykryć szybciej podając tzw. koktajle metaboliczne, w których skład wchodzi kilka jednorazowych dawek różnych leków, np. koktail Karolinska zawiera 100 mg kofeiny, 25 mg losartanu, 20 mg omeprazolu oraz 250 mg chininy, co pozwala na oznaczenie fenotypów 4 enzymów CYP450, tj. CYP1A2, 2C9, 2C19 oraz 3A4), zaś koktail "Cooperstown 5+1" składa się z kofeiny (oznaczającej aktywność CYP1A2, N-acetylotransferazy-2 i oksydazy ksantynowej), dekstrometorfanu (CYP2D6), omeprazolu (CYP2C19), oraz dożylnie podanego midazolamu (CYP3A).

Dotychczasowe postępowanie terapeutyczne polega zwykle na stopniowym zwiększaniu dawek leku i analizie reakcji klinicznej chorego. W wielu przypadkach może to jednak spowodować zwłokę w szybkim osiągnięciu efektów klinicznych, a czasem może nawet być powodem wystąpienia oporności wielolekowej, np. w chemioterapii nowotworów. Wydaje się, że w przyszłości testowanie farmakogenetyczne będzie główną metodą postępowania terapeutycznego, zwłaszcza w gastroenterologii klinicznej, psychiatrii i onkologii, ponieważ leki stosowane w tych specjalnościach mają zwykle niski wskaźnik terapeutyczny. W celu wybrania właściwego leku i jego wyjściowej dawki, określenie genotypu chorego odpowiedzialnego za farmakokinetykę/farmakodynamikę będzie dodatkowym uzupełnieniem dotychczasowych danych (jak wiek, masa ciała, funkcja nerek) na których obecnie opierają się zasady farmakoterapii. Celem pracy jest przedstawienie postępów farmakogenetyki w zakresie gastroenterologii i hepatologii klinicznej, zwłaszcza w odniesieniu do dzieci.

3.2 Białkowy transporter leków – glikoproteina P (gp-P)

W celu wywarcia działania lek podany doustnie musi ulec wchłonięciu z przewodu pokarmowego i takiemu rozmieszczeniu, aby dotarł do miejsc swojego działania w organizmie. W transporcie leków przez błony biologiczne udział bierze gp-P, integralne białko przezbłonowe, która ma często wpływ na skuteczność farmakoterapii a jego warianty genetyczne są odpowiedzialne za różnice wartości parametrów farmakokinetycznych niektórych leków obserwowane u genetycznie predysponowanych chorych. Gp-P należy do podrodziny ABCB białek ABC transportu przezbłonowego. Jest to polipeptyd składający się z 1280 aminokwasów, obejmujący dwie homologiczne połówki składające się z 610 aminokwasów połączone giętym regionem zbudowanym z 60 aminokwasów. Każda z tych połówek zawiera sześć spiral tworzących domenę rozciągniętą przezbłonowo i jedną kasetkę wiążącą ATP. Grupa gp-P jest znana jako MDR1 (*multidrug resistance 1*, oporność wielolekowa) a badania wykazały polimorficzny charakter tego genu.

Gp-P jest przezbłonową pompą ATP-zależną stanowiącą barierę nie pozwalającą różnym ksenobiotykom dotrzeć do poszczególnych kompartmentów lub komórek organizmu. Gp-P jest obecna w komórkach nabłonka jelit, bariery krew-mózg, komórkach śródbłonka naczyń włosowatych ośrodkowego układu nerwowego i jąder, błonie kanalikowej bieguna żółciowego hepatocytów, błonie szczytowej przewodników trzustkowych, trofoblastach łożyska, korze nadnerczy, nabłonku szczoteczkowym komórek kanalików proksymalnych nerek, a także w niektórych komórkach hematopoetycznych. Chroni ona komórki przed toksycznym wpływem nagromadzonych w nich produktów i/lub ich metabolitów dzięki transportowi tych substancji poza komórkę, a także usuwaniu ich z układu krążenia. Wskazuje to na potencjalną fizjologiczną rolę tego białka w sekrecji ksenobiotyków do przewodu pokarmowego, żółci i moczu.

3.3 Wchłanianie leków z przewodu pokarmowego

Obecność gp-P w nabłonku błony śluzowej jelit powodowała zmniejszenie bioprzyjętności m.in. cyklosporyny A, takrolimusa, inhibitorów proteazy HIV, talinolu oraz digoksyny spowodowane wydalaniem ich z powrotem do światła przewodu pokarmowego. Karbamazepina, lek przeciwpadaczkowy będący znanym induktorem enzymu CYP3A4, powodowała zwiększenie ekspresji mRNA MDR1 i MRP2 oraz zawartości białka MRP2 w dwunastnicy, co wiązało się ze zmniejszeniem wchłaniania doustnie podawanego talinolu (100 mg przez 19 dni), a także zwiększeniem klirensu nerkowego i metabolicznego tego leku, które w obu przypadkach wykazywały korelację z mRNA MDR1 oraz MRP2. Z kolei, podawanie werapamilu, cyklosporyny A, oraz preparatu PSC833, będących inhibitorami gp-P, zwiększało wchłanianie leków, których przyswajanie z jelit było ograniczane przez ten transporter. Również niektóre flawonoidy zwiększały wewnątrzkomórkowe stężenie rodamin¹²³, cząsteczki fluorescencyjnej służącej jako substancja próbna dla gp-P, co wskazuje, że związki te mają zdolność hamowania aktywności gp-P. Najbardziej aktywnym okazał się 2-(4-metylpiperazyno-1-ylcarbonyl)-5-hydroksychromon, który miał działanie silniejsze niż cyklosporyna A. Należy przy tym dodać, że bergamotyna, główna furanokumaryna, będąca składnikiem soku grejpfrutowego, także hamowała aktywność wielu enzymów CYP450, m.in. 1A2, 2A6, 2C9, 2C1, 2E1 oraz 3A4 w mikrosomach wątroby i jelit, zwiększając bioprzyjętność wielu leków metabolizowanych przez te enzymy.

U osób dorosłych, znamiennie niższa zawartość gp-P w nabłonku śluzówki jelit mająca swoje odzwierciedlenie w stopniu ekspresji i funkcji tego białka transportowego wykazała korelację z mutacją eksonu 26 (C3435T) u homozygotów wariantu mutacji 3435TT (24% populacji Niemiec) w porównaniu z nosicielami 3435CC. W badaniu 1280 osób, częstość

występowania allelu C w populacjach Afrykanów wynosiła 73-84%, podczas gdy wśród Portugalczyków, Chińczyków, Azjatów południowo-wschodnich, Brytyjczyków, odsetek ten wahał się od 34 do 59%. Dane uzyskane u 14 ochotników uczestniczących w badaniu kinetyki digoksyny w warunkach stałego stężenia leku w surowicy (0,25 mg digoksyny/dobę przez 2 tygodnie) wykazały, że u nosicieli wariantu 3435TT, C_{max} leku było o 38% wyższe niż u osób z mutacją 3435CC (2,2 vs. 1,6 $\mu\text{g/l}$, $p = 0,004$). Homozygoty mieli także 4-krotnie wyższe stężenie digoksyny w surowicy w porównaniu ze średnią wartością stężenia leku po podaniu pojedynczej dawki, zaś po dłuższej kuracji najwyższe stężenie leku w surowicy tych osób było także wyższe niż w grupie kontrolnej. Podobne wyniki otrzymali Kurata i wsp. po dożylnym lub doustnym podaniu pojedynczej dawki 0,5 mg digoksyny. Bioprzydatność leku u osób z genotypem G/G2677C/C3435 wynosiła $67,6\% \pm 4,3\%$ w porównaniu z $87,1\% \pm 8,4\%$ stwierdzoną u osób z genotypem T/T2677T/T3435 ($p < 0,05$). Również klirensy nerkowe leku wykazały prawie 32% różnicę między populacjami tych mutacji genu MDR1 (odpowiednio $2,8 \pm 0,3$ vs. $1,9 \pm 0,1$ ml/min/kg). W tabeli 2 zebrano leki stosowane w praktyce klinicznej transportowane przez gp-P. W tabeli 3 podano przykłady interakcji gp-P z różnymi lekami i substancjami naturalnymi.

Badania przeprowadzone u 247 osób pozwoliły na wyodrębnienie 110 różnych haplotypów MDR1. W przewidywaniu fenotypu MDR1 wyniki badań farmakokinetyki digoksyny oceniane podczas stałego stężenia leku w surowicy wykazały wyższość analizy haplotypów nad badaniem SNPs (*single nucleotide polymorphism*). Należy też brać pod uwagę wspomnianą wyżej specyficzność substratu dla takiego polimorfizmu oraz jego wariantów, a także znamienny udział innych mechanizmów wychwytu, np. przez polipeptydy transportujące organiczne aniony - OATPs (*organic anion-transporting polypeptides*),

znajdujące się w wątrobie, nerkach, mózgu i jelitach, także mające wpływ na transport błonowy wielu substancji endogennych i leków (tabela 4).

3.4 Zapalenie błony śluzowej ściany jelita grubego

Badania Farrella i wsp. wykazały dużą przydatność kliniczną oznaczania stężenia gp-P170 na limfocytach krwi obwodowej oraz komórkach nabłonka jelit w wykrywaniu chorych ze stanami zapalnymi jelita grubego, nie reagujących na leczenie glikokortykosteroidami (substraty gp-P). Było to związane z ekspresją nieaktywnej postaci receptora beta glikokortykosteroidów u tych chorych, a także obecnością genu PG170, który powodował wpływ kortykosteroidów z komórek. Stwierdzono, że osoby z chorobą Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) miały znamienne wyższe poziomy gp-P w porównaniu z kontrolą (odpowiednio $26,7 \pm 2,8$ (SE) oraz $20,3 \pm 2,5$ vs. $11,9 \pm 1$, $p < 0,001$). Ekspresja genu MDR dla gp-P zarówno na limfocytach jak i komórkach nabłonka śluzówki jelit chorych była stabilna i nie zależała od aktywności choroby lub leczenia steroidami. Stwierdzono też znamienne korelację między ekspresją gp-P genu MDR na limfocytach krwi obwodowej a taką ekspresją zarówno na śródnabłonkowych limfocytach śluzówki jelit, jak i komórkach nabłonka śluzówki. Wysoka ekspresja gp-P170 na obwodowych limfocytach towarzyszyła podobnej ekspresji na powierzchniowych limfocytach śluzówki nabłonka i komórkach śluzówki nabłonka jelit. Wyniki tych badań okazały się przydatne przy podejmowaniu decyzji dotyczącej odstawienia glikokortykosteroidów i resekcji zmienionego chorobowo odcinka jelita. Niedawno wykazano, że wysoka ekspresja mRNA receptora beta glikokortykosteroidów (hGRb) na monocytach krwi obwodowej może także służyć za wskaźnik braku wrażliwości chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego na leczenie glikokortykosteroidami.

3.5 Choroby wątroby

Oprócz MDR1, wiele innych białek bierze udział w transporcie leków i substancji endogennych przez błonę kanalikową hepatocyta. Np. gp-P genu MDR2 (znana także jako MDR3) jest odpowiedzialna za przemieszczenie się fosfolipidów przez tę błonę kanalikową. Białko kanalikowe wielolekowej odporności, znane jako cMRP, cMOAT, lub MRP2, może transportować glutationy, glukuroniany, oraz siarczany niektórych leków poprzez błonę apikalną hepatocyta, podczas gdy pompa eksportowa soli żółci jest odpowiedzialna za transport kanalikowy kwasów żółciowych. Keppler i wsp. wykazali, że białko MRP2 jest wyrażone tylko w wątrobie chorych z zespołem Dubin-Johnsona. W tym zespole, stwierdzono też wrodzony defekt wydzielania z hepatocytów do żółci substancji sprzężonych anionowych amfofilicznych. W komórkach u szczurów, Sippel i wsp. wyosobnili fosfoglikoproteinę przezbłonową (m.cz. 110 kD), będącą kanalikowym transporterem kwasu żółciowego, i wykazali, że w tym systemie wydalanie taurocholenu zależy od czasu, temperatury i stężenia.

3.6 Sok grapefruitowy a stosowanie leków

Pojedyńcza szklanka soku grapefruitowego (*Citrus grandis*) wypita raz dziennie przez chorego poddawanego farmakoterapii może zwiększyć bioprzystępność zażywanego leku (-ów), nasilając w ten sposób jego działanie lub wywołując objawy uboczne, zwłaszcza jeśli lek ten ma mały wskaźnik terapeutyczny. Ten sok owocowy działa poprzez zahamowanie metabolizmu leków przez CYP3A4 w jelicie cienkim, zwłaszcza wówczas, gdy zawartość enzymu w jelicie chorego jest duża i lek podlega tzw. "efektowi pierwszego przejścia". Składniki soku grapefruitowego mogą także stymulować lub hamować aktywność gp-P znajdującej się w granicznym nabłonku wewnętrznym wierzchołków mikrokosmków jelit i będącej transporterem

wpływowym ksenobiotyków. W tabeli 5 przedstawiono leki wykazujące interakcję z sokiem grapefruitowym, prawdopodobnie wykazujące, oraz nie wykazujące takiej interakcji.

Składniki soku grapefruitowego odpowiedzialne za interakcję z lekami nie są jeszcze w pełni poznane, lecz działanie soku może być spowodowane kompleksową synergią pomiędzy flawonoidami (naryngina, naryngenina), furanokumarynami (6', 7' -dihydroksybergamotyna, bergamotyna) oraz seskwiterpenem (nootkatone). Żaden z tych składników soku pojedynczo nie wywierał działania hamującego aktywność CYP3A4, które by przekraczało 40% wartości wyjściowej. Okazało się, że po upływie 4 h od spożyciu soku grapefruitowego w enterocytach jelita cienkiego wystąpiło około 47% zahamowanie aktywności CYP3A4, które następnie utrzymywało się przez 24 h.

Karbamazepina jest lekiem przeciwpadaczkowym o małym wskaźniku terapeutycznym stosowanym w napadach częściowych i toniczno-klonicznych. Lek jest metabolizowany przez wątrobowy CYP3A4 do aktywnego metabolitu - 10,11-epoksydu karbamazepiny. Badania 10 chorych na padaczkę w wieku 19-51 lat (7 mężczyzn, 3 kobiety) leczonych przez 2-3 tygodnie karbamazepiną w dawce 200 mg trzy razy dziennie wykazały, że podawanie przez dwa dni 300 ml soku grapefruitowego razem z pierwszą, poranną dawką leku spowodowało zwiększenie o 41% pola pod krzywą oraz C_{max} , pozostając bez wpływu na T_{max} . Sok grapefruitowy zwiększał również biodostępność leku antykoncepcyjnego, etinyloestradiolu, o 28%, podwyższając także stężenie C_{max} leku w surowicy o 37%, podobnie jak estronu, metabolitu etinyloestradiolu. Modyfikacja metabolizmu tych steroidów była spowodowana zahamowaniem aktywności 6 i 11 β -dehydrogenazy hydroksysteroidu, enzymu odpowiedzialnego za utlenianie kortyzolu.

Sok grapefruitowy znamienne hamował metabolizm sertraliny, specyficznego inhibitora wychwyty serotoniny stosowanego w leczeniu depresji,

metabolizowanej przez CYP3A4 do aktywnego metabolitu N-desmetylosertraliny, chociaż zazwyczaj zmiany te nie miały istotnego wpływu na przebieg leczenia, prawdopodobnie z powodu dużego wskaźnika terapeutycznego leku. Wiens opisał jednak przypadek kobiety ze stanem depresyjnym leczonej skutecznie fluwoksaminą (lek ten jest metabolizowany przez CYP2D6 i CYP2C19) w dawce dobowej 150 mg, u której po miesiącu równoczesnego spożywania soku grapefruitowego z tym lekiem wystąpiły palpacje serca.

Podczas równoczesnego zażywania z sokiem grapefruitowym, benzodiazepiny, diazepam (lek metabolizowany przez CYP2C i CYP3A4 mający długi $t_{1/2}$) oraz midazolam i triazolam (CYP3A4, krótkie okresy półtrwania), a także buspiron (CYP3A4), lek lek uspokajający często stosowany zamiast benzodiazepin, miały znamienne wyższe pola pod krzywą, C_{max} , oraz T_{max} , którym towarzyszyły kliniczne efekty tej interakcji w postaci osłabienia, nudności i senności.

3.7 S-metylotransferaza tiopuryny (TPMT)

6-Merkaptopuryna (6-MP) i jej prolek azatiopryna (AZA) mają działanie immunosupresyjne oraz cytotoksyczne i są stosowane w leczeniu ostrej białaczki limfoblastycznej, schorzeń reumatycznych, zapobieganiu odrzucenia przeszczepu wątroby, terapii autoimmunologicznego zapalenia wątroby, a także jako preparaty drugiego rzutu w chorobie Crohna i WZJG.

Po doustnym podaniu, AZA jest bez udziału enzymów przekształcana w 6-MP, która jest następnie inaktywowana przez polimorficzny enzym TPMT. Aktywność TPMT można oznaczać radiochemicznie lub chromatograficznie w obwodowych krwinkach czerwonych chorego. W śluzówce przewodu pokarmowego i wątrobie, w wyniku tzw. efektu "pierwszego przejścia", oksydaza ksantynowa (OK) katalizuje utlenianie części 6-MP do nieaktywnego

kwasu 6-tiomoczowego. Z drugiej strony, aktywne metabolity nieutlenionej 6-MP, nukleotydy 6-tioguaniny (6-TGN), powstają w wyniku działania transferazy fosforybozylowej guaniny/hipoksantyny (HGPRT), enzymu oszczędzającego puryny. Mniejszy udział w biotransformacji 6-MP do 6-TGN mają także dwa inne enzymy, dehydrogenaza monofosforanu inozyny (DMI) i syntaza monofosforanu guanozyny (SMG). Mechanizm działania terapeutycznego 6-TGN polega na ich inkorporacji w DNA chorego i w efekcie zablokowaniu syntezy puryn *de novo*.

Typ "dziki" TPMT przekształca 6-MP głównie w nieaktywną terapeutycznie 6-metylmerkaptopurynę (6-MMP), konkurując także o 6-MP z HGPRT. Prawidłowa aktywność enzymów TPMT i OK ogranicza w ten sposób powstawanie 6-TGN. Wariant zmutowany TPMT powoduje znaczne zwiększenie produkcji aktywnych 6-TGN z powodu nasilenia działania enzymów HGPRT, DMI oraz SMG, prowadząc czasami do wystąpienia niepożądanych objawów hematologicznych. Tkanki hematopoetyczne charakteryzują się brakiem aktywności OK i z tego powodu są zależne od TPMT w ograniczaniu produkcji 6-TGN i ewentualnym wystąpieniu mielosupresji (leukopenia, pancytopenia), lub innych objawów niepożądanych (np. ostre zapalenie trzustki, nowotwory złośliwe).

W razie wystąpienia hiperurykemii towarzyszącej leczeniu AZA i 6-MP, czasami równocześnie stosuje się allopurynol, inhibitor OK, zwiększający wydalanie kwasu moczowego. Wynikające stąd zahamowanie metabolizmu tych leków prowadzi do kumulacji 6-MP i jej metabolitów i szybszego wystąpienia działania immunosupresyjnego. W tej sytuacji, u chorego mogą także pojawić się objawy toksyczne zmuszające lekarza do zmniejszenia skutecznych dawek leków immunosupresyjnych nawet o 2/3 w porównaniu z dawką wyjściową. Ponieważ OK jest enzymem polimorficznym, którego aktywność czasem różni się między chorymi 1- do 10-krotnie, TPMT staje się główną determinantą

genetyczną zróżnicowanych reakcji tiopuryn na organizm. Inny lek, metotreksat, równocześnie stosowany u tych chorych, może także zwiększać bioprzystępność 6-MP poprzez hamowanie aktywności OK, co powoduje nasilenie działania cytotoksycznego dzięki supresji syntezy puryn *de novo*. Lek ten może także podwyższać poziom pirofosforanu fosforybozowego, podstawowego składnika przemiany metabolicznej z udziałem HGPRT, zwiększając w ten sposób skuteczność działania 6-MP.

3.7.1 Polimorfizmy TPMT

U osób rasy kaukaskiej i Afro-Amerykanów aktywność TPMT ma charakter: trójmodalny : 89% każdej z tych populacji ma wysoką aktywność enzymu (> 10-15 jednostek międzynarodowych aktywności na 1 ml krwinek czerwonych), 11% ma aktywność średnią (5 -15 U/ml), zaś 0,3% ma niską aktywność enzymu (< 5-6,3 U/ml). Względna aktywność enzymu korespondowała z obecnością odpowiednio 2, 1 lub 0 alleli funkcjonalnych.

Różnice w aktywności TPMT są spowodowane występowaniem następujących alleli: *2, 3A, *3B, *3C, *3D, *4, *5 oraz *6 (tabela 6). Korelacja między genotypem TPMT i aktywnością enzymu jest wysoka: niedobór enzymu prawie zawsze wynikający z podwójnego wariantu genotypu i obecności alleli *2, *3A lub *3C jest bardzo wrażliwy (95,2%) i specyficzny (100%) dla aktywności pośredniej. Genotypowanie może więc ujawnić chorych z największym ryzykiem wystąpienia objawów toksycznych hematologicznych. U chorych nie badanych genotypowo, z odpowiednio niską lub wysoką aktywnością enzymu, zwykle dawki tiopuryny mogą mieć działanie toksyczne lub są nieskuteczne.

U chorych na AZW nie tolerujących AZA, mediana aktywności TPMT jest znamienne niższa niż u osób będących w stadium remisji po monoterapii tym lekiem (2 mg/kg/d), a ta z kolei jest niższa niż u chorych leczonych

kombinacją kortykosteroidu i AZA. Genotypowanie TPMT pozwala także przewidzieć brak skuteczności zastosowanego leczenia, ponieważ istnieje potencjalna możliwość niedoleczenia chorych z zapaleniem jelit mających wysoką aktywność TPMT. Ryzyko wystąpienia toksyczności leku jest u nich wprawdzie niskie, lecz terapia może okazać się nieskuteczna lub nastąpi nawrót choroby.

Oprócz działania toksycznego na szpik, tiopuryny mogą także wywoływać zależne od dawki potencjalnie szkodliwe działanie na przewód pokarmowy. Badanie genotypu TPMT nie pozwala przewidzieć hepatotoksyczności tych leków, chociaż jej występowanie wykazuje korelację z poziomem 6-MMP. Wśród chorych na zespół drażliwego jelita (ZDJ), u których po leczeniu tiopuryną pojawia się leukopenia, pacjenci z wariantami allelu TPMT stanowią mniejszość, co wskazuje na udział również innych czynników w takiej reakcji organizmu. Co więcej, u osób po przeszczepie narządu morfologia krwi wykazuje zwykle leukopenię w chwili dostosowania dawki leku. Monitorowanie toksyczności leku umożliwia także zwiększenie jego dawki. Przy schemacie terapii polegającym na wyjściowym zastosowaniu małej dawki i powolnym jej zwiększaniu, chorzy mogą otrzymywać AZA lub 6-MP w dawkach odpowiednio 0,5-1,5 mg/kg/d lub 0,25-0,5 mg/kg/d, które następnie mogą być podwyższane do zwykłych dawek podtrzymujących 2-3 mg/kg/d dla AZA i 1-1,5 mg/kg/d dla 6-MP. U chorych szybko metabolizujących TPMT takie postępowanie może być powodem niedostatecznego dawkowania i przedłużenia czasami nawet o kilka miesięcy oczekiwania na efekt terapeutyczny. W tej sytuacji dawkowanie leku na podstawie genotypu lub fenotypu chorego połączone z rutynową oceną liczby krwinek białych we krwi chorego może pozwolić na zastosowanie bardziej agresywnego reżymu terapeutycznego.

Wiek chorego i stopień funkcji nerek mogą zmieniać aktywność TPMT w krwinkach czerwonych, a wykonanie transfuzji krwi w okresie 2 miesięcy poprzedzających leczenie może wpłynąć na uzyskanie fałszywych wyników. Interakcje leków także mogą wywierać niekorzystny wpływ, np. równoczesne stosowanie AZA i mesalaminy (często stosowanej u chorych z ZDJ) może zwiększać stężenie 6-TGN we krwi nasilając ryzyko wystąpienia mielotoksyczności, co wskazuje na odwracalne zahamowanie metabolizmu mesalaminy przez TPMT. U chorych leczonych równocześnie tiopurynami i mesalaminami częściej obserwuje się objawy niepożądane. Stężenia terapeutyczne furosemidu, leku moczopędnego, diuretyków tiazydowych, sulfasalazyny, kwasu 5-acetylosalicylowego, niesteroidowych leków przeciwzapalnych we krwi także hamują aktywność TPMT. I odwrotnie, terapia samą tiopuryną może powodować zwiększenie aktywności tego enzymu.

W niektórych przypadkach, monitorowanie stężenia terapeutycznego 6-TGN we krwi może być równie ważne jak oznaczenie genotypu lub fenotypu TPMT. U dzieci i dorosłych chorych na ZDJ, wyższe poziomy 6-TGN we krwi były związane z uzyskaniem korzystniejszych efektów terapeutycznych i spadkiem aktywności choroby w porównaniu z osobami mającymi niższe stężenia. U dorosłych z okrężnicą lub przetokową postaciami choroby Crohna skuteczność kliniczna terapii wiązała się z osiągnięciem stężeń 6-TGN przekraczających 235 pmoli metabolitu/ 8×10^8 krwinek czerwonych. Poziomy leku powyżej 450 pmoli/ 8×10^8 erytrocytów były związane z większym ryzykiem wystąpienia mielotoksyczności. Monitorowanie metabolitów tioguaniny może także wyjaśniać przyczynę nieskuteczności leku u niektórych chorych: niskie poziomy 6-TGN połączone z wysokimi stężeniami 6-MMP wskazywały na oporność terapeutyczną chorego spowodowaną wysoką aktywnością TPMT, zaś niskie poziomy 6-MMP mogą wskazywać na niestosowanie się chorego do zaleceń lekarza. W związku z brakiem całkowitej

pewności oparcia się na wynikach badania genotypu lub fenotypu TPMT w przewidywaniu reakcji klinicznej chorego zaleca się stopniowe zwiększanie dawkowania preparatu w celu ustalenia jego aktywności u danego chorego.

3.7.2. Objawy niepożądane leków spowodowane polimorfizmami TPMT

Badania retrospektywne przeprowadzone w Niemczech u 93 chorych ze stanem zapalnym jelit (82,8% z chorobą Crohna i 17,2% z WZJG) leczonych AZA wykazały, że u 15,1% pacjentów zmniejszono dawki lub odstawiono lek z powodu wystąpienia objawów niepożądanych, zaś u 4,3% chorych nie stwierdzono jego działania. Mediana dawki leku u osób z objawami ubocznymi wynosiła 1,5 mg/kg/d (0,6-2,2) w porównaniu z 1,9 mg/kg/d (0,7-3,5) u chorych bez takich objawów ($p < 0,0125$). W innych badaniach przeprowadzonych w Anglii u 113 chorych (średni wiek 45 lat, 54% pacjentów z chorobą Cohna i 46% chorych z WZJG) leczonych AZA i obserwowanych przeciętnie przez 4,7 lat, stwierdzono, że niska aktywność TPMT wykazywała korelację ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia neutropenii ($p < 0,001$), a korzystna reakcja chorego na lek była związana ze stosowaniem małych dawek AZA (< 2 mg/kg/d).

3.8. CYP2D6

CYP2D6 bierze udział w metabolizmie ponad 100 leków. Pod względem szybkości metabolizowania przez CYP2D6 populację można podzielić na osoby ultraszybko metabolizujące (USM), szybko metabolizujące (SM), średnio szybko metabolizujące, i wolno metabolizujące leki (WM), co odpowiada obecności przynajmniej 3, 2, 1, lub 0 alleli funkcjonalnych. Częstość występowania fenotypu WM u osób rasy kaukaskiej wynosi 5-10%, zaś u Azjatów około 1%. Oznaczenie fenotypu CYP2D6 wykonuje się przez podanie próbnej dawki debryzochiny, sparteiny lub dekstrometorfanu

i oznaczenie stosunku ilości metabolitu do ilości leku macierzystego w porcji moczu.

Dotychczas zidentyfikowano ponad 75 alleli CYP2D6, przy czym do najczęstszych alleli niefunkcjonalnych należą: CYP2D6*3, *4, *5 i *6 (tab. 7, wg 1). Podczas stosowania niektórych leków antyarytmicznych, przeciwdepresyjnych i neuroleptyków, u osób WM częściej niż u EM występują objawy niepożądane, a opioidowe leki przeciwbólowe rzadziej działają skutecznie.

Trójcykliczne leki przeciwdepresyjne (*TCA*s, *tricyclic antidepressants*) i inhibitory selektywnego wychwytu serotoniny (*SSR*I, *selective serotonin reuptake inhibitors*) są stosowane w celu opanowania objawów klinicznych towarzyszących zaburzeniom funkcji jelit. Amitryptylinę podaje się u chorych z ZDJ oraz w idiopatycznym nietrzymaniu stolca. U chorych na ZDJ często dotkniętych depresją i będących SM stosowanie TCA oraz SSRI może zwiększać stężenie TCA i w efekcie poprawiać skuteczność tego leku metabolizowanego przez CYP2D6.

3.9 CYP2C19

CYP2C19 jest enzymem polimorficznym, lecz większość populacji stanowią osoby skutecznie metabolizujące (*EM*s, *efficient metabolizers*). Genotyp/fenotyp WM stwierdza się u 3% osób rasy kaukaskiej, około 4% czarnych Afrykanów i u 14% Chińczyków. Fenotyp CYP2C19 ustala się po podaniu pojedynczej dawki mefenytoliny lub omeprazolu. Dotychczas zidentyfikowano 9 wariantów alleli tego enzymu: CYP2C19*2A, *2B, *3, *4, *5A, *5B, *6, *7 i *8, z których żaden nie produkuje czynnego funkcjonalnie enzymu. W tabeli 8 przedstawiono przykłady polimorfizmów CYP2C19 i/lub 2C9 mających wpływ na różnice w szybkości metabolizmu niektórych leków. Kliniczne znaczenie polimorfizmu CYP2C19 jest mniejsze niż w przypadku

niedoboru CYP2D6, ponieważ od tego enzymu zależy eliminacja stosunkowo niewielu leków, zwłaszcza u osób rasy kaukaskiej. Do substratów CYP2C19 należą tzw. inhibitory pompy protonowej (PPIs, *proton pump inhibitors*) specyficzne dla ATPazy $-H^+/K^+$, stosowane w chorobie wrzodowej żołądka, zespole Zollinger-Ellisona, oraz w chorobie refluksowej, często w kombinacji z amoksycyliną i makrolidami u chorych z infekcją *H. pylori*, ponieważ hamują funkcję pompy protonowej odpowiedzialnej za końcowe procesy wydzielania soku żołądkowego.

U osób metabolizujących omeprazol ze średnią szybkością (EM), po 8 dniach podawania standardowej dawki 20 mg leku, pH soku żołądkowego zwiększało się z 1 do 3, u heterozygotów enzymu funkcjonalnego CYP2C19 wartość pH podnosiła się do 5,5, zaś u homozygotów z defektem CYP2C19, pH zwiększało się do 6,2 po tej samej dawce leku. U osób WM, długotrwałe leczenie omeprazolem powodowało zwiększone uwalnianie gastryny i chromograniny A osocza, oraz obniżało poziom pepsynogenu I. U chorych bez infekcji *H. pylori*, a także po eradykacji tego zarazka omeprazolem lub lansoprazolem razem z amoksycyliną i klarytromycyną, stwierdzono istnienie związku genotypu CYP2C19 z wpływem omeprazolu i lansoprazolu na pH soku żołądkowego. Najlepsze efekty leczenia uzyskano u osób z genotypem WM enzymu CYP2C19, oraz u heterozygotów i homozygotów EM (tabela 9). Najczęstszym skutkiem niedoboru CYP2C19 jest kumulacja leku i ryzyko wystąpienia objawów toksycznych, które zależą od zwiększania się stężenia tego leku we krwi i tkankach.

U dzieci w wieku od 2 do 16 lat, parametry farmakokinetyczne omeprazolu podanego w pojedynczej doustnej dawce 10 lub 20 mg były podobne do wartości otrzymanych u dorosłych. Nie stwierdzono także zależności między genotypem dzieci będących ekstenzywnymi metabolizerami a farmakokinetyką omeprazolu. U małych dzieci w wieku od 4,5 do 27 miesięcy

będących w krytycznym stanie, dopiero dożylna dawka leku 40 mg/1,73 m² pozwalała utrzymać pH soku żołądkowego powyżej 4 przez 24 h, podczas gdy dawka 20 mg/1,73 m² była nieskuteczna. Z kolei, optymalna wyjściowa doustna dawka lansoprazolu u dzieci z zapaleniem przełyku spowodowanym refluksem żołądkowo-przełykowym (średni wiek 3,5 lat) wynosiła 30 mg/m², chociaż około połowa dzieci zareagowała korzystnie (80% wyleczeń po 4 tygodniach kuracji) na leczenie już po dawce 17 mg/m² stosowanej u dorosłych. U niemowląt w wieku do 6 miesiąca życia, stwierdzono silniejsze działanie doustnego lansoprazolu hamujące wydzielanie soków żołądkowych niż u starszych dzieci i dorosłych, lecz lek miał tendencję do szybszej eliminacji z organizmu.

3.9.1 Preparaty ziołowe

Należy podkreślić, że niektóre preparaty ziołowe, np. Ginkgo bilboa, mogą nasilać hydroksylację omeprazolu i w efekcie zmniejszać stężenie leku i jego metabolitu-sulfonu omeprazolu w osoczu, a także innych substratów CYP2C19, osłabiając znamienne ich działanie kliniczne. W badaniach *in vitro* wykazano, że oczyszczone składniki ziół, kwercetyna, hiperycyna i kempferol ginsengi, wywierały działanie hamujące usuwanie przez gp-P rytonawiru, leku stosowanego w terapii HIV, zwiększając jego wychwyty przez komórki. Hiperycyna znamienne hamowała także metabolizm kortyzolu przez NADPH, podobnie jak kempferol i kwercetyna. Przedłużona ekspozycja na kwercetynę znamienne zwiększała ekspresję mRNA MDR1 oraz poziom CYP3A4 w komórkach zastosowanego modelu, zaś hiperforyna ziela św. Jana powodowała supresję MDR1 i podwyższenie aktywności CYP3A4. Hiperycyna, kempferol, kwercetyna i allicyna czosnku hamowały *in vitro* usuwanie ksenobiotyków z komórek oraz metabolizm z udziałem CYP3A4.

3.9.2 Refluks żołądkowo-przelykowy

Furuta i wsp. badając skuteczność lansoprazolu (30 mg raz dziennie doustnie przez 8 tygodni) u 61 dorosłych z różnie nasiloną chorobą refluksową (GERD, *gastroesophageal reflux disease*) stwierdzili, że odsetek wyleczeń w znamienym stopniu zależał od genotypu CYP2C19 chorego oraz stopnia nasilenia schorzenia (stopnie A-D) ocenianego endoskopowo. Odsetek wyleczeń w grupach chorych ze stopniami A, B i D zaawansowania GERD będących homozygotami EM, heterozygotami EM lub WM wynosił odpowiednio 45,8%, 67,9 i 84,6%. U chorych będących homozygotami EM, odsetek wyleczeń stopnia C i D choroby wynosił tylko 16,7%, przy czym mieli oni najniższe stężenia lansoprazolu w osoczu. Jak widać, częstość potwierdzonego endoskopowo wyleczenia refluksu żołądkowo-przelykowego wykazuje związek z genotypem chorego, jednak u zdrowych osób pełne zahamowanie wydzielania kwasu solnego uzyskuje się dzięki częstemu podawaniu dużych dawek lansoprazolu, zaś do eradykacji *H. pylori* także dochodzi dopiero po powtórzeniu kuracji dużymi dawkami lansoprazolu i amoksycyliny, niezależnie od genotypu pacjenta. Rabeprazol, nowszy PPI, jest w mniejszym stopniu podatny na wpływ ewentualnego polimorfizmu genetycznego CYP2C19 niż starsze leki tej grupy, ponieważ jego metabolizm mniej zależy od tego enzymu.

3.10 CYP3A

Enzymy podrodziny CYP3A metabolizują większość leków stosowanych w praktyce klinicznej. W wątrobie noworodków, do 7 dnia po urodzeniu stwierdza się tylko śladowe ilości CYP3A4, a w wieku 1 miesiąca aktywność enzymu wynosi tylko 30-40% aktywności stwierdzanej u dorosłych. Aktywność CYP3A4 oznacza się za pomocą testu oddechowego z erytromycyną. Dotychczas nie opisano polimorfizmu tego enzymu, lecz stwierdzono różnice w jego aktywności zależne od płci (kobiety mają o 20-50%

większą aktywność enzymu niż mężczyźni) w odniesieniu do erytromycyny, metyloprednizonu, prednizolonu, metadonu, takrolimusu, modafinilu, diltiazemu, nifedypiny, triazolamu, cyklosporyny i werapamilu (tabela 10). Ekspresja CYP3A5 jest polimorficzna, np. w populacji kaukaskiej enzym ten jest wyrażony u mniej niż 10%, zaś u Afro-Amerykanów jest wyrażony w większości populacji. Wynika stąd, że polimorfizm CYP3A5 może być głównym czynnikiem odpowiedzialnym za różnice w aktywności enzymów podrodziny CYP3A. Różnice między populacjami odzwierciedlają zwykle różnice w częstości występowania allelu funkcjonalnego CYP3A5*1.

Nadmierne dawki cizaprydu, związku prokinetycznego stosowanego do niedawna w leczeniu refluksu żołądkowo-przelykowego, lub równoczesne stosowanie z innymi lekami hamującymi jego metabolizm mogą być powodem wystąpienia zaburzeń rytmu serca, kończących się czasami zgonem. Głównym enzymem odpowiedzialnym za metabolizm cizaprydu do norcizaprydu, 3-fluoro-4-hydroksycizaprydu, oraz 4-fluoro-2-hydroksycizaprydu jest CYP3A4. Norcizapryd posiada wprawdzie 15% aktywności prokinetycznej cizaprydu, lecz nie ma wewnętrznej aktywności w odniesieniu do przewodnictwa w mięśniu sercowym. Opisano szereg przypadków niekorzystnego działania tego leku na akcję serca, np. u 8-letniej dziewczynki leczonej erytromycyną i ketokonazolem po dodaniu cizaprydu obserwowano duże zaburzenia rytmu serca w postaci przedwczesnych skurczów komorowych i przedsionkowych. Zmiany te były spowodowane podwyższonym stężeniem cizaprydu w osoczu, które obniżyło się po odstawieniu erytromycyny i ketokonazolu, będących inhibitorami enzymu CYP3A4. Należy jednak podkreślić, że chociaż u noworodków urodzonych pomiędzy 25 a 41 tygodniem ciąży cizapryd stosowany w dawkach 0,42-1,6 mg/kg/24 h wywoływał znaczne przedłużenie odstępu QTc ($QT_{corrected}$) nawet do wartości powyżej 450 ms (stwierdzone u 7 spośród 49 dzieci) nie spowodowało to żadnych niekorzystnych objawów klinicznych. Badania na izolowanym sercu

świni wyjaśniły, że działanie cizaprydu wydłużające fazę repolaryzacji jest związane z blokiem szybkiej składowej prądu potasowego (I_{kr}), natomiast wolna składowa tego prądu była hamowana dopiero przy znacznym przekroczeniu dawki i wysokim stężeniu leku.

3.11 Dehydrogenaza dihydropiryminy (DPD)

DPD, kodowana w genie DPYD, jest enzymem odpowiedzialnym za metabolizm 5- fluorouracylu (5-FU), głównego leku stosowanego w terapii kolorektalnego raka przerzutowego po resekcji chirurgicznej. Częściowy brak aktywności DPD stwierdza się u 3-5% populacji, a jej brak jest związany z wystąpieniem ciężkich objawów toksycznych po podaniu leku i kończy się zgonem chorych na raka leczonych 5-FU. Niedobór enzymu DPD może w dużym stopniu odzwierciedlać występowanie allelu DPYD*2A produkującego enzym nieaktywny. W celu zapewnienia odpowiedniej czułości testów wydaje się, że niezbędne będzie wykonanie skryningu wariantów wielu DPYD. Oznaczanie aktywności DPD oraz stężenia 5-FU we krwi chorych mogą być pomocne w przewidywaniu toksyczności chemoterapii tym lekiem.

3.12 Urydynodifosfoglukuronozyltransferazy (UGTs)

UGTs reprezentują grupę enzymów sprzęgających odpowiednie substraty z kwasem glukuronowym. Opisano wiele mutacji genów UGT1. Dziedziczenie dwóch uszkodzonych alleli jest związane ze zmniejszeniem sprzęgania bilirubiny, sprzyjając powstaniu takich nieprawidłowości klinicznych jak zespół Crigler-Najjara i zespół Gilberta. Żółtaczka noworodków i zapaść sercowo-naczyniowa u noworodków leczonych chloramfenikolem (tzw. zespół "szarego dziecka") są także spowodowane niedojrzałością aktywności UGT.

W wątrobie płodu, sprzęganie bilirubiny przypisane UGT1A1, jest właściwie nieoznaczalne, lecz po urodzeniu dziecka ulega zwiększeniu osiągając

poziom dorosłych w wieku 6 miesięcy. U noworodków, glukuronizacja acetaminofenu, substratu UGT1A6, i w mniejszym stopniu UGT1A9, jest upośledzona w porównaniu z okresem dojrzewania oraz u osób dorosłych, lecz jest to w pewnym stopniu wyrównywane poprzez zwiększone wiązanie z siarczanami. Tak więc, chociaż odsetek dawki niezmetyabolizowanego acetaminofenu wydalonego z moczem jest podobny u noworodków i dorosłych, stosunek ilości wydalonych metabolitów - glukuronianu do siarczanu acetaminofenu zwiększa się z 0,34 u noworodków do 1,8 u dorosłych. *In vitro*, glukuronizacja morfiny, będącej substratem UGT2B7, w wątrobie płodu wynosi 10 - 20% wartości stwierdzanej w wątrobie dorosłych, a *in vivo* może być wykrywana u wcześniaków urodzonych nie wcześniej niż w 24 tygodniu ciąży. Klirens morfiny wykazuje ścisłą korelację z wiekiem ciążowym i zwiększa się około 4-krotnie między 27 tygodniem a końcem prawidłowej ciąży. Ponieważ 6-glukuronid morfiny ma także właściwości przeciwbólowe, opóźnienie dojrzewania aktywności glukuronizacyjnej u noworodków może mieć następstwa farmakodynamiczne.

Irynotekan (prolek będący pochodną kamptotecyny) jest preparatem stosowanym w leczeniu raka jelita grubego i metabolizowanym przez UGT1A1. Polimorfizm tego enzymu metabolizującego irynotekan do jego aktywnego metabolitu (SN-38) hamującego topoizomerazę I (taki sam enzym mają chorzy na zespół Gilberta), jest przyczyną około 50-krotnych różnic w szybkości metabolizmu leku, co zwiększa ryzyko wystąpienia objawów toksycznych, manifestujących się ciężką biegunką. Zmniejszona zdolność do glukuronizacji substratu jest związana z powtórzeniami (A [TA]*n*TAA) w regionie promotora genu UGT1A1, przy czym aktywność transkrypcyjna genu spadała wraz ze zwiększaniem się wartości *n*.

3.12.1. Choroby wątroby

Enzymy UGT katalizują procesy sprzęgania różnych leków, m.in. analogów kamptotecyny. W zespole Gilberta podwyższenie poziomu bilirubiny nie sprzężonej z kwasem glukuronowym w surowicy wynika głównie z niedoboru UGT1A1 spowodowanego insercją TA w region promotora UGT1A1 (polimorfizm najczęściej typu (TA)⁷TAA, dotyczący około 36% Afrykanów i 3% Azjatów), co powoduje powstanie allelu UGT1A1*28. Należy dodać, że zespół Gilberta obserwowany u 2-12% populacji ma także swój udział w przedłużającej się żółtaczce noworodków i w efekcie może wpływać na wystąpienie żółtaczki jąder podstawy mózgu. U kobiet stwierdzono mniejszą niż u mężczyzn aktywność enzymów UGT w odniesieniu do oksazepamu, temazepamu, acetaminofenu, klofibratu, labetalolu, diflunisalu i kwasu mykofenolowego.

W pierwszych dniach życia, u noworodków populacji Japończyków karmionych mlekiem z piersi stwierdzono znamienne wyższe stężenia bilirubiny nie sprzężonej z kwasem glukuronowym w surowicy w porównaniu z noworodkami populacji kaukaskiej. Wykazano, że jest to spowodowane przez genetyczny czynnik ryzyka, tj. mutację *missense* glicyny zamiast argininy w kodonie 71 (Gly71Arg) genu UGT1A1. Po odstawieniu karmienia piersią żółtaczka ustępowała i nasilała się po ponowieniu karmienia piersią. Wskazuje to, że w mleku matki znajdował się jeden lub więcej składników powodujących przedłużanie się żółtaczki fizjologicznej. W populacji kaukaskiej i u Egipcjan stwierdzono też częste, równoczesne, występowanie innych polimorfizmów *locus* UDPGT-1, tj. UGT1A6* i UGT1A7*3. [Warto przy tym pamiętać, że niska aktywność detoksyfikacyjna allelu 3 genu UGT1A7 (UGT1A7*3) została zidentyfikowana jako nowy genetyczny czynnik ryzyka i predyspozycji do wystąpienia chorób trzustki.

Obecność allelu UGT1A1*28 wiąże się też ze zmniejszeniem glukuronizacji aktywnego i toksycznego metabolitu SN-38 irynotekanu w próbkach wątroby, zmienionym rozmieszczeniem tego metabolitu, ciężką leukopenią, oraz biegunką w badaniach retrospektywnych i prospektywnych chorych z różnymi litymi guzami.

3.13. Zespół drażliwego jelita

Zastosowanie antagonisty receptora serotoniny (5-HT) przynosiło ulgę u kobiet chorych na ZDJ manifestującego się głównie biegunką. 5-HT uwalniana w zakończeniach nerwowych podlega wychwytowi przez białko transportowe SERT (serotonin-transporter) będące celem działania leków antydepresyjnych należących do SSRI. Polimorfizmy w obrębie promotora dla syntezy SERT mają wpływ na skuteczność terapii chorych z depresją po podaniu leków serotonergicznych. Badania Camilleri i wsp. wykonane u 30 chorych (15 mężczyzn i 15 kobiet) na ZDJ wykazały obecność długiego allelu (16 kopii jednostki powtarzalnej składającej się z 20-23 par zasad, która prowadzi do syntezy dwukrotnie większej ilości mRNA), krótkiego (14 kopii) i heterozygotycznych polimorfizmów regionu promotora dla SERT. Polimorfizmy te miały związek z czasem tranzytu jelitowego, przy czym większe reakcje obserwowano u osób z polimorfizmami homozygotycznymi niż heterozygotycznymi długiego allelu. Autorzy uważają, że genetyczne polimorfizmy promotora SERT mają wpływ na reakcję tych chorych na antagonistę 5-HT, jakim był alosetron stosowany u tych chorych przez 6 tygodni w dawce 1 mg dwa razy dziennie.

3.14. Polimorfizmy interleukin i zmieniona ekspresja genów a skuteczność leczenia

3.14.1. WZJG

Pod względem histologicznym, choroby zapalne ściany jelita grubego, a zwłaszcza WZJG, cechują się infiltracją błony śluzowej jelita przez aktywowane neutrofile, makrofagi i limfocyty. Cytokiny prozapalne i przeciwzapalne generowane przez te komórki i ich aktywności regulacyjne odgrywają więc ważną rolę w podtrzymywaniu/hamowaniu procesu zapalnego w tych chorobach i ich powikłaniach miejscowych/ systemowych. U chorych na WZJG, chorobę Crohna, a także toczeń rumieniowaty, oraz przypuszczalnie osteoporozę i schorzenia naczyń wieńcowych serca stwierdzono także znamienne częstsze występowanie fenotypu IL1RN*2. Dla wyjaśnienia trzeba podać, że antagonistą receptora IL-1 (IL-1RA) jest naturalnym kompetytywnym inhibitorem aktywności prozapalnej IL-1. Gen IL-1RA może mieć cechy polimorficzne, co sprawia, że czasami w organizmie dochodzi do produkcji zarówno IL-1RA jak i IL-1 β odznaczających się jakościowymi różnicami w aktywności działania. Homozygoty allelu 2 genu IL-1RA (IL1RN*2) wykazują przedłużoną i bardziej nasiloną reakcję prozapalną w porównaniu z osobami mającymi inne genotypy IL-1RA. Status homozygoty IL1RN*2 może być korzystny w zwalczaniu czynników zakaźnych i komórek zmienionych nowotworowo, lecz jest szkodliwy w przypadkach przewlekłych stanów zapalnych w organizmie, a także u kobiet w ciąży (z powodu nawracającego poronienia).

IL-4 jest cytokiną przeciwzapalną produkowaną przez komórki T_H2 powodującą supresję reakcji prozapalnych generowanych przez zaktywowane monocyty, np. produkcja IL-1 i TNF- α , ważną dla obrony immunologicznej błony śluzowej przewodu pokarmowego przed szkodliwymi czynnikami. Badania Aithala i wsp. wykazały, że w analizowanej grupie pacjentów z chorobą

Crohna 32% osób było nosicielami jednej lub dwóch kopii wariantu allelu genu IL-4 w porównaniu z kontrolą ($p < 0,002$), 41% było nosicielami jednej lub dwóch kopii wariantu allelu receptora IL-4 ($p < 0,09$), a 19% chorych było nosicielami zarówno kombinacji IL-4 jak i IL-4RA, w porównaniu z kontrolą ($p < 0,005$). Wynika stąd, że polimorfizmy cytokiny IL-4 i receptora IL-4 mogą odgrywać ważną rolę w patogenezie choroby Leśniowskiego-Crohna. Warto dodać, że w badaniach na szczurach z doświadczalnym zapaleniem jelit wywołanym przez doodbytnicze podanie trójnitrobenzenu kwasu sulfonowego, równoczesne stosowanie *per rectum* przez 2 tygodnie dwa razy dziennie preparatu Mesna (sulfonian 2-merkaptotetanu) będącego antyoksydantem spowodowało znamienne zmniejszenie stanu zapalnego i prawie zupełny powrót śluzówki jelita zwierząt do stanu wyjściowego. Autorzy wykazali też znamienne zwiększenie ekspresji mRNA iNOS (indukowana syntaza NO) oraz aktywności mieloperoksydazy, przypuszczając, że Mesna wywierała swoje korzystne działanie prawdopodobnie dzięki neutralizacji wolnych rodników tlenowych uwalnianych przez leukocyty wielojądrzaste obojętnochłonne podczas infiltracji śluzówki jelita.

U niektórych chorych z WZJG, w zapalnie zmienionym odcinku jelit dochodzi do rozwoju procesu nowotworowego. Guimbaud i wsp. u pacjentów z WZJG stwierdzili dużą miejscową produkcję czynnika hamującego leukemii (LIF, *leukemia inhibitory factor*), która wykazywała znamienne dodatnią korelację ze stopniem wyzwalania cytokiny prozapalnej IL-8. Okazało się też, że LIF w sposób zależny od dawki stymulował wzrost komórek HT29, co może wskazywać na krytyczną rolę tego czynnika w podatności komórek macierzystych jelita grubego chorych na WZJG dla rozwoju guzów nowotworowych.

Do białek rekombinowanych stosowanych obecnie leczniczo w aktywnej chorobie Crohna należą: infliksimab, będący przeciwciałem

chimerycznym myszy-człowieka w odniesieniu do TNF podawanym w okresie remisji i zamknięcia przetok, przeciwciało humanizowane CDP571 anty-TNF oszczędzające steroidy, oraz natalizumab, będący przeciwciałem humanizowanym dla integryny α -4 podawanym w celu wzbudzenia remisji u chorych z aktywną chorobą Leśniowskiego-Crohna. W nowych terapiach biotechnologicznych będących w trakcie oceny stosuje się onercept, w pełni rozpuszczalny ludzki receptor p-55 dla TNF (choroba Crohna), przeciwciało humanizowane dla integryny α -4 β -7 (LDP-02) (WZJG i choroba Crohna), przeciwciało humanizowane w stosunku do IFN- γ (choroba Crohna), sargramostim (czynnik stymulujący kolonie granulocyt-makrofag, GMC-SF) (choroba Crohna), oraz IFN- β (choroba Crohna i WZJG).

3.15. Martwicze zapalenie błony śluzowej jelita cienkiego u niemowląt (*Enterocolitis necroticans*, NEC)

U wcześniaków z bardzo niską urodzeniową masą ciała zaburzona produkcja cytokin immunoregulacyjnych może spowodować wystąpienie NEC, ciężkiego stanu zapalnego jelit. Badania Treszla i wsp. wykazały, że u niemowląt z NEC znamienne rzadziej niż u zdrowych dzieci występowało nosicielstwo genotypu ¹⁹⁰²GG będącego mutantem allelu IL-4ra, charakteryzującego się zwiększonym sygnałem transdukcji cytokiny przeciwzapalnej IL-4. Według autorów, może to mieć ważne znaczenie dla obrony tych dzieci przed wystąpieniem NEC, ponieważ ten wariant genetyczny jest związany ze zwiększonym działaniem IL-4, będącej głównym regulatorem zmiany reakcji odpornościowej organizmu z komórkowej (T_H1) w humoralną (T_H2). Wykazano także, iż dzieci chore na NEC będące nosicielami genotypu ⁶⁰⁷AA, który jest wariantem genu IL-18 indukującej produkcję cytokin prozapalnych, są narażone na ryzyko wystąpienia postaci NEC o bardzo ciężkim przebiegu klinicznym. Obserwacje te są zgodne z niedawnymi doniesieniami, że

w chorobie Crohna nadmierna ekspresja cytokiny przeciwzapalnej IL-15 reprezentuje potencjalny mechanizm ochronny przed zbyt nasiloną reakcją immunologiczną T_H1 organizmu, a także z ważną rolą lipopolisacharydów otoczki bakteryjnej zarazków Gram ujemnych w zapalnym uszkodzeniu komórek nabłonka jelit przez endogenne TNF- α produkowane przez stymulowane wówczas enterocyty.

3.16. Wirusowe zapalenie wątroby

IFN- α jest stosowany w leczeniu przewlekłego zapalenia wątroby typu C dzięki pobudzaniu odporności komórkowej chorych oraz działaniu przeciwwirusowemu. Badania wykazały, że będąc głównym środkiem leczniczym stosowanym w takich przypadkach, IFN- α podawany nawet z innymi preparatami przeciwwirusowymi był skuteczny tylko u około 50% chorych. Z drugiej strony, okazało się jednak, że u chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C, będących nosicielami polimorfizmu genetycznego IL-10 polegającego na niskiej ekspresji tej cytokiny, reakcja na powyższe leczenie była nawet 5-krotnie większa. I odwrotnie, chorzy będący nosicielami genotypu związanego z wysoką produkcją IL-10, reagowali na leczenie IFN- α o wiele słabiej w porównaniu z innymi. Tak więc, u chorych z *hepatitis C chronica*, w zależności od rodzaju genotypu IL-10 można przewidzieć reakcję terapeutyczną na stosowanie IFN- α , i dla osób będących nosicielami polimorfizmu związanego z wysoką produkcją tej cytokiny należy zaplanować alternatywne metody leczenia.

Postępujące wirusowe zapalenie wątroby typu C jest także związane z nadmierną ekspresją odrębnego zestawu genów immunomodulacyjnych i proapoptotycznych, włącznie z białkami CD147 i CD167 związanymi z apoptozą. Badania nad ekspresją genów karcynogenezy pochodzenia wirusowego i progresji raka wątrobowokomórkowego także pozwoliły na

zidentyfikowanie zestawu różnie wyrażonych genów i ekspresji sekwencji końcówek związanych z rozwojem raka wątrobowokomórkowego. W takich przypadkach, potencjalne nowe metody terapeutyczne mogą polegać na supresji nadmiernej ekspresji genów w dużym stopniu odpowiedzialnych za rozwój tych schorzeń. Profilowanie ekspresji genów może też znacznie zwiększyć możliwość odróżnienia chorych na wirusowe zapalenie wątroby typu C reagujących i nie reagujących, np. na leczenie interferonem i rybawiryną oraz zidentyfikowanie tych pacjentów, którzy będą podatni na wystąpienie niepożądanych objawów podczas stosowania tych leków.

Warto podkreślić, że u szczurów otrzymujących w diecie olej uzyskany z czosnku dochodziło do zwiększenia w sposób zależny od dawki stężenia białka izoenzymów Ya, Yb1, Yc wątrobowej S-transferazy glutationu (GST) oraz CYP1A1 i 3A1, przy czym poziomy mRNA CYP1A1 i 3A1 także ulegały zwiększeniu, a także zmniejszenia ekspresji CYP2E1. Z kolei, dieta zawierająca w swoim składzie tran podwyższała poziomy CYP1A1, 3A1 i 2E1. Równoczesne zastosowanie tych dwóch substancji miało działanie addytywnie zwiększające aktywność mRNA CYP1A1 i 3A1 u zwierząt. Wyniki powyższych badań wskazujące na działanie antyoksydacyjne oleju z czosnku i tranu mogą ewentualnie być wykorzystane w postępowaniu terapeutycznym u ludzi z zaburzoną aktywnością tych enzymów w różnych chorobach wątroby.

3.17. Piśmiennictwo

1. Prandota J.: Podstawy farmakogenetyki i farmakogenomiki w praktyce klinicznej. Jak leczyć skuteczniej i bardziej bezpiecznie, Urban & Partner, Wrocław, 2003.
2. Prandota J.: Podstawy farmakogenetyki w pediatrii klinicznej, *Pediatr. Pol.*, 2003, 78, 559-72.
3. Prandota J.: Podstawy farmakogenetyki w praktyce klinicznej, *Pol. Arch. Med. Wew.*, 2003, 111, 119-131.
4. Prandota J.: Postępy w chemioterapii ostrych białaczek, *Post. Hig. Med. Dośw.*, 1974, 38, 193-228.
5. Evans W.E., McLeod H.L.: Pharmacogenomics-drug disposition, drug targets, and side effects, *N. Engl. J. Med.*, 2003, 348, 538-549.
6. Lazarou J., Pomeranz B.H., Corey P.N.: Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients, *JAMA* 1998, 279, 1200-1205.
7. Givens R.C., Watkins P.B.: Pharmacogenetics and clinical gastroenterology, *Gastroenterology* 2003, 125, 240-248.
8. Christensen M. i in.: The Karolinska cocktail for phenotyping of five cytochrome P450 enzymes, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2003, 73, 517-528.
9. Chainuvati S. i in.: Combined phenotypic assessment of cytochrome p450 1A2, 2C9, 2D6, and 3A, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxidase activities with the "Copperstown 5+1 cocktail", *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2003, 74, 437-447.
10. Tribut O. i in. *Pharmacogenomics, Med. Sci. Monit.*, 2002, 8, RA152-163.
11. Meisel C. i in. : Implications of pharmacogenetics for individualizing drug treatment and for study design, *J. Mol. Med.*, 2003, 81, 154-67.
12. Hadjeri M. i in.: Modulation of p-glycoprotein-mediated multidrug resistance by flavonoid derivatives and analogues, *J. Med. Chem.*, 2003, 46, 2125-2131.
13. He K. i in.: Inactivation of cytochrome P450 3A4 by bergamottin, a component of grapefruit juice, *Chem. Res. Toxicol.*, 1998, 11, 252-259.
14. Edwards D.J. i in.: 6',7'-Dihydroxybergamottin in grapefruit juice and Seville orange juice: effects on cyclosporine disposition, enterocyte CYP3A4, and P-glycoprotein, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1999, 65, 237-244.

15. Lilja J.J. i in.: Grapefruit juice substantially increases plasma concentrations of buspirone, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1998, 64, 655-660.
16. Seidman E.G., Furst D.E.: Pharmacogenetics for individualization of treatment of rheumatic disorders using azathioprine, *J. Rheumatol.*, 2002, 29, 2484-2487.
17. Siva C. i in.: Pharmacogenetics in rheumatology: the prospects and limitations of an emerging field, *Rheumatology* 2002, 41, 1273-1279.
18. Nielsen O.H., Vainer B., Rask-Madsen J.: Review article: the treatment of inflammatory bowel disease with 6-mercaptopurine or azathioprine, *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2001, 15, 1699-1708.
19. Baker D.E.: Pharmacogenomics of azathioprine and 6-mercaptopurine in gastroenterologic therapy, *Rev. Gastroenterol. Dis.*, 2003, 3, 150-157.
20. Weinshilboum R.M.: Thiopurine pharmacogenetics: clinical and molecular studies of thiopurine methyltransferase, *Drug Metab. Dispos.*, 2001, 29, 605-
21. Campbell S., Kingstone K., Ghosh S.: Relevance of thiopurine methyltransferase activity in inflammatory bowel disease patients maintained on low-dose azathioprine, *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2002, 16, 389-398.
22. Schwab M. i in.: Azathioprine therapy and adverse drug reactions in patients with inflammatory bowel disease: impact of thiopurine S-methyltransferase polymorphism, *Pharmacogenetics* 2002, 12, 429-436.
23. Linder M.W., Valdes R.: Pharmacogenetics in the practice of laboratory medicine, *Mol. Diagn.*, 1999, 4, 365-379.
24. Dojo M. i in.: Effects of CYP2C19 gene polymorphism on cure rates for *Helicobacter pylori* infection by triple therapy with proton pump inhibitor (omeprazole or rabeprazole), amoxicillin and clarithromycin in Japan, *Dig. Liver Dis.*, 2001, 33, 671-675.
25. Rodrigues A.D., Rushmore T.H.: Cytochrome P450 pharmacogenetics in drug development: in vitro studies and clinical consequences, *Curr. Drug Metab.*, 2002, 3, 289-309.
26. Sagar M. i in.: Omeprazole and CYP2C19 polymorphism: effects of long-term treatment on gastrin, pepsinogen I, and chromogranin A in patients with acid related disorders, *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2000, 14, 1495-1499.
27. Ingelman-Sundberg M.: Pharmacogenetics: an opportunity for a safer and more efficient pharmacotherapy, *J. Int. Med.*, 2001, 250, 186-200.

28. Furuta T. i in.: Effect of cytochrome P450C19 genotypic differences on cure rates for gastroesophageal reflux disease by lansoprazole, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2002, 72, 453-460.
29. Ishizaki T., Horai Y.: Review article: cytochrome P450 and the metabolism of proton pump inhibitors - emphasis on rabeprazole, *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 1999, 13, 27-36.
30. Ando Y. i in.: Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetic analysis, *Cancer Res.*, 2000, 60, 6921-6926.
31. Iyer L. i in.: UGT1A1*28 polymorphism as a determinant of irinotecan disposition and toxicity, *Pharmacogenomics J.*, 2002, 2, 43-47.
32. Camilleri M. i in.: Serotonin-transporter polymorphism pharmacogenetics in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome, *Gastroenterology* 2002, 123, 425-432.
33. Shusterman T. i in. Effect of the antioxidant Mesna (2-mercaptoethane sulfonate) on experimental colitis, *Dig. Dis. Sci.*, 2003, 48, 1177-1185.
34. Sandborn W.J. i in.: An engineered human antibody to TNF (CDP571) for active Crohn's disease: a randomized double-blind placebo-controlled trial, *Gastroenterology* 2001, 120, 1330-1338.
35. Gordon F.H. i in.: A randomized placebo-controlled trial of a humanized monoclonal antibody to alpha4integrin in active Crohn's disease, *Gastroenterology* 2001, 121, 268-274.
36. Edwards-Smith C.J. i in.: Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alfa, *Hepatology* 1999, 30, 526-530.
37. Manns M. P. i in.: Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C, *Lancet* 2001, 358,958-965.

Tabela 1. Charakterystyka specyficznych dróg metabolicznych różnych leków

Enzym	Substraty	Genotyp ¹	Induktory	Inhibitory	Testy fenotypujące
TPMT	AZA, 6-MP	> 90%	AZA, 6-MP	salicylany, furosemid	próba z krwinkami czerwonymi
CYP 2D6	TCA, SSRI, kodeina, β-blokery, nikotyna, leki anty- psychoty- czne	~ 80%	nieznane	fluoksetyna, paroksetyna, chinidyna	Test z wydalaniem Dek strome- torfanu, sparteiny z moczem
CYP 2C19	PPI, proguanil, S-mefeny- toina	80-100%	fenobarbital, ryfampicyna	nieznane	klirens omeprazolu
CYP 3A4	cyklosporyna lowastatyna, nifedypina, erytromycyna		ryfampicyna, deksametazon fenobarbital, fenytoina, karbamazepina	azolowe leki, przeciwi- grzybicze, erytromycyna sok grejpfrut- towy	test oddechowy z erytromycyną , klirens midazolamu

¹ Obecnie ustalony genetycznie odsetek osób będących wolnymi metabolizerami. TCA, trójcykliczne leki przeciwdepresyjne, TPMT, S-metylotransferaza tiopuryny. SSRI - inhibitory selektywnego wychwytu serotoniny, PPI, inhibitory pompy protonowej.

Tabela 2. Leki będące substratami podlegającymi transportowi przez gp-P

Leki sercowo-naczyniowe:	digoksyna, gallopamil, chinidyna, celiprolol, talinolol, werapamil
Leki przeciwnowotworowe:	aktynomycyna D, doksorubicyna, daunorubicyna, etopozyd, irynotekan, paklitaksel, winblastyna
Leki immunosupresyjne:	cyklosporyna A, takrolimus
Steroidy:	aldosteron, hydrokortyzon, deksametazon
Opioidy:	morfina, metadon
Leki przeciwgruźlicze:	ryfampicyna
Różne leki:	cefazolina, kolchicyna, atorwastatyna, erytromycyna, flufenazyna, iwermektyna, lowastyna, perfenazyna, ondansetron, fenytoina, tamoksyfen, terfenadyna, tiorydazyna, loperamid, feksofenadyna

Tabela 3. Przykłady interakcji gp-P z lekami i produktami naturalnymi

Lek/Produkt naturalny	Inhibitor lub induktor	Interakcje
Atorwastatyna	inhibitor	Digoksyna (↑ AUC o 15%)
Cyklosporyna	inhibitor	Docetaksel, paklitaksel (8-11-krotne ↑zwiększenie bioprzystępności leku)
Erytromycyna	inhibitor	Atorwastatyna, cyklosporyna, feksofenadyna, sakwinawir (↑C _{max} i AUC o 32-115%)
Sok grejpfrutowy	Inhibitor	Paklitaksel (7-krotne ↑ bioprzystępności)
Ketokonazol	Inhibitor	1,6-2-krotne ↑ AUC feksofenadyny, sakwinawiru, takrolimusu
Ryfampina	Induktor	↓ AUC o 37-70% digoksyny, feksofenadyny, sakwinawiru, takrolimusu, talinolu
Rytonawir	Inhibitor	↑ AUC sakwinawiru
Ziele św. Jana	Induktor	↓ AUC digoksyny
Werapamil	inhibitor	↑ klirensu talinolu o 29-56%

Tabela 4. Ważne klinicznie transportery leków

Skróty transporterów leków	Pełne nazwy transporterów leków
MDR1/gp-P (multidrug resistant gene/P-glycoprotein)	Gen oporności wielolekowej/glikoproteina P
BSEP/SPGP (bile salt export pump/sister P-glycoprotein)	Pompa eksportowa soli żółci/siostrzana gp-P
MRP1, MRP2, MRP3 (multidrug resistance associated proteins)	Białka towarzyszące genowi oporności wielolekowej
NTCP (sodium taurocholate co-transporting protein)	Białko ko-transportujące taurocholan sodu
PEPT1, 2 (oligopeptide transporter 1)	Transporter 1 oligopeptydu
OATP1, OATP2 (organic anion transporting peptide)	Peptyd transportujący anion organiczny
OCT1, OCT2 (organic cation transporter)	Transporter kationu organicznego
OAT1, OAT2, OAT3 (organic anion transporter)	Transporter anionu organicznego

Tabela 5. Leki wykazujące interakcję z sokiem grapefruitowym, prawdopodobnie wykazujące taką interakcję, oraz nie wykazujące interakcji z sokiem grapefruitowym

Grupy leków	Leki
I. Leki wykazujące interakcję z sokiem grapefruitowym	amiodaron, atorwastatyna, buspiron, kofeina, karbamazepina, cyklosporyna, cyzapryd, klomipramina, dihydropirydyny (amlodypina, nifedypina, nimodypina, nisoldypina, nitrendypina, pranidypina), diazepam, inhibitory proteazy (rytonawir, indynawir, nelfinawir, amprenawir, lopinawir), lowastatyna, midazolam, sakwinawir, symwastatyna, takrolimus, terfenadyna, teofilina, triazolam
II. Leki przypuszczalnie wykazujące interakcję z sokiem grapefruitowym	fluwoksamina, itrakonazol, sertralina, steroidy, werapamil, warfaryna
III. Leki nie wykazujące interakcji z sokiem grapefruitowym	alprazolam, amitryptylina, cerywastatyna, klarytromycyna, diltiazem, fluwastatyna, haloperydol, omeprazol, fenytoina, prawastatyna, chinidyna, chinina

INFORMACJA O AUTORZE

Prof. zw. dr hab. nauk med. Józef Prandota jest kierownikiem Katedry i Zakładu Pediatrii Społecznej Wydziału Zdrowia Publicznego Akademii Medycznej im. Piastów Śląskich we Wrocławiu oraz profesorem Wyższej Szkoły Medycznej LZDZ w Legnicy. Jest autorem ponad 168 prac naukowych, w tym pierwszym lub jedynym autorem 40 artykułów zamieszczonych w recenzowanych czasopismach zagranicznych z wysokim *Impact Factor* opublikowanych w USA i Europie Zachodniej, a także współautorem 3 książek: "EKG w praktyce pediatrycznej", wyd. Sanmedia, Warszawa 1996, "Farmakoterapia Pediatryczna", wyd. Volumed, Wrocław 1998, oraz "Podstawy farmakogenetyki i farmakogenomiki w praktyce klinicznej. Jak leczyć skuteczniej i bardziej bezpiecznie" wyd. Urban & Partner, Wrocław 2003. Jest także autorem 2 rozdziałów w podręczniku pt. „Nefrologia dziecięca” (red. prof. M. Sieniawska i T. Wszyńska), PZWL, Warszawa 2004, oraz rozdziałów w 2 książkach pt. „Choroby autoimmunologiczne u dzieci” (red. prof. J. Socha) wyd. Biblioteka Pediatrii, PZWL, 2005, i „Podstawy farmakologii klinicznej. Alergie, interakcje leków oraz wybrane problemy w stomatologii” (red. prof. T. F. Krzemiński i A. Jabłecka) wyd. Czelej, Lublin, 2005 r.

W latach 1973-1975 prof. Prandota był stypendystą Fulbrighta w Klinice Pediatrycznej Emory University w Atlancie, Georgia, USA, a w latach 1977/78 pracował jako stypendysta rządu francuskiego w Département de Pharmacologie Clinique, Faculté de Médecine de Paris XII, Créteil, Francja. W 1986 r. dwukrotnie otrzymał stypendium Kościuszkowskie w Department of Pediatrics and Pediatric Clinical Pharmacology, LSU Medical Center, Shreveport, LA, USA. We wrześniu 1993 r. przebywał jako Visiting Professor w Kinderklinik, Medizinische Hochschule AM w Hanowerze, kierowanej przez prof. Johannes Brodehla. Jest członkiem komitetu naukowego miesięcznika "Pediatria Polska" oraz „Indian Journal of Medical Sciences”. W 1994 r. wraz z zespołem otrzymał nagrodę Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Pediatrycznego za najlepszą pracę naukową, która została opublikowana w American Journal of Therapeutics.

Wyniki badań naukowych prof. Prandoty zostały docenione przez instytuty biograficzne w Wielkiej Brytanii oraz w USA, które zamieściły résumé jego osiągnięć w amerykańskim wydawnictwie Marquis Who's Who in Science and Engineering 2002-2008, 6th Ed., Marquis 21st Century Editions, Who's Who in the World 2002-2008, 19th Ed., Who'sWho in Medicine and Healthcare 2002-2008, 4th Ed., a także w International Biographical Centre z Cambridge w Wielkiej Brytanii „1000 Great Scientists” (2003), „Living Legends” (2004)

oraz „Great Minds of the 21st Century” (2005), w American Biographical Institute, Raleigh, North Carolina, USA. W 2007 r. Międzynarodowa Rada Naukowa American Biographical Institute uhonorowała osiągnięcia prof. Prandoty umieszczając jego nazwisko na liście American Hall of Fame, która na stałe znajduje się w ABI jako „21st Century Gallery of Achievements”.

Główne osiągnięcia naukowe prof. Prandoty to:

- 1) wyłonienie i zbadanie w pracy doktorskiej właściwości farmakologicznych Vratizolinu, jednego z 6 oryginalnych polskich leków, stosowanego w opryszczce wirusowej (Prandota J., Wilimowski M., Inglot A.D., Machoń Z.: New isothiazole derivatives. V. Antiinflammatory action of 3-methyl-5-benzoylaminoisothiazole-4-carboxy-para-ethoxyphenylamide. Arch. Immunol. Ther. Exp., 1973, 21, 915-923; Prandota J. Central action of new isothiazole derivatives. Arch. Immunol. Ther. Exp. 1973, 21, 345-355; Inglot A., Machoń Z., Wolna E., Wilimowski M., Prandota J.: New isothiazole derivatives. II. Cytotoxicity and antiviral activity in tissue cultures. Arch. Immunol. Ther. Exp., 1973, 21, 891-902);
- 2) wyjaśnienie patomechanizmu znamiennej klinicznie interakcji pomiędzy kwasem tienylowym (lek moczopędny) a pochodnymi kumaryny (leki hamujące krzepnięcie krwi), co spowodowało wycofanie tego leku z rynku farmaceutycznego we Francji i na świecie (Prandota J., Albengres E., Tillement J.P.: Effect of tienilic acid (Diflurex) on the binding of warfarin 14C to human plasma proteins. Int. J. Clin. Pharmacol. Toxicol., 1980, 18, 158-162; Prandota J., Tillement J.P., d'Athis Ph., Drueke T., DiGiulio S.: Binding of tienilic acid (Diflurex) to human serum albumin and to plasma of normal subjects and uraemic patients. Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet., 1982, 5, 99-106);
- 3) wyjaśnienie, dlaczego chorzy na mukowiscydozę (choroba genetycznie uwarunkowana charakteryzująca się nawrotami stanów zapalnych dróg oddechowych i kończąca się wczesnym zejściem śmiertelnym) muszą otrzymywać czasami 2 do 3-krotnie większe dawki niektórych leków w celu zapewnienia terapeutycznego poziomu we krwi (Prandota J.: Drug disposition in cystic fibrosis: progress in understanding pathophysiology and pharmacokinetics. Pediatr. Infect. Dis. J., 1987, 6, 1111; Prandota J.: Clinical pharmacology of antibiotics and other drugs in cystic fibrosis. Drugs 1988, 35, 542; Prandota J.: Unusual distribution, pharmacokinetics, and metabolism of some drugs and their implications to pharmacotherapy. Am. J. Ther., 2000, 7, 332-340); Prandota J., Smith I.J., Hilman B.C., Wilson J.T.: Diuretic effect

-
- and disposition of furosemide in cystic fibrosis. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 1991, 40, 333-341);
- 4) ustalenie, że eliminacyjnego okresu półtrwania niektórych leków nie można oznaczać po podaniu pojedynczej dawki, lecz dopiero w stanie stałego stężenia leku w surowicy (praca opublikowana jako Special Article: Prandota J., Smith I.J., Wilson J.T.: Dosage regimen of cimetidine reviewed. Possible drug accumulation after multiple oral doses. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 1988, 34, 539-542);
 - 5) wprowadzenie do terapii pediatrycznej kwasu ϵ -aminokapronowego (EACA), który podawany równocześnie z prednizonem wywiera działanie oszczędzające endogenne glikokortykosteroidy u chorych z zespołem nerczycowym i zespołem Schönleina-Henocha; ustalenie mechanizmu działania EACA, dawkowania, sposobu i czasu podawania, oraz objawów ubocznych (Prandota J., Panków-Prandota L., Kotecki L., Rotter A.: Plasma proteinase inhibitor activity and hemostasis tests in children with nephrotic syndrome. Effect of prednisone alone and prednisone plus-E-aminocaproic acid treatment regimens: a preliminary report. *Am. J. Ther.*, 2001, 8, 97-107; Prandota J., Panków-Prandota L., Kotecki L.: Impaired activation of the fibrinolytic system in children with Henoch-Schonlein purpura. Beneficial effect of hydrocortisone plus -E-aminocaproic acid therapy on disappearance rate of cutaneous vasculitis and fibrinolysis. *Am. J. Ther.*, 2001, 8, 11-20);
 - 6) wyjaśnienie ważnej roli zakażeń wirusowych hamujących procesy metaboliczne w organizmie w patomechanizmie ujawnienia i wystąpienia autoimmunologicznego zapalenia wątroby, idiopatycznego zespołu Reye'a, zespołu Stevensa-Johnsona, oraz objawów zatrucia nawet po terapeutycznych dawkach acetaminofenu u osób predysponowanych genetycznie (Prandota J.: Viral infections and resulting inhibition of xenobiotic metabolizing enzymes as the possible cause of autoimmune hepatitis in a genetically predisposed person persistently exposed to harmful environmental factor(s). *Autoimmunity*, 2001, 34, 155-156; Prandota J.: Important role of prodromal viral infections responsible for inhibition of xenobiotic metabolizing enzymes in the pathomechanism of idiopathic Reye's syndrome, Stevens-Johnson syndrome, autoimmune hepatitis, and hepatotoxicity of the

therapeutic doses of acetaminophen used in genetically predisposed persons. *Am. J. Ther.*, 2002, 9, 149-156);

- 7) wyjaśnienie mechanizmu działania rozszerzającego oskrzela I przeciwzapalnego znanego leku moczopędnego furosemidu udziałem glikokortykosteroidów (Prandota J.: Extrarenal effects of furosemide on distribution of salt and water. An indirect mechanism of the drug's action? *Int. Urol. Nephrol.*, 1977, 9, 347-352; Prandota J.: Furosemide: progress in understanding its diuretic, anti-inflammatory, and bronchodilating mechanism of action, and use in the treatment of respiratory tract diseases. *Am. J. Ther.*, 2002, 9, 317-328; Prandota J.: Clinical pharmacology of furosemide in children: a supplement. *Am. J. Ther.*, 2001, 8, 275-289); Prandota J., Pruitt A.W.: Pharmacokinetic, biliary excretion and metabolic studies of ¹⁴C-furosemide in the rat. *Xenobiotica*, 1991, 21, 725-736;
- 8) ustalenie przypuszczalnego patomechanizmu autoimmunologicznego zapalenia wątroby (Prandota J.: Possible patomechanism of autoimmune hepatitis. *Am. J. Ther.*, 2003, 10, 51-57; Prandota J., Stolarczyk J.: Autoimmune hepatitis associated with the odour of fish food proteins: a causal relationship or just a mere association? *Allergol. Immunopathol.*, 2002, 30, 331-337; *ibid.* 2003, 31, 56);
- 9) udokumentowanie naukowe, że w okresie dojrzewania zarówno opadnięcie poprzecznicy powoduje bóle brzucha i nawracające przewlekłe zaparcia, podobnie jak opadanie nerki, które może także być przyczyną bólów brzucha i wystąpienia nadciśnienia tętniczego (Prandota J., Iwanczak F, Pytrus T. Changes of the position and length of the transverse colon causing abdominal pain and chronic constipation during adolescence. *Polski Merkurusz Lekarski*, 2003, 85, 47-50; Prandota J., Ostrowska-Skóra J.: Normal limits for renal mobility in children. *Int. J. Ped. Nephrol.*, 1984, 5, 171-174); Prandota J., Sidor D.: Urographic percentile charts for vertical kidney mobility in childhood. *Int. Urol. Nephrol.*, 1996, 28, 1-9);
- 10) wyjaśnienie patomechanizmu ujawnienia się skrycie przebiegających chorób układu moczowego (m.in. zespołu nerczycowego) po szczepieniu DTP u niektórych genetycznie predysponowanych dzieci (Prandota J.: Urinary tract diseases

revealed after DTP vaccination in infants and young children. Cytokine irregularities and down-regulation of cytochrome P-450 enzymes induced by the vaccine may uncover latent diseases in genetically predisposed subjects. *Am. J. Ther.*, 2004, 11, 344-353);

- 11) udokumentowanie, że nieregularności cytokin, polimorfizm genetyczny enzymów/cytokin metabolizujących leki i zmniejszenie metabolizmu leków podczas infekcji/stanów zapalnych mogą mieć znamienny udział w wystąpieniu zapalenia wątroby spowodowanego przez leki (Prandota J.: Important role of proinflammatory cytokines/other endogenous substances in drug-induced hepatotoxicity: depression of drug metabolism during infections/inflammation states, and genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes/cytokines may markedly contribute to this pathology. *Am. J. Ther.*, 2005, 12, 254-261);

- 12) wyjaśnienie szeregu patomechanizmów sprzyjających wystąpieniu śmierci łóżeczkowej niemowląt (SIDS, sudden infant death syndrome) wraz z wykryciem, że od dawna podejrzewany u tych dzieci uraz metaboliczny (wczesna faza cukrzycy typu 2) jest spowodowany niedoborem enzymu PEPCK (karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej) i wynikającymi stąd zaburzeniami procesów biochemicznych glukoneogenezy oraz gliceroneogenezy (Prandota J.: Possible pathomechanisms of sudden infant death syndrome: key role of chronic hypoxia, cytokine irregularities, and metabolic trauma in genetically predisposed subjects. *Am. J. Ther.*, 2004, 11, 517-546; Prandota J.: Limitations in the clinical usefulness of single-dose pharmacokinetic studies of drugs and a Bayesian approach for the estimation of kinetic parameters. *Am. J. Ther.*, 2004, 11, 295-301);

- 13) odkrycie, że potencjalną przyczyną wielu rodzajów bólów głowy manifestujących się także zespołami chorobowymi, jak idiopathic intracranial hypertension, pseudotumor cerebri oraz aseptic meningitis, może być infekcja ośrodkowego układu nerwowego spowodowana przez *Toxoplasma gondii*. Obowiązkowe badanie w tym kierunku i wykrycie pasożyta pozwoli na poprawę jakości życia wielu osób przyzwyczajonych do częstego zażywania leków objawowych zmniejszających towarzyszące temu dolegliwości, a także obniży koszty diagnostyki, leczenia i nieobecności w pracy,

ponieważ w USA na bóle głowy cierpi około 48 milionów ludzi (Prandota J.: Recurrent headache as the main symptom of acquired cerebral toxoplasmosis in non-human immunodeficiency virus-infected subjects with no lymphadenopathy. The parasite may be responsible for the neurogenic inflammation postulated as a cause of different types of headaches. *Am. J. Ther.*, 2007, 14, 63-105); Prandota J.: idiopathic intracranial hypertension may be caused by reactivation of latent cerebral toxoplasmosis. *Int. J. Neurosci.*, 2008.

- 14) wyjaśnienie, że przyczyną łagodnego nawracającego limfocytarnego aseptycznego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych opisanego po raz pierwszy w 1944 r. przez francuskiego neurologa Paula Mollaret, tzw. Mollaret meningitis [*Revue de Neurologie (Paris)*, 1944, 76, 57-76] jest reaktywacja latentnej postaci toksoplazmozy mózgowej, której najczęściej towarzyszy równoczesna reaktywacja latentnej formy infekcji wirusem opryszczki typu 2 ośrodkowego układu nerwowego tych chorych. Choroba manifestuje się głównie nawracającymi bólami głowy, przejściowymi zaburzeniami neurologicznymi, i zmianami w płynie mózgowo-rdzeniowym w postaci komórek jednojądrzastych. (Prandota J. Mollaret meningitis may be caused by reactivation of latent cerebral toxoplasmosis: *Int. J. Neurosci.*, 2008., w druku).