

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

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

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

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

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

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

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

INDEX COPERNICUS
INTERNATIONAL

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

WSZELKIE PRAWA ZASTRZEŻONE

KOMITET REDAKCYJNY

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

REDAKCJA

Redaktor naczelny: dr Bożena Karolewicz

Redaktor techniczny: Joanna Czarnecka

Korekta: Izabela Pranga

ADRES REDAKCJI

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

WYDAWCA

Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne

Dział Wydawnictw – Redaktor prowadzący: Hanna Plata

00-238 Warszawa, ul. Długa 16

tel./faks 22 635 84 43

tel. 22 831 02 41 w. 15

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

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

Adres dla autorów: redakcja@ptfarm.pl

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

ISSN 0014-8261

Skład i łamanie: Foxrabbitt Designers, www.foxrabbitt.pl

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

Nakład: 5000 egz.

Printed on acid-free paper.

Spis treści

- 591 PRACA ORYGINALNA · TERAPIA I LEKI** · Skuteczność leków biologicznych w opinii chorych na reumatoidalne zapalenie stawów i zeszywniające zapalenie stawów kręgosłupa
Katarzyna Najda, Ewa Jaźwińska-Tarnawska, Beata Tomasiewicz
- 597 DIAGNOSTYKA CHORÓB** · Wczesna diagnostyka chorób neurodegeneracyjnych uwarunkowanych przez czynniki środowiskowe o działaniu prooksydacyjnym
Józef Mizera, Anna Furgała, Maciej Gawlik
- 601 BADANIA KLINICZNE** · Inhibitory białka transportującego estry cholesterolu (CETP) w terapii zaburzeń lipidowych
Kamila Puchałowicz, Dariusz Chlubek, Violetta Dziedzicko
- 607 BOTANIKA FARMACEUTYCZNA** · Spirulina (*Arthrospira*) – badania nad działaniem leczniczym i jej właściwościami prozdrowotnymi
Barbara Jękot, Bożena Muszyńska, Tamara Mastalerz, Beata Piórecka
- 615 PRAKTYKA FARMACEUTYCZNA** · Recepty lekarskie – zasady wystawiania. Część 4
Janusz Jaroszyński, Zofia Specht-Szwoch

Farmacja po dyplomie

- 619 DIAGNOSTYKA CHORÓB** · Cyklooksygenaza – znaczenie w biotechnologii, medycynie i farmacji
Małgorzata Duda, Paweł Olczyk, Agnieszka Fenig, Katarzyna Komosińska-Vashev
- 629 TERAPIA I LEKI** · Mechanizmy działania nowych leków przeciwpadaczkowych
Arkadiusz Kazuła, Ewa Kazuła
- 651 LABORATORIA FARMACEUTYCZNE – WYPOSAŻENIE** · Parametry metrologiczne wag nieautomatycznych stosowanych w laboratoriach farmaceutycznych
Wojciech T. Chyla

Table of Contents

- 591 ORIGINAL ARTICLE · THERAPY AND DRUG** · The effectiveness of biological drugs in the opinion of patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis
Katarzyna Najda, Ewa Jaźwińska-Tarnawska, Beata Tomasiewicz
- 597 DIAGNOSIS OF DISEASES** · Early diagnostics of neurodegenerative diseases conditioned by environmental prooxidative factors
Józef Mizera, Anna Furgała, Maciej Gawlik
- 601 CLINICAL TRIALS** · Inhibitors of cholesterol esters transport proteins (CETP) in the treatment of lipid disorders
Kamila Puchałowicz, Dariusz Chlubek, Violetta Dziedzicko
- 607 PHARMACEUTICAL BOTANY** · Spirulina (*Arthrospira*) – research on the curative activity and its health benefits
Barbara Jękot, Bożena Muszyńska, Tamara Mastalerz, Beata Piórecka
- 615 PHARMACEUTICAL PRACTICE** · Issue of prescriptions – rules. Part 4
Janusz Jaroszyński, Zofia Specht-Szwoch

Postgraduate pharmacy

- 619 DIAGNOSIS OF DISEASES** · Cyclooxygenase – significance in the field of biotechnology, medicine and pharmacy
Małgorzata Duda, Paweł Olczyk, Agnieszka Fenig, Katarzyna Komosińska-Vashev
- 629 THERAPY AND DRUG** · Mechanisms action of novel antiepileptic drugs
Arkadiusz Kazuła, Ewa Kazuła
- 651 PHARMACEUTICAL LABORATORIES – EQUIPMENTS** · Metrological parameters of non-automatic balances used in pharmaceutical laboratories
Wojciech T. Chyla

Skuteczność leków biologicznych w opinii chorych na reumatoidalne zapalenie stawów i zesztywniające zapalenie stawów kręgosłupa

Katarzyna Najda, Ewa Jaźwińska-Tarnawska, Beata Tomasiewicz

Katedra i Zakład Farmakologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Adres do korespondencji: Katarzyna Najda, ul. Bierutowska 11, 51-317 Wrocław, e-mail: katarzyna.najda@o2.pl

Wstęp

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) oraz zesztywniające zapalenie stawów kręgosłupa (ZZSK) są chorobami przewlekłymi, które nieskutecznie leczone mogą prowadzić do niepełnosprawności oraz przedwczesnej śmierci. Przełomem w farmakoterapii tych jednostek chorobowych było wprowadzenie do leczenia leków biologicznych. Wielu chorych nie reaguje na standardową terapię lekami modyfikującymi przebieg choroby (LMPCh) oraz niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi (NLPZ) i dużą szansę na uzyskanie remisji choroby stanowi terapia biologiczna. Terapia ta nie jest leczeniem przyczynowym, preparaty, hamując proces zapalny, zapobiegają procesom destrukcyjnym tkanek oraz łagodzą objawy choroby, takie jak: ból czy sztywność stawów. Leki biologiczne stosowane w reumatologii to białka pozyskiwane dzięki technikom inżynierii genetycznej, które działają selektywnie na poszczególne etapy patogenezы chorób. Najczęściej mają budowę przeciwciał lub białek fuzyjnych, znacznie rzadziej cytokin lub ich receptorów. Ogólny mechanizm ich działania polega na bezpośredniej ingerencji w kaskadę zjawisk zachodzących w przebiegu stanu zapalnego. Leki biologiczne stosowane w RZS i ZZSK ze względu na mechanizm działania można podzielić na inhibitory czynnika martwicy nowotworów TNF- α (*tumor necrosis factor*), do których zalicza się m.in.: adalimumab, infliksymab, etanercept, oraz leki o innych mechanizmach działania (m.in.: rytuksymab, tocilizumab, abatacept) [1].

Reumatoidalne zapalenie stawów jest ogólnoustrojową chorobą tkanki łącznej o podłożu autoimmunologicznym. Schorzenie ma charakter przewlekły i charakteryzuje się występowaniem stanów zapalnych w obrębie stawów, tkanek

The effectiveness of biological drugs in the opinion of patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis

Rheumatoid arthritis (RA) and ankylosing spondylitis (AS) are chronic, autoimmune connective tissue diseases in which progressive inflammation leads to progressive joint destruction. Introduction of biologic disease modifying antirheumatic drugs (DMARDs) to the treatment of rheumatoid diseases was a major breakthrough. The aim of the study was analysis of efficacy of biological drugs based on assessment of patients' with RA and AS.

The study was performed in form of author's questionnaire. The patients were treated on an outpatient unit at the Department of Internal Medicine at the Military Clinical Hospital in Wrocław. The study group ($n = 76$) consisted of 42 women and 34 men.

Therapy as an effective rated 90% of respondents, 6% as an average effective, and 4% as ineffective. 73.68% of the respondents during biological therapy introduced beneficial modifications in the pharmacotherapy of pain and doses of glucocorticoids; 30% of patients completely discontinued painkillers.

Keywords: biological drugs, Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α) blockers, rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, rituximab.

© Farm Pol, 2014, 70(11): 591–596

okołostawowych oraz różnorodnych zmian narządowych. RZS prowadzi do zniekształcenia stawów, znacznego ograniczenia sprawności chorego, postępującego kalectwa, a w wielu wypadkach do przedwczesnej śmierci. Przebieg reumatoidalnego zapalenia stawów znacznie się różni u poszczególnych pacjentów pod względem: obrazu klinicznego, występowania powikłań narządowych, postępu zmian radiologicznych oraz odpowiedzi na stosowane leczenie [2]. Odkrycia ostatnich lat dotyczące patomechanizmu choroby pozwoliły na opracowanie leków biologicznych, które obecnie dają dużą szansę na uzyskanie remisji choroby u pacjentów,

u których syntetyczne LMPCh nie przyniosły zamierzonych efektów terapeutycznych. Poznanie cytokin biorących istotny udział w patogenezie RZS umożliwiło wyznaczenie nowych celów terapeutycznych. Komórkami odpowiedzialnymi za rozpoczęcie procesu zapalnego w RZS uznaje się obecnie limfocyty pomocnicze typu T CD4+. W stawach chorych na reumatoidalne zapalenie stawów tworzy się ekotopowa tkanka limfoidalna spowodowana obfitym naciekiem leukocytów. Stanowi ona miejsce toczącego się procesu autoimmunologicznego. Dobremu efektowi terapii lekami z grupy inhibitorów TNF- α towarzyszy zanik tkanki ekotopowej, co stanowi dowód, że jej powstawanie jest krytyczną składową w patomechanizmie choroby. Poznanie roli limfocytów w patogenezie RZS pozwoliło na opracowanie leków biologicznych (abatacept, rytuksymab), dla których stanowią komórki docelowe. Abatacept normalizuje czynność limfocytów T, imitując działanie cząsteczki CTLA-4 (*cytotoxic T cell antigen*), znajdującej się na jego powierzchni i mającej za zadanie zahamowanie ich aktywności. Rytuksymab osłabia natomiast działanie limfocytów B. Obecnie prowadzone są badania kliniczne nad zastosowaniem w leczeniu RZS belimumabu oraz ataciceptu – przeciwciał niwelujących aktywność czynników wzrostu limfocytów B [3].

Zeszytniające zapalenie stawów kręgosłupa

Zeszytniające zapalenie stawów kręgosłupa jest chorobą przewlekłą, przebiegającą przeważnie z postępującym procesem zapalnym obejmującym stawy krzyżowo-biodrowe, międzykręgowe, drobne stawy kręgosłupa oraz przyczepy ścięgna. Ponadto u wielu chorych zajęte są procesem chorobowym stawy obwodowe oraz występują objawy pozastawowe. Stan zapalny prowadzi do stopniowego usztywnienia stawów. ZZSK występuje trzykrotnie częściej u mężczyzn niż u kobiet, najczęściej dotyka mężczyzn przed 40. rokiem życia. Wyróżnia się 2 postacie choroby, które różnią się obrazem klinicznym oraz sposobem leczenia. W postaci osiowej przeważają objawy dotyczące kręgosłupa, związane z zajęciem stawów krzyżowo-biodrowych i międzykręgowych, natomiast postać obwodowa cechuje się głównie zapaleniem stawów kończyn dolnych oraz stawów krzyżowo-biodrowych [4].

Inhibitory TNF- α : etanercept, adalimumab, infliksymab

Do inhibitorów TNF- α mających zastosowanie w leczeniu zarówno reumatoidalnego zapalenia stawów, jak i zeszytniającego zapalenia stawów kręgosłupa należą m.in.: etanercept, adalimumab,

infliksymab, golimumab oraz certolizumab pegol, który dzięki pegylacji, czyli kowalentnemu połączeniu polimerów polietylenoglikolowych (PEG), ma wydłużony okres półtrwania, a zatem również aktywności farmakologicznej. Mechanizm działania tej grupy leków polega na kompetycyjnym hamowaniu łączenia się czynnika martwicy nowotworów z jego powierzchniowymi receptorami komórkowymi TNFR. W ten sposób zostaje zahamowane działanie TNF- α , który jest odpowiedzialny za przetrwały proces zapalny w przebiegu zarówno RZS, jak i ZZSK. Adalimumab, jak i infliksymab wiążą się zarówno z aktywną, jak i nieaktywną postacią TNF, niezwiązaną lub związaną z komórkami, wyjątek stanowi etanercept, który łączy się tylko z nieaktywną postacią endogennego czynnika martwicy nowotworów [5]. Pierwszym lekiem biologicznym, zarejestrowanym w 1998 r. przez FDA, do leczenia RZS o ciężkim przebiegu był etanercept. W 2000 r. po raz pierwszy opisano korzystny wpływ tej cząsteczki na przebieg ZZSK. Etanercept jest białkiem fuzyjnym złożonym z fragmentu Fc ludzkiej immunoglobuliny IgG1 oraz fragmentu receptora TNFR2 (p75). Lek jest podawany w postaci wstrzyknięć podskórnych raz w tygodniu. Skuteczność etanerceptu została potwierdzona w badaniach klinicznych, przewagę nad placebo udowodniło po raz pierwszy badanie przeprowadzone w 1997 r. przez Moreland i wsp. Czas, po którym obserwuje się wystąpienie efektu klinicznego po zastosowaniu etanerceptu różni się znacznie u poszczególnych pacjentów i może wynosić do 30 dni od podania pierwszej dawki [5, 6]. Adalimumab jest 100% ludzkim przeciwciałem monoklonalnym klasy IgG1, pozyskiwanym z komórek jajnika chomika chińskiego metodami inżynierii genetycznej. Skuteczność leku wykazano w licznych badaniach klinicznych. Udowodniono także pozytywny wpływ adalimumabu na przebieg choroby u pacjentów nieodpowiadających na leczenie pozostałymi inhibitorami TNF- α : etanerceptem lub infliksymabem. Ponadto zaobserwowano, iż zastosowanie leku u tych pacjentów nie wiązało się z większym ryzykiem wystąpienia poważnych infekcji [5, 7]. Infliksymab – to chimeryczne (tzn. w około 25% mysie) przeciwciało monoklonalne klasy IgG. Lek redukuje naciek komórek zapalnych w obrębie stawów, zmniejsza także poziom IL-6 (interleukiny 6) biorącej udział w patogenezie RZS. Infliksymab podaje się w formie infuzji dożylniej, bez konieczności premedykacji. W badaniach klinicznych u pacjentów z RZS wykazano lepszą skuteczność infliksymabu w skojarzeniu z metotreksatem w porównaniu do monoterapii, dlatego należy je stosować łącznie. Prawdopodobnie jest to związane z większym stężeniem leku biologicznego w surowicy w czasie równoczesnego zastosowania metotreksatu. Ponadto MTX

zmniejsza częstość powstawania autoprzeciwciał HACA (*human anti-chimeric antibodies*), które najczęściej, w porównaniu do innych inhibitorów TNF- α , występują przy podaniu infliksymabu (u ok. 15% wszystkich pacjentów). Zaobserwowano związek między powstawaniem przeciwciał przeciwko infliksymabowi a zjawiskiem wtórnego braku skuteczności leku [5, 8]. 10 września 2013 r. Komisja Europejska przyznała pozwolenie na dopuszczenie do obrotu w całej Unii Europejskiej leku biopodobnego Remsima (infliksymab). Jest to pierwszy lek biopodobny odwzorowujący tak dużą i skomplikowaną strukturę cząsteczki referencyjnego przeciwciała monoklonalnego. Analiza porównawcza produktu biopodobnego nie wykazała istotnych różnic w zakresie bezpieczeństwa oraz skuteczności, w porównaniu do innych leków biologicznych. Wprowadzenie na rynek farmaceutyczny produktów biopodobnych, mających zastosowanie w leczeniu chorób reumatycznych daje nadzieję, że programy lekowe z udziałem leków biologicznych staną się dostępne dla szerszej grupy pacjentów [9].

Inhibitor interleukiny 6 – tocilizumab

Jest to humanizowane (tzn. w około 5% mysie) przeciwciało monoklonalne, blokujące zarówno błonowy, jak i rozpuszczalny receptor interleukiny 6. IL-6 jest pleiotropową cytokiną prozapalną, która bierze istotny udział w zapoczątkowaniu autoimmunologicznego procesu zapalnego. Cytokina ta jest odpowiedzialna m.in. za aktywację limfocytów T, podtrzymanie przewlekłego procesu zapalnego, stymulację hematopoezy oraz proces różnicowania limfocytów T-pomocniczych do limfocytów Th17, które biorą istotny udział w patogenezie RZS. Lek w 2009 r. został zarejestrowany do leczenia ciężkiej postaci RZS niereagującej na terapię syntetycznymi LMPCh oraz inhibitorami TNF- α , natomiast nie potwierdzono jego skuteczności w terapii ZZSK. W badaniu RADIATE (*The Research on Actemra Determining Efficacy After Anti-TNF Failures Trial*) udowodniono skuteczność tocilizumabu u chorych niereagujących na terapię inhibitorami TNF- α [10].

Lek eliminujący limfocyty B – rytuksymab

Jest to chimeryczne przeciwciało monoklonalne zbudowane z ludzkich sekwencji stałych IgG1 oraz mysich sekwencji zmiennych, złożonych z łańcuchów lekkich i ciężkich. Rytuksymab jest zarejestrowany od 2006 r. do terapii RZS i jest lekiem biologicznym drugiego rzutu, dodawanym gdy schematy leczenia syntetycznymi LMPCh oraz inhibitorami TNF- α nie przynoszą efektów. Ponadto rytuksymab stosuje się w leczeniu chłoniaków

nieziarniczych oraz w przewlekłej białaczce limfocytowej, nie jest natomiast skuteczny w leczeniu ZZSK. Mechanizm działania leku polega na wiązaniu się z cząsteczką CD20 znajdującą się zarówno na powierzchni prawidłowych, jak i zmienionych nowotworowo limfocytów B. Antygen CD20 bierze udział w proliferacji, aktywacji oraz w procesie apoptozy limfocytów B. Połączenie się przeciwciała z antygenem CD20 skutkuje lizą komórek B. Lek prowadzi do prawie całkowitej deplecji limfocytów B, której szczyt przypada na 15 dzień od jego podania, natomiast od 16 tygodnia ilość limfocytów B stopniowo zaczyna wzrastać, a wraca do stanu sprzed podania leku po około 24 tygodniach. Okresowe zmniejszenie liczby limfocytów B we krwi obwodowej jest związane prawdopodobnie z cytotoksycznością leku zależną od kaskady dopełniacza oraz cytotoksycznością komórkową zależną od przeciwciała. Połączenie się leku z CD20 prowadzi także do śmierci limfocytów na drodze apoptozy. Udowodniono większą skuteczność rytuksymabu u pacjentów z seropozytywną postacią RZS w porównaniu do chorych, u których nie obserwuje się obecności czynnika RF oraz ACPA w surowicy [10, 11].

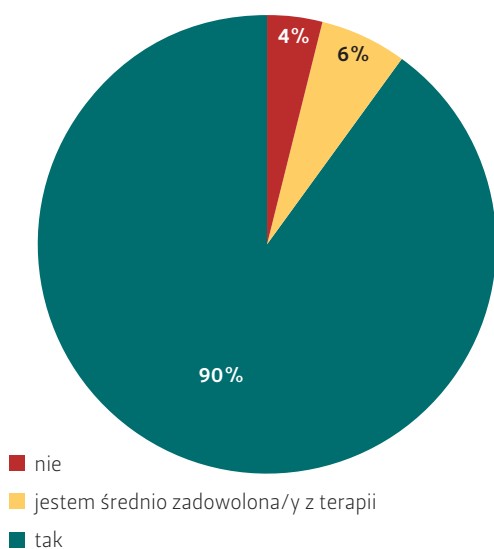
Terapia biologiczna RZS i ZZSK

W terapii RZS stosuje się wszystkie powyżej omówione leki biologiczne, natomiast w leczeniu ZZSK dotychczas skuteczne okazały się tylko inhibitory TNF- α . W Polsce leki te są podawane w ramach programów lekowych, do których kwalifikowani są chorzy spełniający ściśle określone kryteria zawarte w opisie danego programu. Leki biologiczne całkowicie zrewolucjonizowały dotychczasową farmakoterapię reumatoidalnego zapalenia stawów oraz zeszytniającego zapalenia stawów kręgosłupa. Najlepsze efekty obserwuje się u pacjentów, u których przebieg choroby jest agresywny. Około 1/3 osób reaguje na leczenie biologiczne bardzo dobrze, u kolejnej 1/3 pacjentów odpowiedź jest dobra, natomiast u pozostałych nie obserwuje się żadnej poprawy. Obecnie nie ma wystarczających informacji pozwalających przewidzieć, który z leków biologicznych wywoła najkorzystniejszy efekt u danego pacjenta. U chorych, u których inhibitor TNF- α nie przyniósł zamierzonego efektu, można zastosować lek biologiczny o innym mechanizmie działania. Liczne badania obserwacyjne potwierdzają korzyści płynące z takiej zamiany. U chorych z obecnymi w surowicy autoprzeciwciałami ACPA dobre efekty może dać terapia lekiem biologicznym eliminującym limfocyty B. Lek biologiczny w skojarzeniu z metotreksatem może zostać zastosowany także u chorych cierpiących na agresywną postać RZS, dotychczas nieleczonych klasycznymi LMPCh [12, 13].

Celem pracy była analiza subiektywnych ocen pacjentów z RZS i ZZSK dotyczących skuteczności terapii poszczególnymi lekami biologicznymi. W przeprowadzonym badaniu w formie ankiety oceniano m.in. wpływ terapii biologicznej na farmakoterapię bólu oraz stosowanie glikokortykosteroidów, których, ze względu na ich liczne działania niepożądane, czas przyjmowania powinien być jak najkrótszy, a dawki możliwie najmniejsze.

Grupa badana i metody

Badaniem objęto 76 osób, w wieku od 18 do 77 lat, w tym 41 kobiet oraz 35 mężczyzn z rozpoznaniem reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS) lub zeszytniającego zapalenia stawów kręgosłupa (ZZSK) leczonych w Klinice Chorób Wewnętrznych Wojskowego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu, od stycznia 2014 r. do kwietnia 2014 r. (7 ankiet zostało wypełnionych przez pacjentów drogą internetową). Badanie zostało przeprowadzone w formie anonimowego wywiadu ankietowego, dotyczącego występowania niepożądanych działań leków biologicznych oraz subiektywnej oceny skuteczności terapii, wśród pacjentów ze schorzeniami reumatycznymi (RZS i ZZSK) Kliniki Chorób Wewnętrznych Wojskowego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu. Na przeprowadzenie ankiety uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej UMED nr 156/2014 oraz Ordynatora Kliniki. Ankieta została przygotowana w Katedrze i Zakładzie Farmakologii Klinicznej w ramach działalności Studenckiego Koła Naukowego i przeprowadzona samodzielnie. Jedną z części kwestionariusza ankietowego zawierała pytania



Rycina 1. Zestawienie udzielanych odpowiedzi na pytanie: Czy w Pani/Pana ocenie terapia biologiczna choroby stawów przynosi zadowalające rezultaty?

dotyczące skuteczności terapii biologicznej, jej wpływu na występowanie zaostrzeń choroby stawów oraz farmakoterapię bólu i przyjmowanie glikokortykosteroidów (GKS).

Wyniki

Ocena skuteczności terapii w ocenie ankietowanych

W badanej grupie spośród 76 pacjentów na pytanie, czy w ich ocenie terapia biologiczna przynosi zadowalające rezultaty, zdecydowana większość, bo aż siedemdziesięciu ankietowanych (90%), odpowiedziało tak, pięciu (6%) udzieliło odpowiedzi, że są średnio zadowoleni z zastosowanego leczenia, natomiast 3 pacjentów (4%) udzieliło odpowiedzi negatywnej. Zestawienie udzielanych odpowiedzi przedstawia **rycina 1**.

Wpływ stosowania leków biologicznych na farmakoterapię bólu

Analiza danych dotyczących stosowania leków przeciwbólowych przyjmowanych przez pacjentów z RZS i ZZSK wykazała, że 56 ankietowanych (73,68%) w trakcie terapii biologicznej zmniejszyło dawki stosowanych leków, natomiast u 20 (26,32%) pacjentów terapia bólu nie uległa modyfikacji. Spośród ankietowanych, u których terapia biologiczna miała wpływ na farmakoterapię bólu, 33 (59%) pacjentów zaczęło stosować leki przeciwbólowe tylko sporadycznie – w razie wystąpienia bólu (wcześniej stosowali regularnie), 17 (30%) chorych odstawiło leki przeciwbólowe całkowicie, a 6 osób (11%) zmniejszyło dawki leków przeciwbólowych o około połowę, co przedstawia **tabela 1**. Otrzymane dane świadczą, iż zastosowanie leku biologicznego u większości ankietowanych łagodzi objawy bólowe związane z chorobą, a co za tym idzie – znacznie zmniejsza potrzebę stosowania leków przeciwbólowych. Przyczynia się to do poprawy jakości życia pacjentów nie tylko ze względu na brak lub złagodzenie bólu towarzyszącego chorobie, ale i do zmniejszenia liczby działań niepożądanych związanych ze stosowaniem leków przeciwbólowych.

Wpływ terapii biologicznej na stosowanie GKS

W badanej grupie (n=76) u 28 ankietowanych (37%) nigdy nie stosowano glikokortykosteroidów, a u 2 osób (3%) ze względu na występowanie działań niepożądanych przerwano terapię jeszcze przed decyzją o zastosowaniu leku biologicznego. U pozostałych ankietowanych (n=46) GKS zalecano przed wdrożeniem do farmakoterapii leku biologicznego. U 15 pacjentów terapia biologiczna pozwoliła na odstawienie GKS, u kolejnych 15 na zmniejszenie

dawki GKS o połowę, u 5 na zmniejszenie dawki GKS o około 3/4, natomiast u 11 pacjentów nie zmodyfikowano dawki.

Analizę wpływu terapii biologicznej na stosowanie GKS przedstawia **tabela 2**. Duży procent ankietowanych, u których nigdy nie stosowano GKS (37%) wynika z niewielkiego zlecenia tej grupy leków w ZZSK (stosuje się tylko miejscowo – dostawowo lub w leczeniu zmian ocznych). Analiza otrzymanych danych wykazała korzystny wpływ terapii biologicznej na wielkości dawek stosowanych GKS, gdyż tylko u 14% wszystkich ankietowanych nie zmniejszono ich dawki.

Brak skuteczności terapii

Obecnie ze względu na brak informacji o tym, który lek biologiczny będzie najskuteczniejszy i najbezpieczniejszy dla danego pacjenta, u części chorych nie uzyskuje się pozytywnej odpowiedzi na zastosowaną terapię. Zmiana leku na inny często przynosi korzystny efekt. W badanej grupie chorych u 5 ankietowanych, ze względu na obserwowany brak skuteczności stosowanej terapii lekami biologicznymi przez okres od 3 miesięcy do 1,5 roku, średnio po $8 \pm 5,40$ miesiącach zaprzestano leczenia danym lekiem biologicznym i wprowadzono kolejny.

Analizę przerwanych terapii z powodu braku skuteczności, z uwzględnieniem rodzaju leku biologicznego i czasu, po którym odstąpiono od leczenia, przedstawia **tabela 3**.

Utrata skuteczności

W trakcie terapii biologicznej może nastąpić utrata skuteczności przyjmowanego leku nawet po wielu latach stosowania. Jedną z przyczyn tego niepożądanego zjawiska może być pojawienie się przeciwciał przeciwko cząsteczkom leku (HACA). Aby zmniejszyć ryzyko utraty skuteczności, Europejska Liga do Walki z chorobami Reumatycznymi (EUCLAR) zaleca dołączanie do terapii metotreksatu, który m.in. zapobiega powstawaniu przeciwciał przeciwko cząsteczkom leku biologicznego. Pozostałe przyczyny nagłego pogorszenia objawów choroby podczas terapii biologicznej są dotychczas nieznane. U 9 (11,84%) ankietowanych w trakcie terapii biologicznej nastąpiła utrata skuteczności leczenia, w wyniku czego wprowadzono do farmakoterapii kolejny lek z tej grupy. Utrata skuteczności działania leku biologicznego następowała po 8 miesiącach do 10 lat stosowania, średnio po $3,7 \pm 3,4$ lat. Skuteczność kolejnego leku biologicznego wprowadzonego w miejsce odstawionego wszyscy pacjenci ocenili pozytywnie.

Analizę czasu podawania leku biologicznego, po którym nastąpiła utrata jego skuteczności farmakologicznej przedstawia **tabela 4**.

Tabela 1. Modyfikacja farmakoterapii bólu w trakcie stosowania leków biologicznych u chorych z RZS i ZZSK

Wpływ leku biologicznego na farmakoterapię bólu	Liczba pacjentów
Odstawienie leków przeciwbólowych całkowicie	17 (30%)
Stosowanie leków przeciwbólowych sporadycznie (w razie bólu)	33 (59%)
Zmniejszenie dawki leku przeciwbólowego o około połowę	6 (%)

Tabela 2. Wpływ leczenia biologicznego na stosowanie glikokortykosteroidów

Wpływ leczenia biologicznego na stosowanie GKS	Liczba pacjentów
Brak zmiany dawki GKS	11 (14%)
Odstawienie GKS całkowicie	15 (20%)
Zmniejszenie dawki GKS o około 3/4	5 (6%)
Zmniejszenie dawki GKS o około połowę	15 (20%)
Ankietowani, którzy nigdy nie stosowali GKS	28 (37%)
Ankietowani niestosujący GKS ze względu na ndl	2 (3%)

Tabela 3. Liczba przerwanych terapii biologicznych, z uwzględnieniem rodzaju leku biologicznego i czasu, po którym odstąpiono od leczenia z powodu braku skuteczności u chorych z RZS i ZZSK

Lek po którym nie nastąpiła poprawa	Czas, po którym przerwano leczenie (miesiące)
Certolizumab	4
Etanercept	18
Etanercept	9
Infliksymab	6
Infliksymab	3
$\bar{x}$ $\bar{x}$ czas, po którym przerwano leczenie	8
Odchylenie standardowe	5,40
Mediana	7

Tabela 4. Analiza przerwanych terapii biologicznych (z uwzględnieniem czasu stosowania i rodzaju leku) z powodu utraty skuteczności działania farmakologicznego u chorych z RZS i ZZSK

Lek, po którym obserwowano utratę skuteczności działania	Czas stosowania leku biologicznego, po którym nastąpiła utrata jego skuteczności (lata)
Etanercept	6
Etanercept	10
Etanercept	0,67 (8 miesięcy)
Etanercept	1,5
Etanercept	7
Etanercept	5
Etanercept	1
Adalimumab	1
Adalimumab	1,17 (14 miesięcy)
$\bar{x}$ $\bar{x}$ czas stosowania leku biologicznego, po którym nastąpiła utrata jego skuteczności	3,70
Odchylenie standardowe	3,40
Mediana	1,5

Omówienie

Zarówno w badaniach klinicznych, jak i po-
rejestracyjnych ocenę skuteczności terapii bio-
logicznych dokonywano za pomocą dobrze zdefinio-
wanych wskaźników aktywności choroby, takich
jak: DAS28 (*Disease Activity Score*) czy wskaźni-
ka odpowiedzi wg Amerykańskiego Kolegium Reu-
matologicznego ACR (*American College of Rheu-
matology Index*). Dzięki dobrze walidowanym
wskaźnikom choroby można dokładnie i rzetelnie
ocenić skuteczność leków biologicznych w scho-
rzeniach reumatycznych. Skuteczność leków bio-
logicznych została potwierdzona w badaniach
klinicznych oraz w licznych badaniach porejstra-
cyjnych [14]. W przedstawionej pracy skuteczność
leczenia RZS i ZZSK była oceniana przez pacjen-
tów, zatem nie można przyrównywać bezkrytycz-
nie wyników własnych do wyników prezentowa-
nych w innych badaniach dotyczących skuteczności
leków w ocenie personelu medycznego. W prezen-
towanej pracy poprawę przebiegu choroby na sku-
tek zastosowanego leczenia biologicznego rapor-
towała zdecydowana większość chorych (90%),
co pozwala pozytywnie ocenić odpowiedź na sto-
sowaną terapię. Tylko 4% stwierdziło, iż leczenie
jest nieskuteczne, być może było to spowodowa-
ne zbyt krótkim okresem stosowania leku do mo-
mentu przeprowadzania wywiadu ankietowego lub
obecnością przeciwciał przeciwko cząsteczkom leku
(HACA).

Wnioski

1. Leki biologiczne stosowane w terapii RZS i ZZSK
w ocenie pacjentów są skuteczne.
2. Zastosowanie leku biologicznego u chorych na
RZS i ZZSK znacznie zmniejsza potrzebę stoso-
wania środków przeciwbólowych.
3. Stosowanie leku biologicznego pozwala na całko-
wite odstawienie lub zmniejszenie dawek stoso-
wanych glikokortykosteroidów.

Podziękowania

Badanie zostało zrealizowane dzięki uprzejmo-
ści Ordynatora Oddziału pplk. lek. med. Wojciecha
Tańskiego z wymienionej wyżej Kliniki.

Otrzymano: 2014.09.04 · Zaakceptowano: 2014.09.26

Piśmiennictwo

1. Świerkot J., Madej M.: Zastosowanie leków biologicznych w tera-
pii reumatoidalnego zapalenia stawów ze szczególnym uwzględnie-
niem uzyskania remisji choroby. Część I. Inhibitory czynnika mar-
twicy nowotworów *α*. *Pol. Merk. Lek.* 2011, 30(178): 283–287.
2. Bobrowska-Snarska D., Brzosko M.: Reumatoidalne zapalenie sta-
wów. W: Samborski W., Brzosko M. *Reumatologia praktyczna*. Wol-
ters Kluwer Polska Sp. z o.o. Warszawa 2011: 115–128.
3. Kontny E.: Patogeneza reumatoidalnego zapalenia stawów. Część
I – odpowiedź nabyta, uwarunkowania genetyczne i środowiskowe.
Reumatologia. 2011, 49(1): 47–54.
4. Filipowicz-Sosnowska A.: Reumatoidalne zapalenie stawów W: Ga-
jewski P. *Interna Szczeklika*. Wyd 5. Kraków: Medycyna Praktyczna
2013: 1833–1846.
5. Bednarek A., Samborski W.: Leczenie biologiczne w reumatologii. W:
Adamski Z., Linke K., Samborski W. *Leczenie biologiczne w dermato-
logii, gastroenterologii i reumatologii*. Wyd I. Poznań: Termedia wy-
dawnictwa Medyczne 2010: 285–304.
6. Zhou H., Mayer P., Wajdula J., Fatenejad S.: Unaltered etaner-
cept pharmacokinetics with concurrent methotrexate in patients
with rheumatoid arthritis. *J Clin Pharmacol.* 2004, 44: 1235–1243.
7. Bombardieri S., Ruiz A., Fardellone P., Geusens P., McKenna F., Unnebrink
K., Oezler U., Kary S., Kupper H., Burmester G.: Effectiveness of adalimu-
mab for rheumatoid arthritis in patients with a history of TNF-antago-
nist therapy in clinical practice. *Oxford Journals* 2007, 48: 1191–1199.
8. Charakterystyka produktu leczniczego – Remicade 100 mg proszek
do sporządzania koncentratu do przygotowania roztworu do infuzji.
9. Baji P., Péntek M., Cziráj L., Szekanez Z., Nagy G., Gulácsi
L., Brodsky V.: Efficacy and safety of infliximab-biosimilar com-
pared to other biological drugs in rheumatoid arthritis: a mixed treat-
ment comparison. *Eur J Health Econ.* 2014, 15(1): 53–64.
10. Świerkot J., Madej M.: Zastosowanie leków biologicznych w terapii
reumatoidalnego zapalenia stawów ze szczególnym uwzględnieniem
uzyskania remisji choroby. Część II. Tocilizumab, abatacept, rytuk-
symab – leki o innych mechanizmach działania niż inhibitory TNF- α .
Pol. Merk. Lek. 2011, 30(178): 289–293.
11. Song H., Heldmann F., Rudwaleit M., Listing J., Appel H., Braun
J., Sieper J.: Different response to rituximab in tumor necrosis factor
blocker-naïve patients with active ankylosing spondylitis and in pa-
tients in whom tumor necrosis factor blockers have failed: a twenty-
four-week clinical trial. *Arthritis Rheum.* 2010, 62(5): 1290–1297.
12. Bijlsma J., Gajewski P., Tlustochowicz W.: Optymalne leczenie reu-
matoidalnego zapalenia stawów – zalecenia EULAR dla praktyki kli-
nicznej. *Medycyna Praktyczna*. 2010, 9: 35–49.
13. Pradeep D., Keat A., Gaffney K., Brooksby A., Leeder J., Harris C.:
Switching anti-TNF therapy in ankylosing spondylitis. *Rheumato-
logy* 2008, 47(11): 1726–1727.
14. Alonso-Ruiz A., Pijoan I., Ansuategui E., Urkaregi A., Calabozo
M., Quintana A.: Tumor necrosis factor alpha drugs in rheumatoid
arthritis: systematic review and metaanalysis of efficacy and safety.
BMC Musculoskelet Disord. 2008, 52(9): 2474–9.

Wczesna diagnostyka chorób neurodegeneracyjnych uwarunkowanych przez czynniki środowiskowe o działaniu prooksydacyjnym

Józef Mizera¹, Anna Furgała¹, Maciej Gawlik²

¹ Studenci kierunku Farmacja, Wydział Farmaceutyczny Uniwersytetu Jagiellońskiego, Collegium Medicum, Kraków

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

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

Wstęp

Choroby neurodegeneracyjne stanowią grupę chorób, których wspólną cechą jest patologiczny proces prowadzący do utraty komórek nerwowych na drodze apoptozy lub nekrozy. Do najważniejszych chorób tej grupy należą: choroba Alzheimera (AD), choroba Parkinsona (PD), stwardnienie rozsiane, stwardnienie zanikowe boczne i choroba Huntingtona. Dokładniejsze poznanie ich patomechanizmów, skuteczniejsza diagnostyka oraz leczenie są obecnie jednym z głównych wyzwań dla współczesnej medycyny. Mimo znacznych postępów, jakie dokonały się w tej dziedzinie, nadal nie potrafimy zatrzymać rosnącej skali tych chorób. W związku ze zjawiskiem starzenia się społeczeństw krajów zachodnich, liczba osób cierpiących z powodu choroby Alzheimera i Parkinsona będzie stale rosła, co jeszcze podnosi rangę problemu.

Obok przypadków uwarunkowanych genetycznie uwagę zwraca często obserwowane powiązanie zwiększonej zapadalności na choroby neurodegeneracyjne z narażeniem na czynniki występujące w środowisku zawodowym i bytowania człowieka. Wśród tych czynników wymienia się grupę substancji chemicznych o udowodnionym działaniu prooksydacyjnym. Efektem ich działania jest zaburzenie równowagi pro-/antyoksydacyjnej w żywej komórce, nasilony stres oksydacyjny i ostatecznie jej obumarcie.

W pracy przedstawiono możliwości zastosowania wybranych markerów biologicznych stresu oksydacyjnego jako wczesnych wskaźników zmian

Early diagnostics of neurodegenerative diseases conditioned by environmental prooxidative factors

The exacerbation of oxidative stress in neuronal cells is now regarded as one of the possible reasons in multifactor etiology of neurodegenerative diseases. Clear relationship between oxidative stress and neurodegeneration leads to the conclusion that a good marker of degenerative changes in the neurons should also well illustrate the intensity of oxidative processes in the brain. Highly developed analytical techniques allow to accurate measurements of the amount of oxidation products of both proteins, fatty acids and nucleic acids. Some of these compounds may be used as potential biomarkers of neurodegenerative diseases at early stage of its development.

Keywords: neurodegenerative diseases, Parkinson, Alzheimer, oxidative stress, biological markers, environmental factors.

© Farm Pol, 2014, 70(11): 597–600

neurodegeneracyjnych inicjowanych jonami manganu i żelaza.

Stres oksydacyjny i jego rola w chorobach neurodegeneracyjnych

Jednym z niewątpliwych czynników zaangażowanych w rozwój chorób neurodegeneracyjnych jest stres oksydacyjny. Możemy o nim mówić, gdy w komórkach organizmu przeważają procesy oksydacyjne nad antyoksydacyjnymi. Przyczyną tego stanu są reaktywne formy tlenu (RFT), czyli cząsteczki o wysokiej aktywności oksydacyjnej, powstające podczas niepełnej redukcji cząsteczki tlenu w łańcuchu oddechowym oraz wielu innych

reakcji biochemicznych zachodzących w komórce. Skutkiem działania RFT są uszkodzenia lipidów błon komórkowych, zmiany strukturalne i funkcjonalne białek enzymatycznych i nieenzymatycznych oraz zaburzenia w budowie DNA wywołujące poważne zmiany w funkcjonowaniu komórek. Przyczyną stresu oksydacyjnego może być nie tylko nadmierne wytwarzanie RFT, ale również spadek aktywności enzymów antyoksydacyjnych i/lub obniżenie poziomu czynników redukujących. Taka sytuacja zachodzi, kiedy czynników prooksydacyjnych, generowanych w komórce, jest bardzo dużo, a mechanizmy obronne w postaci enzymów zmiatających wolne rodniki i antyoksydanty nie są w stanie poradzić sobie z ich ilością. Narządem szczególnie podatnym na stres oksydacyjny jest mózg. Przyczyną tego jest znaczna ilość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w tkance nerwowej, intensywny metabolizm tlenowy oraz względnie niska aktywność enzymów antyoksydacyjnych (dysmutaza ponadtlenkowa, peroksydaza glutationowa, katalaza) [1, 2].

Mimo wielu lat badań, mechanizmy prowadzące do rozwoju chorób neurodegeneracyjnych wciąż nie są w pełni poznane, jednak wyraźny pozostaje udział stresu oksydacyjnego, jako jednego z wielu czynników w patogenezie procesu neurodegeneracji. Wciąż otwartym pozostaje pytanie, czy stres oksydacyjny jest przyczyną prowadzącą do zmian neurodegeneracyjnych, czy jednak tylko konsekwencją zmian w komórkach nerwowych [3, 4]. Prawdopodobna wydaje się teoria „błędnego koła”, gdzie nasilenie stresu oksydacyjnego indukuje patologiczne zmiany w neuronach, które następnie wzmagają procesy oksydacyjne [5]. Stres oksydacyjny może być również nasilany przez czynniki środowiskowe. Często podkreślany jest w tym przypadku udział metali przejściowych, takich jak mangan czy żelazo.

Mangan jest ważnym dla naszego organizmu pierwiastkiem, jednakże przewlekła ekspozycja na Mn prowadzi do bardzo poważnych zaburzeń pracy naszego organizmu, w tym do neurozwyrodnienia. Wśród prawdopodobnych przyczyn odpowiedzialnych za uszkodzenia wymienia się działanie prooksydacyjne tego metalu i generowanie stresu oksydacyjnego, dysfunkcję mitochondriów, a także zaburzenia metabolizmu glutaminianu i dopaminy [6]. W przypadku narażenia zawodowego wśród górników, hutników czy rolników posiadających ciągły kontakt z pestycydami zawierającymi ten pierwiastek występuje zwiększone ryzyko zespołu parkinsonowskiego [7]. Bardzo poważne i coraz częściej występujące są również przypadki zatrucia manganem wśród narkomanów. Wynika to z faktu zwiększającej się popularności efedronu – substancji bardzo podobnej w działaniu

do amfetaminy, otrzymywanej w wyniku utleniania nadmanganianem potasu efedryny lub pseudoefedryny. Przyjmowanie dożylnie tak samodzielnie przyrządzonego narkotyku, który nie został oczyszczony z resztek Mn, prowadzi bardzo często u tych osób do zatrucia [8].

Akumulacja żelaza w istocie czarnej może również sprzyjać rozwojowi choroby Parkinsona. Metal ten w reakcji Fentona w naszym organizmie prowadzi do powstawania dużej ilości czynnych oksydacyjnie cząsteczek. Kaskada zdarzeń rozpoczyna się od rozpadu dopaminy, podczas którego powstaje nadtlenek wodoru. Cząsteczka ta następnie w reakcji przy udziale jonów żelaza jest przekształcana do rodnika hydroksylowego reagującego też z samą dopaminą, w wyniku czego powstaje neurotoksyczna 6-hydroksydopamina [9]. O jej szkodliwości świadczy fakt, iż jest ona używana do indukowania objawów PD w modelach zwierzęcych [10].

Potencjalne biomarkery procesów neurodegeneracyjnych

Idealny marker zaburzeń biochemicznych powinien być specyficzny, skuteczny i powtarzalny. Nie powinien stwarzać zagrożenia w laboratorium analitycznym przy zapewnieniu jak najmniejszej inwazyjności pobrania materiału oraz przede wszystkim musi w miarę ilościowo obrazować zachodzące zmiany związane z rozwojem choroby lub leczeniem. Istotne jest również, aby wskazywał zmiany potencjalnie rozwijające się w chorobę zanim pojawią się jej pierwsze objawy kliniczne. W przypadku AD pojawienie się zmian w mózgu wyprzedza wystąpienie objawów choroby o 10-20 lat, co stwarza możliwość wykrycia choroby jeszcze w okresie przedobjawowym lub wczesnoobjawowym, zanim dojdzie to znaczących ubytków w sieci neuronalnej. Możliwość wczesnego wykrycia choroby pozwala wcześniej wdrożyć leczenie i/lub rehabilitację w celu spowolnienia progresji choroby. Wyraźny udział stresu oksydacyjnego w patogenezie neurodegeneracji sprawia, że dobry marker tych chorób powinien być powiązany z procesami oksydacyjnymi w mózgu, jak również dobrze oddawać ich natężenie [2, 11].

Neuroprostany

Izoprostany (IsoPs) i neuroprostany (NPs) są produktami nieenzymatycznych, wolnorodnikowych reakcji określonych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Izoprostany powstają z kwasu arachidonowego i mogą być wykorzystane jako skuteczne markery stresu oksydacyjnego oraz peroksydacji lipidów w organizmie. Strukturalne podobieństwo do prostaglandyn sprawia, że IsoPs również mają aktywność biologiczną, wykazując działanie na naczyń i wpływając na procesy zapalne [12, 13].

Lepszymi biomarkerami zmian neurodegeneracyjnych niż izoprostanyny wydają się być neuroprostanyny. Powstają one jako produkty peroksydacji kwasu dokozaheksaenowego (DHA). Kwas ten występuje w mózgu w szczególnie dużych ilościach, stanowiąc 25–35% wszystkich kwasów tłuszczowych w aminofosfolipidach istoty szarej mózgu [1]. Obecność aż sześciu wiązań podwójnych w DHA czyni go dość podatnym na procesy utleniania. Najważniejsza klasa NPs zawiera w swojej budowie pierścień prostanowy F. Oznacza się ją F4-NPs. Na słuszność zastosowania neuroprostanów jako biomarkerów wskazują liczne badania, które wykazały zwiększone stężenia neuroprostanów w mózgu i płynie mózgowo-rdzeniowym (CSF) osób chorujących na AD w stosunku do osób zdrowych [1, 2, 14, 15]. Również zwiększone ilości F4-NPs zaobserwowano u pacjentów chorych na PD (w porównaniu z grupą kontrolną) [3]. Do ilościowego i jakościowego oznaczania NPs stosuje się połączenie chromatografii gazowej lub cieczowej ze spektrometrią masową (GC/MS, LC/MS) oraz metody radioimmunologiczne (RIA) [1, 14]. Za najbardziej dokładne uważa się oznaczenie przy pomocy chromatografii gazowej i spektrometrii mas techniką ujemnej jonizacji chemicznej (GC-NICI-MS) [16]. Jednakże zastosowanie NPs w diagnostyce niesie ze sobą istotne ograniczenia. Materiałem do analizy NPs jest płyn mózgowo-rdzeniowy, którego samo pobranie stanowi oczywisty problem [17]. Innym ograniczeniem jest dość duży koszt aparatury oraz brak jednolitych standardów określających proces oznaczania NPs.

alfa-Synukleina

Już dawno zaobserwowano w mózgach osób chorych na PD obecność cytoplazmatycznych wtrętów, tzw. ciał Lewy'ego. Składają się one głównie z alfa-synukleiny (ASN) oraz ubikwityny i białek neurofilamentów. ASN jest fibrylarnym białkiem presynaptycznym neuronów w OUN, choć jej obecność stwierdzono również we krwi i CSF. Uczestniczy m.in. w biosyntezie, magazynowaniu, uwalnianiu i wychwycie zwrotnym DA. Jej fizjologiczną postacią jest monomer oraz tetramer. W przebiegu PD dochodzi do łączenia się ASN w oligomery i dalej w ciała Lewy'ego. Obecność ASN nie tylko w strukturach mózgu stwarza możliwość jej wykorzystania jako biologicznego markera choroby Parkinsona [18]. Badania przeprowadzone przy użyciu western blot, spektrometrii masowej, chromatografii ekskluzyjnej i nowej techniki Luminex wykazały obniżone stężenia alfa-synukleiny w płynie mózgowo-rdzeniowym osób chorych na PD w stosunku do osób zdrowych [19–22]. Nawet bardziej obiecujące wyniki udało się otrzymać innej grupie badaczy. Przy użyciu elektroforezy żelowej i immunoblotingu został oznaczony poziom ufosforylowanej ASN.

Ufosforylowana w pozycji Ser-129 alfa-synukleina jest jedną z postaci zagregowanej ASN. Jej poziom był z kolei wyższy u chorych niż w grupie kontrolnej. Badanym materiałem było osocze krwi, a nie CSF, co podnosi użyteczność metody [23]. Jednakże w żadnym przypadku oznaczania ASN nie wykazano korelacji ze stopniem zaawansowania choroby [19–21, 23]. Potencjalne zastosowanie w diagnostyce PD może mieć również oznaczanie poziomu przeciwciał przeciwko alfa-synukleinie. Przeprowadzone badanie wykazało istotne różnice w odpowiedzi immunologicznej między grupą chorych a grupą kontrolną. Wykazano również, że oznaczanie przeciwciał jest w stanie określić stopień progresji choroby, czego nie mogło potwierdzić oznaczenie samej ASN [24].

8-hydroksy-2'-deoksyguanozyna

Możliwą przydatność diagnostyczną wykazują również produkty oksydacji kwasów nukleinowych. Jednym z nich jest 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyna (8-OHdG), utleniona pochodna deoksyguanozyny. Liczne badania wykazały związek między procesem neurodegeneracji, a zwiększonym poziomem 8-OHdG. Tę zależność udało się potwierdzić zarówno w PD, jak i AD. U osób chorych na AD wzrost stężenia 8-OHdG zaobserwowano we krwi i CSF, a w przypadku PD również w moczu [1, 2, 5, 19, 21, 25, 26]. Co ciekawe, udało się powiązać poziom 8-OHdG ze stopniem progresji choroby Parkinsona [19, 26]. Na dokładne i stosunkowo proste i tanie oznaczenie 8-OHdG w moczu pozwala metoda będąca połączeniem elektroforezy kapilarnej i detekcji fluorescencji indukowanej laserem (CE-LIF) [27].

Podsumowanie

Wczesna i precyzyjna diagnostyka w zakresie chorób neurodegeneracyjnych wciąż stanowi wyzwanie dla współczesnej medycyny. Rozliczne badania w tej dziedzinie przyniosły obiecujące efekty, jednakże żaden z analizowanych biomarkerów nie uzyskał na tyle dobrych wyników, aby zostać uznanym jako standard w diagnostyce. Lepszym rozwiązaniem niż stosowanie pojedynczych markerów wydaje się użycie ich kombinacji. Pozwoliłoby to osiągnąć bardziej rzetelne rezultaty w prawidłowej ocenie stanu pacjenta.

Otrzymano: 2014.09.04 · Zaakceptowano: 2014.09.23

Piśmiennictwo

1. Mangialasche F., Polidori M.C., Monastero R., Ercolani S., Camarda C., Cecchetti R., Mecocci P.: Biomarkers of oxidative and nitrosative damage in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Ageing Res. Rev.* 2009, 8: 285–305.

2. Gutowicz M.: Wpływ reaktywnych form tlenu na ośrodkowy układ nerwowy. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2011, 65: 104–113.
3. Seet R., Lee C.-Y., Lim E., Tan J., Quek A., Chong W.-L., Looi W.-F., Huang S.-H., Wang H., Chan Y.-H., Halliwell B.: Oxidative damage in Parkinson disease: Measurement using accurate biomarkers. *Free Rad. Biol. Med.* 2010, 48: 560–566.
4. Farooqui T., Farooqui A.: Lipid-mediated oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease. SAGE-Hindawi Access to Research. *Parkinson's Dis.* 2011, ID 247467, doi: 10.4061/2011/247467.
5. Zengi O., Karakas A., Ergun U., Senes M., Inan L., Yucel D.: Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine level and plasmiparaoxonase 1 activity with Alzheimer's disease. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2012, 50: 529–534.
6. Rybakowska I., Kaletha K., Sein Anand J.: Manganizm – choroba neurodegeneracyjna mózgu spowodowana zatruciem manganem. *Przegląd Lekarski*, 2012, 8: 555–556.
7. Benedetto A., Au C., Silva Avila D., Milatovic D., Aschner M.: Extracellular dopamine potentiates Mn-induced oxidative stress, lifespan reduction, and dopaminergic neurodegeneration in a BLI-3-dependent manner in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genetics*. 2010, 6: 1–18.
8. Myślicka D., Żuk M., Dziurkowski M.: Uzależnienie od efedronu – opis przypadku. *Psychiatria Polska*. 2011, 1: 79–85.
9. Bras J., Guerreiro R., Darwent L., Parkkinen L. et al.: Genetic analysis implicates APOE, SNCA and suggests lysosomal dysfunction in the etiology of dementia with Lewy bodies. *Hum. Mol. Genet.* 2014, doi: 10.1093/hmg/ddu334.
10. Grealish S., Mattsson B., Draxler P., Bjorklund A.: Characterisation of behavioral and neurodegenerative changes induced by intranigral 6-hydroxydopamine lesions in a mouse model of Parkinson's disease. *Eur. J. Neurosci.* 2010, 31: 2266–2278.
11. Zboch M., Leszek J.: Znaczenie biologicznych markerów we wczesnej diagnostyce choroby Alzheimera. *Psychogeriatrya Polska*. 2010, 7: 29–37.
12. Porta A., Pasi M., Brunoldi E., Zanoni G., Vidari G.: Biology and chemistry of neuroprostanes. First total synthesis of 17-A₄-NeuroP: Validation of a convergent strategy to a number of cyclopentenone neuroprostanes. *Chem. Phys. Lipids*. 2013, 174: 64–74.
13. Wachowicz B., Kulifer A., Olas B.: Właściwości biologiczne izoprostanów. *Kosmos. Problemy nauk biologicznych*. 2011, 60: 33–42.
14. <http://bioinfo.mol.uj.edu.pl/articles/Oszmiana08> (stan z dnia 15.07.2014).
15. Miller E., Morel A., Saso L., Saluk J.: Isoprostanes and neuroprostanes as biomarkers of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Oxid. Med. Cell. Long.* 2014, doi: 10.1155/2014/572491.
16. Hsiu-Chuan Y., Hsing-JuWei, Ting-Wei C.: Analytical variables affecting analysis of f2-isoprostanes and F4-neuroprostanes in human cerebrospinal fluid by gas chromatography/mass spectrometry. *BioMed Res. Inter.* 2013, doi.org/10.1155/2013/810915.
17. Hsiu-Chuan Y.: Detection of F2-isoprostanes and F4-neuroprostanes in Clinical Studies. *J. Biomed. Lab. Sci.* 2010, 22: 1–11.
18. Szejder-Pacholek A., Joniec-Maciejak I., Wawer A., Członkowski A., Mirowska-Guzel D.: α -Synukleina – nowe spojrzenie na znane białko. Możliwości wykorzystania w diagnostyce i terapii choroby Parkinsona. *Farmakoterapia w Psychiatrii i Neurologii*. 2013, 3–4: 151–157.
19. Gerlach M., Maetzler W., Broich K. et al.: Biomarker candidates of neurodegeneration in Parkinson's disease for the evaluation of disease-modifying therapeutics. *J. Neural. Transm.* 2012, 119: 39–52.
20. Hong Z., Shi M., Chung K.A. et al.: DJ-1 and α -synuclein in human cerebrospinal fluid as biomarkers of Parkinson's disease. *Brain*. 2010, 133: 713–726.
21. Waragai M., Sekiyama K., Sekigawa A., Takamatsu Y., Fujita M., Hashimoto M.: α -Synuclein and DJ-1 as potential biological fluid biomarkers for Parkinson's disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2010, 11: 4257–4266.
22. Parnetti L., Farotti L., Eusebi P. et al.: Differential role of CSF α -synuclein species, tau, and A β 42 in Parkinson's disease. *Front. Aging Neurosci.* 2014, 6: 1–8.
23. Foulds P.G., Mitchell J.D., Parker A. et al.: Phosphorylated α -synuclein can be detected in blood plasma and is potentially a useful biomarker for Parkinson's disease. *FASEB J.* 2011, 25: 4127–4137.
24. Yanamandra K., Gruden M.A., Casate V., Meskys R., Forsgren L., Morozova-Roche L.A.: α -Synuclein reactive antibodies as diagnostic biomarkers in blood sera of Parkinson's disease patients. *PLoS One*. 2011, 6: e18513.
25. Sultana R., Cenini G., Butterfield A.: Biomarkers of oxidative stress in neurodegenerative diseases w Molecular Basis of Oxidative Stress: Chemistry, Mechanisms and Disease Pathogenesis, Frederick A. Villalena Ed. 2013 John Wiley & Sons, Inc. 359–376.
26. Saracchi E., Ferri S., Brighina L.: Emerging candidate biomarkers for Parkinson's disease: a Review. *Aging and disease*. 2014, 5: 27–34.
27. Zhang C., Nestorova G., Rissman R. A., Feng J.: Detection and quantification of 8-Hydroxy-2-Deoxyguanosine in Alzheimer's transgenic mouse urine using capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 2013, 34: 2268–2274.

Inhibitory białka transportującego estry cholesterolu (CETP) w terapii zaburzeń lipidowych

Kamila Puchałowicz, Dariusz Chlubek, Violetta Dziedzicko

Katedra Biochemii i Chemii Medycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie

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

Wstęp

Powszechnie wiadomo, że choroby sercowo-naczyniowe (ChSN) są główną przyczyną zgonów w Polsce i na świecie [1, 2]. Wśród nich możemy wymienić chorobę wieńcową, niedokrwienność mózgu oraz chorobę tętnic obwodowych. Niosą one ze sobą wysokie koszty opieki zdrowotnej. Czynniki zaangażowane w rozwój ChSN możemy podzielić na niemodyfikowalne (wiek i płeć męska) oraz dużą grupę czynników modyfikowalnych, takich jak: palenie tytoniu, brak aktywności fizycznej, nawyki żywieniowe, podwyższone ciśnienie tętnicze, cukrzyca typu 2 i dyslipidemia [3]. Dyslipidemia jest stanem przebiegającym z nieprawidłowym stężeniem lub składem jednej lub więcej frakcji lipoprotein (w surowicy na czczo). W praktyce klinicznej dyslipidemia klasyfikuje się na podstawie wyników badań laboratoryjnych:

- hipercholesterolemia – stężenie cholesterolu całkowitego TC (*total cholesterol*) $\geq 5,0$ mmol/l ($\geq 190,0$ mg/dl) i (lub) stężenie cholesterolu LDL (LDL-C) $\geq 3,0$ mmol/l ($\geq 115,0$ mg/dl);
- hipertrójglicerydemia – stężenie trójglicerydów (TG) $\geq 1,7$ mmol/l (150,0 mg/dl);
- niskie stężenie cholesterolu HDL (HDL-C) – stężenie HDL-C $< 1,0$ mmol/l ($< 40,0$ mg/dl) u mężczyzn i $< 1,2$ mmol/l ($< 45,0$ mg/dl) u kobiet;
- hiperlipidemia mieszana [4].

Hipercholesterolemia oraz obniżone stężenie HDL-C są istotnymi czynnikami ryzyka ChSN, hipertrójglicerydemia w mniejszym stopniu [4]. Hipercholesterolemia jest aktualnie jednym z głównych celów leczenia pacjentów z ChSN lub o zwiększonym ryzyku ich wystąpienia. Wynika to z faktu, że może być modyfikowana poprzez

Inhibitors of cholesteryl esters transport proteins (CETP) in the treatment of lipid disorders

Increased level of LDL-cholesterol and decreased level of HDL-cholesterol are important risk factor of cardiovascular diseases. Basic drugs used in these disorders are hypolipemic drugs, mainly statines and fibrates. Unfortunately, in some patients these drugs are ineffective even with using low fat diet and additionally, they may cause adverse effects. Researches are carried out to find of active substances which can increase plasma concentration of HDL-cholesterol. Such drugs are inhibitors of cholesteryl esters transport proteins (CETP): torcetrapib, dalcetrapib, anacetrapib and evacetrapib. Investigations on the torcetrapib and dalcetrapib must be suspended because of increased mortality in case of the first one and inefficiency of the second. Current results of clinical investigations on the anacetrapib and evacetrapib give a lot of hope for reaching of new anti-atherogenic drugs.

Keywords: cardiovascular disease, CETP, clinical trials, dyslipidemias, HDL cholesterol.

© Farm Pol, 2014, 70(11): 601–606

zmianę stylu życia i farmakoterapię. Ogólnie wiadomo, że obniżenie stężenia cholesterolu całkowitego oraz cholesterolu LDL może zapobiegać chorobom sercowo-naczyniowym [3]. Natomiast nie jest pewny związek między wzrostem stężenia HDL-C a redukcją ryzyka ChSN, ponieważ dotychczasowe prace dostarczają sprzecznych wyników badań [5]. Metaanaliza regresyjna oparta o dostępne wyniki badań (12 randomizowanych badań kontrolnych) z użyciem fibratów, niacyny i inhibitorów CETP wskazuje na brak istnienia związku między wzrostem stężenia HDL-C a zmniejszeniem częstości powikłań sercowo-naczyniowych [6]. Prawdopodobnie istotne znaczenie dla zahamowania

rozwoju miażdżycy ma funkcjonalność HDL, rozumiana jako zdolność do zwrotnego transportu cholesterolu z komórek piankowatych, niezależnie od stężenia HDL-C [7]. Należy uwzględnić również inne właściwości HDL, jak: działanie antyoksydacyjne, przeciwzapalne, przeciwzakrzepowe, wazorelaksacyjne i antyapoptotyczne (w stosunku do komórek śródbłonna naczyń i kardiomiocytów), które mogą być odpowiedzialne za jego potencjał antyaterogenny. Od niedawna wiadomo, że funkcje cząstki HDL mogą ulec zmianie w zależności od sytuacji klinicznej [5]. Aktualne wytyczne dotyczące postępowania w dyslipidemiach podkreślają jednak rolę niskiego stężenia HDL-C jako czynnika ryzyka ChSN [3].

W terapii pacjentów z hipercholesterolemią stosuje się leczenie nefarmakologiczne (zmiana diety, zwiększenie aktywności fizycznej, zmniejszenie masy ciała, abstynencja tytoniowa) oraz farmakologiczne, obejmujące kilka grup leków. Wśród nich możemy wymienić inhibitory reduktazy HMG CoA (3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzym A), czyli statyny będące lekami pierwszego wyboru oraz żywice jonowymiennne, selektywne inhibitory wchłaniania cholesterolu (ezetymib), fibraty i kwas nikotynowy. Stosowanie wielu z nich wiąże się z występowaniem działań niepożądanych (kwas nikotynowy) lub niską skutecznością (ezetymib) [4]. Również w grupie pacjentów przyjmujących statyny zdarzają się przypadki nietolerancji tej grupy leków (występowanie miopatii oraz wzrost aktywności enzymów wątrobowych) lub słabej odpowiedzi na leczenie (hipercholesterolemia rodzinna). Należy wziąć też pod uwagę fakt, że pacjenci z hipercholesterolemią cierpią często na szereg chorób towarzyszących, które wymagają dodatkowej farmakoterapii i uzyskania rygorystycznych wyników parametrów lipidowych.

Uzasadnia to potrzebę tworzenia nowych leków dla pacjentów z dyslipidemią w celu uzyskania jak najkorzystniejszych wyników badań lipidowych oraz zmniejszenia ryzyka ChSN. Jedną z badanych, obiecujących grup leków są inhibitory białka transportującego estry cholesterolu (CETP): torcetrapib, dalcetrapib, anacetrapib i evacetrapib. Celem tej pracy jest przybliżenie dotychczasowych informacji na temat tej nowej grupy leków i perspektyw z nimi związanych.

CETP (białko transportujące estry cholesterolu)

CETP jest osoczymym białkiem związanym z frakcją HDL-C, głównie HDL₃, które odpowiada za transport estrów cholesterolu, trójglicerydów

i w mniejszym stopniu fosfolipidów między lipoproteinami osocza. Białko to zmienia metabolizm lipoprotein i wpływa na ich skład oraz ilość.

Większość estrów cholesterolu osocza pochodzi z HDL i są one produktem aktywności LCAT (acylotransferaza lecytyna:cholesterol) [8]. CETP może transportować estry cholesterolu z HDL₃ do lipoprotein zawierających apoB (VLDL i LDL), czemu towarzyszy przenoszenie trójglicerydów w kierunku przeciwnym (transport heterotypowy). Efektem tego jest powstanie bogatych w estry cholesterolu VLDL i LDL oraz wzbogaconych w trójglicerydy HDL₂. Transport estrów cholesterolu może zachodzić również pomiędzy subfrakcjami HDL (HDL₃, HDL₂ i pre-β HDL) (transport homotypowy). Estry cholesterolu są transportowane do wątroby głównie przez VLDL i LDL (pośredni zwrotny transport cholesterolu), a także przez HDL₂ (zwrotny transport cholesterolu z tkanek obwodowych) [9].

U zwierząt nieposiadających CETP obserwowano bardzo wysokie stężenia HDL-C i niskie LDL-C, natomiast w przypadku królików o naturalnie wysokiej aktywności tego białka stwierdzono wysokie stężenia LDL-C i niskie HDL-C oraz predyspozycje do miażdżycy. Badania na zwierzętach sugerują proaterogenną rolę tego białka. Stwierdzono również, że niektóre mutacje genu *CETP* są przyczyną niedoboru białka CETP u ludzi. Zależnie od występującego genotypu obserwowano różnego stopnia wzrost stężenia HDL-C (obecność większych, mniej gęstych HDL₂ bogatych w estry cholesterolu i apoE) związany z obniżeniem szybkości katabolizmu tych lipoprotein oraz spadek stężenia LDL-C i apoB. Indukowany wzrost stężenia HDL-C (>60,0 mg/dl) był prawdopodobnie odpowiedzialny za spadek ryzyka ChSN [8]. Metaanaliza obejmująca 92 badania epidemiologiczne potwierdziła, że występowanie genotypu obniżającego aktywność białka CETP (nieznacznie zwiększone stężenie HDL-C) wiąże się ze zmniejszonym ryzykiem ChSN [10]. Również w badaniu kohortowym na grupie 18 245 zdrowych kobiet stwierdzono związek pomiędzy występowaniem jednonukleotydowych polimorfizmów (SNP-ów) genu *CETP* a wzrostem stężenia HDL-C i/lub zmniejszeniem ryzyka wystąpienia zawału serca [11].

Protektoryjne, antyaterogenne działanie HDL-C jest tłumaczone jego właściwościami antyoksydacyjnymi i przeciwzapalnymi, a nie indukcją zwrotnego transportu cholesterolu [8]. W związku z tym inhibitory białka CETP stanowią atrakcyjną alternatywę dla dotychczasowych badań nad lekami, których efektem ma być wzrost stężenia HDL-C i/lub spadek LDL-C w surowicy pacjentów z dyslipidemią oraz zmniejszenie ryzyka rozwoju miażdżycy i ChSN.

Inhibitory CETP

Pojawienie się w drugiej połowie XX w. prac wskazujących na odwrotną zależność między stężeniem HDL-C a ryzykiem ChSN przyczyniło się do rozwoju nowych metod terapii dyslipidemii [12, 13]. W oparciu o tę hipotezę powstały takie leki, jak: fibraty oraz kwas nikotynowy, które korzystnie wpływają na zmiany miażdżycowe, jednak obarczone są licznymi działaniami niepożądanymi [7]. W toku dalszych prac nad nowymi lekami zwiększającymi stężenie HDL-C wykorzystano opisane powyżej właściwości białka CETP oraz dane doświadczalne i stworzono syntetyczne modulatory/inhibitory tego białka.

Badania prowadzone z użyciem inhibitorów CETP potwierdziły, że hamowanie aktywności CETP prowadzi do wzrostu osoczowego stężenia HDL-C. W porównaniu do badań dotyczących wpływu mutacji/polimorfizmów genu *CETP* indukowany przez inhibitory wzrost stężenia HDL-C prowadzi do nasilenia obrotu cząstek HDL i zwrotnego transportu cholesterolu z makrofagów zmienionych miażdżycowo tętnic do wątroby, gdzie jest usuwany wraz z żółcią [9]. Niektóre inhibitory CETP wpływają tylko na transport heterotypowy estrów cholesterolu (dalcetrapib), a inne na oba typy transportu (torcetrapib, anacetrapib i evacetrapib) [7]. Sugeruje się, że dynamika zwrotnego transportu cholesterolu jest istotniejsza dla uzyskania efektu antyaterogennego niż samo stężenie HDL-C w krążeniu, którego wysokie wartości mogą być wręcz niekorzystne [9]. Dotychczas prowadzono badania kliniczne nad 4 inhibitorami CETP: torcetrapibem, dalcetrapibem, anacetrapibem oraz evacetrapibem.

Torcetrapib

Torcetrapib jest pochodną 3,5-bis(trifluorometylo)fenylową i całkowitym inhibitorem CETP [9]. Wiąże się z tym białkiem, uniemożliwiając tworzenie jego funkcjonalnego kompleksu z cząstką HDL. Prowadzi to do zahamowania hetero- i homotypowego transportu estrów cholesterolu [7]. Tall i wsp. stwierdzili, że torcetrapib w warunkach *in vitro* zwiększa wpływ cholesterolu z pochodzących z makrofagów komórek piankowatych proporcjonalnie do wzrostu stężenia HDL-C w osoczu, czemu towarzyszy gromadzenie bogatych w apoE oraz LCAT cząstek HDL₂ [14]. Inne badania prowadzone w warunkach *in vitro* wskazują, że w zależności od dawki, torcetrapib hamuje tworzenie pre-β HDL, które są istotne dla pobierania cholesterolu z tkanek obwodowych i jego zwrotnego transportu [15].

Torcetrapib był pierwszym badanym inhibitorem CETP. Ocenę jego wpływu na miażdżycę wykonano w trzech badaniach klinicznych: ILLUSTRATE

[16], RADIANCE 1 [17] i 2 [18]. Stwierdzono w nich wzrost stężenia HDL-C (o ok. 60%) i spadek LDL-C (o ok. 20%), ale nie obserwowano korzystnego wpływu na zmiany miażdżycowe w tętnicach wieńcowych oraz grubość kompleksu błona wewnętrzna-błona środkowa tętnic szyjnych wspólnych.

W badaniu ILLUMINATE (III faza badań klinicznych) obserwowano, że mimo korzystnego wpływu na stężenie lipidów (wzrost HDL-C o 72% i spadek LDL-C o 25%), w grupie przyjmującej torcetrapib wystąpił wzrost ciśnienia tętniczego krwi o 5,4 mm Hg oraz częstości zdarzeń sercowo-naczyniowych (o 25%) i zgonów z przyczyn sercowo-naczyniowych (o 40%) [19]. III faza badań nad torcetrapibem została przerwana w 2006 r. w związku ze zwiększoną śmiertelnością w grupie przyjmującej ten lek. Badania RADIANCE i ILLUMINATE wykazały związek między wzrostem ciśnienia tętniczego krwi a pogrubieniem ścian naczyń szyjnych, a także aktywacją układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAA) a ryzykiem śmierci. W późniejszym czasie potwierdzono, że pozostałe inhibitory CETP nie wywołują działań niepożądanych torcetrapibu w postaci aktywacji układu RAA (stymulowanie syntezy aldosteronu w komórkach kory nadnerczy) i zwiększania ciśnienia tętniczego krwi [9].

Dalcetrapib (JTT-705)

Dalcetrapib był pierwszą cząsteczką, w przypadku której stwierdzono wpływ na aktywność CETP i działanie przeciwmiażdżycowe w warunkach *in vivo*. Dalcetrapib jako jedyny z tej grupy leków jest pochodną benzentiolową, w związku z czym znacznie różni się od pozostałych pod względem budowy i mechanizmu działania [9]. Występuje w postaci proleku, który w organizmie jest hydrolizowany przez niespecyficzne esterazy oraz lipazy i przekształcany do farmakologicznie aktywnej formy tiolowej [7]. W porównaniu do pozostałych leków z tej grupy nie jest inhibitorem, ale modulatorem aktywności CETP. Jego działanie polega na indukcji zmian konformacyjnych w cząsteczce CETP poprzez tworzenie mostków dwusiarczkowych między formą tiolową dalcetrapibu a resztą cysteiny CETP (jest to prawdopodobnie proces odwracalny). W ten sposób hamuje transport heterotypowy estrów cholesterolu, ale nie homotypowy. Małe pre-β HDL ulegają przemianie w HDL₃, a te – w większe cząstki HDL₂. Wpływa to korzystnie na usuwanie estrów cholesterolu i zwrotny transport cholesterolu [9].

Badania nad skutecznością oraz bezpieczeństwem stosowania dalcetrapibu u ludzi (II i III faza badań klinicznych) były prowadzone w ramach programu dal-HEART. W badaniu dal-PLAQUE (faza IIb) trwającym 24 miesiące oceniono wpływ

leku na płytkę miażdżycową przy użyciu nieinwazyjnego obrazowania multimodalnego. W grupie przyjmującej dalcetrapib stwierdzono wzrost stężenia HDL-C (o 30,9%), a stężenia LDL-C i trójglicerydów nie uległy zmianie. Analiza metodą PET/CT z ^{18}F -fluorodeoksyglukozą nie wykazała różnic w nasileniu zapalenia w obrębie ścian tętnic pomiędzy grupami, ale w przypadku oceny ograniczonej do tętnic szyjnych stwierdzono redukcję zapalenia (o 7%) w grupie z dalcetrapibem. Zmiany ocenione w MRI w całkowitym polu naczynia również uległy redukcji w porównaniu do placebo. Po 24 miesiącach nie stwierdzono progresji płytki miażdżycowej [20]. W badaniu dal-VESSEL (faza IIb) trwającym 36 miesięcy oceniono wpływ leku na funkcję śródbłonna naczyń. Stwierdzono spadek aktywności CETP (o 56%), wzrost stężenia HDL-C (o 31%), ale nie LDL-C. Poza tym nie wykazano wpływu stosowania dalcetrapibu na zależną od tlenu azotu funkcję śródbłonna (ocena testem FMD, *flow-mediated dilation test*), ciśnienie tętnicze krwi, markery zapalenia, stresu oksydacyjnego i krzepnięcia [21].

Badanie dal-OUTCOMES (III faza badań klinicznych) oceniło skuteczność i bezpieczeństwo stosowania dalcetrapibu u pacjentów ze świeżo przebytym ostrym zespołem wieńcowym. Podobnie jak w badaniach II fazy, obserwowano wzrost stężenia HDL-C przy braku wpływu na LDL-C. Poza tym dalcetrapib wywoływał niekorzystny wzrost ciśnienia skurczowego krwi oraz stężenia białka C-reaktywnego (CRP) czego nie obserwowano wcześniej. Ostatecznie nie stwierdzono zmniejszenia ryzyka nawracających zdarzeń sercowo-naczyniowych w grupie przyjmującej ten lek (skumulowana częstość zdarzeń wynosiła 8,0% w grupie przyjmującej placebo i 8,3% w grupie przyjmującej dalcetrapib). Badanie dal-OUTCOMES zostało zakończone w 2012 r. przed zaplanowanym terminem z powodu braku zmniejszenia częstości epizodów sercowo-naczyniowych [22]. Być może przyczyną nieskuteczności dalcetrapibu u części badanych są jego właściwości farmakokinetyczne, tj. konieczność przekształcenia do aktywnej farmakologicznie formy tiolowej i jego względnie krótki czas półtrwania albo jego przejściowe, modulujące działanie na CETP [7]. Innym wytłumaczeniem jest powstawanie dysfunkcyjnych cząstek HDL, które nie mogą pełnić swoich fizjologicznych funkcji [23].

Anacetrapib

Anacetrapib, podobnie jak torcetrapib, jest pochodną 3,5-bis(trifluorometylo)fenylową hamującą transport hetero- i homotypowy estrów cholesterolu oraz tworzenie pre- β HDL w warunkach *in vitro* (zależnie od dawki) [9, 15]. W badaniu

na chomikach obserwowano, że anacetrapib nie zwiększa usuwania z kałem znakowanych [^3H] steroli obojętnych i kwasów żółciowych po uprzednim podaniu autologicznych makrofagów zawierających znakowany [^3H] cholesterol, przy wzroście znakowanego [^3H] HDL-C w osoczu. Wskazuje to, że anacetrapib nie zwiększa zależnego od HDL-C zwrotnego transportu cholesterolu [15]. Przeciwnie wyniki badań przedstawiają Wang i wsp., w których stwierdzono, że anacetrapib wpływa korzystnie na funkcjonowanie cząstek pre- β HDL, zwiększa wpływ cholesterolu z tkanek i jego zwrotny transport do wątroby [24]. Wykazano również, że leczenie anacetrapibem nie wpływa niekorzystnie na właściwości przeciwzapalne cząstek HDL w stosunku do komórek śródbłonna naczyń [25].

W badaniu klinicznym DEFINE (III faza badań klinicznych) oceniono bezpieczeństwo i skuteczność anacetrapibu w grupie pacjentów z chorobą wieńcową serca lub obciążonych wysokim ryzykiem jej wystąpienia. Po upływie 24 tygodni stosowania anacetrapibu obserwowano redukcję stężenia LDL-C (o prawie 40%), wzrost stężenia HDL-C (o 138%), obniżenie się stężenia apoB (o 21%) i wzrost stężenia apoA-I (o prawie 45%) w porównaniu do placebo. Stwierdzono dodatkowo spadek stężenia cholesterolu nie-HDL (o ponad 31,7%), lipoproteiny(a) (o 36,4%) i trójglicerydów (o 6,8%). Wyniki te utrzymywały się w ciągu 76-tygodniowego okresu leczenia. W trakcie badania nie stwierdzono istotnych działań niepożądanych (anacetrapib nie wpływał negatywnie na ciśnienie tętnicze krwi, stężenia elektrolitów, CRP i aldosteronu w surowicy), a nawet rzadziej pojawiał się wzrost poziomu enzymów wątrobowych oraz spadła wartość hemoglobiny glikowanej u pacjentów z cukrzycą w porównaniu z grupą placebo. Co istotne, pacjenci stosujący anacetrapib rzadziej musieli mieć wykonaną koronaroplastykę. Badanie DEFINE dowodzi, że stosowanie łączonej terapii anacetrapibem oraz statyną poprawia profil lipidowy [26]. Zgodne z tym są wyniki badania przeprowadzonego na pacjentach z dyslipidemią w populacji japońskiej [27].

Badanie DEFINE było prowadzone na niewielkiej grupie pacjentów (1623 osób). Po opublikowaniu jego obiecujących wyników rozpoczęto w 2011 r. kolejne badanie kliniczne, tj. badanie REVEAL (III faza badania klinicznego). Obejmuje ono 30 000 pacjentów z chorobą sercowo-naczyniową w wywiadzie, leczonych statynami w celu obniżenia stężenia LDL-C. Celem badania jest ocena wpływu anacetrapibu na częstość występowania poważnych zdarzeń sercowych (zgon sercowy, zawał serca, rewaskularyzacja wieńcowa). Ukończenie badania przewidywane jest na 2017 r. [7, 9].

Evacetrapib

Evacetrapib jest kolejną pochodną 3,5-bis(trifluorometylo)fenylową, dotychczas najmniej poznaną, która hamuje hetero- i homotypowy transport estrów cholesterolu [9]. Wydaje się być silniejszym inhibitorem CETP niż torcetrapib i anacetrapib. Mechanizm jego wpływu na zwrotny transport cholesterolu oraz transport estrów cholesterolu nie został jeszcze wyjaśniony.

Wpływ na parametry biochemiczne, bezpieczeństwo i tolerancję evacetrapibu (monoterapia lub w połączeniu ze statynami) oceniono w II fazie badań klinicznych. Badaniu poddano 398 pacjentów z dyslipidemią (podwyższone stężenie LDL-C lub obniżone HDL-C) przez 12 tygodni. Zarówno w przypadku monoterapii, jak i terapii łączonej uzyskano wzrost stężenia HDL-C oraz spadek LDL-C (odpowiednio o ponad 125% i o ponad 35% dla najwyższej stosowanej dawki).

Uzyskana w terapii łączonej redukcja stężenia LDL-C była większa, natomiast wzrost stężenia HDL-C był mniejszy niż w przypadku monoterapii. Poza tym stwierdzono wzrost stężenia apoA-I, apoA-II i apoE. Evacetrapib wydaje się być dobrze tolerowany i nie wykazuje negatywnego wpływu na ciśnienie tętnicze krwi oraz stężenie mineralokortykoidów [28]. Zbliżone wyniki badań uzyskano w grupie zdrowych wolontariuszy oraz pacjentów z dyslipidemią w populacji japońskiej [29, 30].

Aktualnie trwa III faza badania klinicznego „A Study of Evacetrapib in High-Risk Vascular Disease, ACCELERATE”, której celem jest ocena bezpieczeństwa i skuteczności evacetrapibu. Szacowana liczba osób objętych badaniem to 11 000 pacjentów obarczonych wysokim ryzykiem chorób naczyniowych. Jej zakończenie przewiduje się na 2016 r. [7].

Podsumowanie

Mimo wcześniejszych nieudanych doświadczeń z torcetrapibem i dalcetrapibem, wyniki I i II fazy badań klinicznych nad pozostałymi dwoma lekami tej grupy wydają się obiecujące. Anacetrapib i evacetrapib nie wywołują niekorzystnych efektów ubocznych torcetrapibu, a przy tym wpływają korzystnie zarówno na stężenie HDL-C, jak i LDL-C w porównaniu do dalcetrapibu, który powodował tylko wzrost stężenia HDL-C. Miejmy nadzieję, że wyniki badań, które skończą się planowo w 2016/2017 r., wykażą skuteczność evacetrapibu/anacetrapibu u pacjentów ze zwiększonym ryzykiem sercowo-naczyniowym i poszerzą grupę leków modulujących gospodarkę lipidową. Należy wziąć pod uwagę, że w przypadku uzyskania pozytywnych wyników III fazy obu badań klinicznych

może być trudne wskazanie, który z czynników (wzrost stężenia HDL-C, spadek stężenia LDL-C lub inny czynnik) przyczynił się bezpośrednio do ich otrzymania.

Otrzymano: 2014.09.04 · Zaakceptowano: 2014.09.30

Piśmiennictwo

1. Wojtyniak B., Stokwiszewski J., Goryński P., Poznańska A.: Długość życia i umieralność ludności Polski. Umieralność według przyczyn. W: Wojtyniak B., Goryński P., Moskalewicz B. Sytuacja zdrowotna ludności Polski i jej uwarunkowania. Warszawa: Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego-Państwowy Zakład Higieny, 2012: 55-59.
2. World Health Organization: The top 10 causes of death. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/> (stan z 21.08.2014).
3. Reiner Ž., Catapano A.L., De Backer G., Graham I., Taskinen M.-R., Wiklund O., Agewall S., Alegria E., Chapman M.J., Durrington P., Erdine S., Halcox J., Hobbs R., Kjekshus J., Filardi P.P., Riccardi G., Storey R.F., Wood D.: Wytoczne ESC/EAS dotyczące postępowania w dyslipidemiach. Kard. Pol. 2011, 69(supl. IV): 143-200.
4. Cybulska B., Szostak W.B., Podolec P., Kopeć G., Naruszewicz M., Undas A., Kozek E., Zdrojewski T., Drygas W., Godycki-Ćwirko M., Pająk A., Czarnecka D., Stańczyk J., Opala G., Grodzicki T.: Wytoczne Rady Radkacyjnej PFP dotyczące dyslipidemii (Aktualizacja 03.2012). <http://www.pfp.edu.pl/index.php?id=wytylipidy2> (stan na 21.08.2014).
5. Banach J., Sinkiewicz W.: Cholesterol HDL – przyjaciel czy wróg? Kard. Pol. 2013, 71(3): 290-294.
6. Kaur N., Pandey A., Negi H., Shafiq N., Reddy S., Kaur H., Chadha N., Malhotra S.: Effect of HDL-raising drugs on cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-regression. PLoS One. 2014, 9(4): e94585.
7. Mohammadpour A.H., Akhlaghi F.: Future of cholesteryl ester transfer protein (CETP) inhibitors: a pharmacological perspective. Clin Pharmacokinet. 2013, 52(8): 615-626.
8. Barter P.J., Brewer H.B. Jr, Chapman M.J., Hennekens C.H., Rader D.J., Tall A.R.: Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003, 23(2): 160-167.
9. Shinkai H.: Cholesteryl ester transfer-protein modulator and inhibitors and their potential for the treatment of cardiovascular diseases. Vasc Health Risk Manag. 2012, 8: 323-331.
10. Thompson A., Di Angelantonio E., Sarwar N., Erqou S., Saleheen D., Dullaart R.P., Keavney B., Ye Z., Danesh J.: Association of cholesteryl ester transfer protein genotypes with CETP mass and activity, lipid levels, and coronary risk. JAMA 2008, 299(23): 2777-2788.
11. Ridker P.M., Paré G., Parker A.N., Zee R.Y., Miletich J.P., Chasman D.I.: Polymorphism in the CETP gene region, HDL cholesterol, and risk of future myocardial infarction: Genomewide analysis among 18 245 initially healthy women from the Women's Genome Health Study. Circ Cardiovasc Genet. 2009, 2(1): 26-33.
12. Gordon T., Castelli W.P., Hjortland M.C., Kannel W.B., Dawber T.R.: High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease: the Framingham Study. Am J Med. 1977, 62(5): 707-714.
13. Gordon D.J., Probstfield J.L., Garrison R.J., Neaton J.D., Castelli W.P., Knoke J.D., Jacobs D.R. Jr, Bangdiwala S., Tyroler H.A.: High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease: four prospective American studies. Circulation 1989, 79(1): 8-15.
14. Tall A.R.: The effects of cholesterol ester transfer protein inhibition on cholesterol efflux. Am J Cardiol. 2009, 104(supl. 10): 39E-45E.
15. Niesor E.J., Magg C., Ogawa N., Okamoto H., von der Mark E. et al.: Modulating cholesteryl ester transfer protein activity maintains efficient pre-β-HDL formation and increases reverse cholesterol transport. J Lipid Res. 2010, 51(12): 3443-3454.
16. Nissen S.E., Tardif J.C., Nicholls S.J., Revkin J.H., Shear C.L., Duggan W.T., Ruzyllo W., Bachinsky W.B., Lasala G.P., Tuzcu E.M.: Effect of torcetrapib on the progression of coronary atherosclerosis. N Engl J Med. 2007, 356(13): 1304-1316.
17. Kastelein J.J., van Leuven S.I., Burgess L., Evans G.W., Kuivenhoven J.A., Barter P.J. et al.: Effect of torcetrapib on carotid atherosclerosis in familial hypercholesterolemia. N Engl J Med. 2007, 356(16): 1620-1630.
18. Bots M.L., Visseren F.L., Evans G.W., Riley W.A., Revkin J.H., Tegeler C.H. et al.: Torcetrapib and carotid intima-media thickness in mixed dyslipidaemia (RADIANCE 2 study): a randomised, double-blind trial. Lancet 2007, 370(9582): 153-160.
19. Barter P.J., Caulfield M., Eriksson M., Grundy S.M., M.D., Kastelein J.P., Komajda M., Lopez-Sendon J., Mosca L., Tardif J.-C., Waters

- D.D. et. al.: Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med.* 2007, 357(21): 2109–2122.
20. Fayad Z.A., Mani V., Woodward M., Kallend D. et. al.: Safety and efficacy of dalcetrapib on atherosclerotic disease using novel non-invasive multimodality imaging (dal-PLAQUE): a randomised clinical trial. *Lancet* 2011, 378(9802): 1547–1559.
 21. Lüscher T.F., Taddei S., Kaski J.C., Jukema J.W., Kallend D., Münzel T., Kastelein J.J., Deanfield J.E.: Vascular effects and safety of dalcetrapib in patients with or at risk of coronary heart disease: the dal-VESSEL randomized clinical trial. *Eur Heart J.* 2012, 33(7) 857–865.
 22. Schwartz G.G., Olsson A.G., Abt M., Ballantyne C.M. et. al.: Effects of Dalcetrapib in Patients with a Recent Acute Coronary Syndrome. *N Engl J Med.* 2012, 367(22): 2089–2099.
 23. Schaefer E.J.: Effects of cholesteryl ester transfer protein inhibitors on human lipoprotein metabolism: why have they failed in lowering coronary heart disease risk? *Curr Opin Lipidol.* 2013, 24(3): 259–264.
 24. Wang S.P., Daniels E., Chen Y., Castro-Perez J., Zhou H., Akinsanya K.O., Previs S.F., Roddy T.P., Johns D.G.: In vivo effects of anacetrapib on pre β HDL: improvement in HDL remodeling without effects on cholesterol absorption. *J Lipid Res.* 2013, 54(10): 2858–2865.
 25. Han S., Levoci L., Fischer P., Wang S.P., Gagen K., Chen Y., Xie D., Fisher T., Ehrhardt A.G., Peier A.M., Johns D.G.: Inhibition of cholesteryl ester transfer protein by anacetrapib does not impair the anti-inflammatory properties of high density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta.* 2013, 1831(4): 825–833.
 26. Cannon C., Shah S., Dansky H.M., Davidson M. et. al.: Safety of anacetrapib in patients with or at high risk for coronary heart disease. *N Engl J Med.* 2010, 363(25): 2406–2415.
 27. Teramoto T., Shirakawa M., Kikuchi M., Nakagomi M., Tamura S., Surks H.K., McCrary Sisk C., Numaguchi H.: Efficacy and safety of the cholesteryl ester transfer protein inhibitor anacetrapib in Japanese patients with dyslipidemia. *Atherosclerosis* 2013, 230(1): 52–60.
 28. Nicholls S.J., Brewer H.B., Kastelein J.J., Krueger K.A., Wang M.D., Shao M., Hu B., McErlan E., Nissen S.E.: Effects of the CETP inhibitor evacetrapib administered as monotherapy or in combination with statin on HDL and LDL cholesterol. A randomized controlled trial. *JAMA* 2011, 306(19): 2099–2109.
 29. Suico J.G., Wang M.D., Friedrich S., Cannady E.A., Konkoy C.S., Ruotolo G., Krueger K.A.: Effects of the cholesteryl ester transfer protein inhibitor evacetrapib on lipoproteins, apolipoproteins and 24-h ambulatory blood pressure in healthy adults. *J Pharm Pharmacol.* Czerwec 2014. doi: 10.1111/jphp.12287.
 30. Teramoto T., Takeuchi M., Morisaki Y., Ruotolo G., Krueger K.A.: Efficacy, safety, tolerability, and pharmacokinetic profile of evacetrapib administered as monotherapy or in combination with atorvastatin in Japanese patients with dyslipidemia. *Am J Cardiol.* 2014, 113(12): 2021–2029.

Spirulina (*Arthrospira*) – badania nad działaniem leczniczym i jej właściwości prozdrowotne

Barbara Jękot¹, Bożena Muszyńska², Tamara Mastalerz², Beata Piórecka³

¹ Apteka, Al. Daszyńskiego 30/13, 14, Kraków

² Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Kraków

³ Zakład Żywienia Człowieka IZP, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Wydział Nauk o Zdrowiu, Kraków

Adres do korespondencji: Bożena Muszyńska, Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków, e-mail: muchon@poczta.fm

Arthrospira (spirulina)

Algi, glony (łac. *Algae*, gr. *Phykos*) – tą nazwą określa się plechowate, najczęściej samożywne organizmy żyjące w środowisku wodnym i miejscach wilgotnych. Występują we wszystkich strefach geograficznych, w wodach słodkich, słonych, chłodnych lub ciepłych. Były one jednymi z pierwszych organizmów zdolnych do fotosyntezy, jakie pojawiły się na Ziemi. Według systematyki należą do królestwa jądrowych (Eukaryota), jednak niektórzy przedstawiciele mogą należeć również do królestwa bezjądrowych (Prokaryota), czyli do gromady sinic. Sinice (*Cyanobacteriaceae*) pojawiły się na świecie 3,5 miliarda lat temu jako jedne z pierwszych organizmów i w tej formie występują obecnie. Są organizmami zdolnymi do fotosyntezy, ale też do asymilacji azotu atmosferycznego, co pozwala im na przeżycie nawet w bardzo trudnych warunkach. Dzięki temu uważa się sinice za najbardziej efektywne autotrofy. Przyczyniły się one w dużej mierze do powstania tlenu w atmosferze, dzięki któremu mamy warunki pozwalające na życie organizmom tlenowym. Jednym z ciekawszych przedstawicieli, o szerokim zastosowaniu w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym i kosmetycznym, jest sinica spirulina. *Arthrospira* (spirulina) od dłuższego czasu jest wykorzystywana w różnych krajach jako dodatek do diety ze względu na dużą wartość odżywczą i bezpieczeństwo stosowania. *Arthrospira* jest rodzajem należących do rzędu *Oscillatoriales* swobodnie pływających sinic, występujących w postaci cylindrycznych, wielokomórkowych nitkowatych lewoskrętnych

kolonii. Do suplementów diety zaliczane są gatunki *Arthrospira platensis* i *Arthrospira maxima*, inaczej spirulina [1, 2]. Prawidłowo *Arthrospira*; jednak mylący, starszy termin spirulina pozostaje w użyciu ze względów historycznych [1, 2]. *Arthrospira platensis* i *Arthrospira maxima* występują naturalnie w jeziorach tropikalnych i subtropikalnych o wysokim pH i wysokim stężeniu węglanu i wodorowęglanu [3]. *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*) występuje w Afryce, Azji i Ameryce Południowej, a zasięg występowania *Arthrospira maxima* ogranicza się do Ameryki Środkowej, natomiast *Arthrospira pacifica* jest endemitem występującym na Hawajach [2]. Żywili się nią już starożytni Aztekowie oraz pierwotni mieszkańcy Afryki z okolic jeziora Czad. W Afryce jest ona spożywana przez niektóre plemiona w postaci placków o nazwie Dihe. Wykonuje się je z wysuszonych na słońcu mat. W latach 60. ubiegłego wieku wykonano pierwszą analizę biochemiczną *Arthrospira platensis*. Pod koniec lat 70. rozpoczęła się masowa hodowla algi, a w 1979 r. w Stanach Zjednoczonych wprowadzono na rynek pierwszy suplement na jej bazie. Większość upraw spiruliny prowadzi się w izolowanych basenach w otwartym ocenie, a specjalne koła łopatkowe stosowane są do mieszania wody [3]. Największe uprawy komercyjne spiruliny znajdują się w Stanach Zjednoczonych, Tajlandii, Indiach, Tajwanie, Chinach, Pakistanie, Birmie (Myanmar), Grecji i Chile [2]. Liofilizowana spirulina wchodzi w skład grupy produktów leczniczo-odżywczych przeznaczonych przez NASA dla suplementacji załóg misji kosmicznych (**rycina 1**).

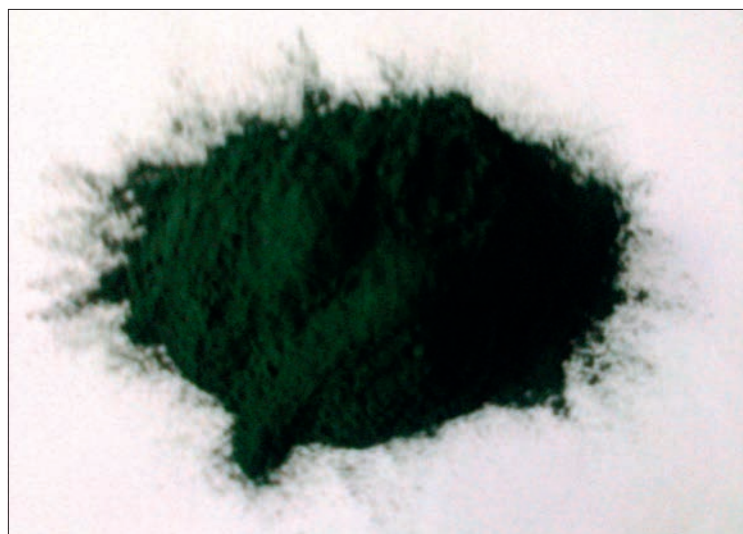
Spirulina (*Arthrospira*) – research on the curative activity and its health benefits

Algae (lat. *Algae*, gr. *Phykos*) is the name of thallus organisms, mostly autotrophic which live in the aquatic environment and humid places. They occur in all geographical areas, in fresh, salt, cold or warm waters. They were one of the first organisms able to photosynthesize that appeared on Earth. The earliest reports regarding their presence date back to 1.5 billion years ago. Algae, due to the fact that they are the source of many substances such as amino acids, proteins, minerals, vitamins, polysaccharides, lipids, and polyamides, which are necessary for proper functioning of the human body have been applied in various industries. They are used among others in cosmetology, pharmacy, food industry, agriculture and environmental protection. According to the taxonomy they belong to the empire of nucleus (Eukaryote) and kingdom plants (*Phytobionta*) but some representatives may also belong to the empire of non-nucleus (Prokaryote) to phylum of blue-green algae (*Cyanobacteriaceae*). One of the most commonly used *Cyanobacteria* is *Arthrospira*.

Arthrospira (Spirulina) has been used in various countries as a supplement to the diet because of the high nutritional value and safety. Protein (65–71% of composition and is a complete source of amino acids) contains all 20 essential amino acids, including 8 essential amino acids and 12 endogenous). *Arthrospira* proteins do not cause allergies. This organism is a source of vitamins such as vitamin C, E, PP (niacin) and B vitamins (B_1 , B_2 , B_6 and B_{12}). It is also a rich source of minerals P, Fe, Ca, K, Na, Mg, also contains folic acid, pantothenic acid and inositol. Spirulina contains many pigments which may be beneficial and bioavailable (neutralized free radicals), including carotenoids: β -carotene in the 4 molecular forms of 9-cis, 13-cis, 15-cis and trans β -carotene, zeaxanthin, chlorophyll-a, xanthophyll, echinenone, myxoxanthophyll, canthaxanthin, diatoxanthin, 3'-hydroxyechinenone, β -cryptoxanthin and oscillaxanthin, and the phycobiliproteins: c-phycocyanin and allophycocyanin. As far as experimentally confirmed it's therapeutic and dietetic properties started many studies, which allow and explaining its use.

Keywords: Algae, *Arthrospira*, *Cyanobacteriaceae*, phycobilins, phycocyanin.

© Farm Pol, 2014, 70(11): 607–614



Rycina 1. Liofilizowana spirulina

Arthrospira (spirulina) od dłuższego czasu jest wykorzystywana w różnych krajach jako dodatek do diety ze względu na dużą wartość odżywczą i bezpieczeństwo stosowania. Białko (65–79% składu) jest kompletnym źródłem aminokwasów) zawiera 20 podstawowych aminokwasów, w tym 8 aminokwasów egzogennych i 12 endogennych. Białka *Arthrospira* nie wywołują alergii. Zawartość lipidów w spirulinie wynosi około 7% wagi i jest ona bogata w kwas γ -linolenowy (GLA), a także dostarcza kwasu α -linolenowego (ALA), kwasu linolowego (LA), kwasu stearydonowego (SDA), kwasu eikozapentaenowego (EPA), kwasu dokozaheksaenowego (DHA) i kwasu arachidonowego (AA). *A. platensis* gromadzi znaczne ilości kwasu γ -linolenowego (GLA). Związek ten, należący do grupy kwasów tłuszczowych ω -6, ze względu na swoje właściwości znalazł zastosowanie w preparatach kosmetycznych, jak i farmaceutycznych. Spirulina jest polecana do pielęgnacji skóry suchej, spierzchniętej, dojrzałej, alergicznej. Zapewnia skórze odpowiednie nawilżenie, utrzymuje jej elastyczność, zmniejsza szorstkość naskórka, co prowadzi do opóźnienia procesu powstawania zmarszczek, a także przyspiesza gojenie się ran. Atopowe zapalenie skóry może być jednym z efektów niedoboru kwasu GLA w organizmie. Spirulina ze względu na zdolność regulowania pracy gruczołów łojowych znalazła zastosowanie w kosmetykach do cery tłustej, trądzikowej. Likwiduje łojotok, podrażnienia oraz zaczerwienienie skóry.

Jest źródłem witamin, takich jak: C, E, PP (niacyna) oraz z grupy B (B_1 , B_2 , B_6 i B_{12}). Stanowi bogate źródło minerałów: P, Fe, Ca, K, Na, Mg, zawiera również kwas foliowy, kwas pantotenowy i inozytol oraz barwniki. Fikocyjanina, należąca do fikobilyn (1% masy spiruliny) i głównie odpowiadająca za jej zdolność do neutralizacji wolnych rodników, jest niebieskim barwnikiem, nadającym *A. platensis* charakterystyczny, ciemnoturkusowy kolor (**rycina 2**). Ponadto zawiera ona karotenoidy: β -karoten, w tym: 4 molekularne formy 9-cis, 13-cis, 15-cis i trans β -karoten, zeaksantynę, beta-kryptoksantynę i chlorofil a. Odkąd zwrócono uwagę na jej właściwości, przeprowadzono wiele badań umożliwiających i tłumaczących jej zastosowanie [15, 16].

Właściwości lecznicze spiruliny

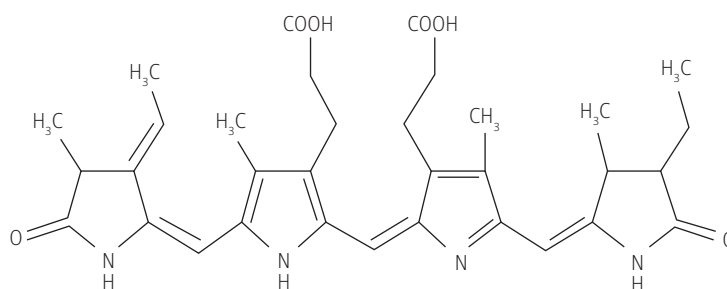
Właściwości przeciwzapalne i neowaskularyzacyjne

Aby sprawdzić, czy spirulina posiada działanie przeciwzapalne, przeprowadzono badania *in vitro* oraz *in vivo*. Do badania *in vivo* użyto myszy, które podzielono na dwie grupy – badaną i kontrolną.

Zwierzętom w znieczuleniu wprowadzano bezpośrednio do oczu po 3 μ l 1 N NaOH (30 sekund). Po tym zabiegu oczy zwierząt były natychmiastowo przemyte roztworem soli fizjologicznej. Grupie badanej aplikowano następnie na poparzone oko ekstrakt ze spiruliny (PSP) w ilości 5 μ l, cztery razy dziennie przez 7 dni. Natomiast grupie kontrolnej podawano roztwór soli fizjologicznej bez spiruliny. Siódmego dnia eksperymentu oczy sfotografowano lampą szczelinową, a neowaskularyzacja rogówki (CNV) została zbadana przy zastosowaniu metody oceniającej angiogenezę rogówki. Do badań *in vitro* posłużyły komórki śródbłoka żyły pępowinowej (HUVEC) [16]. Wyniki badań udowodniły, że ekstrakt ze spiruliny hamuje ekspresję czynników, takich jak: VEGF (czynnik wzrostu śródbłoka naczyń), MMP2 (metaloproteinaza macierzy 2) oraz MMP9 (metaloproteinaza macierzy 9), natomiast stymuluje ekspresję PEDF (*Pigment epithelium-derived factor*). Sugeruje to, że PSP może hamować CNV poprzez zmniejszenie ilości czynników biorących udział w angiogenezie i jednocześnie aktywację czynników ją hamujących [16].

W celu określenia potencjalnego efektu przeciwwzapalnego PSP zbadano zawartość TNF- α (czynnik martwicy guza) oraz SDF1 (*stromal cell-derived factor 1*) w rogówce wypalanej NaOH. SDE1/CXCR4 jest to para ligand-receptor, która odgrywa ważną rolę w procesie neowaskularyzacji oka, z kolei TNF- α jest jednym z regulatorów reakcji zapalnej i może brać pośrednio udział w procesie angiogenezy. W uszkodzonej rogówce potraktowanej PSP naciek z komórek SDF1 dodatnich oraz ekspresja SDF1 i RNA TNF- α były znacznie zmniejszone. Dodatkowo badanie *in vitro* udowodniło, że PSP hamował proliferację komórek HUVEC, migrację i tworzenie się rurkowatych struktur nowego naczynia. Są to trzy kluczowe mechanizmy przyczyniające się do rozwoju CNV. Założono, że PSP hamuje CNV przez bezpośredni wpływ na komórki śródbłoka oraz pośrednio poprzez zwiększone hamowanie produkcji czynników zapalnych, które regulują proces angiogenezy. Mechanizm tego działania można przypisać wpływowi PSP na ERK1/2 (kinazy regulowanych zewnątrzkomórkowymi sygnałami), ponieważ w badaniach *in vitro* zanotowano znaczne zmniejszenie fosforylacji tych czynników, jednak ekstrakt nie miał wpływu na ich całkowitą ilość. PSP może wpływać na regulację innych ważnych czynników związanych z angiogenezą przez zmniejszenie ich ekspresji – tymi czynnikami są MMP i VEGF, jednak mechanizm ten nie został jeszcze dokładnie zbadany [16].

Wpływ PSP na mediatory stanu zapalnego badano również przy użyciu myszy albinosów obu płci, u których wywołano reumatoidalne zapalenie



Rycina 2. Fikocyjanina

stawów za pomocą adiuwantów. Zwierzęta podzielono na cztery grupy, I stanowiła grupę kontrolną, zwierzętom z grup II i III do prawej łapy wstrzyknięto kompletny adiuwant Freud'a (zawiera on zabite temperaturą bakterie *Mycobacterium tuberculosis* w oleju parafinowym). Zwierzęta z III grupy otrzymywały spirulinę przez 8 dni, począwszy od 11 dnia od podania adiuwanta Freud'a. Grupie IV nie wstrzyknięto adiuwanta. Zwierzętom z tej grupy podawano wyłącznie spirulinę przez 8 dni. Następnie w 19 dniu eksperymentu pobrano organy myszy do dalszej analizy [17].

Badania wykazały, że ekstrakt ze spiruliny hamował obrzęk kończyn, co było spowodowane spadkiem poziomu lizosomalnych hydrolaz. Uważa się, że zmniejszenie obrzęku przez spirulinę związane jest z jej ingerencją w przemiany cyklicznej oksygenazy. Dodatkowo u szczurów leczonych ekstraktem zaobserwowano wzrost masy ciała w stosunku do grupy kontrolnej. U zwierząt z chorobą reumatoidalną utrata masy ciała może być związana ze zmniejszoną absorpcją z jelita glukozy i lecytyny, natomiast stosowanie spiruliny powoduje przywrócenie zdolności absorpcyjnych jelita cienkiego. U szczurów z zapaleniem stawów indukowanym adiuwantem glukohydrolaza uwolniona z inwazyjnych makrofagów, neutrofilów, synowicytów oraz chondrocytów zapoczątkowuje syntezę mediatorów stanu zapalnego. Podanie spiruliny zmniejsza uwalnianie lizosomalnych enzymów, co wskazuje na przeciwzapalne działanie spiruliny. Dodatkowo zmniejsza ona ilość aminotransferazy i fosfatazy alkalicznej we krwi, co również wiąże się z jej właściwościami przeciwzapalnymi [17].

Właściwości przeciwwirusowe

Przeprowadzono badanie *in vitro* mające na celu sprawdzenie czy spirulina posiada właściwości przeciwwirusowe. Polegało ono na wyekstrahowaniu ze spiruliny polisacharydu zawierającego reszty kwasu siarkowego(VI) – spirulanu wapnia (Ca-SP), który posłużył jako materiał do badań. Przeprowadzony eksperyment dowiódł, że Ca-SP posiada przeciwwirusowe właściwości w stosunku do wirusa HIV-1, HSV-1 oraz ludzkiego wirusa cytomegalii

(HCMV). Mechanizm, za pomocą którego ten polisacharyd blokuje replikację wirusa, polegającą na hamowaniu połączenia się wirusa z komórką gospodarza i ich późniejszej fuzji. Uważa się, że wczesny efekt zatrzymywania wirusa może być spowodowany zaburzeniem jonowej interakcji pomiędzy dodatnio naładowanymi regionami z powierzchniowymi glikoproteinami wirusa a fosfolipidami błony komórkowej komórki gospodarza. Ważną rolę w działaniu przeciwwirusowym odgrywają grupy siarczanowe (VI), ale również, jak się okazało – jony wapnia. To stwierdzenie znalazło swoje potwierdzenie w późniejszym etapie badań, w którym sprawdzano zdolność do hamowania replikacji wirusa HIV-1 spirulanu pozbawionego jonów wapnia (H-SP), nie zatrzymywał on replikacji wirusa. Przez co sugeruje się, że jony wapnia poprzez utworzenie wiązań chelatowych z grupami siarczanowymi (VI) polisacharydu stwarzają odpowiednią strukturę przestrzenną niezbędną do uzyskania właściwości przeciwwirusowych [18].

Wiele innych polisacharydów, takich jak np.: siarczan dekstranu, pentozan sodu wykazują również działanie przeciwwirusowe, jednak okazało się, że w niskich dawkach stymulują replikację wirusa HIV, zamiast ją hamować. Ca-SP w sposób zależny od dawki skutecznie zatrzymuje działanie wirusa, poza tym nie powoduje on stymulacji jego replikacji w niskich dawkach, jak to ma miejsce w przypadku innych polisacharydów. Uważa się, że brak tego działania związany jest również z obecnością jonów wapniowych, ponieważ po zamianie ich na jony sodu otrzymano Na-SP, który w niskich dawkach działa identycznie jak inne polisacharydy – stymuluje replikację wirusa. Dodatkowo inne polisacharydy wykazują działanie antykoagulacyjne, które powoduje znaczne utrudnienie w wykorzystaniu ich jako potencjalnych leków przeciw AIDS, Ca-SP wykazuje o wiele mniejszą aktywność przeciwkrzepliwą i może być wykorzystywany w mniejszych stężeniach od pozostałych polisacharydów. Jest jeszcze jedna właściwość, która przemawia za wykorzystaniem Ca-SP w terapii przeciwwirusowej, a mianowicie jego długi okres półtrwania, który wynosi 150 minut [18].

Właściwości antyoksydacyjne

Do badań właściwości antyoksydacyjnych spiruliny wykorzystano myszy albinosy obu płci, które podzielono na pięć grup. Pierwsza grupa stanowiła grupę kontrolną, myszy z tej grupy otrzymały sól fizjologiczną, II grupa otrzymała acetaminofen (paracetamol) rozpuszczony w wodzie w dawce 900 mg/kg m.c., III grupa otrzymała ekstrakt ze spiruliny *p.o.* (800 mg/kg m.c.) 30 minut po pojedynczym wstrzyknięciu acetaminofenu (900 mg/kg m.c.), IV grupa otrzymał silmarynę (30 mg/kg m.c.)

również 30 minut po wstrzyknięciu tej samej dawki paracetamolu, ostatnia grupa otrzymała spirulinę *p.o.* w 2% gumie arabskiej, następnie po 4 godzinach od podania paracetamolu pobrano tkanki wątroby i krew z pnia tętniczego, które posłużyły do dalszej analizy [20].

W tym doświadczeniu u zwierząt, którym podano acetaminofen zanotowano wzrost stężenia enzymów w surowicy. Były to: transaminaza alaminowa, transaminaza asparaginowa oraz fosfataza alkaliczna. Są one uwalniane do krwiobiegu w przypadku uszkodzenia komórek wątroby, a paracetamol spowodował zniszczenia integralnej struktury wątroby i tym samym uwolnienie tych enzymów z cytoplazmy. Na tej podstawie uważa się, że spirulina hamuje degradację integralnej struktury komórek wątroby, ponieważ w grupie, w której zwierzęta otrzymały ekstrakt ze spiruliny zanotowano zmniejszone stężenie tych enzymów. Uważa się, że powrót do fizjologicznego stężenia enzymów w surowicy związany jest z procesem gojenia się miększu wątroby i regeneracją hepatocytów [20].

W uszkodzonej acetaminofenem wątrobie zaobserwowano wzrost peroksydacji lipidów i spadek poziomu glutationu – przeciwutleniacza występującego w wątrobie. W grupie myszy, które otrzymały ekstrakt ze spiruliny zanotowano wzrost poziomu glutationu w stosunku do zwierząt z uszkodzoną wątrobą, które jej nie otrzymały. Dodatkowo w grupie III zanotowano wzrost poziomu enzymów, takich jak: dysmutaza ponadtlenkowa, peroksydaza glutationowa, reduktaza glutationowa oraz S-transferaza glutationu, przez co zmniejszeniu uległa peroksydacja lipidów w wątrobie. Stało się tak, ponieważ te enzymy mają właściwości przeciwutleniające i pełnią ważną rolę w eliminacji reaktywnych form tlenu. Przyjmuje się, że za to działanie odpowiedzialne są witaminy C i E oraz β -karoten, które działają przeciwutleniająco, a spirulina jest ich bogatym źródłem. Dodatkowo w przypadku uszkodzenia wątroby spowodowanego paracetamolem następuje aktywacja mediatorów stanu zapalnego, między innymi TNF- α , co z kolei przyczynia się do martwicy tkanki. Spirulina powoduje obniżenie podwyższonego poziomu TNF- α i w ten sposób dodatkowo chroni komórki wątroby [20].

Działanie antyoksydacyjne spiruliny może być również wykorzystane w profilaktyce choroby Alzheimera, gdyż uważa się, że oprócz odkładania się β -amyloidu w mózgu ważną rolę w rozwoju tej choroby odgrywa stres oksydacyjny. Przeprowadzono eksperyment na myszach dotyczący wpływu spiruliny na odkładanie β -amyloidu w mózgu. Doświadczenie to udowodniło, że suplementacja spiruliną w dawce 200 mg/kg m.c. widocznie zmniejszyła ilość blaszek β -amyloidu w hipokampie,

dotatkowo zmniejszeniu uległa peroksydacja lipidów w korze, prążkowiu oraz hipokampie. Podawanie wodnego ekstraktu ze spiruliny myszom, u których wywołano chorobę Alzheimer'a, przyczyniło się również do wzrostu aktywności enzymów antyoksydacyjnych, takich jak np. katalaza (CAT). Jej aktywność zwiększyła się w korze, prążkowiu i hipokampie, zanotowano również wzrost aktywności peroksydazy glutationowej, natomiast aktywność dysmutazy ponadtlenkowej nie uległa zmianie. Oprócz działania antyoksydacyjnego na neuroprotekcyjny mechanizm ma wpływ również zwiększona ilość dopaminy w prążkowiu przez ekstrakt ze spiruliny oraz aktywacja do szybszej regeneracji komórek mikrogleju po uszkodzeniu systemu nigrostriatalnego. Jednak mechanizm tego zjawiska nie jest jeszcze w pełni poznany [21].

Właściwości hemoprotekcyjne

Testy dotyczące działania hemoprotekcyjnego spiruliny przeprowadzono *in vivo* na myszach oraz *in vitro* na komórkach raka wątroby HepG2. Zwierzęta podzielono na cztery grupy, I stanowiła grupę kontrolną, II otrzymywała ekstrakt ze spiruliny jako dodatek do wody, u III i IV grupy wywołano uszkodzenie wątroby przy pomocy dibutylnitrozoaminy, z tym że IV grupa otrzymywała jeszcze ekstrakt. Następnie wszystkie zwierzęta uśmiercono, a ich wątroby posłużyły do dalszych badań. Z kolei komórki HepG2 zostały potraktowane ekstraktem ze spiruliny o wzrastającym stężeniu, od 0–800 µg/ml [22].

Badania pokazały, że w komórkach uszkodzonej wątroby dibutylnitrozoaminą poziom PCNA (jądrowy antygen komórek proliferujących) jest wysoki, jednak w grupie suplementowanej spiruliną poziom tego antygenu był znacznie mniejszy niż w grupie, która tej suplementacji nie otrzymywała. PCNA i p53 (czynniki transkrypcyjne o właściwościach supresora nowotworowego) są ściśle związane z cyklem komórkowym, ich wzrost obserwuje się w fazie G₁, natomiast w fazie S ich maksymalną ilość, która powoli spada w fazie G₂, aż do ich całkowitego braku podczas mitozy. W komórkach patologicznie zmienionych widoczna jest duża liczba komórek PCNA pozytywnych, natomiast w komórkach zwierząt, które otrzymywały ekstrakty ze spiruliny, zarówno tych z uszkodzoną wątrobą, jak i nie, ilość komórek PCNA pozytywnych jest niewielka. Po analizie komórek HepG2 okazało się, że ekstrakt ze spiruliny indukuje p53, który z kolei zwiększa aktywność inhibitora cyklu komórkowego p21. Inhibitor ten jest odpowiedzialny za hamowanie proliferacji komórek. Odnotowano również wzrost Bax (białko z rodziny białek Bcl-2, przyspiesza apoptozę, poprzez tworzenie porów w błonie zewnętrznej mitochondrium) i spadek ekspresji

Bcl-2 (heterogenna grupa białek, regulująca uwalnianie cytochromu c i AIF z mitochondriów), który pokrywał się z indukcją apoptozy. Sugeruje się, że działanie ochronne na wątrobę ekstraktu ze spiruliny może być związane z jej właściwościami antyoksydacyjnymi oraz że barwnik asymilacyjny, jakim jest fikocyjanina C, stanowi główny związek odpowiedzialny za wywołanie apoptozy w komórkach nowotworowych [22].

Właściwości przeciwbakteryjne

W teście *in vitro* użyto ekstraktu metanolowego i acetonowego ze spiruliny wobec *Staphylococcus aureus* MTCC-96 i *Salmonella typhimurium* MTCC-98. W zależności od szczepu bakterii, jak i rozpuszczalnika ekstrakt wykazywał różną inhibicję wzrostu bakterii. W przypadku *S. aureus* acetonowy ekstrakt ze spiruliny wykazywał większą zdolność do zahamowania rozwoju bakterii w teście na płycie agarowej w porównaniu do ekstraktu metanolowego. Z kolei w przypadku *S. typhimurium* metanolowy roztwór spiruliny wykazywał większą zdolność do zahamowania wzrostu bakterii niż ekstrakt acetonowy. Test ten pokazał, że rozpuszczalnik ma bardzo duże znaczenie w przypadku aktywności przeciwbakteryjnej spiruliny. Dodatkowo rozpuszczalniki organiczne nie wykazały negatywnego wpływu na aktywność ekstraktu. Uważa się że kwas γ-linolenowy oraz takie związki, jak: 1-oktadekan i 1-heptadekan odpowiadają za właściwości przeciwbakteryjne, a ekstrakt ze spiruliny jest ich bogatym źródłem. Związki te przenikają między cząsteczkami peptydoglikanu w ścianie komórkowej, nie powodując zmian w jej strukturze, ale docierając do błony komórkowej, powodują jej rozpad i w ten sposób przyczyniają się do śmierci bakterii [23].

Sprawdzono też właściwości przeciwbakteryjne ekstraktu ze spiruliny na kolejnych szczepach bakterii patogennych, na trzech szczepach Gram-dodatnich (*Staphylococcus aureus* MTCC96, *Bacillus subtilis* MTCC619 i *Bacillus pumilus* MTCC1456) i na trzech szczepach Gram-ujemnych (*Escherichia coli* MTCC443, *Pseudomonas aeruginosa* MTCC424 i *Proteus vulgaris* MTCC 426) oraz na bakterii fermentacji mlekowej (*Lactobacillus casei* MTCC1423, *Lactobacillus acidophilus* MTCC447 i *Streptococcus thermophilus* MTCC1938). Testy te wykazały, że ekstrakt ze spiruliny powodował przyspieszony wzrost bakterii mlekowych, które zaliczane są do organizmów probiotycznych i pomagają utrzymywać równowagę pomiędzy szkodliwymi i korzystnymi mikroorganizmami w przewodzie pokarmowym, przez co poprawione zostaje wchłanianie jelitowe. Podobnie jak we wcześniejszym eksperymencie, ekstrakt ze spiruliny hamował rozwój bakterii patogennych [24].

Właściwości przeciwnowotworowe

Za właściwości przeciwnowotworowe ekstraktu ze spiruliny odpowiada C-fikocyjanina (C-PC). Przeprowadzono test *in vitro* na komórkach HeLa, sprawdzający wpływ C-PC na poliferaację i apoptozę komórek nowotworowych. Test ten pokazał, że w komórkach HeLa potraktowanych C-PC zachodziły zmiany prowadzące do ich apoptozy. Były to zmiany, takie jak: kurczenie się komórek, tworzenie błony pęcherzykowej, kondensacja jądra i cytoplazmy oraz rozszczepianie DNA na mniejsze fragmenty. Sugeruje to, że C-PC indukuje apoptozę komórek HeLa i wywołuje ją najprawdopodobniej w fazach S i G₂ cyklu komórkowego. Dodatkowo w komórkach nowotworowych, na które podziałano ekstraktem ze spiruliny, zaobserwowano zmniejszoną ekspresję ICAM-1 (cząstka adhezyjna, glikoproteina, budową swoją zbliżoną do immunoglobulin), podczas gdy ekspresja Bcl-2 (heterogenna grupa białek, regulująca uwalnianie cytochromu c i AIF z mitochondriów) była zwiększona, potwierdza to też, że C-PC silnie zwiększa aktywność mediatorów proapoptotycznych, podczas gdy obniża aktywność mediatorów antyapoptotycznych. Ułatwia to przekazywanie sygnału apoptozy do komórek HeLa, co skutkuje ich śmiercią w teście *in vitro*. Zbadano jeszcze wpływ C-PC na kaspazy, które są ważnym mediatorem w szlakach inicjujących śmierć komórki. W komórkach HeLa potraktowanych ekstraktem ze spiruliny kaspazy 2, 3, 4, 6, 8, 9 i 10 były aktywne. Ta droga indukcji apoptozy oparta jest na oddziaływaniu tzw. ligandów śmierci, czyli np. Fas/TNF-R1 i TRAIL (ligand indukujący związany z czynnikiem martwicy guza – TNF), które wiążą się z odpowiednimi receptorami błonowymi, dzięki czemu zostają aktywowane kaspazy. Wynika z tego, że C-PC aktywuje w hodowli komórek HeLa apoptozę na drodze zależnej od kaspaz. W mitochondriach cytochrom C pełni ważną rolę w fosforylacji oksydacyjnej i tworzeniu ATP. Niektóre czynniki apoptotyczne są w stanie wywołać rozpręczenie kompleksu cytochromu, co prowadzi do rozerwania błony zewnętrznej, a to z kolei powoduje uwolnienie czynników apoptotycznych, takich jak AIF (czynnik wywołujący apoptozę) oraz Apaf-1 (apoptotyczny czynnik aktywujący proteazę 1) do cytozolu. W cytozolu cytochrom C pochodzący z mitochondrium wiąże Apaf-1 i nieaktywną prokaspazę 9, które razem tworzą apoptosom. To inicjuje proteolityczną kaskadę kaspaz efektorowych 9–3–7 [25].

Właściwości hipocholesterolemiczne

Badania nad właściwościami hipocholesterolemicznymi spiruliny zostały przeprowadzone na ochotnikach – mężczyznach i kobietach w wieku od 18 do 65 lat. Przyjmowali oni doustnie spirulinę w dawce 4,5 g/dzień przez 6 tygodni. W tym czasie

pobierano od nich próbki krwi i mierzono stężenie trójglicerydów (TG), cholesterolu (TC), HDL-C oraz aminotransferazy asparaginowej (AST). Dodatkowo monitorowano ciśnienie skurczowe, jak i rozkurczowe krwi oraz BMI. Po sześciu tygodniach odnotowano znaczny spadek stężenia TG, TC oraz LDL-C oraz wzrost HDL-C. Zmiany TC i HDL-C zależały od zmian stężenia TG, natomiast stężenie LDL-C uległo zmniejszeniu w sposób niezależny. Największy spadek tych parametrów zaobserwowano w najstarszej grupie wiekowej (od 49–65 lat), co jest bardzo ważne, ponieważ dyslipidemia jest powiązana z wieloma różnymi jednostkami chorobowymi dotykającymi starsze osoby.

Przed rozpoczęciem testu tylko 11% ochotników nie cierpiało z powodu nadciśnienia, 44% odznaczało się wysokim ciśnieniem tętniczym krwi, a na nadciśnienie tętnicze I° cierpiało 31% ochotników, a II° – 14%. Po suplementacji spiruliną 36% pacjentów osiągnęło prawidłowe ciśnienie tętnicze, a u 50% ochotników z nadciśnieniem I° i II° wartość ciśnienia spadła do stanu określanego jako ciśnienie wysokie prawidłowe. Nie został poznany mechanizm odpowiedzialny za wpływ spiruliny na ciśnienie tętnicze i metabolizm lipidów. Niektórzy uważają, że spirulina hamuje wchłanianie cholesterolu w jelicie czczym i krętym oraz resorpcję kwasu żółciowego, sugerując, że C-fikocyjanina jest odpowiedzialna za ten efekt. Dodatkowo wykazuje ona hamujący wpływ na lipazy trzustkowe. Za efekt hipotensyjny ekstraktu ze spiruliny odpowiedzialna jest C-fikocyjanina hamująca agregację płytek poprzez zatrzymywanie mobilizacji wapnia oraz blokująca uwalnianie wolnych rodników przez płytki krwi. Dodatkowo niska zawartość sodu i wysoka zawartość potasu w ekstrakcie ze spiruliny może odgrywać pozytywną rolę w obniżaniu ciśnienia tętniczego krwi [26].

Kolejne eksperymenty dotyczące wpływu spiruliny na profil lipidowy przeprowadzono na pacjentach z cukrzycą typu 2. Podzielono ich na dwie grupy, z których jedna stanowiła grupę kontrolną, a druga otrzymywała ekstrakt ze spiruliny w dawce 8 g/dziennie przez 12 tygodni. U pacjentów nie zanotowano obniżenia poziomu glukozy na czczo, jak i zmniejszenia ilości hemoglobiny HbA1c (glikohemoglobina). Jednak, tak jak we wcześniej przytoczonym eksperymencie, u tych pacjentów zanotowano również obniżenie ciśnienia krwi oraz spadek stężenia frakcji lipidowej w osoczu. Co ciekawe, testy przeprowadzone na zdrowych ludziach w podobnym wieku pokazały, że ekstrakty ze spiruliny znacząco obniżały stężenie glukozy, z 105,1 mg/dl do 100,0 mg/dl [27].

Działanie metaloprotekcyjne

Test dotyczący działania metaloprotekcyjnego ekstraktu ze spiruliny przeprowadzono na

myszach albinosach. Zwierzęta podzielono na cztery grupy. I grupa stanowiła grupę kontrolną, II grupa dostawała ekstrakt ze spiruliny przez 30 dni, III grupie podano dootrzewnowo $HgCl_2$ w 0,9% roztworze NaCl, IV grupa otrzymywała ekstrakt ze spiruliny 10 dni przed oraz 30 dni po podaniu $HgCl_2$. Następnie po 1, 3, 7, 15 i 30 dniu testu wątroby zwierząt zostały poddane analizie. Zatrucie rtęcią spowodowało znaczny wzrost aktywności aminotransferaz: aminotransferazy asparaginowej (AST) i aminotransferazy alaninowej (ALT). Ich wzrost w surowicy może być spowodowany nekrozą komórek wątroby, która powoduje wzrost przepuszczalności błony komórkowej, przez co aminotransferaza zostaje uwolniona do krwi. Z kolei zaobserwowano spadek aktywności fosfatazy alkalicznej w surowicy po zatruciu rtęcią. W wątrobie jest ona związana z błoną lipidową strefy kanalikowej, przez co każda ingerencja w przepływ żółci prowadzi do jej zmniejszonej aktywności. Rtęć przyczynia się do uszkodzenia błony komórkowej poprzez wywołanie peroksydacji lipidów, co prowadzi do zachwiania równowagi pomiędzy syntezą i rozkładem białkowych enzymów. Glutation (GSH) jest ważnym enzymem wiążącym wolne rodniki, rtęć charakteryzuje się dużym powinowactwem do GSH i powoduje nieodwracalny podział GSH na dwa tripeptydy. Po połączeniu GSH z metalem następuje jego wydalenie do żółci. Jednak poprzez związanie się rtęci z GSH poziom zredukowanego glutationu się zmniejsza, a co za tym idzie – potencjał antyoksydacyjny komórki maleje. Zatrucie rtęcią zmniejszyło zawartość GSH w wątrobie, co przyczyniło się do wzrostu szybkości degradacji hepatocytów na drodze peroksydacji lipidów. W wątrobach zwierząt, którym podawano ekstrakt ze spiruliny przed, jak i po zatruciu rtęcią stwierdzono podwyższoną zawartość GSH i zmniejszoną aktywność aminotransferaz AST i ALT oraz zwiększenie aktywności fosfatazy alkalicznej, co skutkowało mniejszym uszkodzeniem wątroby niż w przypadku zwierząt nieotrzymujących dodatkowej suplementacji spiruliną. Metaloprotekcyjne właściwości spiruliny naukowcy przypisują witaminie C, E i β -karotenowi oraz selenowi, które wchodziły w skład ekstraktu. β -Karoten neutralizuje wolne rodniki, z kolei witaminy C i E hamują peroksydację lipidów dzięki właściwościom antyoksydacyjnym. Dodatkowo witamina E zmniejsza wchłanianie rtęci z przewodu pokarmowego. Oprócz tego selen wchodzi w skład enzymów, z których kilka wykazuje działanie antyoksydacyjne, np. peroksydaza glutationowa, zadaniem innych enzymów zawierających selen jest kompleksowanie metali ciężkich i w ten sposób neutralizowanie ich działania toksycznego na organizm człowieka [28].

Przykłady preparatów OTC dostępnych w aptekach zawierających spirulinę

Spirulina kapsułki: Herbapol Kraków; Spirulina Hawajska; Cyanotech Copr; Multi CODE, USP ZDROWIE SP. ZO.O; Belissa hydro, AFLOFARM; Figura detox. HERBAPOL LUBLIN

Podsumowanie

Organizmy morskie, a zwłaszcza glony są ciągle słabo zbadanym źródłem substancji o ogromnym potencjale biologicznym. Jednym z ciekawszych glonów ekspansywnie wchodzących na rynek preparatów OTC oraz produktów spożywczych jest spirulina. Ta jednokomórkowa bakteria zawiera całe bogactwo metabolitów istotnych ze względów prozdrowotnych i leczniczych. Pod względem zawartości flawonoidów, kwasu γ -linolenowego, fikobilin, witamin, zwłaszcza z grupy B oraz witaminy E, β -karotenu i niezbędnych biopierwiastków (Fe, Se, Zn, Cu) przewyższa wszystkie ich znane źródła pokarmowe. Ten jeden z najbardziej pełnowartościowych organizmów działa odżywczo, przeciwzapalnie, antyoksydacyjnie, przeciwstarzeniowo i antyalergicznie. Dzięki stosowaniu tej algi można skutecznie działać profilaktycznie, zapobiegając rozwojowi chorób cywilizacyjnych, w tym nowotworów.

Otrzymano: 2014.09.08 · Zaakceptowano: 2014.09.27

Piśmiennictwo

1. Szwejkowska A., Szwejkowski J.: Botanika tom 2. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2012. Wydanie X.
2. Braz J.: Aeration effect on *Spirulina platensis* growth and γ -Linolenic acid production: Microbiology, 2012, 43:12–20.
3. Abdulqader G., Barsanti L., Tredici M.: Harvest of *Arthrospira platensis* from Lake Kossorom (Chad) and its household usage among the Kanembu. Journal of Applied Phycology, 2000, 12: 493–498.
4. Cavalcante-Silva L., Brito da Matta C., Vital de Araújo M., Barbosa-Filho J., Pereira de Lira D., Santos B., Emmanuel G. Miranda C., Alexandre-Moreira M.: Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Crude Methanolic Extract of Red Alga *Bryothamnion triquetrum*, Marin Drugs, 2011, 10:1977–1992.
5. Cutan J.: Cosmeceuticals for Hyperpigmentation: What is Available? Aesthetic Surgery, 2013, 6: 4–11
6. Habib M., Ahsan B., Parvin Mashuda.: Huntington Tim C.; Hasan Mohammad R., A Review on Culture, Production and Use of Spirulina as Food for Humans and Feeds for Domestic Animals and Fish, Food and Agriculture Organization of The United Nations. Retrieved 2008, 20: 2011.
7. Guiry M.D.: Arthrospira. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Gal, 2008.
8. Belay A.: Spirulina (Arthrospira): Production and Quality Assurance. Spirulina in Human Nutrition and Health, CRC Press, 2008: 1–25.
9. Babadzhanyan A.S.: Chemical Composition of *Spirulina Platensis* Cultivated in Uzbekistan, Chemistry of Natural Compounds, 2004, 40: 276–279.
10. Mostafa Y., Amel S., Yakoot S.: *Spirulina platensis* versus silymarin in the treatment of chronic hepatitis C virus infection. A pilot randomized, comparative clinical trial: BMC Gastroenterology, 2012, 12: 32.
11. Cornet J.F., Dubertret G.: The cyanobacterium *Spirulina* in the photosynthetic compartment of the MELISSA artificial ecosystem.

- Workshop on artificial ecological systems, DARA-CNES, Marseille, France, 1990: 24–26.
12. Vonshak A. (ed.): *Spirulina platensis* (Arthrospira): Physiology, Cell-biology and Biotechnology. London: Taylor & Francis, 1997.
 13. McCarty M. F.: Clinical Potential of Spirulinas a Source of Phycocyanobilin, *Journal of Medicinal Food*, 10: 566–570.
 14. Lingling Y., Yao W., Qingjun Z., Peng C., Yiqiang W., Ye W., Ting L., Lixin X.: Inhibitory effects of polysaccharide extract from *Spirulina platensis* on corneal neovascularization, *Molecular Vision*, 2009; 15: 1951–1961.
 15. Pielesz A.: *Algi i alginiany – leczenie, zdrowie i uroda*, Wydawnictwo internetowe e-bookowo, 2010.
 16. Ling-Ling Y.; Qing-Jun Z.; Yao W.; Yan G.; Yi-Qiang W.: Comparison of the therapeutic effects of extracts from *Spirulina platensis* and amnion membrane on inflammation-associated corneal neovascularization. *International Journal of Ophthalmology* 2012; 5.
 17. Rasool M., Sabina E.P., Lavanya B.: Anti-inflammatory effect of *Spirulina fusiformis* on adjuvant-induced arthritis in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2006, 29: 2483–2487.
 18. Hayashi K., Hayashi T., Kojima I.: A natural sulfated polysaccharide, calcium spirulan, isolated from *Spirulina platensis*: *In vitro* and *ex vivo* evaluation of Anti-Herpes Simplex Virus and Anti-Human Immunodeficiency Virus activities. *AIDS Research and Human Retroviruses* 1996, 12: 1463–1471.
 19. Ayeahunie, S.: Inhibition of HIV-1 Replication by an Aqueous Extract of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*), *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes & Human Retrovirology*, 1998, 18: 7–1.
 20. Sabina E.P., Samuel J., Rajappa Ramya S., Patel S., Mandal N., Prantharthiharan P., Mishra P.P., Rasool M.: Hepatoprotective and antioxidant potential of *Spirulina fusiformis* on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *International Journal of Integrative Biology*, 2009, 6: 1–5.
 21. Hwang JH., Lee IT., Jeng KCh., Wang MF., Hou R.ChW., Wu SM., Chan YCh.: Spirulina prevents memory dysfunction, reduces oxidative stress damage and augments antioxidant activity in senescence-accelerated mice. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 2011, 57: 186–191.
 22. Ismaili M.F., Ali D.A., Fernando A., Abdraboh M.E., Gaur R.L., Ibrahim W.M., Raj M.HG., Ouhtit A.: Chemoprevention of rat liver toxicity and carcinogenesis by Spirulina. *International Journal of Biological Sciences*, 2009, 5: 377–387.
 23. Kumar V., Bhatnagar A.K., Srivastava J.N.: Antibacterial activity of crude extract of *Spirulina platensis* and its structural elucidation of bioactive compound. *Journal of Medicinal Plants Research* 2011, 5: 7043–7048.
 24. Bhowmik D., Dubey J., Mehra S.: Probiotic efficiency of *Spirulina platensis* – stimulating growth of lactic acid bacteria, *World Journal of Dairy & Food Sciences* 2009, 4: 160–163.
 25. Li B., Gao MH., Zhang XCh., Chu XM.: Molecular immune mechanism of C phycocyanin from *Spirulina platensis* induces apoptosis in HeLa cells in vitro. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2006, 43: 155–164.
 26. Torres-Duran P.V., Ferreira-Hemosillo A., Juarez-Oropeza M.A.: Antihyperlipemic and antihypertensive effects of *Spirulina maxima* in an open sample of mexican population: a preliminary report. *Lipids in Health and Disease* 2007, 6: 33.
 27. Lee E.H., Park JE., Choi YJ., Huh KB., Kim WY.: A randomized study to establish the effects of *Spirulina* in type 2 diabetes mellitus patients. *Nutrition Research and Practice*, 2008, 2(4): 295–300.
 28. Kumar M., Sharma M.K., Kumar A.: *Spirulina fusiformis*: A food supplement against mercury induced hepatic toxicity. *Journal of Health Science* 2005, 51: 424–430.

Recepty lekarskie – zasady wystawiania. Część 4

Janusz Jaroszyński¹, Zofia Specht-Szwoch²

¹ Katedra i Zakład Zdrowia Publicznego – Uniwersytet Medyczny w Lublinie

² Wojewódzkie Centrum Onkologii w Gdańsku

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

Podstawa prawna

- 1) Ustawa z dnia 12 maja 2011 r. o refundacji leków, środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego oraz wyrobów medycznych (Dz.U. 2011 nr 122, poz. 696, z późn. zm.);
- 2) Ustawa z dnia 27 sierpnia 2004 r. o świadczeniach opieki zdrowotnej finansowanych ze środków publicznych (Dz.U. 2008 nr 164, poz. 1027, z późn. zm.);
- 3) Ustawa z dnia 6 września 2001 r. Prawo farmaceutyczne (Dz.U. 2008 nr 45, poz. 271, z późn. zm.);
- 4) Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 11 września 2006r. w sprawie środków odurzających, substancji psychotropowych, prekursorów kategorii I i preparatów zawierających te środki lub substancje (Dz.U. nr 169, poz. 1216, z późn. zm.);
- 5) Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 8 marca 2012 r. w sprawie recept lekarskich. (Dz.U. poz. 260, z późn. zm.).

Stan prawny na 10.09.2014 r.

Czy można zrealizować receptę, na której nie wpisano danych, wpisano je w sposób nieczytelny, błędny lub niezgodny z rozporządzeniem?

Receptę, na której nie zostały wpisane dane, wpisane w sposób nieczytelny, błędny lub niezgodny z rozporządzeniem osoba wydająca **może** zrealizować w następujących przypadkach:

- **Kod uprawnień dodatkowych pacjenta** – zostaje on określony przez osobę wydającą na podstawie odpowiednich dokumentów dotyczących pacjenta przedstawionych przez osobę okazującą receptę. Następnie osoba wydająca zamieszcza go na rewersie recepty oraz składa swój podpis i zamieszcza ten kod w komunikacie elektronicznym przekazywanym do oddziału wojewódzkiego Funduszu;

Issue of prescriptions – rules. Part 4 · In those articles the legal analysis were presented concerning the correct form of drugs prescribed by doctors employed in the hospitals or privately practicing. We discussed refundation method and legal, finansial and penal responsibility for the possible mistakes. Also the most common mistakes were pointed according to the medical documentation.

Keywords: prescriptions, mistakes, refundation.

© Farm Pol, 2014, 70(11): 615–618

- **Postać leku, środka spożywczego specjalnego przeznaczenia żywieniowego, wyrobu medycznego** – zostaje określona przez osobę wydającą na podstawie posiadanej wiedzy;
- **Dawka leku lub środka spożywczego specjalnego przeznaczenia żywieniowego** – przyjęcie przez osobę wydającą, że jest to najmniejsza dawka dopuszczona do obrotu na terytorium RP;
- **Sposób dawkowania** – możliwość wydania maksymalnie dwóch najmniejszych opakowań leku, środka spożywczego specjalnego przeznaczenia żywieniowego, wyrobu medycznego określonych w wykazie refundowanych leków, środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego, wyrobów medycznych, a w przypadku leków, wyrobów medycznych niepodlegających refundacji dwa najmniejsze opakowania dopuszczone do obrotu na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej;
- **Numer poświadczenia albo numer dokumentu uprawniającego do korzystania ze świadczeń opieki zdrowotnej** na podstawie przepisów o koordynacji oraz symbol państwa, w którym znajduje się zagraniczna instytucja właściwa dla osoby uprawnionej do świadczeń opieki zdrowotnej na podstawie przepisów o koordynacji – zostaje on ustalony przez osobę wydającą na podstawie

odpowiednich dokumentów dotyczących pacjenta przedstawionych przez osobę okazującą receptę, a następnie osoba wydająca zamieszcza numer tego poświadczenia lub dokumentu na rewersie recepty oraz składa swój podpis i zamieszcza ten numer w komunikacie elektronicznym przekazywanym do oddziału wojewódzkiego Funduszu

- **Data realizacji recepty „od dnia”** – przyjmuje się, że wpisano znak „X”;
- **Wiek** – w przypadku pacjenta do 18 roku życia, a wieku nie można ustalić na podstawie numeru PESEL, wówczas określa się go na podstawie innego dokumentu przedstawionego przez osobę okazującą receptę, a następnie osoba wydająca zamieszcza tę informację na rewersie recepty oraz składa swój podpis;
- **Odpłatność**
 - w przypadku gdy lek, środek spożywczy specjalnego przeznaczenia żywieniowego, wyrób medyczny występuje w jednej odpłatności w wykazie refundowanych leków, środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego, wyrobów medycznych i nie wpisano oznaczenia „X” albo „100%” – osoba wydająca wydaje lek, środek spożywczy specjalnego przeznaczenia żywieniowego, wyrób medyczny za odpłatnością dla tego leku, środka spożywczo specjalnego przeznaczenia żywieniowego, wyrobu medycznego określoną w tym wykazie;
 - w przypadku gdy lek, środek spożywczy specjalnego przeznaczenia żywieniowego, wyrób medyczny występuje w więcej niż jednej odpłatności w wykazie refundowanych leków, środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego, wyrobów medycznych i nie wpisano oznaczenia „X” albo „100%” – osoba wydająca wydaje lek, środek spożywczy specjalnego przeznaczenia żywieniowego, wyrób medyczny za najwyższą odpłatnością dla tego leku, środka spożywczo specjalnego przeznaczenia żywieniowego, wyrobu medycznego określoną w tym wykazie;
 - w przypadku gdy recepta zawiera kod uprawnienia dodatkowego pacjenta, osoba wydająca wydaje lek, środek spożywczy specjalnego przeznaczenia żywieniowego, wyrób medyczny za odpłatnością wynikającą z tego uprawnienia;
- **Numer prawa wykonywania zawodu osoby wystawiającej receptę** – zostaje określony na podstawie posiadanych danych dotyczących osoby wystawiającej receptę, a następnie osoba wydająca zamieszcza ten numer na rewersie recepty oraz składa swój podpis i zamieszcza go

w komunikacie elektronicznym przekazywanym do oddziału wojewódzkiego Funduszu;

- **Dane dotyczące osoby uprawnionej albo świadczeniodawcy** – zostają określone przez osobę wydającą na podstawie posiadanych danych, a następnie zamieszczone na rewersie recepty oraz potwierdzone podpisem i zamieszczone w komunikacie elektronicznym przekazywanym do oddziału wojewódzkiego Funduszu;
- **Dane pacjenta** – zostają one określone przez osobę wydającą na podstawie dokumentów dotyczących pacjenta przedstawionych przez osobę okazującą receptę. Następnie osoba wydająca zamieszcza go na rewersie recepty oraz składa swój podpis i zamieszcza ten kod w komunikacie elektronicznym przekazywanym do oddziału wojewódzkiego Funduszu;
- **Ilość leku, środka spożywczo specjalnego przeznaczenia żywieniowego, wyrobu medycznego** – przyjmuje się, że jest to jedno najmniejsze opakowanie określone w wykazie refundowanych leków, środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego, wyrobów medycznych, a w przypadku leków, środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego, wyrobów medycznych niepodlegających refundacji – jedno najmniejsze opakowanie dopuszczone do obrotu na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej. Osoba wydająca, określając sposób dawkowania i okres stosowania, przyjmuje obliczoną na tej podstawie ilość, jako ilość przepisana przez osobę wystawiającą receptę.

Należy zwrócić uwagę, iż w rozporządzeniu jest mowa o tym, że apteka może, ale nie musi zrealizować takiej recepty. W praktyce może się więc zdarzyć, że pacjenci odesłani z apteki będą wracali na ponowną wizytę celem naniesienia poprawek. Warto zwrócić uwagę na prawidłowy i zgodny z rozporządzeniem sposób wystawiania recept refundowanych.

(Podstawa prawna – § 16 ust. 1 Rozporządzenia Ministra Zdrowia w sprawie recepty).

Jeżeli z liczby, wielkości opakowań, liczby jednostek dawkowania oraz sposobu dawkowania, który został podany na receptce, wynikają rozbieżności co do ilości leku, środka spożywczo specjalnego przeznaczenia żywieniowego, wyrobu medycznego, wówczas osoba wydająca wydaje najmniejszą z nich.

(Podstawa prawna – § 16 ust. 2 Rozporządzenia Ministra Zdrowia w sprawie recepty).

Realizacji podlega także taka recepta, na której:

- nie wpisano lub wpisano w sposób błędny dane podmiotu drukującego;

- błędnie lub niezgodnie z rozporządzeniem wpisano adnotację na recepcie wystawionej dla siebie albo dla małżonka, zstępnych lub wstępnych w linii prostej oraz dla rodzeństwa;
- zawierającej inne niż określone w rozporządzeniu informacje lub znaki niestanowiące reklamy leków, środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego, wyrobów medycznych.

(Podstawa prawna – § 16 ust. 4 Rozporządzenia Ministra Zdrowia w sprawie recept).

Co to jest Charakterystyka Produktu Leczniczego i gdzie szukać informacji na ten temat?

Charakterystyka Produktu Leczniczego jest dokumentem niezwykle istotnym dla całego procesu leczenia pacjenta, ale przede wszystkim ważnym przy wystawianiu recepty refundowanej. Można bowiem spotkać się z różnymi sytuacjami dotyczącymi podstaw refundacji zawartych w Obwieszczeniu Ministra Zdrowia. Mogą to być zarówno „wszystkie zarejestrowane wskazania na dzień wydania decyzji” bądź też wskazania zawężone lub rozszerzone. Ustawa Prawo farmaceutyczne z 6 września 2001 r. stanowi w art. 23 ust. 2, iż wydanie pozwolenia jest tożsame z zatwierdzeniem Charakterystyki Produktu Leczniczego, ulotki oraz opakowań produktu leczniczego. Należy jednak zauważyć, że Charakterystyka Produktu Leczniczego to dokument przeznaczony przede wszystkim dla fachowego personelu medycznego natomiast ulotka adresowana jest do pacjenta.

Punkt 4.1 Charakterystyki Produktu Leczniczego zawiera wskazania do stosowania danego produktu leczniczego, podobnie punkt „Jak stosować” ulotki dla pacjenta. Każda zmiana w Charakterystykach wprowadzana jest po zatwierdzeniu takiej zmiany. Wszystkie dane zawarte w Charakterystyce Produktu Leczniczego są jawne na podstawie art. 11 ust. 5 Prawa farmaceutycznego.

W związku z powyższym Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych umieścił na swojej stronie internetowej (www.urpl.gov.pl) wykaz Charakterystyk Produktów Leczniczych wszystkich refundowanych produktów leczniczych, w tym także tych, które są dopuszczone do obrotu przez Komisję Europejską na terenie UE w tzw. procedurze centralnej. Ma to na celu ułatwienie dostępu do przedmiotowych charakterystyk osobom wykonującym zawód medyczny. Leki można wyszukiwać, wpisując zarówno nazwę handlową, nazwę substancji czynnej lub kod EAN.

(Podstawa prawna – Ustawa z dnia 6 września 2001 r. Prawo farmaceutyczne).

Źródło: Komunikat Prezesa Urzędu Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych z dnia 11 stycznia 2012 r.

Jakie zmiany wprowadza Rozporządzenie Ministra Zdrowia z 21 sierpnia 2014 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie środków odurzających, substancji psychotropowych, prekursorów kategorii 1 i preparatów zawierających te środki lub substancje w odniesieniu do recept?

Najważniejsze zmiany dotyczą:

1. Określenia sumarycznej ilości środka odurzającego lub substancji psychotropowej wyrażonej słownie albo ilość środka odurzającego lub substancji psychotropowej wyrażoną słownie za pomocą ilości jednostek dawkowania oraz wielkości dawki.

§ 6 ust. 1 Rozporządzenia

„Recepta wystawiona na preparaty zawierające środki odurzające lub substancje psychotropowe zawiera, oprócz danych określonych w przepisach wydanych na podstawie art. 45 ust. 5 ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentystry, sumaryczną ilość środka odurzającego lub substancji psychotropowej wyrażoną słownie albo ilość środka odurzającego lub substancji psychotropowej wyrażoną słownie za pomocą ilości jednostek dawkowania oraz wielkości dawki.”

2. Wydłużenia czasu na jaki jednorazowo może być dokonana preskrypcja z miesiąca do 90 dni.

§ 7 Rozporządzenia

„1. Recepta wystawiona na preparaty zawierające środki odurzające grupy I-N oraz substancje psychotropowe grupy II-P może dotyczyć takiej ilości środka lub substancji, która nie przekracza zapotrzebowania pacjenta **na maksymalnie 90 dni** stosowania.

2. Na preparaty zawierające środki odurzające grupy I-N oraz substancje psychotropowe grupy II-P można wystawić do 3 recept na następujące po sobie okresy stosowania nieprzekraczające łącznie 90 dni stosowania.

3. Na recepcie, o której mowa w ust. 1, podaje się sposób dawkowania przepisanych środków odurzających lub substancji psychotropowych.

4. Jeżeli ze wskazanego przez osobę wystawiającą receptę sposobu dawkowania nie można obliczyć sumarycznej ilości przepisanych środków odurzających lub substancji psychotropowych, osoba wydająca przyjmuje, że są to dwa najmniejsze opakowania określone w wykazie określonym w obwieszczeniu,

o którym mowa w art. 37 ust. 1 ustawy z dnia 12 maja 2011 r. o refundacji leków, środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego oraz wyrobów medycznych (Dz.U. nr 122, poz. 696, z późn. zm.), a w przypadku leków niepodlegających refundacji – dwa najmniejsze opakowania dopuszczone do obrotu na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej”.

3. Realizacja recept

§ 10 Rozporządzenia

- „1. Recepty, na których przepisano preparaty zawierające środki odurzające grupy I-N lub substancje psychotropowe grupy II-P są realizowane nie później niż w ciągu **30 dni** od daty ich wystawienia”.

Powyższe zmiany wynikają z faktu, iż pacjenci zapisywali się na wizytę lekarską wyłącznie z uwagi na wystawienie kolejnych recept na te same produkty lecznicze, zwiększając tym samym kolejki do specjalistów. Wydłużenie czasu, na jaki jednorazowo może być dokonana preskrypcja ma za zadanie nie tylko odciążenie pacjenta od zbyt częstych wizyt, ale również pozwoli lekarzowi na poświęcenie

czasu pacjentom, którzy oprócz wystawienia recepty wymagają również badania fizykalnego. Niemniej jednak należy podkreślić, że to lekarz będzie decydował, na jak długi okres może pacjentowi zalecić farmakoterapię. Czas farmakoterapii został wydłużony. Termin ważności recepty zmieniono z **14 na 30 dni**.

Umożliwiono dodatkowo wpisywanie słownie ilości środka odurzającego lub substancji psychotropowej za pomocą ilości jednostek dawkowania oraz wielkości dawki.

(Podstawa prawna – Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 21 sierpnia 2014 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie środków odurzających, substancji psychotropowych, prekursorów kategorii 1 i preparatów zawierających te środki lub substancje – Dz.U. poz. 1172).

Powyższe rozporządzenie wchodzi w życie 18 września 2014 r.

Otrzymano: 2014.07.18 · Zaakceptowano: 2014.08.10

Przedruk z Pulsu 2014.4.

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

Cyklooksygenaza – znaczenie w biotechnologii, medycynie i farmacji

Małgorzata Duda¹, Paweł Olczyk², Agnieszka Fenig³, Katarzyna Komosińska-Vassev⁴

¹ Farmacol DS

² Zakład Farmacji Aptecznej Katedry Farmacji Stosowanej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

³ Szpital Powiatowy im. Jana Pawła II, Zakład Opieki Zdrowotnej we Włoszczowie

⁴ Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Adres do korespondencji: Małgorzata Duda, ul. Dąbskiego 3/61, 41-310 Dąbrowa Górnicza, e-mail: malgorzataduda@interia.eu

Formy molekularne cyklooksygenazy – wprowadzenie

Cyklooksygenaza jest podstawowym enzymem w procesie syntezy prostanoidów – prostaglandyn, prostacyklin oraz tromboksanów [1].

COX występuje w nomenklaturze enzymów jako syntaza cyklicznego nadtlenu prostaglandynowego. Należy przy tym podkreślić, iż syntaza ta ma dwie odmienne aktywności enzymatyczne – cyklooksygenazy i peroksydazy. Substratem dla cyklooksygenazy są nienasycone kwasy tłuszczowe uwalniane z błon komórkowych przy udziale fosfolipazy: kwas dihomog- γ -linoleinowy, α -linoleinowy, eikozapentanowy oraz przede wszystkim arachidonowy. Aktywność cyklooksygenazowa odpowiada za cyklizację kwasu arachidonowego do labilnego, cyklicznego 15-hydroksynadtlenku – prostaglandyny G₂ (PGG₂), jak również za podwójną jego oksydację w pozycji 9-11. COX zapoczątkowuje zatem kaskadę reakcji prowadzących do otrzymania związków, które jako centralny element struktury zawierają kwas prostanowy. Aktywność peroksydazowa COX ujawnia się w drugim etapie procesu syntezy prostanoidów – powstania prostaglandyny H₂ (PGH₂) w wyniku redukcji PGG₂ w obrębie grupy 15-hydroksynadtlenkowej. Dalsze działanie swoistych syntaz warunkuje powstanie prostaglandyn D, F, E, prostacykliny (PGI₂) i tromboksanu A₂ (TXA₂) [1-4]. Uproszczony szlak syntezy eikozanoidów przedstawiono na **rycynie 1**.

Dotychczas zidentyfikowano trzy formy cyklooksygenazy – COX-1, COX-2 oraz COX-3. Cyklooksygenazę po raz pierwszy opisano w 1976 r., zaś dwanaście lat później określono jej sekwencję DNA. Przestrzenną strukturę określono dwadzieścia lat

Cyclooxygenase – significance in the field of biotechnology, medicine and pharmacy

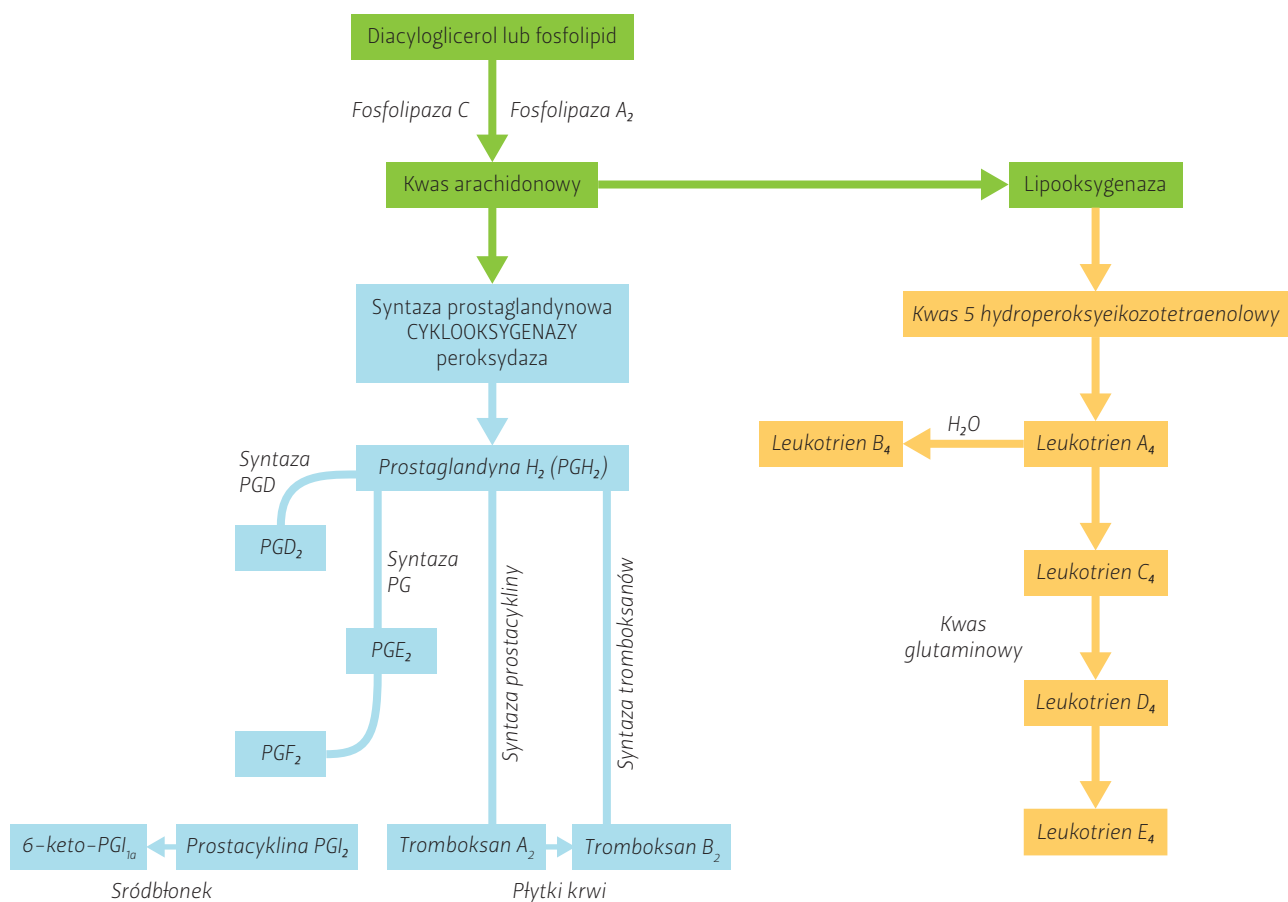
Cyclooxygenase (COX) is an enzyme involved in the synthesis of eicosanoids. There are three major isoenzymes COX – constitutive form (COX-1), inducible form (COX-2), and – least understood – central nervous system form (COX-3). The Constant expression of COX-1 is responsible for the correct course of many physiological processes. The inducible form plays a special role during pathological states. The presence of COX-3 has been demonstrated physiologically especially in the central nervous system. There are also partial forms of COX-1 and COX-2, the importance of which is not yet understood. Cyclooxygenase may be an extremely important marker in the assessment of many diseases development process. Moreover, widely used in clinical practice are COX inhibitors – nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Detailed knowledge of cyclooxygenases mechanism of action and the correlation of their expression with the pathological conditions, may help to introduce new diagnostic and therapeutic alternatives.

Keywords: COX-1, COX-2, COX-3, NSAIDs, prostanooids, arachidonic acid, wounds.

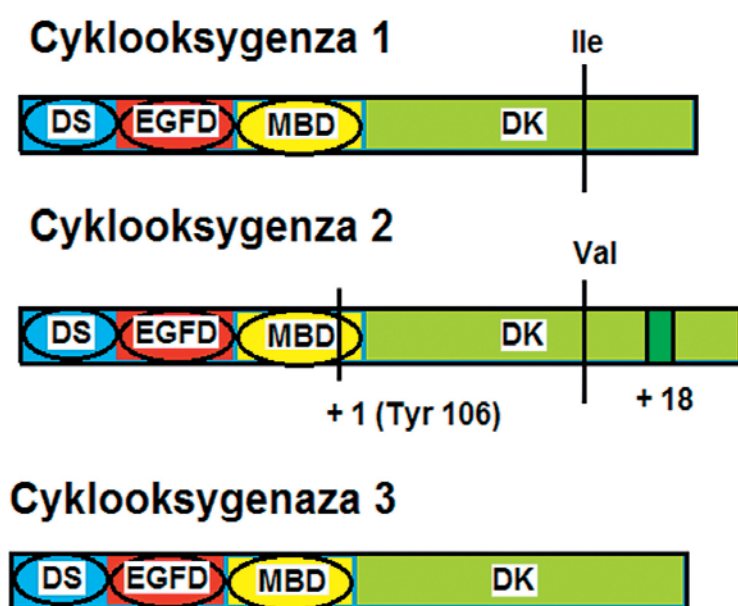
© Farm Pol, 2014, 70(11): 619–628

po odkryciu enzymu. Zasadniczą lokalizacją COX w komórce jest błona retikulum endoplazmatycznego oraz jądro komórkowe [6].

Cyklooksygenaza-1 jest konstytutywną formą enzymu, której obecność została potwierdzona w większości komórek. Cyklooksygenaza-2 jest formą indukowaną, której zwiększoną ekspresję indukują czynniki zapalne oraz stres. Niemniej jednak występowanie COX-2 stwierdza się również fizjologicznie w wielu narządach. Cyklooksygenaza-3 jest wreszcie najmniej poznaną formą enzymu, której obecność stwierdza się w ośrodkowym układzie nerwowym [1].



Rycina 1. Synteza eikozanoidów (PGD₂ – prostaglandyna D₂, PGE₂ – prostaglandyna E₂, PGF₂ – prostaglandyna F₂) [1, 5–7, w modyfikacji własnej]

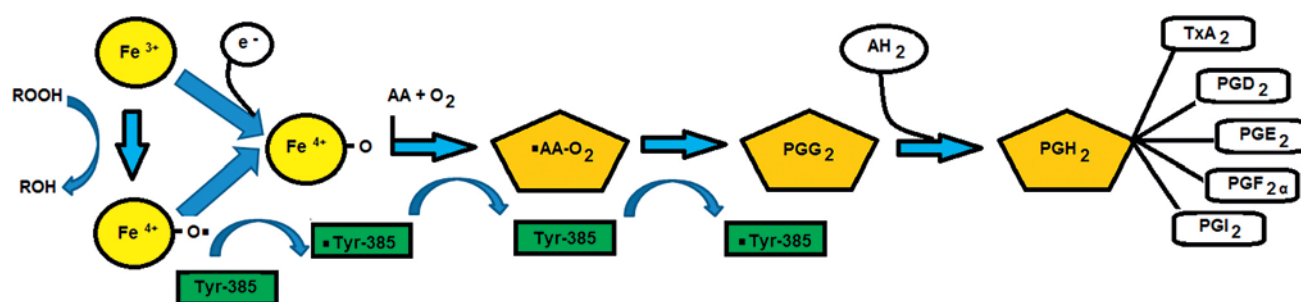


Rycina 2. Struktura pierwszorzędowa izoenzymów COX (DS – domena sygnałowa, EGFD – domena przypominająca naskórkowy czynnik wzrostu, MBD – domena łącząca z błoną jądrową, DK – domena katalityczna) [1, w modyfikacji własnej]

U człowieka gen kodujący COX-1 jest zlokalizowany na 9 chromosomie (11 eksonów, 22 kb, lokalizacja: chr 9q32–q33.3), natomiast kodujący COX-2 znajduje się na chromosomie 1 (10 eksonów, 8,3 kb, lokalizacja: chr 1q25.2–q25.3) i jest zaliczany do genów podstawowego cyklu komórkowego [8]. Gen kodujący COX-3 zlokalizowany jest na chromosomie 9 (5.2 kb, lokalizacja: chr 9q32–q33.3) [1, 8, 9].

Pomiędzy tymi genami wykazano polimorfizm pojedynczych nukleotydów, który warunkuje odmienną funkcję obu izoenzymów (COX-1 i COX-3) oraz odmienną odpowiedź na leki hamujące ich aktywność [10, 11]. COX-3 jest kodowany przez gen PTGS1 – ten sam gen, co COX-1, jednak wówczas zachowany zostaje 31-aminokwasowy intron białkowy [1]. Uważa się, że COX-3 jest posttranskrypcyjną modyfikacją COX-1, choć nie wyklucza się również powiązania z COX-2 [1, 12–14].

Mejza i Nizankowska stwierdzili, że ekspresja genu kodującego COX-1, zaliczanego do tzw. genów cytohomeostatycznych (ang. housekeeping genes), jest stała i podlega niewielkiej regulacji przez czynniki wewnątrzkomórkowe. Gen ten nie posiada sekwencji regulatorowych TATA w rejonie 5', ale cechują go liczne miejsca inicjacji transkrypcji. Z kolei



Rycina 3. Schemat mechanizmu reakcji cyklooksyzgenazy. COX uczestniczy w postawianiu PGH_2 na drodze dwuetapowej reakcji chemicznej, zachodzącej z udziałem aktywności cyklooksyzgenazy i peroksydazy. PGH_2 jest następnie przekształcany przez enzymy specyficzne tkankowo do innych prostanoidów (AA – aminokwas, PGD_2 – prostaglandyna D_2 , PGE_2 – prostaglandyna E_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ – prostaglandyna $\text{F}_{2\alpha}$, PGG_2 – prostaglandyna G_2 , PGH_2 – prostaglandyna H_2 , PGI_2 – prostaglandyna I_2 , Tyr – tyrozyna, TxA_2 – tromboksan A_2) [17, w modyfikacji własnej]

ekspresja genu COX-2 pobudzana jest przez szereg czynników – m.in. czynniki wzrostu, mediatory zapalenia, lipopolisacharydy, czynniki transkrypcyjne oraz produkty białkowe onkogenów [15, 16]. Zahamowanie ekspresji tego genu obserwuje się pod wpływem glikokortykosteroidów oraz interleukiny 4 i 10 [1].

Łańcuch białka COX-1 ma masę cząsteczkową 70 kDa i składa się z 599 reszt aminokwasowych, zaś COX-2 – z 604 reszt aminokwasowych i waży ok. 72 kDa. Białko COX-3 zawiera 633 aminokwasy, a jego masa wynosi ok. 65 kDa [1, 7].

W pierwszorzędowej strukturze izoenzymów COX wyróżnia się: domenę sygnałową (*signal domain*, DS), domenę przypominającą naskórkowy czynnik wzrostu (*epidermal growth factor-like domain*, EGFD), domenę łączącą z błoną komórkową (*membrane binding domain*, MBD) oraz domenę katalityczną, co pokazuje **rycina 2**.

Najbardziej znaczącą różnicą w budowie COX-3 w porównaniu do pozostałych izoenzymów jest zachowanie peptydu sygnałowego (DS) podczas modyfikacji potranslacyjnych oraz obecność intronu białkowego, liczącego 30–34 aminokwasy [6].

Pełna zgodność sekwencji aminokwasowej między ludzkimi COX-1 i COX-2 sięga 63%, a w 78% uważa się ją za zbieżną (różnice dotyczą jedynie pojedynczych aminokwasów). Zgodność sekwencji między białkami COX u człowieka i innych ssaków sięga ok. 85%, zaś u człowieka i innych kręgowców ok. 65%. COX-3 zachowuje cechy katalityczne COX-1 oraz COX-2 [1]. Pomimo znacznego podobieństwa w pierwszorzędowej strukturze oraz przestrzennej budowie cząsteczek białek COX, reaktywność enzymów COX-1 oraz COX-2 w stosunku do substratów oraz inhibitorów jest znaczna. Substratami dla ludzkiego COX są: kwas dihomog- γ -linoleinowy, kwas arachidonowy, kwas α -linoleinowy oraz eikozapentanowy. W przypadku badań doświadczalnych COX-1 z zastosowaniem owczego modelu zwierzęcego (najlepiej poznany

izoenzymem COX) kwas arachidonowy łączy się z tyrozyną w pozycji 385 (Tyr385) i arginina w pozycji 120 (Arg120) łańcucha białka. W przypadku mysiego izoenzymu COX-2 ten sam substrat wiąże się z tyrozyną i glicyną, w pozycjach 348 (Tyr348) i 533 (Gly533). Kwas dihomog- γ -linoleinowy łączy się z owczym COX-1 w pozycji Val349, Try387 i Leu534 [1]. Powyższe przemiany przedstawia **rycina 3**.

Należy również zaznaczyć istnienie tzw. partial COX-1 oraz COX-2, czyli form częściowych, nazywanych również połączonymi odmianami COX. W grupie COX-1 wyróżnia się: COX-1_{SNP}, PCOX-1_a, PCOX-1_b, COX-1V₁. W grupie COX-2 zidentyfikowano COX-2SNP oraz COX-2V₁ [10].

Znaczenie COX-1

COX-1 dzięki regulacji syntezy prostanoidów odpowiada za utrzymanie prawidłowej funkcji narządów wewnętrznych oraz układów: krążenia, moczowego, nerwowego, oddechowego, pokarmowego oraz rozrodczego [6, 18].

Fizjologiczną ekspresję genów kodujących COX-1 wykazano w błonie śluzowej układu pokarmowego. Dodatkowo, stałą ekspresję COX-1 stwierdza się w trzustce ludzkiej oraz w kryptach jelitowych u myszy [1].

Ocena immunoekspresji COX-1, ale także COX-2 (uczestniczącego w syntezie – nasilającego agregację płytek krwi – TxA_2) uważana jest za cenny wskaźnik diagnostyczny w ocenie uszkodzenia ściany naczyń krwionośnych oraz serca.

Obecność COX-1 stwierdza się również w obrębie górnych i dolnych dróg oddechowych oraz w opłucnej [1].

W układzie moczowym wykryto stałą ekspresję COX-1 w śródbłonku naczyń tętniczych, mięśniach gładkich tętnic i żył, w komórkach nabłonkowych kanalików zbiorczych oraz komórkach śródmiąższowych kory i rdzenia nerki [1].

W układzie rozrodczym aktywność COX-1 została stwierdzona w większości wewnętrznych oraz zewnętrznych narządów płciowych. Stała ekspresja zachodzi również w niezapłodnionej macicy [19]. Chakraborty i wsp. przeprowadzili badania doświadczalne na modelu mysim, które udowodniły istotne obniżenie ekspresji COX-1 po zetknięciu się zapłodnionego jaja z błoną śluzową macicy [19]. Ekspresja COX-1 w trakcie trwania ciąży jest relatywnie słaba i nie wykazuje istotnej korelacji z wiekiem ciąży. Obecność COX-1 stwierdzono ponadto w nabłonku owodni oraz w mezodermie kosmówki [1]. Znajomość poziomu ekspresji COX-1 jest istotna, bowiem zaburzenia fizjologicznej aktywności COX-1 w tkankach płodu mogą prowadzić do powstania wad wrodzonych, takich jak przepuklina pępkowa czy przeponowa, wytrzewienia, ubytek przegrody międzykomorowej serca, o czym wspominało wielu autorów prac doświadczalnych [1, 20, 21].

W przypadku układu nerwowego należy analizować ekspresję wszystkich trzech izoform (COX-1, COX-2 oraz COX-3). Ekspresja COX-1 jest największa w obrębie kresomózgowia oraz międzymózgowia [1].

Zwiększona immunoekspresja tej formy COX została również stwierdzona w zmianach patologicznych – w tym w komórkach śródbłonka i miocytach w bezpośrednim sąsiedztwie blaszek miażdżycowych oraz samych zmian [22, 23]. Wzrost ekspresji COX-1 zaobserwowano również w przebiegu chorób reumatycznych – w komórkach błony maziowej stawów, objętych procesem zapalnym [7, 24].

Aktualnie istotnym problemem jest walidacja technik pomiaru aktywności cyklooksygenazy. Opisywane procedury oznaczania aktywności różnych podjednostek COX-1 charakteryzują się różnorodnością warunków pomiarów w zakresie temperatury pomiaru, stosowanego stężenia enzymu, ewentualnej jego preinkubacji, rodzaju buforu i innych czynników, wpływających na przebieg reakcji enzymatycznej. Konieczne są zatem dalsze badania, które sprecyzują warunki oznaczania aktywności poszczególnych podjednostek COX-1 [25].

Znaczenie COX-2

Przez długi czas indukowana cyklooksygenaza była utożsamiana wyłącznie z odpowiedzią na stres oraz na czynniki, które inicjują zapalenie. Cyklooksygenaza-2 bez wątpienia odgrywa kluczową rolę w procesach zapalnych [22]. Fizjologicznie stwierdzono jednak jej obecność u dorosłych osobników w mózgu, rdzeniu kręgowym oraz nerwie, łożysku oraz w chrząstce, nerwie, płucach, sercu i skórze płodu [4, 26, 27, 28]. Dowiedziono także, iż udział COX-2 w metabolizmie endokannabinoidów

zwiększa złożoność kontroli nad procesami zapalenia [2].

Zwiększenie ekspresji COX-2 wiąże się ze wzrostem adhezji komórkowej, zmian fenotypowych, odpornością komórek guza na apoptozę oraz zwiększeniem angiogenezy [29].

Fux i wsp. wykazali zwiększoną ekspresję COX-2 w gruczolakach i rakach gruczołowych jelit [30]. W warunkach fizjologicznych aktywność omawianego enzymu w błonie śluzowej żołądka jest niewielka. Selektywną ekspresję COX-2 zaobserwowano natomiast w komórkach wysp trzustkowych [1].

Cyklooksygenaza-2 jest obecna w śródbłonku naczyń i odpowiada za syntezę prostacykliny. Uważa się, że ta forma COX bierze również udział w procesie gojenia ran, co zostanie szerzej omówione w dalszej części [1].

Harris i wsp. wykryli białko COX-2 w aparacie przykłębuszkowym, komórkach nabłonka nefronu oraz komórkach śródmiąższowych brodawki nerkowej [31]. Komhoff i wsp. wykazali ekspresję COX-2 w podocytach [33].

McKanna i wsp. zaobserwowali obecność omawianego COX-2 w nabłonku części dystalnej nasieniowodu [18]. Ekspresja COX-2 warunkuje prawidłową owulację. Badania Siroisa i wsp., które przytacza również Burdan, przeprowadzone na modelu zwierzęcym, wykazały, iż pozbawienie genu COX-2 zaburza proces uwalniania komórki jajowej, przy zachowaniu prawidłowej oogenezy [1]. Aktywność COX-2 jest odpowiedzialna za angiogenezę oraz rozpoczęcie formowania łożyska. Ekspresji COX-2 nie obserwuje się w trofoblaście, została ona jednak wykazana w nabłonku owodni, warstwie siatkowatej kosmówki oraz doczesnej [1]. Wzrost aktywności COX-2 koreluje z wiekiem ciążowym. Istotna ekspresja indukowanej cyklooksygenazy podczas ciąży pojawia się stosunkowo późno, w związku z czym selektywne zahamowanie aktywności tej postaci prowadzi głównie do zaburzeń rozwojowych, takich jak wewnątrzmaciczne zahamowanie wzrostu płodu, które w późniejszym okresie ciąży oraz postnatalnym okresie rozwoju dziecka są odwracalne. W okresie poprzedzającym rozwiązanie oraz w trakcie porodu obserwuje się spadek ekspresji COX-2 [1, 8]. Dodatkowo stwierdza się zwiększenie ekspresji indukowanej cyklooksygenazy podczas jajeczkowania, zapłodnienia, zagnieżdżenia się blastocysty, jak również oddzielania się błony śluzowej podczas krwawienia miesiączkowego [1].

Należy również wspomnieć o ekspresji COX-2 w układzie oddechowym. U osób dorosłych, w warunkach fizjologicznych pozostaje ona na niewielkim poziomie, ograniczając się głównie do nabłonka drzewa oskrzelowego oraz pęcherzyków płucnych.

Istotny bywa jednak wzrost ekspresji, który towarzyszy zapaleniom oraz zmianom rozrostowym tkanki płucnej [1].

Fizjologiczna ekspresja COX-2 jest obserwowana w przodomózgowiu oraz rdzeniu kręgowym. Największy poziom obserwowano w obrębie zwojów korzeni grzbietowych nerwów rdzeniowych, rogach przednich oraz tylnych istoty szarej rdzenia. Dodatkowo stałą ekspresję, niezależną od umiejscowienia obserwuje się w astrocytach. Czynniki zwiększającymi syntezę tego enzymu są: stres, stany zapalne, choroby zwyrodnieniowe oraz choroby nowotworowe [3].

Izoenzymy COX wykryto ponadto w obrębie różnych tkankach oka. Ekspresja COX-2 jest powszechnie obserwowana w normalnych tkankach oka, ale wyraźny jej wzrost jest zauważalny podczas stanów patologicznych, takich jak zapalenie oka lub jego uraz [33].

Opisana została także rola cyklooksygenazy-2 w epilepsji. Enzym COX-2 jest gwałtownie indukowany podczas drgawek. Zwiększona ekspresja COX-2 w określonych obszarach mózgu podczas napadu padaczkowego może posłużyć identyfikowaniu regionów odpowiedzialnych za wystąpienie napadu. Inhibitory COX-2 mogą stanowić szansę jako środki terapeutyczne w leczeniu padaczki, stanów zapalnych mózgu oraz neurodegeneracyjnych [34].

Nadekspresja COX-2 prowadzi do powstania oraz rozwoju raka poprzez wpływ na apoptozę, neoangiogenezę, tworzenie przerzutów czy układ immunologiczny. Nadekspresja COX-2 hamuje apoptozę na drodze wzrostu aktywności białka antyapoptycznego BCL-2 oraz aktywacji szlaku kinazy serotoninowo-treoninowej. Wpływa ona również na stężenie oraz stabilizację surwiwiny (uniemożliwienie aktywacji kaspaz), co w rezultacie zwiększa oporność na apoptozę [7]. Dowiedzono ponadto, iż zahamowanie aktywności COX-2 może przeciwdziałać nieprawidłowej metylacji, co stanowi kluczowy element w ścieżce kancerogenezy [35].

Wzrost aktywności COX-2 stanowi kluczowy element w łańcuchu zmian prowadzących do powstania nowotworu. Poziom tej nadekspresji może być potencjalnym biomarkerem selekcyjnym chorých, dla których leczenie inhibitorami cyklooksygenazy mogłoby zostać wykorzystane w terapii przeciwnowotworowej [7]. Właściwość ta może okazać się pomocnym narzędziem terapeutycznym w walce z nowotworami, zapewniając alternatywne metody prewencji oraz walki z nowotworami.

Mało poznana COX-3

Cyklooksygenaza-3, określana jako izoforma ośrodkowa, jest najmniej poznaną formą COX. Jej gen zlokalizowany jest na chromosomie 9.

COX-3 wykazuje duże podobieństwo do COX-1, z tą różnicą, iż w przypadku COX-3 zachowany zostaje intron białkowy, zbudowany z 31 aminokwasów [1].

W jednym z badań Chandrasekharana dotyczących COX-3 udało się wyizolować mRNA u psa. Stwierdzono, że jego wielkość przewyższa wielkość transkryptu mRNA COX-1 i COX-2 u ludzi. Cechą różnicującą COX-3 od pozostałych izoenzymów jest również nieodłączenie peptydu sygnałowego podczas modyfikacji potranslacyjnych. Zbliżoną budowę do COX-3 stwierdza się w przypadku tzw. częściowych COX-1 [1].

Immunoekspresja COX-3 została wykazana głównie w obrębie ośrodkowego układu nerwowego, co zostało potwierdzone w licznych badaniach [1, 6, 12, 13, 36]. Wykryto ją w obrębie podwzgórza i rdzenia kręgowego. Chandrasekharan i wsp. stwierdzili obecność COX-3 także w ścianie aorty [37].

Selektywnym inhibitorem COX-3 jest paracetamol, w związku z czym enzym ten wydaje się być integralnym składnikiem bramki analgetycznej w rdzeniu kręgowym. Paracetamol jest pochodną acetanilidu. W odróżnieniu do innych NLPZ, wykazuje bardzo słabe działanie przeciwzapalne. Istotną zaletą jest fakt, iż stosowanie paracetamolu nie zaburza procesów krzepnięcia krwi. Ciekawe jest również to, że krótkotrwale stosowanie paracetamolu podnosi poziom serotoniny we krwi, a długotrwale go obniża [1, 12].

Inhibitory COX

Znaczenie cyklooksygenaz w farmacji nierozłącznie wiąże się z lekami, będącymi inhibitorami tych enzymów. Leki z grupy NLPZ cechować może działanie przeciwzapalne, przeciwbólowe oraz przeciwgorączkowe. Leki te są szeroko stosowane w dzisiejszym świecie medycyny. Są przedmiotem intensywnych badań z dziedziny farmacji, dotyczących projektowania syntezy nowych leków przeciwzapalnych oraz badania nieznanych dotychczas kierunków ich działań farmakologicznych. Podział inhibitorów COX przedstawia **tabela 1** [6, 38].

Tabela 1. Klasyfikacja NLPZ [6, 38–40]

Działanie na enzym	Wybrane leki
COX-1 selektywne (COX-1 specyficzne)	acemetacyna, flurbiprofen, indometacyna, ketoprofen, ketorolak, kwas acetylosalicylowy (ASA), kwas tiaprofenowy, suprofen
COX nieselektywne (COX niespecyficzne)	diflunisal, diklofenak, etofenamat, ibuprofen, fenoprofen, kwas nifluminowy, kwas mefenamonowy, kwas tolfenamowy, meklofenamat, metamizol, nabumeton, naproksen, nepafenak, piroksydam, salicylan sodu, sulindak
COX-2 selektywne (COX-2 preferencyjne)	aceklofenak, celekoksyb, etodolak, meloksydam, nabumeton, nimesulid
COX-2 wysoce selektywne (COX-2 specyficzne)	etorykoksyb, lumirakoksyb, parekoksyb, rofekoksyb, waldekoksyb
COX-3	paracetamol

Czynniki, które uszkodzają błonę komórkową przyczyniają się do aktywacji fosfolipazy A_2 . Rozkłada ona fosfolipidy błonowe do kwasu arachidonowego, który uczestniczy w kaskadzie reakcji prowadzących do powstania cyklooksygenazy oraz lipooksygenazy. Szlak ten jest regulowany przez COX i skutkuje wytworzeniem mediatorów stanu zapalnego – prostaglandyn, prostacyklin i tromboksanu. NLPZ hamują aktywność COX poprzez wyciszenie produkcji prozapalnych prostanoidów. Fosfolipaza błonowa stanowi punkt uchwytu kortykosteroidów i nie dopuszcza do powstania kwasu arachidonowego. Brak podstawowego substratu uniemożliwia syntezę cyklooksygenazy i uruchomienie dalszej kaskady prozapalnych przemian [39].

Inhibitory COX możemy zatem podzielić na inhibitory COX-1, inhibitory COX-2 oraz COX-3. Do inhibitorów COX-1 zaliczamy kwas acetylosalicylowy, który wykazuje większą selektywność w stosunku do COX-1 niż COX-2. Małe dawki ASA całkowicie oraz nieodwracalnie blokują płytkową produkcję tromboksanu A_2 . Wynikiem jest skuteczna pierwotna i wtórna prewencja incydentów sercowo-naczyniowych. Z kolei działanie selektywnych inhibitorów COX-2 jest wybiórcze, bowiem nie wywołują one efektu antyagregacyjnego, zależnego od blokowania tromboksanu A_2 , a co z tym związane – leki te, popularnie zwane koksymbami, nie wykazują działania kardioprotekcyjnego. Ich skuteczność wykazano natomiast w leczeniu chorób reumatycznych o charakterze zapalnym. Wybiórczo hamują one syntezę prostaglandyn, jako mediatorów odczynu zapalnego. Ta grupa leków przeciwdziała rozwojowi angiogenezy, co może mieć zastosowanie w hamowaniu progresji niektórych nowotworów [23].

Powszechnie wiadomo, że u osób starszych, osób z chorobą wrzodową, leczonych glikokortykosteroidami, ASA, antykoagulantami, czy też osób nadużywających alkoholu – stosowanie NLPZ może wiązać się ze zwiększonym ryzykiem krwawień z układu pokarmowego. Tu korzystnie wypadają koksymby, których stosowanie koreluje z niskim poziomem powikłań tego typu. Z drugiej strony, u starszych pacjentów, z zaawansowanym stopniem rozwoju miażdżycy, przewlekła terapia koksymbami może wiązać się ze wzrostem ryzyka aktywacji płytek krwi [23, 40].

Stosowanie selektywnych inhibitorów COX-2 powoduje zahamowanie syntezy PGI_2 , w wyniku czego dochodzi do zaburzenia równowagi między prostanoidami. Może to powodować wykrzepianie wewnątrznaczyniowe. Powikłania zakrzepowo-zatorowe były często obserwowane podczas stosowania celekoksibu i rofekoksibu [41]. Co ciekawe, powikłania takie występują rzadziej u pacjentów przyjmujących nieselektywne inhibitory COX, co wynika z jednoczesnego blokowania przez nie

COX-1 w płytkach krwi [42]. W trakcie badań doświadczalnych wykazano również, że niektóre inhibitory COX, w tym inhibitory selektywnie hamujące COX-2, gdy wiążą się z centrum aktywnym COX, uniemożliwiają przyłączenie do niego ASA, stosowanego dosyć powszechnie w profilaktyce przeciwzakrzepowej [43].

Działanie inhibitorów cyklooksygenazy dotyczy także nerek. Spośród prostanoidów największą aktywność w nerce wykazuje PGE_2 , która syntetyzowana jest przez komórki śródmiąższowe oraz PGI_2 , która powstaje w śródbłonku naczyń i kłębuszków, a w mniejszym stopniu $PGF_{2\alpha}$. Wyniki badań doświadczalnych i klinicznych z różnymi inhibitorami COX dowiodły, iż substancje te, hamując syntezę prostaglandyn, obniżają przepływ krwi przez nerki i filtrację kłębuszkową. PGE_2 zmniejszają dodatkowo absorpcję sodu, a łącznie z PGI_2 pośredniczą w uwalnianiu reniny i aktywacji szlaku renina-angiotensyna-aldosteron [1].

Selektywne i nieselektywne inhibitory COX mają wielokierunkowe działanie biologiczne. Z jednej strony mogą bowiem negatywnie wpływać na śluzówkę przewodu pokarmowego (krwawienia, perforacje), z drugiej zaś mogą wykazywać działanie kardioprotekcyjne. Selektowne inhibitory COX-2 działają bardziej prozakrzepowo, przy jednoczesnym niskim ryzyku krwawień z układu pokarmowego.

Ekspresja COX-2 warunkuje prawidłową owulację. Stosowanie inhibitorów COX przyczynia się do jej zaburzeń. Ekspresja COX-2 została wykazana w komórkach nabłonkowych dystalnej części jajodra u mysiego modelu doświadczalnego oraz w pęcherzykach nasiennych w przypadku modelu małpiego. Silną ekspresję COX stwierdzono w trzonie macicy. Aktywność COX-2 odpowiada za angiogenezę oraz rozpoczęcie formowania łożyska [44].

Niesteroidowe leki przeciwzapalne oprócz działania przeciwbólowego i przeciwzapalnego mogą również działać wspomagająco w terapiach przeciwnowotworowych. Mechanizm ich działania prowadzi do zmniejszenia kancerogenezy poprzez inicjowanie apoptozy i hamowanie angiogenezy. Aktualne badania wskazują na możliwy znacznie szerszy zakres działania tej grupy związków [45]. Badania te wskazują na przykład na możliwość włączenia NLPZ do terapii przeciwnowotworowych, co daje szansę na zwiększenie skuteczności leczenia pacjentów z chorobą nowotworową, z jednoczesnym zmniejszeniem działań niepożądanych. Jednym z mechanizmów, poprzez który leki z tej grupy mogą zmniejszać kancerogenezę, jest zahamowanie aktywności cyklooksygenazy-2. COX-2 ulega nadekspresji w różnych tkankach nowotworowych. Enzym ten sprzyja proliferacji komórek, hamuje apoptozę, zwiększa zdolność do naciekania limfocytami T oraz angiogenezę [45]. Jednocześnie należy zaznaczyć, że selektywne

inhibitory COX-2 mogą również działać poprzez mechanizmy niezależne od cyklooksygenazy, a co z tym związane, oddziaływać na różne szlaki przekazywania sygnału w komórce [45]. Dotychczas przeprowadzone badania z udziałem inhibitorów COX dowodzą skuteczności w zapobieganiu nowotworom pochodzenia nabłonkowego. Przyjmowanie inhibitorów COX wykazuje korzystne działanie podczas leczenia m.in. nowotworów jelita grubego, przełyku, nerek, języka. Z drugiej strony ekspresja COX-2 jest czynnikiem prognostycznym progresji procesu nowotworowego, np. w śmiertelnym złośliwym międzybłoniu opłucnej [45, 46].

W nowotworach nabłonkowych wzrasta synteza prostaglandyn, które poprzez immunosupresyjne działanie mogą przyczyniać się do powstawania przerzutów. W kolejnych stadiach progresji nowotworów złośliwych dochodzi do zwiększenia aktywności COX-2 i prostaglandyn w tkankach guza. Stąd cyklooksygenaza-2 bywa określana mianem nowego potencjalnego markera w diagnostyce patomorfologicznej nowotworów, co potwierdzono eksperymentalnie zarówno na zwierzęcym, jak i ludzkim modelu doświadczalnym [22].

Zważywszy, iż inhibitory COX należą do najczęściej stosowanych leków, nie sposób pominąć wpływu aspiryny na organizm ludzki. Wiadomo, że stosowanie niskich dawek aspiryny zmniejsza ryzyko miażdżycy tętnic, co wywołuje kaskadę kolejnych pożądanych dla człowieka procesów. Aspiryna jako NLPZ ma zdolność do hamowania aktywności izoenzymów COX, a co z tym związane – do zmniejszania wytwarzania prostanoidów. Wykazuje działanie przeciwgorączkowe, przeciwzapalne, antyagregacyjne oraz słabe przeciwbólowe [40]. Mechanizm działania aspiryny może być przydatny w chemoprewencji procesu nowotworzenia [29]. Aspiryna zmniejsza ryzyko wystąpienia raka jelita grubego – zachamowanie syntezy prostaglandyn uniemożliwia uruchomienie szlaków sygnałowych prowadzących do nowotworu [40]. Co więcej, regularne stosowanie małych dawek aspiryny może zmniejszać ryzyko raka żołądka [29]. Stosowanie małych dawek aspiryny hamuje tylko COX-1, natomiast istotnie większych dawek zarówno COX-1, jak i COX-2. Stosowanie większych dawek wykorzystywane jest w leczeniu chorób gośćcowych – różnych postaciach zapaleń stawów.

W leczeniu bólu oraz stanów zapalnych w chorobie zwyrodnieniowej stawów, reumatoidalnym zapaleniu stawów, zeszywniającym zapaleniu stawów kręgosłupa zastosowanie znajduje również aceklofenak – COX-2 preferencyjny NLPZ. Jego zaletą jest lepsza tolerancja, korzystniejszy profil działań niepożądanych w porównaniu do pozostałych leków z grupy NLPZ oraz dodatkowe działanie chondroprotektoryjne [40].

Niestety stosowanie niestroidowych leków przeciwzapalnych wiąże się również z działaniami niepożądanymi. Oprócz negatywnego wpływu na śluzówkę żołądka wykazują one również podwyższone ryzyko powikłań ze strony układu sercowo-naczyniowego. Podawanie NLPZ w okresie ciąży, w szczególności w trzecim tryestrze, znamienne zwiększa ryzyko przedwczesnego zamknięcia przewodu tętniczego, występowania wtórnego nadciśnienia płucnego u płodów oraz noworodków, może nasilać częstotliwość występowania wrodzonego ubytku części błonistej przegrody międzykomorowej serca. NLPZ mogą również odpowiadać za migotanie przedsionków i zwiększenie odsetka powikłań zatorowo-zakrzepowych u osób dorosłych. Odchodzi się natomiast od teorii istotnego wpływu inhibitorów COX na zaburzenie krążenia wieńcowego. Mogą one natomiast przyczyniać się do odwracalnej częściowej niedrożności naczyń wieńcowych bez następstw śmiertelnych [47].

Na uwagę zasługują badania Aronoffa, obejmujące analizę modelu zwierzęcego z zakażeniem powodującym sepię [48]. Wyniki badań wskazują, iż zwierzę cechowało się łagodniejszym przebiegiem sepsy po podawaniu mu inhibitorów COX. Badania te wskazują na możliwy wpływ inhibitorów COX na mechanizmy obronne gospodarza oraz regulację wrodzonej i nabytej odporności.

Cyklooksygenaza-2 zmniejsza ekspresję cytokin prozapalnych, wpływając na glutaminergiczne neuroprzekaznictwo oraz metabolizm szlaku tryptofanu/kinureniny. Przeprowadzono badania, dotyczące zastosowania inhibitora COX-2, dokładnie celekoksylu, w schizofrenii oraz ciężkiej depresji. Wykazano, że stosowanie celekoksylu wywiera pożądany efekt terapeutyczny i wspomaga leczenie stanów depresyjnych [33].

Niesteroidowe leki przeciwzapalne są również stosowane w okulistyce. Stosowane są tu głównie krople oczne. Z punktu widzenia terapii powinny one skutecznie hamować stan zapalny oraz ból, nie powinny być toksyczne dla rogówki, powinny być komfortowe dla pacjentów. Ponadto powinny penetrować do tkanek oka w stężeniu terapeutycznym i zapobiegać torbielowatemu obrzękowi plamki (CME). Niesteroidowe leki zapalne w postaci kropli ocznych leczą pooperacyjny ból, zapobiegają stanom zapalnym związanym z chirurgicznym usuwaniem zaćmy, hamują zwężenie źrenicy podczas operacji chirurgicznych, wspomagają leczenie alergicznych schorzeń rogówki oraz spojówki. NLPZ w postaci kropli ocznych stanowią zróżnicowaną grupę leków. W ostatnim czasie na uwagę zasłużył nepafenak. Ma on formułę proleku – amidowego analogu amfenaku, pozbawionego ładunku powierzchniowego, o lipofilnej strukturze i fizjologicznym pH. Cechy te przyczyniają się do faktu, iż nepafenak jest silnym oraz długotrwałym inhibitorem COX-1 oraz

COX-2. W ostatnim czasie pojawiła się propozycja, aby wprowadzić go do podstawowego schematu pooperacyjnego leczenia żączy [39].

Leki z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych łagodzą ból i niwelują skutki procesu zapalenia. Jednakże istotna część tej grupy leków przyczynia się do owrzodzenia żołądka. Dodatkowo, hamowanie aktywności cyklooksygenazy powoduje opóźnienie gojenia się wrzodów żołądka. Inhibicja syntezy prostaglandyn oraz czynniki, takie jak: stres oksydacyjny, wpływ neutrofilów, interakcje leukocytów-śródbłonek czy też zachwianie równowagi cytokin odgrywają kluczową rolę w patogenezie uszkodzenia żołądka, indukowanego przez NLPZ [49]. Powyższe działanie przyczynia się do konieczności dalszego poszukiwania coraz nowszych alternatyw w leczeniu niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi.

Inhibitory cyklooksygenaz są jednymi z najczęściej używanych leków na świecie. Selektywne inhibitory COX-2 powstały z konieczności wyeliminowania działań niepożądanych COX-1. Podwyższona ekspresja cyklooksygenazy-2 jest obserwowana w miejscach stanu zapalnego, co przyczyniło się do spekulacji, iż hamowanie COX-2 przez leki z grupy NLPZ będzie korzystniejsze, niż hamowanie COX-1, z uwagi na ryzyko niepożądanych skutków ubocznych ze strony układu pokarmowego [14]. Niepożądane skutki uległy zmniejszeniu, jednak nie eliminacji, co więcej – były też związane z wystąpieniem dodatkowych zdarzeń niepożądanych w układzie sercowo-naczyniowym. W związku z powyższym, obie klasy inhibitorów mają swoje wady i zalety. Stosowanie wybranego leku jest zależne od szeregu czynników charakteryzujących wybranego pacjenta [41].

Cyklooksygenaza a gojenie ran

Coraz większe zainteresowanie wzbudza temat powiązania cyklooksygenaz i procesu gojenia ran. Udowodniono, iż uraz fizyczny indukuje ekspresję cyklooksygenazy-2, co przyspiesza gojenie się ran. W procesie tym uczestniczą także ISMFs, czyli jelitowe podnabłonkowe miofibroblasty – kluczowe czynniki w tworzeniu bariery przeciw bodźcom prozapalnym, znajdujące się pod nabłonkiem prześwitu jelita. Działają one niczym bariera przeciwbakteryjna. Fizycznie uszkodzone komórki uwalniają ATP. Proces zranienia wiąże się ze wzrostem ekspresji COX-2, a następnie wydzielaniem PGE₂ przez ISMFa. Miofibroblasty te przyczyniają się do promocji zamknięcia rany [50].

Badanie Kämpfera na mysim modelu zwierzęcym wykazało ponadto funkcjonalne sprzężenie pomiędzy COX-1 a biosyntezą prostaglandyny E₂/D₂ w procesie naprawy skóry [51]. Ekspresja COX-1 uległa początkowo przejściowemu spadkowi,

spadało również tempo biosyntezy prostaglandyn E₂/D₂. Wzrost ekspresji COX-1 zaobserwowano w marginesie rany. Silna ekspresja COX-2 została wykazana w ziarninie tworzącej się w ranie. Nie wiązała się jednak ze wzrostem poziomu prostaglandyny E₂/D₂. Zastosowanie selektywnych inhibitorów COX-1 oraz diklofenaku, gdzie nie zastosowano wysoce selektywnych inhibitorów COX-2, wykazało istotne obniżenie ekspresji prostaglandyny E₂/D₂, co wiązało się z zaburzeniami normalnej morfologii rany. Natomiast domiejscowe podanie prostaglandyny E₂ było w stanie przywrócić normalne gojenie się ran. Powyższe badania dowiodły, iż poziom ekspresji COX-1 jest sprzężony z biosyntezą prostaglandyn E₂/D₂, co odgrywa istotną rolę w procesach naprawczych skóry oraz gojenia się ran [51].

Hipotezę o roli wzrostu ekspresji COX-2 w procesach gojenia ran skórnych wysunął również Futagami i wsp. [52]. Dokonano analizy z wykorzystaniem zwierzęcego modelu szczurzego. Badano zmiany czasowe i przestrzenne w lokalizacji białek COX-1 oraz COX-2 i mRNA po wycięciu fragmentu skóry modelu zwierzęcego. Dodatkowo analizowano ilościowo ekspresję tych białek i wpływ określonego inhibitora COX-2 w przebiegu leczenia. Badania immunohistochemiczne oraz hybrydyzacja *in situ* wykazały, że białka COX-2 oraz mRNA wyrażane były głównie w podstawowej warstwie naskórka, komórek obwodowych, na zewnętrznej osłonie mieszków włosowych i komórek fibroblastów oraz w naczyniach włosowatych, w pobliżu brzegów rany naskórka. Istotnie mniejsza intensywność ekspresji COX-2 została zaobserwowana w normalnej skórze, niż w ranie skórnej. Uszkodzenie ciągłości skóry pociąga za sobą indukcję COX-2, rozpoczynającą się w pierwszych 12 godzinach po urazie i narastającą przez 3 dni po powstaniu urazu. Natomiast nie wykazano istotnej zmiany w lokalizacji i poziomie aktywności w przypadku COX-1 w czasie gojenia się ran. Podawanie inhibitorów COX-2 opóźnia ponowną epitelizację we wczesnej fazie gojenia się rany oraz hamuje angiogenezę [52].

Proces gojenia najczęściej kojarzony jest z gojeniem tkanek miękkich. Należy jednak zaznaczyć, że cyklooksygenaza odgrywa również istotną rolę w procesie gojenia kości.

Gen COX-2 jest bezpośrednim genem zaangażowanym we wczesny etap modulacji stanu zapalnego. COX-1 odgrywa natomiast rolę w utrzymaniu homeostazy komórek. Wiele zapalnych cytokin i chemokin, w tym PGE₂, jest istotnych dla naprawy złamania kości [53]. Przy złamaniu dochodzi do wzrostu lokalnej produkcji i uwalniania prostaglandyn. Badania na modelu zwierzęcym wskazują, iż lokalne podawanie egzogennych prostaglandyn może stymulować odbudowę kości [53]. Brak

syntezy PGE₂ powoduje zaburzenia procesu gojenia się złamań. Istotny jest tutaj również wiek [53]. U młodych myszy ekspresja COX-2 osiągnęła swoje maksimum szybciej niż w przypadku myszy starszych. Na podstawie badań przeprowadzonych przez Geusens i wsp. można wnioskować, iż leki z grupy NLPZ należy stosować po złamaniu krótkotrwale, a wybór rodzaju leku powinien być uzależniony od dodatkowych czynników ryzyka, aby uniknąć lub zniwelować ryzyko opóźnionego gojenia się złamań, opóźnionego zrostu lub jego braku [53].

Stosowanie leków z grupy NLPZ po operacjach ortopedycznych budzi wciąż kontrowersje z powodu niejasnego wpływu na gojenie się tkanek miękkich oraz kości. Gojenie kości rozpoczyna się natychmiast po uszkodzeniu. Tworzy się krwiak i rozpoczyna faza zapalna. Zapalne mediatory i cytokiny stymulują produkcję prostaglandyn. Prostaglandyny są wytwarzane przez osteoblasty, a w największej ilości produkowana jest prostaglandyna E₂. Prostaglandyna E₂ pobudza resorpcję kości. Następuje wzrost masy kostnej i wytrzymałości kości na złamania. Właściwości przeciwzapalne oraz przeciwgorączkowe NLPZ wspomagają procesy regeneracyjne tkanek poprzez zmniejszenie fazy zapalnej. Dodatkowe działanie przeciwbólowe umożliwia szybsze rozpoczęcie rehabilitacji ruchowej. Niestety nie do końca poznany jeszcze wpływ NLPZ na szereg różnych szlaków sygnałowych wskazuje na konieczność zachowania dużej ostrożności przy stosowaniu tych leków [54, 55, 56]. Dotychczas przeprowadzane badania wykazały bowiem, iż COX-2 jest pozytywnym regulatorem złamań. Jednak z drugiej strony, mechanizmy, na drodze których COX-2 wpływa na proces gojenia, nie są do końca poznane. Jest wysoce prawdopodobne, iż utrata funkcji COX-2 przy użyciu NLPZ zmienia wiele szlaków komórkowych niezbędnych do leczenia i regeneracji kości. Jedną z teorii głosi, że COX-2 jest niezbędna do różnicowania komórek mezenchymalnych do osteoblastów, co jest konieczne dla prawidłowego gojenia złamań. Stąd oczekuje się, że hamowanie aktywności COX-2 może mieć negatywny wpływ na osteogenezę [57]. Inna teoria jest związana z regulacją przez prostaglandyny i COX-2 proangiogennych środowisk, niezbędnych do odpowiedzi komórkowej i regeneracji kości i tkanek. COX-2 pobudza bowiem angiogenezę podczas gojenia się złamań [57].

Podsumowując, ekspresja COX-1 jest obserwowana w normalnej, zdrowej kości, natomiast wzrost ekspresji COX-2 jest związany z procesami naprawy kości po złamaniu, w przypadku zapalenia lub w przypadku procesów nowotworzenia w kościach [18].

Przedkliniczne modele badawcze wykazały, że stosowanie NLPZ może osłabiać kości, ścięgna

i więzadła. Jednak wyniki różnych badań bywają sprzeczne. Stosowanie leków, takich jak: aspiryna, diklofenak, ibuprofen, indometacyna czy tenoksylam zaburzało gojenie kości u szczurów i królików. Natomiast w innym projekcie badawczym – przeprowadzonym na psim nierasowym modelu zwierzęcym, zastosowanie indometacyny i fenylobutazonu nie wpływało na gojenie się kości [58].

Podsumowanie

Dalsze badania nad cyklooksygenazą mogą istotnie wpłynąć na rozwój diagnostyki chorób nowotworowych. Znajomość mechanizmów działania izoenzymów COX, poziomów ekspresji poszczególnych genów COX w procesach zarówno fizjologicznych, jak i patologicznych umożliwi rozwój farmakologii w zakresie leczenia bólu. Znaczenie cyklooksygenazy w medycynie, farmacji, szeroko pojętej biotechnologii jest wyraźnie zaznaczone, konieczny jest jednak dalszy rozwój badań, umożliwiających precyzyjne wyjaśnienie mechanizmów działania leków, poprawę efektywności i bezpieczeństwa terapii z ich zastosowaniem oraz rozwój diagnostyki wybranych stanów chorobowych.

Obecnie badania koncentrują się na poszukiwaniu nowych selektywnych inhibitorów COX-2, stanowiących bezpieczniejszą alternatywę dla NLPZ w zakresie eliminacji działań niepożądanych ze strony przewodu pokarmowego. Jednak nadal istnieje szereg obaw związanych z bezpieczeństwem toksykologicznym dotyczącym nerek i układu sercowo-naczyniowego. Specyficzne inhibitory COX-2 mogą być stosowane u pacjentów z zapaleniem stawów, mogą spowolnić wzrost nowotworu, opóźnić proces niepożądaną proliferacji komórek i utrudniać zmiany zwyrodnieniowe związane z chorobą Alzheimera czy chorobą Parkinsona. Nie sposób też pominąć COX-3, którego hamowanie COX-3 może stanowić dodatkowy mechanizm niwelowania bólu oraz gorączki [59, 60, 61].

Wszechstronność zastosowania wiedzy na temat zmian ekspresji cyklooksygenazy oraz możliwości zastosowań terapeutycznych inhibitorów COX wskazują na konieczność rozwoju i intensyfikacji badań z zakresu powyższej tematyki.

Otrzymano: 2014.09.16 · Zaakceptowano: 2014.10.19

Piśmiennictwo

1. Burdan F., Chalas A., Szumilo J.: Cyklooksygenaza i prostanoidy – znaczenie biologiczne. *Postepy Hig Med Dosw.*, 2006, 60, 129–141.
2. Alhouayek M., Muccioli G.: COX-2-derived endocannabinoid metabolites as novel inflammatory mediators. *Trends Pharmacol Sci.* 2014, 35(6): 284–292.
3. Dannhardt G., Kiefer W.: Cyclooxygenase inhibitors-current status and future prospects. *Eur. J. Med. Chem.* 2001, 36: 109–126.

4. LaValle J.B.: The COX-2 connection natural breakthrough treatment for arthritis, Alzheimer's and cancer. Healing Arts Press, Rochester 2001.
5. Davies N.M., Good R.L., Roupe K.A., Yanez J.A.: Cyclooxygenase-3: axiom, dogma, anomaly, enigma or splice error? – not as easy as 1,2,3. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 2004, 7: 217–226.
6. Korzeniowska K., Jankowski J., Jabłeczka A.: Niesteroidowe leki przeciwzapalne. *Med. Współcz.* 2010, 3: 192–197.
7. Sitarz R., Kolasirńska-Bzoma M., Skórzewska M. i wsp.: Cyklooksygenaza-2 i jej rola w kancerogenezie. *Zeszyty Naukowe Towarzystwa Doktorantów UJ – Nauki Ścisłe*. 2012, 2(5): 19–39.
8. Burdan F., Dudka J., Szumilo J. i wsp.: Prenatal effects of DuP-697 – the irreversible, highly selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Reprod. Toxicol.* 2003, 17: 413–419.
9. Cui J.G., Kuroda H., Chandrasekharan N.V. i wsp.: Cyclooxygenase-2 gene expression in Alzheimer hippocampus and in stressed human neural cells. *Neurochem Res.* 2004, 29, 9: 1731–1737.
10. Fritsche E., Baek S.J., King L.M. i wsp.: Functional characterization of cyclooxygenase-2 polymorphisms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001, 299: 468–476.
11. Halushka M.K., Walker L.P., Halushka P.V.: Genetic variation in cyclooxygenase 1: effects on response to aspirin. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2003, 73, 122–130.
12. Botting R.: COX-1 and COX-3 inhibitors. *Thromb. Res.* 2003, 110: 269–272.
13. Simmons D.L.: Variants of cyclooxygenase-1 and their roles in medicine. *Thromb. Res.* 2003, 110: 265–268.
14. Willoughby D.A., Moore A.R., Colville-Nash P.R.: COX-1, COX-2 and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *Lancet.* 2000, 355: 646–648.
15. Mejza F., Nizankowska E.: Selektywne inhibitory cyklooksygenazy 2 (COX-2). *Post. Hig. Med. Dośw.* 2001, 55: 287–302.
16. Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H.K. i wsp.: Farmakologia i toksykologia. *MedPharm Polska*, 2013, wyd. III polskie popr. i uzup.
17. Salvemini D., Sangwon F., Mollace V.: Reciprocal regulation of the nitric oxide and cyclooxygenase pathway in pathophysiology: relevance and clinical implications. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2013, 304: 473–487.
18. McKanna J.A., Zhang M.Z., Wang J.L. i wsp.: Constitutive expression of cyclooxygenase-2 in rat vas deferens. *Am. J. Physiol.* 1998, 275: R227–R233.
19. Chakraborty I., Das S.K., Wang J. i wsp.: Developmental expression of the cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 genes in the periimplantation mouse uterus and their differential regulation by the blastocyst and ovarian steroids. *J. Mol. Endocrinol.* 1996, 16: 107–122.
20. Burdan F.: Developmental toxicity evaluation of ibuprofen and tolmetin administered in triple daily doses to Wistar CRL: (WI)WUBR rats. *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.* 2004, 71: 321–330.
21. Cook J.C., Jacobson C.F., Gao F. i wsp.: Analysis of the nonsteroidal anti-inflammatory drug literature for potential developmental toxicity in rats and rabbits. *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.* 2003, 68: 5–26.
22. Badowska-Kozakiewicz A.: Rola cyklooksygenazy-2 w onkologii weterynaryjnej. *Życie Wet.* 2011, 86: 11.
23. Kuklińska A., Musiał W., Modrzejewski W.: Korzyści a ryzyko powikłań sercowo-naczyniowych przy stosowaniu inhibitorów cyklooksygenazy. Której droga? *Forum Kardiol.* 2003, 8(1): 5–10.
24. Crofford L.J., Wilder R.L., Ristimaki A.P. i wsp.: Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids. *J. Clin. Invest.* 1994, 93: 1095–1101.
25. Siewiera K., Kassassir H., Watała C.: Badanie aktywności podjednostki cyklooksygenazowej i podjednostki peroksygenazowej cyklooksygenazy 1 (COX-1) z wykorzystaniem metody oksygraficznej i fluorescencyjnej. *J Lab Diag.* 2012, 48(2): 153–162.
26. Burdan F., Szumilo J., Marzec B. i wsp.: Skeletal developmental effects of selective and nonselective cyclooxygenase-2 inhibitors administered through organogenesis and fetogenesis in Wistar CRL: (WI)WUBR rats. *Toxicology.* 2005, 216: 204–223.
27. Stanfield K.M., Bell R.R., Lisowski A.R. i wsp.: Expression of cyclooxygenase-2 in embryonic and fetal tissues during organogenesis and late pregnancy. *Birth Defects Res. Part A Clin. Mol. Teratol.* 2003, 67: 54–58.
28. Streck R.D., Kumpf S.W., Ozolsins T.R. i wsp.: Rat embryos express transcripts for cyclooxygenase-1 and carbonic anhydrase-4, but not for cyclooxygenase-2, during organogenesis. *Birth Defects Res. Part B Dev. Reprod. Toxicol.* 2003, 68: 57–69.
29. Sostres C., Gargallo C., Lanás A.: Aspirin, cyclooxygenase inhibition and colorectal cancer. *World J Gastrointest Pharmacol Ther.* 2014, 5(1): 40–49.
30. Fux R., Schwab M., Thon K.P. i wsp.: Cyclooxygenase-2 expression in human colorectal cancer is unrelated to overall patient survival. *Clin. Cancer. Res.* 2005, 11: 4754–4760.
31. Harris R.C., McKanna J.A., Akai Y. i wsp.: Cyclooxygenase-2 is associated with the macula dense of rat kidney and increases with salt restriction. *J. Clin. Invest.* 1994, 94: 2504–2510.
32. Komhoff M., Grone H.J., Klein T. i wsp.: Localization of cyclooxygenase-1 and -2 in adult and fetal human kidney: implication for renal function. *Am. J. Physiol.* 1997, 272: F460–F468.
33. Müller M.: The role of anti-inflammatory treatment in psychiatric disorders. *Psychiatria Danubina.* 2013, 25(3): 292–298.
34. Rojas A., Jiang J., Yang M. i wsp.: Cyclooxygenase-2 in epilepsy. *Epilepsia.* 2014, 55: 17–25.
35. Tsujii M.: Cyclooxygenase, cancer stem cells and DNA methylation play important roles in colorectal carcinogenesis. *Digestion.* 2013, 87: 12–16.
36. Schwab J.M., Schluesener H.J., Laufer S.: COX-3: just another COX or solitary elusive target of paracetamol? *Lancet.* 2003, 361: 981–982.
37. Cappon G.D., Cook J.C., Hurtt M.E.: Relationship between cyclooxygenase 1 and 2 selective inhibitors and fetal development when administered to rats and rabbits during the sensitive periods for heart development and midline closure. *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.* 2003, 68: 47–56.
38. Korbut R., Olszaniecki R., Wolkow P.: *Farmakologia*. Wydawnictwo Naukowe PZWL, 2012, wyd. I.
39. Jurys M., Mrukwa-Kominek E.: Zastosowanie nepafenaku w okuliście. *Przegl. Okul.* 2012, 3(47): 14–15.
40. Szalek E., Grześkowiak E.: Acyklofenak – NLPZ preferencyjnie hamujący cyklooksygenazę 2 o działaniu chondroprotektoryjnym. *Geriatrics.* 2012, 6: 158–165.
41. Mendes R., Stanczyk R., Sordi R. i wsp.: Selective inhibitors of cyclooxygenase-2: risk and benefits. *Rev Bras Reumatol.* 2012, 52(5): 767–782.
42. Dachman R.: Increased risk of cardiovascular events with coxibs and NSAIDs. *Lancet.* 2005, 365: 1537–1538.
43. Catella-Lawson F., Reilly M.P., Kapoor S.C., Cucchiara A.J., DeMarco S., Tournier B., Vyas S.N., FitzGerald G.A.: Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. *N. Engl. J. Med.* 2001, 345: 1809–1817.
44. Salhab A.S., Gharaibeh M.N., Shomaf M.S. i wsp.: Meloxicam inhibits rabbit ovulation. *Contraception.* 2001, 63: 329–333.
45. Wigłusz K., Trynda-Lemiesz L.: Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ). *Aspiryna czy kokszyby?* *Post. Farm.* 2011, 1: 19–24.
46. Hull M.A.: Cyclooxygenase-2: how good is it as a target for cancer chemoprevention? *Eur. J. Cancer.* 2005, 41: 1854–1863.
47. Kobylińska J., Burdan F., Dworżański W. i wsp.: Sercowo-naczyniowe powikłania stosowania inhibitorów cyklooksygenazy w okresie pre- i postnatalnym. *Pol. Merk. Lek.*, 2013, XXXIV, 200: 113.
48. Arnoff D.: Cyclooxygenase inhibition in sepsis: is there life after death? *Mediators Inflamm.*, 2012, ID 696897.
49. Adhikary B., Yadav S.K., Bandyopadhyaya S.K., Chattopadhyay S.: Role of the COX-independent pathways in the ulcer-healing action of epigallocatechin gallate. *Food Funct.* 2011, 2: 338–347.
50. Iwanaga K., Murata T., Hori M. i wsp.: Purinergic P2Y1 receptor signaling mediates wound stimuli-induced cyclooxygenase-2 expression in in test in alsubepithelial myofibroblasts. *Eur J Pharmacol.* 2013, 702: 158–164.
51. Kämpfer H., Bräutigam L., Geisslinger G.: Cyclooxygenase-1 – coupled prostaglandin biosynthesis constitutes an essential prerequisite for skin repair. *The Soc. for Invest. Derm.* 2003, 120, 5: 880–890.
52. Futagami A., Ishizaki M., Fukuda Y., Kawana S., Yamanaka N.: Wound healing involves induction of cyclooxygenase-2 expression in rat skin. *Lab Invest.* 2002, 82(11): 1503–1513.
53. Geusens P., Emans P.J., de Jonga J.A.: NSAIDs and fracture healing. *Curr Opin Rheumatol.* 2013, 25(4): 524–531.
54. Chen M.R., Dragoo J.L.: The effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on tissue healing. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 2013, 21: 540–549.
55. Dogne J.M., Supuran C.T., Pratico D.: Adverse cardiovascular effects of the coxibs. *J. Med. Chem.* 2005, 48: 2251–2257.
56. Wigłusz K., Trynda-Lemiesz L.: Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ). *Nowe oblicze meloksykamu*. *Post. Farm.* 2012, 1: 12–15.
57. Cottrell J., O'Connor P.: Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on bone healing pharmaceuticals. 2010, 3: 1668–1693.
58. Radi Z.A.: Pathophysiology of Cyclooxygenase inhibition in animal models. *Toxicol Pathol.* 2009, 37: 34.
59. Saqib A., Karigar C.: Cyclooxygenase isoforms in health and disease. *Internet J. Pharmacol.* 2008, 7(1): 1–21.
60. Schwab J.M., Beiter T., Linder J.U. i wsp.: COX-3 a virtual pain target in humans? *FASEB J.* 2003, 17: 2174–2175.
61. Schwab J.M., Schluesener H.J., Meyerman. i wsp.: COX-3 the enzyme and the concept: steps towards highly specialized pathways and precision therapeutics? *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 2003; 69, 339–343

Mechanizmy działania nowych leków przeciwpadaczkowych

Arkadiusz Kazula¹, Ewa Kazula²

¹ Apeka prywatna, ul. Wolności 54a, Nisko

² Apteka prywatna, ul. Zakładowa 50, Tarnobrzeg

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

Wstęp

Padaczka należy do najczęściej występujących chorób neurologicznych (około 1% populacji). Choroba ta charakteryzuje się występującymi napadowo zaburzeniami czynności OUN, związanymi z nadmierną pobudliwością neuronów ruchowych kory mózgowej i pnia mózgu. Celem leczenia tej choroby jest kontrola napadów padaczkowych przy minimalnej ilości działań niepożądanych. Fakt, że padaczka jest schorzeniem heterogennym o wielu typach napadów, wpływa w decydujący sposób na szerokie spektrum stosowanych leków, a właściwy wybór leku decyduje o skuteczności terapii przeciwpadaczkowej [1]. W przypadku około 75–80% pacjentów napady padaczkowe kontrolowane są za pomocą konwencjonalnych leków przeciwpadaczkowych (LPP). Do takich LPP najczęściej stosowanych należą: karbamazepina, etosuksymid, fenobarbital, fenytoina i walproinian sodu. Podczas stosowanej farmakoterapii padaczki u około 30% pacjentów pojawiają się nawracające napady, a wielu z nich doświadcza niepożądanych skutków ubocznych [2, 3]. Dlatego stale istnieje zapotrzebowanie w zakresie opracowania nowych, skutecznych leków przeciwpadaczkowych, które mogą zmniejszać częstotliwość i nasilenie napadów, a także poprawiać tolerancję oraz bezpieczeństwo stosowanej terapii. Dla wielu pacjentów z oporną padaczką jednoczesne podawanie kilku leków przeciwpadaczkowych lub wykorzystanie nowych jest pożądanym wymogiem terapii. W latach 90. ubiegłego wieku pojawiły się nowe leki przeciwpadaczkowe. Do leków nowej generacji należą: gabapentyna, oksykarmazepina, lamotrygina, tiagabina, wigabatryna, topiramata i zonisamid. Posiadają one korzystne działanie farmakologiczne, lepszy profil

Mechanisms action of novel antiepileptic drugs · Novel antiepileptic drugs acting selectively through the GABA-ergic system are tiagabine and vigabatrin. The former inhibits neuronal and glial uptake of GABA whilst the latter increases the synaptic concentration of GABA by inhibition of GABA-aminotransferase. Gabapentin, designed as a precursor of GABA easily entering the brain, was shown to increase brain synaptic GABA. This antiepileptic drug also decreases influx of calcium ions into neurons via a specific subunit of voltage-dependent calcium channels. Novel antiepileptic drugs, mainly associated with an inhibition of voltage-dependent sodium channels are lamotrigine and oxcarbazepine. Since glutamate-mediated excitation is involved in the generation of seizure activity, some antiepileptics are targeting glutamatergic receptors – for instance, felbamate, phenobarbital, and topiramate. Besides, they also inhibit sodium currents. Novel antiepileptic drugs are better tolerated by epileptic patients and practically are devoid of important pharmacokinetic drug interactions. Currently used antiepileptic drugs may cause many side effects and have no therapeutic effects in up to 25% of patients. That is why new antiepileptic drugs – more effective and with a better tolerance profile – are sought for.

Keywords: epilepsy, antiepileptic drugs, ion channels, neurotransmitters.

© Farm Pol, 2014, 70(11): 629–650

tolerancji i bezpieczeństwo stosowania, a ich skuteczność jest zdecydowanie wyższa niż leków konwencjonalnych [4]. Wiele stosowanych obecnie leków przeciwpadaczkowych może być sklasyfikowanych według jednego, głównego mechanizmu działania. W wielu jednak przypadkach istnieje problem z ich odpowiednią klasyfikacją, ze względu na fakt, że wykazują one w terapeutycznych stężeniach mechanizm aktywności oparty na kilku kierunkach neurobiochemicznego działania [5]. Posiadanie wielu mechanizmów działania terapeutycznego jest bardziej powszechne wśród

nowoczesnych leków przeciwpadaczkowych, niż ich tradycyjnych odpowiedników. Jedynym takim wyjątkiem jest walproinian sodu, w jego przypadku nie udało się przy pomocy badań laboratoryjnych ustalić jednego mechanizmu działania, na podstawie którego udaloby się wyjaśnić jego szerokie spektrum aktywności klinicznej. Zastosowanie leków LPP o wielokierunkowym mechanizmie działania przynosi duże korzyści podczas terapii pacjentów z różnymi typami napadów lub u których początkowa diagnoza typu padaczki jest niejednoznaczna.

Klasyczne leki przeciwpadaczkowe, leki I generacji

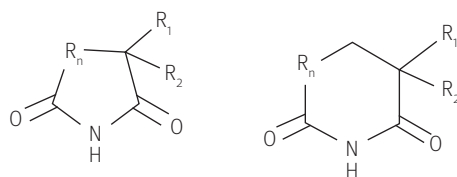
Właściwa terapia przeciwpadaczkowa zaczyna się w chwili odkrycia i wprowadzenia do terapii pierwszego leku o właściwościach przeciwdrgawkowych, fenobarbitalu w 1912 r., który ustanowił fundament dla współczesnej farmakoterapii padaczki. W latach 70. ubiegłego wieku wprowadzono do terapii padaczki tzw. klasyczne leki przeciwpadaczkowe, takie jak: fenytoinę, etosuksymid, karbamazepinę, walproinian sodu oraz liczne pochodne benzodiazepin. Wszystkie te związki są

określane mianem klasycznych leków przeciwpadaczkowych lub lekami przeciwpadaczkowymi I generacji. Przełom w terapii padaczki nastąpił w latach 90. ubiegłego wieku. W okresie tym wprowadzono nowe leki przeciwpadaczkowe, tzw. leki II generacji, które można wykorzystać w monoterapii i terapii skojarzonej. Do chwili obecnej trwają badania mające na celu ustalenie mechanizmów działania

stosowanych leków przeciwpadaczkowych na poziomie komórkowym. Próbuje się zbadać, w jaki sposób stosowane leki przywracają zaburzoną w padaczce równowagę między stanem pobudzenia i hamowania w neuronach. Leczenie padaczki to przede wszystkim leczenie objawowe, które sprowadza się do zapobiegania napadom padaczkowym lub zmniejszania częstotliwości ich występowania. U około 60–70% pacjentów kontrolę napadów padaczkowych można osiągnąć za pomocą monoterapii [5]. W pozostałych przypadkach stosuje się terapię dwoma lub trzema lekami przeciwpadaczkowymi. Leki nowej generacji wykazują lepszą farmakokinetykę, powodują mniej działań niepożądanych i interakcji z innymi lekami, a ich skuteczność w porównaniu z lekami klasycznymi bywa porównywalna lub bardziej efektywna. Natomiast w niektórych typach napadów padaczkowych skuteczniejszymi są ciągle leki klasyczne [6]. Większość stosowanych obecnie klasycznych leków przeciwpadaczkowych posiada pewne podobieństwo strukturalne. Elementami wspólnymi są 5- lub 6-członowe heterocykliczne pierścienie, zawierające co najmniej jedną grupę karbonylową, która stanowi obszar o zwiększonej gęstości elektronowej oraz tetraedyczny atom węgla podstawiony ugrupowaniami aromatycznymi lub alkilowymi o odpowiedniej orientacji przestrzennej (**rycina 1**).

Leki przeciwpadaczkowe I generacji stanowią heterogenną grupę leków pod względem parametrów farmakokinetycznych i możliwości regulacji danych funkcji organizmu, zasadniczo opartych na kilku mechanizmach: wzmacnianiu hamującego przekazywania GABA-ergicznego, hamowaniu pobudzającego działania aminokwasów lub modulowaniu pobudliwości błon komórkowych. Nasilenie efektu GABA-ergicznego z udziałem leków I generacji można uzyskać poprzez: pobudzenie jonotropowych receptorów GABA_A, zwiększanie ilości GABA w szczeliny synaptycznej, które może następować w wyniku blokowania nieodwracalnego enzymu, transaminazy GABA (GABA-T). Następny mechanizm związany jest z hamującym działaniem na pobudzające działanie aminokwasów podwyższających próg drgawkowy, prawdopodobnie

Odkrycie i zastosowanie nowych leków przeciwpadaczkowych w latach 90. ubiegłego wieku skorelowane było z postępem w zrozumieniu mechanizmów molekularnych związanych z rozwojem padaczki na poziomie komórkowym. Wśród obecnie stosowanych leków dominujące mechanizmy ich działania opierają się na blokowaniu zależnych od napięcia kanałów jonowych: sodowych i wapniowych, allosterycznej aktywacji receptorów GABA_A, zwiększaniu obrotu neurotransmitera GABA, blokowaniu receptorów glutaminergicznych, hamowaniu anhidazy węglanowej i modulacji aktywności pęcherzyków synaptycznych.



$R_n = C, N, O \quad n = 1, 2$
 $R_1, R_2 = \text{aryl, alkyl, alkaryl}$

Rycina 1. Schemat ogólnej budowy leków przeciwpadaczkowych

poprzez blokowanie czynności receptora NMDA. Kolejny punkt uchwytu dotyczy stabilizowania pobudliwości błon komórkowych, która następuje na skutek oddziaływania leków przeciwpadaczkowych na jonowe kanały sodowe oraz w wyniku hamującego działania na prądy jonowe związane z kanałami wapniowymi.

Mechanizm działania nowych leków na układ GABA-ergiczny

GABA i układ GABA-ergiczny odgrywają ważną rolę w powstawaniu napadów padaczkowych. Kwas gama-aminomasłowy (GABA) jest głównym neuroprzekaźnikiem hamującym w ośrodkowym układzie nerwowym, a układ GABA-ergiczny związany jest z hamującym wpływem na procesy neuronalne. Dla zachowania prawidłowego poziomu pobudliwości neuronalnej istotna jest równowaga między aktywującym układem glutaminergicznym, a hamującym układem GABA-ergicznym. Zaburzenie tej równowagi neuronalnej między tymi dwoma układami ma istotne znaczenie w rozwoju padaczki. Działanie hamujące GABA jest związane z jego oddziaływaniem w synaptycznych połączeniach na dwa typy receptorów, tzw. receptory jonotropowe GABA i receptory metabotropowe GABA.

Wśród receptorów jonotropowych związanych z kanałami chlorkowymi wyróżniamy receptory $GABA_A$ i $GABA_C$, natomiast receptory metabotropowe są związane z kaskadą intraneuronalnych przekaźników drugiego rodzaju i są oznaczane jako receptory $GABA_B$ [7]. Jonotropowe receptory $GABA_A$ i $GABA_C$ są zbudowane z wielu podjednostek tworzących w błonie komórkowej kanał przepuszczalny dla jonów Cl . Należy zwrócić uwagę, że szybkie hamujące przekazywanie synaptyczne realizowane jest głównie przy udziale postsynaptycznych receptorów $GABA_A$ i to tym receptorom przypisuje się najważniejszą rolę w hiperpolaryzacji neuronów, zapobieganiu napadom padaczkowym czy kontrolowaniu stanów drgawkowych. Pobudzenie receptorów $GABA_A$ hiperpolaryzuje neurony i przeważnie zapobiega powstawaniu i szerzeniu się aktywności drgawkowej.

Receptor $GABA_A$

Aktywacja receptorów jonotropowych $GABA_A$ powoduje zwiększenie odpowiedzi synaptycznej uwalnianego GABA i jest głównym mechanizmem działania wielu leków przeciwpadaczkowych. Receptor $GABA_A$ jest kompleksem białkowym integralnie związanym z kanałem chlorkowym, zbudowanym z pięciu niezależnych homologicznych podjednostek peptydowych (α , β , γ , δ , σ)

rozmieszczonych centralnie wokół kanału przepuszczalnego dla jonów chlorkowych i wodorowęglanowych. Wśród podjednostek peptydowych istnieją różne izoformy kodowane przez odrębne geny [8]. Do tej pory zidentyfikowano około 19 podjednostek receptora $GABA_A$ ($\alpha 1-6$, $\beta 1-3$, $\gamma 1-3$, θ , ϵ , ζ , ρ i $\sigma 1-3$). Wszystkie te podjednostki łączą się w heteromeryczne pentamery tworzące funkcjonalne kanały jonowe. Skład podjednostkowy receptora decyduje o jego właściwościach farmakologicznych, m.in. o powinowactwie do ligandów i modulatorów, takich jak: benzodiazepiny, barbiturany, neurosteroidy, pikrotoksyna czy jony cynku. Mechanizm działania receptora polega na wiązaniu liganda GABA i otwieraniu wybiórczego kanału chlorkowego, powoduje to gwałtowny napływ jonów chlorkowych do wnętrza komórki, prowadzący do hiperpolaryzacji błony, co powoduje podwyższenie progu drgawkowego dla neuronów [8, 9].

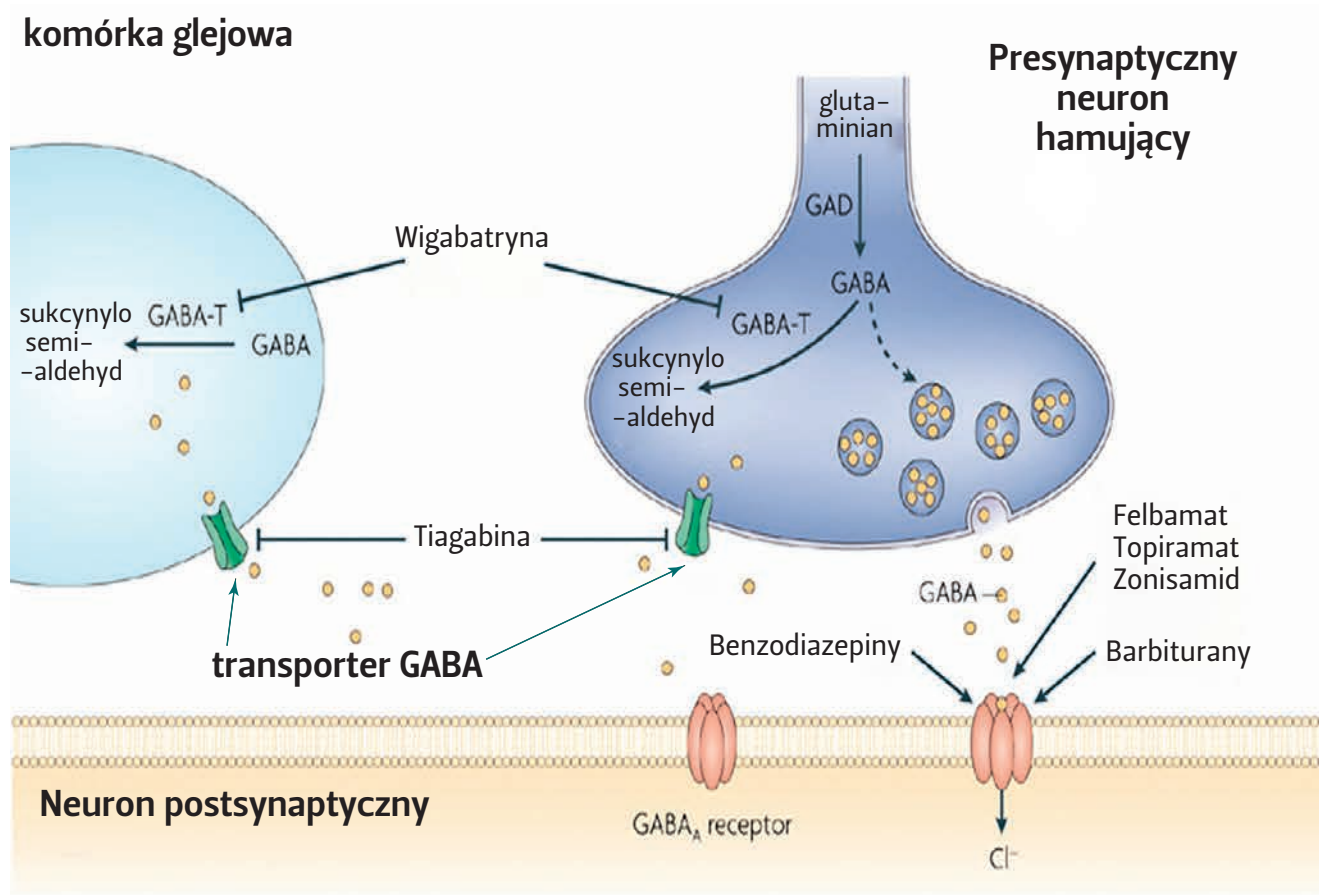
Receptor $GABA_B$

W przeciwieństwie do receptorów jonotropowych, wiązanie GABA do metabotropowych receptorów $GABA_B$ powoduje aktywację fosfolipazy-2, która następnie stymuluje biosyntezę kwasu arachidonowego z fosfolipidów.

Kwas arachidonowy poprzez białka G_i może modulować aktywność cykazy adenylowej i poziomy cyklicznego AMP, przekaźnika drugiego rodzaju. GABA poprzez receptory $GABA_B$ wpływa na uwalnianie innych ważnych dla aktywności neuronalnej neuroprzekaźników.

Receptory $GABA_C$ występują głównie w siatkówce i ich znaczenie fizjologiczne nie jest związane z wpływem na procesy epileptogenezy i powstawaniem napadów padaczkowych [9] (**rycina 2**).

GABA i układ GABA-ergiczny odgrywają ważną rolę w powstawaniu napadów padaczkowych. Kwas γ -aminomasłowy (GABA) jest głównym neuroprzekaźnikiem hamującym w ośrodkowym układzie nerwowym, a układ GABA-ergiczny związany jest z hamującym wpływem na procesy neuronalne. Zaburzenie aktywności układu GABA-ergicznego ma istotne znaczenie w rozwoju padaczki. Z tego względu w terapii napadów padaczkowych wykorzystuje się leki przeciwpadaczkowe powodujące zwiększanie transmisji GABA-ergicznej, poprzez stymulowanie syntezy GABA, hamowanie zwrotnego wychwytu GABA w szczelinie synaptycznej oraz w wyniku ich bezpośredniego działania na odpowiednie receptory $GABA_A$.



Rycina 2. Mechanizm działania leków przeciwpadaczkowych na układ GABA-ergiczny

Leki wpływające na obrót GABA

W latach 50. ubiegłego wieku wykazano na modelach zwierzęcych padaczki¹, że GABA hamuje aktywność napadów padaczkowych w mózgu [9]. Obserwacja ta przyczyniła się do badań nad lekami przeciwpadaczkowymi, które poprzez modulację aktywności GABA-ergicznej tłumią aktywność napadową w tej chorobie. GABA nie był dobrym kandydatem do zastosowania jako lek przeciwpadaczkowy, ponieważ słabo przenika przez barierę krew-mózg. Z tego powodu dużą uwagę poświęcono otrzymaniu agonistów GABA-ergicznych, które łatwo przenikałyby do neuronów OUN. Wykazano również, że substancje zwiększające stężenie GABA w mózgu w wyniku hamowania metabolizmu GABA wywierają istotnie działanie przeciwdrgawkowe, natomiast hamowanie biosyntezy GABA,

np. na skutek podawania hydrazynu kwasu nikotynowego, prowadzi do powstawania i rozwoju drgawek (na modelu zwierzęcym) [10]. W konsekwencji późniejsze poszukiwanie czynników zwiększających hamowanie GABA-ergiczne jako potencjalnych leków przeciwpadaczkowych skoncentrowało się na substancjach pośrednio zwiększających funkcje GABA przez hamowanie jego metabolizmu lub zmniejszenie jego neuronalnego wychwytu. Strategia ta doprowadziła do odkrycia silnych substancji przeciwdrgawkowych, a niektóre z nich obecnie są stosowane jako leki przeciwpadaczkowe [10]. W terapii napadów padaczkowych wykorzystuje się leki przeciwpadaczkowe powodujące zwiększanie transmisji GABA-ergicznej na skutek ich wpływu na syntezę, wychwyt zwrotny GABA w szczelinie synaptycznej oraz w wyniku ich bezpośredniego działania na odpowiednie receptory GABA_A.

¹ Zwierzęce modele padaczki. Do chwili obecnej opracowano i wdrożono do badań wiele zwierzęcych modeli padaczki, w których stymuluje się powstawanie napadów padaczkowych typu uogólnionego za pomocą impulsów elektrycznych lub w wyniku zastosowania związków o właściwościach prodrzawkowych, takich jak: agonistów receptora NMDA, agonistów receptorów GABA, np. pentylenetetrazol, bikukulinę i pikrotoksynę. W celu otrzymania modelu drgawek częściowych prostych podaje się miejscowo (tj. do tkanki mózgowej zwierząt) związki, takie jak: pikrotoksynę, bikukulinę, pilokarpinę, NMDA, kwas kainowy. Napady częściowe złożone (padaczka skroniowa) na modelu zwierzęcym epilepsji (gryzonie) wywołuje się, podając domózgowo lub obwodowo związki drgawkotwórcze, takie jak: kwas kainowy, pilokarpinę lub poprzez stymulację prądem elektrycznym niektórych struktur mózgu, np. ciała migdałowate lub hipokamp. Instresującym modelem padaczki jest rozniecanie drgawek (kindling). Kindling polega na wielokrotnej stymulacji prądem elektrycznym struktur układu limbicznego, takich jak: kora gruszkowata, hipokamp, lub wielokrotne podawanie substancji prodrzawkowych (pentylenetetrazolu) w dawkach podprogowych. Na skutek takiej powtarzalnej stymulacji (elektrycznej lub chemicznej) dochodzi do trwałego obniżenia progu drgawkowego.

Wśród leków przeciwpadaczkowych aktywność pobudzającą receptory $GABA_A$ posiadają barbiturany (fenobarbital) oraz benzodiazepiny (diazepam, klonazepam). Kompleks receptora $GABA_A$ zawiera miejsce wiązania GABA, benzodiazepin, barbituranów oraz pikrotoksyny, która blokuje kanał chlorkowy. Agoniści receptora $GABA_A$: diazepam, klonazepam są stosowani do przerywania napadu padaczkowego. Związki te wiążą się w różnych miejscach receptorowego kompleksu $GABA_A$ i wykazują różny wpływ na otwarcie porów dla jonów chlorkowych. Wszystkie receptory $GABA_A$ zawierają przynajmniej jedną podjednostkę α i β , są podatne na aktywację przez barbiturany, z drobną różnicą we wrażliwości na te związki [8]. W przeciwieństwie do barbituranów, beznodiazepiny wykazują bardziej odrębny wzór selektywności. Związki te zwiększają powinowactwo receptorów $GABA_A$ i $GABA_C$ do endogennej GABA, nasilają przepływ jonów Cl przez zwiększenie częstotliwości otwarcia kanału chlorkowego [8]. Receptory $GABA_A$ wrażliwe na benzodiazepiny zazwyczaj składają się z dwóch podjednostek α ($\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3$ lub $\alpha 5$), dwóch podjednostek β ($\beta 3, \beta 2$) i podjednostki $\gamma 2$, natomiast receptor $GABA_A$ zawierający podjednostkę δ , mediujący hamowanie GABA, jest całkowicie niewrażliwy na benzodiazepiny, jak i receptory zawierające podjednostki $\alpha 4$ i $\alpha 6$. Aktywne terapeutycznie barbiturany zwiększają okres otwarcia kanałów chlorkowych, podczas gdy benzodiazepiny zwiększają ich częstotliwość otwarcia [10]. Barbiturany są również zdolne do bezpośredniej aktywacji receptora $GABA_A$ przy braku obecności GABA, powyższy efekt leży u podstaw ich właściwości uspokajających. W terapii do przerywania napadów padaczkowych używa się agonistów receptora BZD: diazepam, klonazepam. Natomiast antagoniści receptora $GABA_A$, tacy jak: bikukulina, pentylenotetrazol oraz związki blokujące kanał chlorkowy (pikrotoksyna) posiadają działanie prodrżawkowe i mogą służyć do wywoływania napadów padaczkowych w zwierzęcych modelach padaczki [10].

Działanie przeciwdrgawkowe nowych leków, takich jak: tiagabina i wigabatryna jest związane głównie z wpływem na aktywność systemu GABA-ergicznego [11]. Wigabatryna jest nieodwracalnym inhibitorem aminotransferazy GABA i na skutek hamowania aktywności tego enzymu zwiększa pulę dostępnego GABA w szczelinie synaptycznej. Podobny efekt działania wykazuje tiagabina, która hamuje neuronalny i glejowy wychwyt GABA, prowadząc w ten sposób do wydłużenia i wzmocnienia aktywności GABA w połączeniach synaptycznych [12]. Gabapentyna, cykliczny analog GABA, nie ma aktywności wobec kompleksu receptora $GABA_A$, a po tym leku wzrasta biosynteza GABA w neuronach [13–15]. Inny lek przeciwpadaczkowy, taki

jak np. felbamat, posiada wiele mechanizmów działania, wpływając między innymi na GABA-ergiczną transmisję [16,17].

Progabid

Jednym z pierwszych leków nowej generacji, opracowanym w oparciu o dane wykazujące wpływ związków modulujących układ GABA-ergiczny w hamowaniu napadów padaczkowych, był progabid 4-[[4-chlorofenylo]-5-fluoro-2-hydroksyfenylo]-metyleno]-amino}-butanamid.

Lek zsyntetyzowany w oparciu o rozważania teoretyczne był pierwszym selektywnym agonistą receptora GABA. Związek ten posiada charakter amfoteryczny, trudno rozpuszczalny w wodzie, trwały w środowisku kwaśnym żołądka. Metabolizm progabidu polega na deaminacji i rozerwaniu wiązania iminowego oraz hydrolizacji benzofenonu w położeniu C3 lub C5. Jednym z metabolitów progabidu jest kwas 4-chlorofenylo-5-fluoro-2-hydroksyfenylometyleno-aminomasłowy, wykazujący aktywność przeciwdrgawkową. Dodatkowo, w wyniku rozerwania wiązania iminowego, powstaje gabamid i kwas γ -aminomasłowy (GABA).

Lek ten może być stosowany we wszystkich typach padaczek, lecz ze względu na działanie hepatotoksyczne jest stosowany tylko w przypadkach padaczki odpornej na inne leki.

Kwas glutaminowy jest głównym neurotransmiterem pobudzającym i należy do najważniejszych neuroprzekazników regulujących przekaznictwo synaptyczne i powolne zmiany plastyczne. Jest zatem oczywiste, że zaburzenia w funkcjonowaniu układu glutaminergicznego odgrywają istotną rolę w powstawaniu napadów padaczkowych. Odkrycie roli tego układu w patomechanizmach powstawania padaczki determinuje jednocześnie kierunek badań w celu opracowania nowych skutecznych leków w terapii tej choroby. W chwili obecnej żaden z dostępnych leków przeciwpadaczkowych nie wykazuje wyłącznego działania na układ glutaminergiczny. Blokowanie receptorów NMDA przyczynia się do farmakologicznego działania felbamatu, również topiramatu wykazuje działanie hamujące na receptory AMPA i kainowe, o wyższym powinowactwie do tych ostatnich, natomiast lamotrygina może selektywnie hamować uwalnianie glutaminy. W dalszym ciągu trwają prace nad lekami, których jednym z mechanizmów działania jest antagonizm wobec układu glutaminergicznego.

Wigabatryna (Vigabatrinum, Sabril, kwas D,L-4amino-5-heksenowy, kwas γ -winyloaminomasłowy)

Lek ten należy do nowoczesnych leków przeciw-padaczkowych, który wywiera swoje działanie w wyniku neurochemicznych efektów na hamujące synapsy, a rezultatem działania jest zaburzenie obrotu GABA w synapsach. Związek ten jest pochodną GABA, γ -winylo-GABA, która posiada unikalny i selektywny mechanizm działania. Ten strukturalny analog GABA jest nieodwracalnym inhibitorem mitochondrialnego enzymu, transaminazy-GABA odpowiedzialnej za katabolizm GABA. Lek ten, wiążąc się nieodwracalnie do transaminazy GABA, powoduje zahamowanie aktywności enzymu i hamowanie rozkładu GABA, powoduje to wzrost stężenia GABA w szczeliny synaptycznej, torując tym samym wzrost hamującej aktywności w neurotransmisji GABA-ergicznej, która odgrywa podstawową rolę w hamowaniu napadów padaczkowych [18, 19]. Wigabatryna zmniejsza liczbę napadów padaczkowych, ich nasilenie oraz zmniejsza stopień uszkodzeń mózgu [20]. Ten wzmacniacz GABA jest szczególnie skuteczny przeciwko napadom padaczkowym wywołanym za pomocą kwasu kainowego (w warunkach doświadczalnych) [21]. Engelborghs i wsp. są zdania, że przeciwdrgawkowa aktywność wigabatryny może nie być wyłącznie związana ze zwiększeniem poziomu GABA w szczeliny synaptycznej [22]. Autorzy rozważają inny prawdopodobny mechanizm i sugerują, że lek ten może również działać poprzez zmniejszenie stężenia pobudzających aminokwasów w mózgu i podniesienia zawartości glicyny [23, 24]. Jest godne uwagi, że wigabatryna nie wpływa na mechanizmy poznawcze i zachowanie, w niewielkim stopniu poprawia funkcje poznawcze pacjentów otrzymujących ten lek [25]. Inną istotną właściwością z farmakologicznego punktu widzenia jest fakt, że wigabatryna zmniejsza liczbę i częstotliwość napadów padaczkowych, a także zmniejsza stopień uszkodzenia mózgu [26].

Tiagabina (Gabitril)

Lek ten jest przepisywany w wielu europejskich krajach, USA i Australii jako lek w terapii napadów częściowych u pacjentów, począwszy od 13 roku życia [27]. Ta pochodna kwasu nipekotynowego została zaprojektowana w taki sposób, aby działała na układ GABA-ergiczny. Związek ten zwiększa stężenie GABA i aktywuje neuroprzekaznictwo GABA-ergiczne w wyniku hamowania wychwytu zwrotnego GABA ze szczeliny synaptycznej do zakończeń nerwowych i komórek glejowych [28]. Działając w ten sposób, związek ten zwiększa dostępność GABA w szczeliny synaptycznej, przedłuża obecność tego neuroprzekaznika w synapsach, co wpływa aktywująco na neurotransmisję GABA-ergiczną [29]. Związek ten jest drugim obok wigabatryny

lekiem selektywnie aktywującym układ GABA-ergiczny w OUN, na drodze hamowania wychwytu zwrotnego neuroprzekaznika - GABA. Wykazuje on aktywność w padaczce z napadami częściowymi złożonymi oraz napadami wtórnie uogólnionymi u osób dorosłych [29]. Wigabatryna w porównaniu do tiagabiny ma nieco wyższe powinowactwo do neuronów zawierających GABA transaminazy, natomiast tiagabina jest bardziej skuteczna w hamowaniu wychwytu GABA przez komórki glejowe. Hamowanie synaptycznego transportu GABA przez tiagabinę wynika z faktu, że związek ten jest selektywnym inhibitorem GABA transportera GAT-1, który występuje w korze mózgowej i hipokampie w takich ilościach, że można dostrzec odpowiednie efekty farmakologiczne po zastosowaniu tiagabiny. Na modelach zwierzęcych w czasie stymulacji stanu padaczkowego (szczury) tiagabina wyraźnie zmniejsza nasilenie napadów i zmniejsza uszkodzenia mózgu dotyczące ubytku komórek piramidalnych w czasie napadów padaczkowych. Ponadto tiagabina zapobiega zaburzeniom pamięci przestrzennej, zależnej od uszkodzenia hipokampa w czasie napadów padaczkowych [20]. Na modelu zwierzęcym padaczki z napadami nieświadomości tiagabina wyraźnie obniża częstotliwość i czas trwania napadów [30-33].

Leki o mieszanym mechanizmie działania

Istnieją leki przeciwpadaczkowe, takie jak: walproinian sodu, gabapentyna i topiramata, które w działaniu oprócz wpływu na obrót GABA przez zwiększanie syntezy i uwalniania GABA posiadają inne kierunki przeciwpadaczkowego działania. Przykładem może być jeden z pierwszych leków wprowadzonych do terapii padaczki, jakim jest fenobarbital. Związek ten należy do barbituranów, który toruje neurotransmisję GABA-ergiczną i moduluje kanały jonowe, ograniczając w ten sposób szerzenie się wyładowania padaczkowego [34, 35].

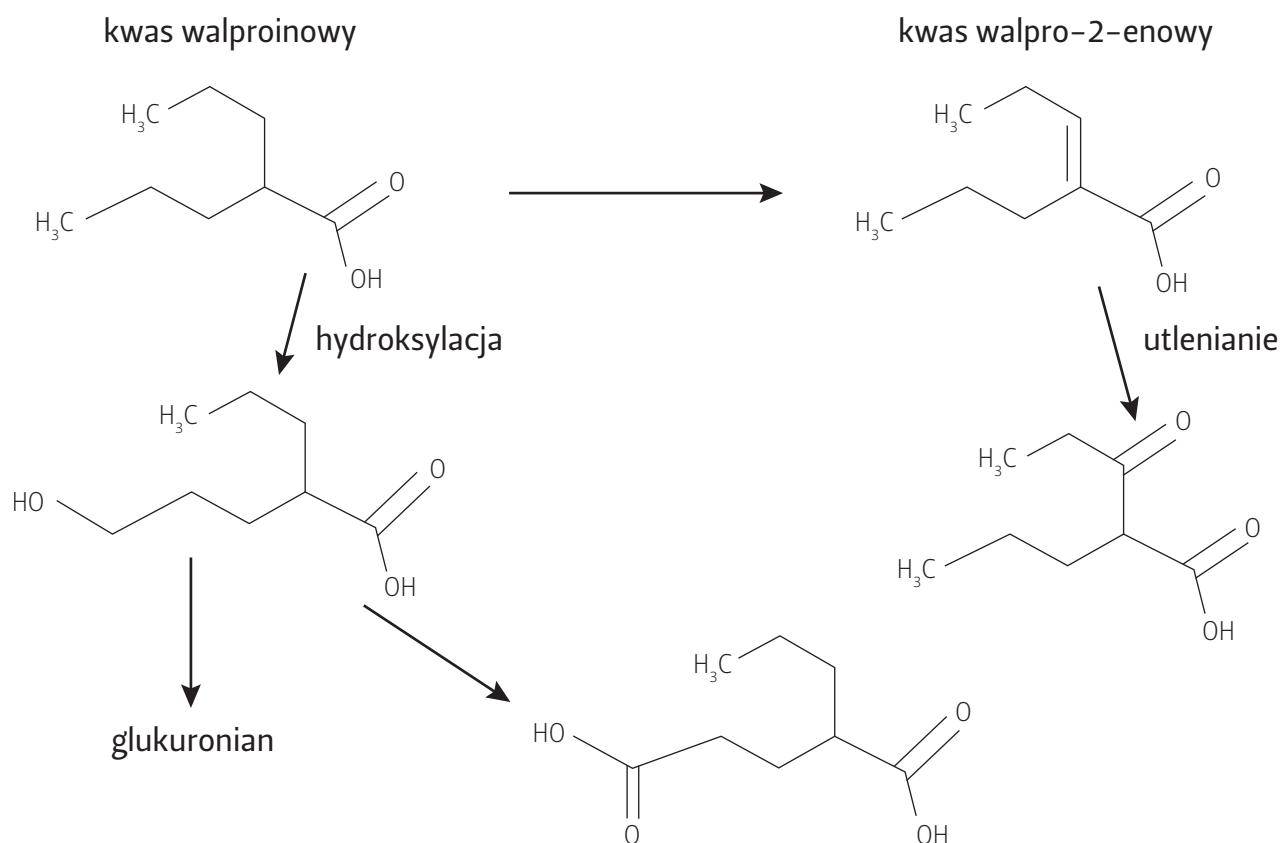
Kwas walproinowy (Acidum Valproicum, Convulex, kwas 2-propylovalerianowy, kwas dipropylooctowy)

Jest najczęściej stosowany w postaci soli sodowej, magnezowej (Dipromal) lub wapniowej (valproatum calcii). W postaci soli sodowej został wprowadzony do leczenia epilepsji w latach 60. ubiegłego wieku. Lek ten jest klasycznym lekiem przeciwpadaczkowym o złożonym mechanizmie działania. Najważniejszym mechanizmem działania tego związku odpowiedzialnym za jego aktywność przeciwpadaczkową jest hamowanie rozkładu GABA na skutek hamowania aktywności transaminazy GABA-T, enzymu odpowiedzialnego za rozkład GABA oraz blokowania aktywności dehydrogenazy semialdehydu bursztynowego, który jest produktem metabolizmu GABA,

co w konsekwencji powoduje wzrost stężenia tego neurotransmitera w szczeliny synaptycznej. Związek ten zmniejsza aktywność drgawkową stymulowaną przez inhibitor syntezy GABA, isoniazyd, ale nie przywraca obniżonego poziomu GABA [36]. Lek ten zwiększa stężenie GABA, hamując jego dekarboksylację i wychwyt (re-uptake). W dużych dawkach może hamować przewodnictwo GABA-ergiczne oraz modyfikuje przewodnictwo wapniowe [36]. Podobnie jak fenytoina modyfikuje on przewodnictwo sodowe, opóźniając reaktywację kanałów sodowych, blokując wyładowania i zmniejszając pobudliwość błon neuronów. Podczas metabolizmu w organizmie, kwas walproinowy ulega β -oksydacji i ω -hydroksylacji łańcucha propylowego. Na skutek tych przemian powstają 3-hydroksy i 3-oksy-pochodne, z których w dalszych etapach powstaje kwas pentanowy, propionowy, metylomalony, bursztynowy i octowy. Najważniejszym metabolitem jest kwas walpro-2-enowy, który jest aktywnym metabolitem o właściwościach przeciwdrgawkowych. Pochodną kwasu walproinowego stosowaną w terapii padaczki z objawami chorób psychicznych jest walproamid (valpromidum, amid kwasu 2-propylowalerianowego). Lek ten szybko ulega biotransformacji do głównego metabolitu, kwasu walproinowego (**rycina 3**).

Gabapentyna

Jest ona kolejnym lekiem o wielokierunkowym mechanizmie działania, który budową chemiczną przypomina GABA i został zaprojektowany jako agonista GABA. Związek ten nie spełnił oczekiwań, ponieważ nie posiada powinowactwa do receptorów GABA. Wydaje się, że lek ten wpływa modulując na transmisję glutaminergiczną poprzez działanie na kanały sodowe [37]. Badania kliniczne wykazały, że związek ten hamuje również kanały wapniowe poprzez wiązanie się z podjednostką $\alpha 2\beta$ [27]. Dodatkowo wykazano, że związek ten hamuje uwalnianie serotoniny i noradrenaliny w korze mózgowej [39–41]. Jak wspomniano powyżej, gabapentyna nie ma powinowactwa do receptorów GABA, oprócz blokowania specyficznych podjednostek zależnych od napięcia kanałów wapniowych lek ten może zwiększyć biosyntezę GABA [42]. Badania doświadczalne wskazują, że gabapentyna hamuje drgawki toniczne indukowane pentylenotetrazolem (na modelu zwierzęcym). W terapeutycznych dawkach gabapentyna zwiększa przeciwdrgawkowe działanie diazepam, fenobarbitalu, kwasu walproinowego w znacznym stopniu, felbamatu, fenytoiny w umiarkowanym stopniu, natomiast karbamazepiny i lamotryginy w niewielkim stopniu [43].



Rycina 3. Metabolizm kwasu walproinowego

Najwyraźniej nefarmakokinetyczne interakcje są odpowiedzialne za kombinacyjną terapię gabapentyny z innymi lekami przeciwpadaczkowymi [44]. Gabapentyna jest głównie polecana w terapii wspomagającej w napadach częściowych bez wtórnych uogólnień [45]. Monoterapia tym lekiem jest również skuteczna w napadach częściowych. Lek ten wydaje się skuteczny wobec opornych, uogólnionych napadów toniczno-klonicznych [45].

Topiramát

Topiramát jest dobrym przykładem leku przeciwpadaczkowego o wielokierunkowym mechanizmie działania. Związek ten jest pochodną amidosulfonianową występującego naturalnie monocukru D-fruktozy. Jego pełna nazwa brzmi 2,3,4,5-bis-O-(1-metyletylidieno)-β-D-amidosulfonian fruktopiranozy. Związek ten został pierwotnie zsyntetyzowany jako lek przeciwcukrzycowy w ramach projektu badawczego, którego celem było otrzymanie analogu fruktozo-1,6-difosforanu, zdolnego do blokowania enzymu 1,6-difosfatazy i w ten sposób blokującego glukoneogenezę. Niestety badania nie wykazały oczekiwanej aktywności hipoglikemizującej, natomiast strukturalne podobieństwo cząsteczki O-sulfaminianu w topiramacie do cząsteczki sulfonamidu w acetazolamidzie skłoniło do badań mających na celu ocenę jego potencjalnej aktywności przeciwdrgawkowej [46]. Topiramát jest lekiem przeciwpadaczkowym II generacji, który ze względu na wielokierunkowy mechanizm działania wykazuje wysoką skuteczność i szeroki zakres działania przeciwdrgawkowego zarówno w modelach eksperymentalnych, jak i klinicznych. Związek ten zwiększa głównie aktywność receptora GABA_A poprzez wpływ na częstotliwość otwarcia kanału i zwiększenie napływu jonów chlorkowych do komórki oraz powoduje blokowanie receptorów dla pobudzających aminokwasów typu AMPA i kainowych, przy braku wpływu na receptory NMDA [47, 48]. Dodatkowo, topiramát blokuje zależne od napięcia kanały sodowe, co powoduje skrócenie czasu trwania potencjałów neuronalnych oraz zmniejszenie ich ilości w czasie wyładowań padaczkowych [49]. Do innych działań topiramatu, o mniejszym znaczeniu klinicznym, należy hamowanie kanałów wapniowych typu L oraz ograniczenie uwalniania wtórnych przekźników zależnych od wapnia, jak również pobudzanie aktywności kanałów potasowych [50, 51]. Aktywacja receptora i kanałów przez topiramát prawdopodobnie wynika z jego wiązania się do konkretnych miejsc fosforylacji przez cAMP-zależnych kinaz białkowych. Prowadzi to do zaburzenia fosforylacji kanałów lub receptora, który w warunkach fizjologicznych jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania receptora lub kanału jonowego

[52]. Topiramát jest również inhibitorem kilku izoenzymów anhidrazy węglanowej [52]. Ten mechanizm działania ma niewielki efekt przeciwdrgawkowy, natomiast zwiększa ryzyko powstawania zmian nerkowych, takich jak powstawanie złożeń nerkowych. Lek ten może być stosowany w leczeniu napadów częściowych u dorosłych, w napadach częściowych u dzieci, wykazuje także znaczącą skuteczność w napadach pierwotnie uogólnionych toniczno-klonicznych [50]. Obecnie dla tego leku zatwierdzonym wskazaniem oprócz padaczki jest profilaktyka migreny u dorosłych. W badaniach klinicznych wykazano możliwość wykorzystania tego leku w uzależnieniach, zaburzeniach odżywiania, bólu neuropatycznym, chorobach psychicznych i stresie pourazowym [53]. Dane doświadczalne wskazują, że topiramát zwiększa potencjał ochronny konwencjonalnych leków przeciwpadaczkowych w różnych modelach zwierzęcych padaczki [54]. Odzwierciedla to zdolność pozytywnej interakcji tego leku z innymi lekami przeciwpadaczkowymi w przypadku ludzkiej lekoopornej padaczki [54]. Lek ten posiada szerokie spektrum przeciwpadaczkowej skuteczności, jest praktycznie skuteczny we wszystkich rodzajach napadów padaczkowych [55].

Oporność na leki przeciwpadaczkowe

Przyjmuje się, że około 30% leczonych pacjentów nie reaguje na terapię z użyciem LPP. Badania eksperymentalne i kliniczne dostarczają dowody, że poprawa GABA-ergicznej transmisji nie przynosi pozytywnych efektów ograniczających napady padaczkowe, co wskazuje na złożony mechanizm powstawania napadów padaczkowych. Na modelu zwierzęcym (szczury) wykazano, że leki nasilające transmisję synaptyczną GABA mogą doprowadzić do nasilenia napadów padaczkowych [56]. Wydaje się prawdopodobne, że prokonwulsyjne efekty leków GABA-mimetycznych mogą być związane z aktywacją receptorów GABA_B [56]. Dowodem na to jest fakt, że selektywny antagonist receptoru GABA_B związek CGP 36742, silnie hamuje napady padaczkowe. Jest prawdopodobne, że wzrost hamowania za pośrednictwem GABA może być ściśle związana z indukowaniem braku drgawek. Wiele leków przeciwpadaczkowych, znanych ze zwiększania funkcji GABA-ergicznych, jest znana jako dobre leki antynarkotyczne, na przykład benzodiazepiny i walproinian sodu. Możliwe wyjaśnienie zakłada opcję, że te leki mogą posiadać alternatywny mechanizm działania, odpowiedzialny za ich antynarkotyczne efekty. Prawdopodobnie jednym z powodów oporności na leki jest nadekspresja białek zaangażowanych w aktywny transport przez naturalne bariery, na przykład przez barierę krew-mózg

[56]. Innym powodem nabywania oporności na leki może być utrata neuronów podczas trwania choroby [57]. W badaniach udowodniono (na modelu zwierzęcym), że utrata neuronów w obszarze CA3 hipokampa, na skutek napadów padaczkowych, spowodowała zmniejszenie wrażliwości na leki przeciwpadaczkowe zwiększające transmisję GABA-ergiczną [58, 59]. Jest prawdopodobne, że neurodegeneracja może upośledzać aktywność przeciwdrgawkową leków przeciwpadaczkowych w warunkach klinicznych. Oprócz naturalnej farmakooporności na leki przeciwpadaczkowe istnieją również inne przyczyny trudności w tego typu terapii. Badania wykazały, że kofeina i inne metylokasantyny w wysokich stężeniach mogą wykazywać aktywność konwulsyjną, natomiast podczas przewlekłego podawania hamują one aktywność leków przeciwpadaczkowych na modelach zwierzęcych padaczki [60]. Najnowsze dane wskazują, że efekt podobny do kofeiny może być wywołany podawaniem nikotyny [61]. Badania kliniczne potwierdzają dane doświadczalne i wykazują, że spożywanie napojów bogatych w kofeinę może w znaczący sposób zmniejszać skuteczność leków przeciwpadaczkowych podczas terapii padaczki [62].

Kwas 3-amino-propylo-N-butylofosfinowy (CGP 36742)

Związek ten całkowicie różni się w mechanizmie działania od poprzednio omawianych leków, ponieważ nie wpływa na zwiększenie GABA-ergicznej transmisji, tylko blokuje receptory GABA_B. Jak wykazano na zwierzęcych modelach padaczki, CGP 36742 posiada działanie neuroprotektoryjne oraz poprawia funkcje poznawcze neuronów mózgu [63, 64]. W badaniach na modelach zwierzęcych CGP 36742 wykazuje synergizm w połączeniu z innymi lekami przeciwpadaczkowymi [65, 66].

Znaczenie układu glutaminergicznego w terapii

Kwas glutaminowy jest głównym neurotransmiterem pobudzającym, który należy do najważniejszych neuroprzekazników regulujących przekaznictwo synaptyczne i powolne zmiany plastyczne. Jest zatem oczywiste, że zaburzenia w funkcjonowaniu układu glutaminergicznego odgrywają istotną rolę w powstawaniu napadów padaczkowych [67]. Pobudzające aminokwasy, takie jak: glutaminian lub asparginian indukują aktywność drgawkową po podaniu systemowym oraz domózgowym [68]. W niektórych przypadkach padaczki dochodzi do wzrostu pozakomórkowego stężenia aminokwasów pobudzających, głównie glutaminianu [69]. Jest prawdopodobne, że etiologicznego punktu widzenia choroby, że pobudzenie za pośrednictwem

glutaminianu lub innych pobudzających aminokwasów, neuronów w mózgu może być związane przyczynowo z występowaniem padaczki u ludzi. Skuteczność antagonistów aminokwasów pobudzających, szczególnie tych blokujących receptory jonotropowe dla glutaminianu, w różnych eksperymentalnych modelach padaczki wydaje się wspierać takie założenie [70]. Odpowiednia aktywność kwasu glutaminowego jest wynikiem stymulacji dwóch grup pre- i postsynaptycznych receptorów błonowych, tzw. receptorów jonotropowych (iGluR) będących kanałami jonowymi bramkowanymi ligandami oraz receptorów metabotropowych (mGluR), których pobudzenie następuje poprzez aktywację białka G oraz fosfolipazy C, co wywołuje aktywację wewnątrzkomórkowych systemów przekazywania sygnałów. Podczas uwalniania z zakończeń nerwów glutaminergicznych glutaminian oddziałuje na trzy konkretne podtypy postsynaptycznych jonotropowych receptorów błonowych oznaczonych zgodnie z ich pobudzeniem przez określonych agonistów, tj. receptory NMDA, AMPA i kainowe [71]. Agonistą receptora NMDA jest kwas N-metylo-D-asparaginowy, receptora AMPA – kwas α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy, natomiast receptora kainowego – kwas kainowy. Powyższe receptory odpowiadają na wiązanie glutaminianu zwiększonym przewodnictwem jonów wapniowych, w wyniku czego dochodzi do depolaryzacji neuronów lub ich pobudzenia [70]. Receptory AMPA i kainowe są półprzepuszczalne dla jonów sodowych i są zaangażowane w szybką pobudzającą synaptyczną transmisję. W odróżnieniu od nich receptory NMDA są półprzepuszczalne dla jonów wapnia, sodu i wpływają na potencjał błony neuronów w okresach długotrwałej depolaryzacji, np. podczas napadów padaczkowych. Ze względu na fakt, że receptory jonotropowe dla kwasu glutaminowego odgrywają istotną rolę w pobudzeniu neuronów, mediując dokomórkowy prąd wapniowy i sodowy, przyjęto założenie, że mają one kluczowe znaczenie w procesach powstawania napadów padaczkowych [71]. Do drugiej grupy receptorów pobudzanych przez kwas glutaminowy należą receptory metabotropowe mGlu: Gr I, Gr II i Gr III. Receptory metabotropowe dla glutaminianu pełnią podobną funkcję co receptory GABA_B, są one sprzężone z białkiem G i działają głównie jako autoreceptory na zakończeniach glutaminergicznych, ograniczając uwalnianie glutaminianu. Glutaminian jest usuwany z synapsy w zakończeniach nerwowych i komórek glejowych przez rodzinę specyficznych, zależnych od jonów sodowych, protein transportowych (EAAT1, EAAT5) i jest dezaktywowany przez enzymy, takie jak syntetaza glutaminowa (w komórkach glejowych) i dehydrogenaza kwasu glutaminowego [72].

Glutaminergiczne receptory jonotropowe w terapii

Odkrycie roli układu glutaminergicznego w patomechanizmach powstawania padaczki determinuje jednocześnie kierunek badań w celu opracowania nowych skutecznych leków w terapii tej choroby.

Receptory NMDA

Powszechnie uważa się, że receptory NMDA mogą odgrywać kluczową rolę w powstawaniu i utrzymywaniu napadów padaczkowych. Działanie to potwierdzono w badaniach, wykazując działanie przeciwdrgawkowe antagonistów receptora NMDA [72]. Antagoniści receptora NMDA hamują drgawki wywołane pilokarpiną. Badania neurofizjologiczne na modelu padaczki częściowej wykazały, że zmiany w kinetyce receptorów NMDA, lecz nie w ich konfiguracji czy w aktywności transporterów kwasu glutaminowego wydają się w dużym stopniu ponosić odpowiedzialność za nasiloną transmisję glutaminergiczną i obniżenie progu drgawkowego. Wykazano, że receptory tego typu u zwierząt eksperymentalnych z drgawkami rozniecanymi elektrycznie są bardzo wrażliwe na bodźce pobudzające, co prowadzi do łatwiejszego szerzenia się patologicznych pobudzeń (szczególnie w obrębie płata skroniowego) [73]. Aktywacja receptorów NMDA wymaga przyłączenia agonisty w dwóch specyficznych miejscach, z których główne stanowi miejsce wiązania NMDA lub glutaminianu (agoniści receptora). Oprócz miejsca wiążącego NMDA, do którego mają powinowactwo także: kwas L-asparaginowy, kwas chinolinowy, L-homocysteinowy i homocysteina, receptor NMDA posiada szereg oddzielnych miejsc wiążących m.in. ketaminę, fencyklidynę (antagoniści receptora) czy glicynę (koagonista receptora) oraz jony cynku i manganu, poliamidy (spermina, spermidyna) oraz miejsce redoks wiążące tlenek azotu (*Nitric Oxide*, NO) [74]. Pobudzenie receptora NMDA powoduje dokomórkowy napływ jonów sodowych i wapniowych przez kanały jonowe bramkowane w spoczynku jonami Mg^{2+} . Agoniści receptorów NMDA wykazują silniejsze działanie wobec receptorów niż antagoniści, co jest tłumaczone zaburzeniami bramkowania kanału przez jony Mg^{2+} . Glutaminian wywiera działanie na receptor NMDA poprzez kanały jonowe bramkowane ligandem, prowadzące do wzrostu przewodności jonowej [74]. Otwarty kanał jonowy tego receptora jest wysoko przepuszczalny dla dokomórkowego prądu jonów wapniowych, sodowych oraz potasowych. Napływ jonów wapnia do neuronów indukuje tzw. sygnał wapniowy, który aktywuje m.in. fosfolipazę A, syntazę NO (*Nitric Oxide Synthase*, NOS) oraz proteazy. Na funkcjonowanie receptora NMDA wpływa potranslacyjna fosforylacja białek jego podjednostek, katalizowana przez kinazy białkowe zależne

od wapnia. Wyniki badań wskazują, że związki hamujące działanie receptorów NMDA mogą stanowić potencjalne leki przeciwdrgawkowe. Jednak liczne działania niepożądane antagonistów receptorów NMDA, jak np. zaburzenia pamięci i innych funkcji poznawczych oraz działania psychostymulujące, utrudniają ich zastosowanie kliniczne [75].

Receptory AMPA

Receptory AMPA odpowiadają za podstawowe przewodnictwo synaptyczne w OUN, kształtują one kanały jonowe przepuszczalne dla jonów Na^+ i K^+ i czasami jonów Ca^{2+} . Podwyższony poziom receptorów AMPA opisano w badaniach nad hipokampem pacjentów z padaczką skroniową [75, 76]. Główny mechanizm regulacji funkcji tych receptorów związany jest z procesami fosforylacji. Fosforylacja nasila przepływ jonów przez kanał receptora, co ma ważne znaczenie we wczesnym stadium długotrwałego wzmocnienia synaptycznego oraz powstawania wyładowań padaczkowych. Ekspresja receptorów jonotropowych AMPA ulega zmianom w przebiegu drgawek na modelach zwierzęcych [77]. Do tych zmian należy zaliczyć zmniejszenie gęstości podjednostek GluR1 i GluR2 składających się na receptor AMPA, regulujących przepuszczalność jonową kanału receptora. W warunkach fizjologicznych receptory AMPA przewodzą jedynie dokomórkowy prąd kationowy jonów Na^+ i K^+ . Ubytek podjednostek GluR2 prowadzi do silnego wzrostu przewodnictwa dla jonów Ca^{2+} (około 30-krotny) [78]. Konsekwencją zmian w czynności receptorów AMPA może być przeładowanie komórek jonami wapnia, co z kolei prowadzi do uruchomienia procesów apoptozy, a także ułatwia szerzenie się patologicznych wyładowań [79]. Na modelach zwierzęcych padaczki drgawki wywołane kwasem kainowym i pilokarpiną powodowały obniżenie ekspresji receptorów GluR2 w komórkach CA2 hipokampa, natomiast antagoniści receptorów AMPA hamowali drgawki indukowane czynnikami chemicznymi oraz drgawki indukowane czynnikami genetycznymi [79]. Oczekiwano, że antagoniści receptorów AMPA będą skutecznymi lekami przeciwpadaczkowymi, jednak w badaniach klinicznych okazało się, że zastosowanie tych leków jest niemożliwe z powodu licznych działań niepożądanych.

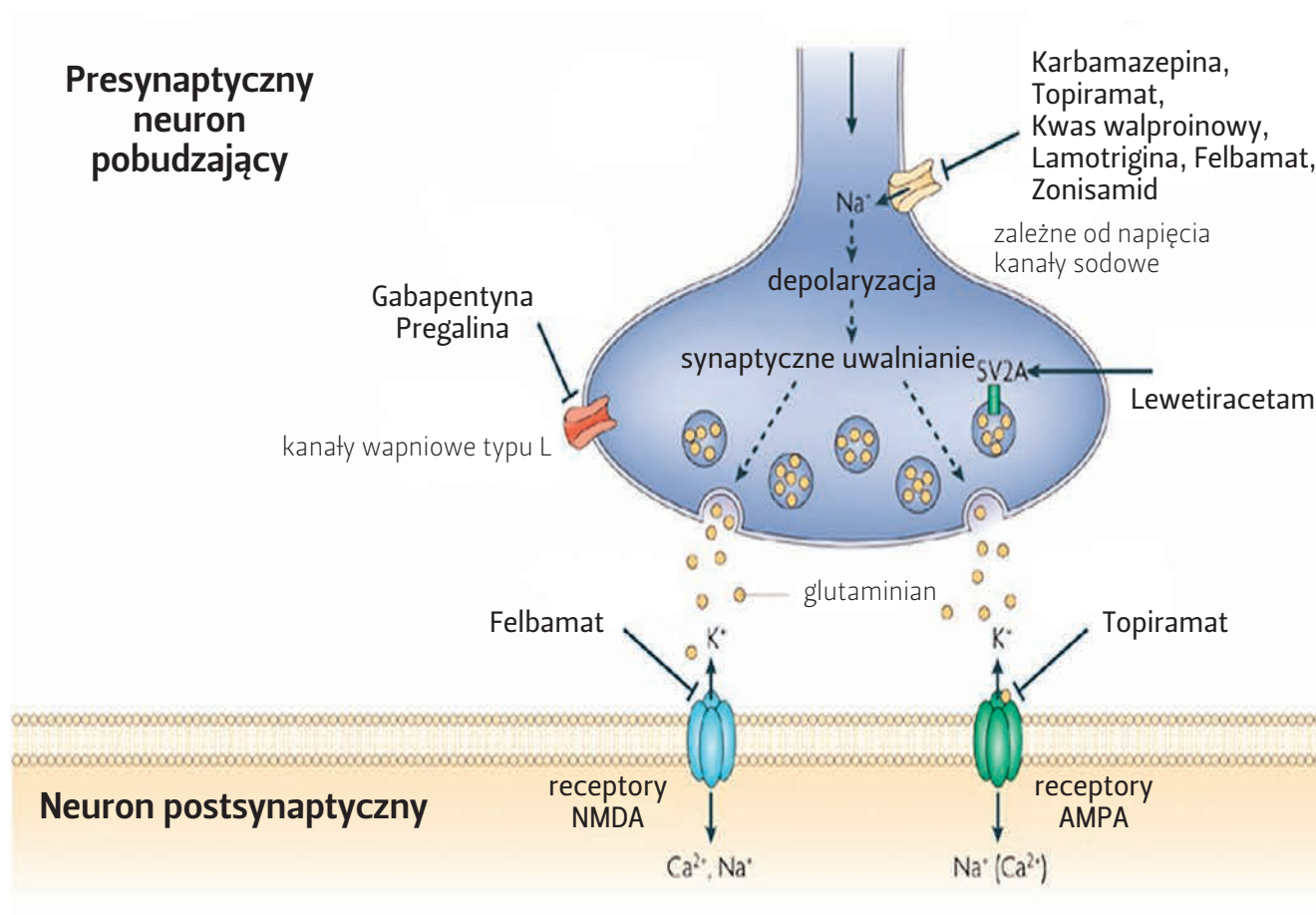
Receptory kainowe

Ostaną grupę receptorów jonotropowych kwasu glutaminowego stanowią receptory kainowe. Podanie kwasu kainowego, który jest neurotoksyną, zwierzętom doświadczalnym wywołuje drgawki, a obserwowane zmiany po podaniu tej neurotoksyny w rejonie hipokampa i płata skroniowego przypominają zaburzenia obserwowane u ludzi [80]. Za prodrgawkowe działanie kwasu kainowego odpowiada prawdopodobnie podjednostka GluR6. Zwierzęta

zmodyfikowane genetycznie i nieposiadające tej podjednostki (*knock-out*) nie są wrażliwe na prodrgawkowe działanie kwasu kainowego. W związku z tym uważa się, że podjednostka ta może stanowić punkt uchwytu dla działania przyszłych leków przeciwdrgawkowych. Szczegółowa analiza zmian w ilości i funkcji tych receptorów na modelach doświadczalnych padaczki oraz podczas badań klinicznych nie przyniosła jednoznacznych wyników. Receptory tego typu złożone z podjednostek GluR5–7 oraz KA1 i KA2 tworzą około 50 razy mniejszą populację w OUN niż receptory AMPA. Wydaje się, że drgawkotwórcze działanie kwasu kainowego może być związane z presynaptycznym hamowaniem uwalniania GABA w obszarze CA1 hipokampa [81]. W związku z faktem, że na modelach zwierzęcych padaczki wykazano hamujący wpływ antagonistów receptorów jonotropowych dla kwasu glutaminowego wobec drgawek, oczekiwano, że związki te będą skutecznymi lekami przeciwpadaczkowymi. Jednak w badaniach klinicznych okazało się, że zastosowanie tych leków jest niemożliwe z powodu licznych działań niepożądanych, takich jak pobudzenie czy działanie psychozomimetyczne [82].

Spośród konwencjonalnych leków przeciwpadaczkowych tylko walproinian i diazepam są zdolne do hamowania drgawek wywołanych systemowym

podaniem N-metylo-D, L-asparaginanu (u myszy). Fenytoina, karbamazepina i etosuksymid, w szerokim zakresie dawek, są całkowicie nieskuteczne, a tylko walproinian i diazepam były skuteczne przeciwdrgawkowo w domózgowym podaniu NMDA (u myszy) [83, 84]. Z drugiej strony, wszystkie ważniejsze leki przeciwpadaczkowe, z wyjątkiem etosuksymidu, mogą kontrolować napady padaczkowe wywołane podaniem śródmożgowym glutaminianu [85]. W chwili obecnej żaden z dostępnych leków przeciwpadaczkowych nie wykazuje wyłącznego działania na system glutaminowego neurotransmitera. Jednak zablokowanie receptorów NMDA przyczynia się do farmakologicznego działania felbamatu, również topiramatu wykazuje działanie hamujące na receptory AMPA i kainowe, o wyższym powinowactwie do tych ostatnich, również fenobarbital posiada zdolność blokowania receptorów AMPA (w dużych dawkach). Natomiast lamotrygina może selektywnie hamować uwalnianie glutaminianu, efekt ten jest prawdopodobnie związany z działaniem hamującym tego związku na presynaptyczne kanały sodowe i wapniowe [71]. W dalszym ciągu trwają prace nad lekami, których jednym z mechanizmów działania jest antagonizm wobec glutaminergicznych receptorów jonotropowych (**rycina 4**).



Rycina 4. Mechanizm działania leków przeciwpadaczkowych na układ glutaminergiczny

Glutaminergiczne receptory metabotropowe w terapii

Brak znaczących postępów nad zastosowaniem ligandów glutaminergicznych receptorów jonotropowych jako potencjalnych leków w terapii przeciwpadaczkowej spowodował duże zainteresowanie receptorami metabotropowymi. Receptory metabotropowe aktywowane za pomocą glutaminianu podzielono na trzy główne grupy i szereg podtypów. Najlepiej poznaną grupą receptorów metabotropowych jest grupa I, do której zaliczamy zlokalizowane postsynaptycznie receptory typu mGlu1 i mGlu5, do grupy II zaliczamy receptory mGlu2 i 3, a do grupy III receptory mGlu4, 6, 7 i 8. Wspólną cechą powyższych grup receptorów jest brak ich bezpośredniego powiązania z kanałami jonowymi. Funkcją tych receptorów w OUN jest regulacja uwalniania neuroprzekazników, takich jak kwas glutaminowy i GABA, jak również kontrola pobudliwości neuronalnej [84]. Poznanie roli poszczególnych receptorów mGluR w regulacji aktywności układu GABA-ergicznego i glutaminergicznego spowodowało, że związki oddziałujące na te receptory szybko wzbudziły duże zainteresowanie jako środki o potencjalnym działaniu przeciwdrgawkowym. Prace nad tą grupą ligandów uległy przyspieszeniu ze względu na brak postępu nad opracowaniem skutecznych leków przeciwpadaczkowych działających na receptory jonotropowe oraz ze względu na mechanizm działania receptorów mGluR, w którym brak bezpośredniego wpływu na kanały jonowe, co wskazuje na mniejsze prawdopodobieństwo występowania działań niepożądanych. Wśród potencjalnych zastosowań klinicznych dla tych ligandów wymienia się zaburzenia lękowe – lęk uogólniony i napady lęku panicznego,

depresję, schizofrenię, chorobę Parkinsona i inne choroby neurodegeneracyjne oraz padaczkę [85].

Receptory grupy I

Grupa I to obecnie najlepiej poznana grupa glutaminergicznych receptorów metabotropowych, których aktywność brano pod uwagę w celu opracowania nowych leków przeciwdrgawkowych. Aktywacja tych receptorów powoduje wzrost uwalniania glutaminianu, co

może prowadzić do powstawania wyładowań padaczkowych. Do grupy tej należą zlokalizowane postsynaptycznie receptory mGluR1 i mGluR5 [85]. Receptory grupy I są sprzężone z fosfolipazą C, pozostałe (grupa II i III) z cyklazą adenylową. Aktywacja receptorów grupy I zwiększa syntezę trifosforanu fosfatydyloinozytolu. Jednocześnie bezpośrednie pobudzenie receptorów tej grupy może wywoływać aktywację nieselektywnych kanałów kationowych, takich jak: kanały wapniowe typu L, inaktywację kanałów potasowych, nasilenie wymiany sodowo-wapniowej oraz depolaryzację neuronów. Ponadto aktywacja tych receptorów może upośledzać hamujące działanie GABA (kwas γ -aminomasłowy) oraz nasilać odpowiedź receptorów NMDA i AMPA [86].

Agoniści receptorów grupy I

Podawanie nieselektywnego agonisty grupy I oraz II, kwasu 1-aminocyklopentano-1,3-dikarboksylowego (ACPD), powodowało powstawanie drgawek na zwierzęcym modelu padaczki (myszy i szczury). Podobny efekt obserwowano również po podaniu innego agonisty grupy I, 2-chloro-5-hydroksyfenyloglicyny (CHPG) [86]. W badaniach prowadzonych na zwierzętach wykazano, że podawanie agonistów tej grupy do struktur mózgu, jak również dokomorowo, powoduje pojawianie się drgawek. W badaniach wykorzystano selektywnego agonistę receptorów mGluR1 i mGluR5, DHPG (3,5-dihydroksyfenyloglicyna) i agonistę receptora mGluR5 (CHPG) [87]. Mechanizm wywoływania drgawek przez powyższe substancje jest złożony i dotyczy wielu mechanizmów zarówno w obrębie receptorów, jak i na poziomie komórkowym. Dotyczy on mianowicie aktywacji kanałów wapniowych typu L, nasilenia działania pompy $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, hamowanie aktywności kanałów K^+ , nasilenia działania NMDA i AMPA (poprzez fosforylację niektórych podjednostek, np. dla NMDA NR2A), pobudzenia ekspresji receptorów NMDA na powierzchni błony komórkowej [87].

Antagoniści receptorów grupy I

Antagoniści grupy I wykazują działanie przeciwdrgawkowe. Związki, takie jak: AIDA (kwas 1-aminoinodano-1,5-dikarboksylowy) i LY 367385 ((S)-2-metylo-4-karboksyfenyloglicyna) hamowały drgawki typu uogólnionego. Inny antagonist receptoru mGluR5, MPEP (2-metylo-6-fenylotylnyl-O-pirydyna), hamował drgawki wywołane podaniem agonistów grupy I (CHPG i DHPG). Przyjmuje się, że agoniści receptorów grupy I wywołują drgawki i wydłużają czas trwania wyładowań międzynaładowych u zwierząt doświadczalnych, natomiast antagoniści receptorów grupy I zapobiegają drgawkom [86]. Podawanie substancji o działaniu antagonistycznym względem

Blokada zależnych od napięcia kanałów sodowych jest jednym z mechanizmów działania obecnie stosowanych leków przeciwpadaczkowych. Działanie tych leków na kanały sodowe polega na stabilizacji nieaktywnej formy kanału sodowego i przez to zapobieganie kolejnemu pobudzeniu neuronu, a szybka inaktywacja kanałów sodowych jest niezbędna do utrzymania normalnej aktywności elektrycznej pobudliwych neuronów.

receptorów grupy I wykazały ich przeciwdrgawkowe działanie na zwierzęcych modelach drgawek. Nie wykazano przy tym istotnych różnic między antagonistami o większej specyficzności wobec receptorów mGluR1 czy mGluR5 [88]. Również antagonist receptorów mGlu5 – MPEP hamuje drgawki wywołane podawaniem agonistów grupy I (CHPG i DHPG). Badania wykazały, że wiele nowo syntetyzowanych związków, np. LY393053 (kwas 2-amino-2-(3-karboksycyklobutylo-3-(9-tioksantyl)propionowy), poprzez nieselektywny antagonistyczny wpływ na receptory mGluR1 i mGluR5 wywiera istotne działanie przeciwdrgawkowe. Obecnie przyjmuje się, że działanie przeciwdrgawkowe powodują związki blokujące niespecyficzenie receptory grupy I, mGluR1 czy mGluR5, chociaż oba receptory odpowiedzialne są za nieco inny element aktywacji neuronalnej (mGlu5 – indukowanie wzbudzenia, mGlu1 – podtrzymanie pobudzenia) [86].

Receptory grupy II

Następna grupa, tzw. grupa II receptorów mGlu, odgrywa odmienną funkcję i ma różną lokalizację w porównaniu do grupy I receptorów metabotropowych. Do receptorów grupy II należą zlokalizowane głównie presynaptycznie receptory mGluR2 i mGluR3, w odróżnieniu od grupy I, która jest zlokalizowana głównie postsynaptycznie. Receptory mGlu grupy II są to hamujące presynaptyczne autoreceptory na zakończeniach neuronów glutaminergicznych, a wewnątrzkomórkowy mechanizm ich działania polega na obniżaniu aktywności cykazy adenylowej [89]. Efektem ich pobudzenia jest hamowanie uwalniania glutaminianu z puli neurotransmitterowej zakończeń presynaptycznych oraz uwalnianie neurotrofin w astrogleju. Wykazano, że agoniści grupy II, CCG-1 (2-karboksyfenylocyklopropyloglicyna) czy DCG-IV (dikarboksyfenylocyklopropyloglicyna) wywierają działanie przeciwdrgawkowe. Mechanizm działania powyższych agonistów grupy II związany jest z silnym hamowaniem uwalniania kwasu glutaminowego, jak również innych aminokwasów pobudzających [89]. Związki o działaniu antagonistycznym wobec receptorów grupy II powodują pojawienie się drgawek u zwierząt z genetyczną skłonnością do napadów padaczkowych (myszy szczepu DB2).

Receptory grupy III

Glutaminergiczne receptory metabotropowe grupy III są to zlokalizowane presynaptycznie receptory mGluR4, mGluR6, mGluR7 i mGluR8. Agoniści tej grupy receptorów wykazują działanie przeciwdrgawkowe, choć znane są prace o ich działaniu prodrdawkowym. Przykładem są związki, takie jak: L-AP4 (kwas L-2-amino-4-fosfonomasłowy) i L-SOP (fosfono-L-seryna), agoniści grupy III, to

związki o działaniu przeciwdrgawkowym, ale Ghauri (1996) wykazał ich efekt prodrdawkowy na zwierzęcym modelu padaczki (myszy) [90]. Rola fizjologiczna receptorów metabotropowych grupy III polega na regulowaniu funkcji (aktywności) szlaków dla kwasu glutaminowego i GABA. Receptory tej grupy kontrolują uwalnianie wymienionych neuroprzekazników z neuronów [91]. W związku z ewidentnym działaniem wpływającym na aktywność układu glutaminergicznego badano ligandy grupy III na zwierzęcych modelach padaczki. Związki o działaniu agonistycznym do tej grupy receptorów mogą wywierać nie tylko działanie przeciwdrgawkowe, ale także prodrdawkowe. Wyjaśnienie tych rozbieżnych wyników było tłumaczone niską selektywnością ligandów. Agoniści grupy III wykazywali także działanie agonistyczne wobec receptorów jonotropowych NMDA, przez co zwiększały prawdopodobieństwo wystąpienia drgawek. Podawanie dokomorowe agonisty receptorów mGlu8, PPG (4-fosfonofenyloglicyna) wywiera efekt przeciwdrgawkowy, a działanie PPG jest blokowane przez antagonistów [91]. Ligandy receptorów metabotropowych dla glutaminianu, szczególnie grupy II i III, regulują nie tylko aktywność układu glutaminergicznego, ale także GABA-ergicznego i w ten sposób mogą działać przeciwdrgawkowo jeszcze skuteczniej. Wyniki badań wskazują, że związki zaliczane do ligandów receptorów metabotropowych wykazują istotną aktywność przeciwdrgawkową na zwierzęcych modelach drgawek. Na modelach genetycznie uwarunkowanych drgawek niektóre ligandy mGluR charakteryzują się skutecznością porównywalną z lekami przeciwdrgawkowymi o uznanej już skuteczności [92]. Niestety wiarygodna ocena potencjału przeciwdrgawkowego tych związków jest trudna, ponieważ modele zwierzęce nie stanowią precyzyjnego odzwierciedlenia zjawisk obserwowanych w praktyce klinicznej [93]. Ponadto rola ligandów receptorów metabotropowych nie jest jeszcze do końca zbadana i brakuje pełnej analizy farmakologicznej ligandów receptorów metabotropowych (oceny ich metabolizmu, interakcji, działań niepożądanych itd.).

Leki wpływające na kanały jonowe

Blokada zależnych od napięcia kanałów sodowych jest jednym z mechanizmów działania obecnie stosowanych leków przeciwpadaczkowych. Działanie leków na kanały sodowe polega na stabilizacji nieaktywnej formy kanału sodowego i przez to zapobieganiu kolejnemu pobudzeniu neuronu, a szybka inaktywacja kanałów sodowych jest niezbędna do utrzymania normalnej aktywności elektrycznej pobudliwych neuronów. Leki, takie jak: fenytoina i karbamazepina wykazują ten typ działania

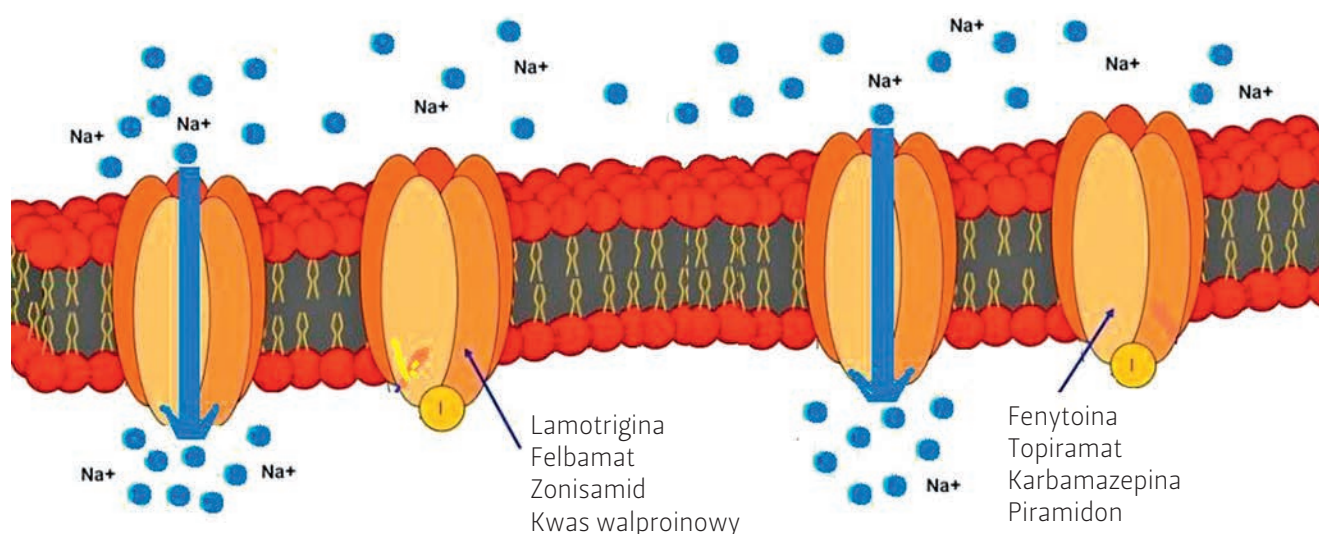
przeciwpadaczkowego [94]. Również podobny mechanizm działania związany z kanałami sodowymi wykazują nowsze leki, takie jak: lamotrigina, felbamat, topiramát oraz oksykabazepina, zonisamid, rufinamid, lokozamid i octan eslikarbazepiny. Istnieją również dowody sugerujące, że gabapentyna i walproinian sodu wykazują również wpływ na neurony poprzez oddziaływanie na kanały sodowe. Zależne od napięcia kanały sodowe istnieją w jednym z trzech podstawowych stanów konformacyjnych, tj. w fazie odpoczynku, otwarcia i inaktywacji. Podczas jednej rundy cyklu depolaryzacji kanały te przechodzą kolejne fazy stanów konformacyjnych [94]. Leki przeciwpadaczkowe blokujące kanały sodowe wykazują właściwość wysokiego powinowactwa do białek kanału sodowego w stanie nieaktywnym, a po związaniu spowalniają przejścia konformacyjne między fazą aktywną i spoczynkową kanału jonowego. W rezultacie leki tego typu powodują zmniejszenie przewodnictwa kanałów, co w konsekwencji ogranicza powstawanie seryjnych wyładowań w neuronach. Zmniejszenie napływu dodatnich jonów sodowych do wnętrza komórki nerwowej prowadzi w konsekwencji do podwyższenia progu drgawkowego. Leki przeciwpadaczkowe działające preferencyjnie na wolno inaktywującą konformację kanału sodowego, występującą w warunkach przedłużonej depolaryzacji lub przy wyładowaniach padaczkowych, hamują zarówno powtarzające się potencjały czynnościowe w ognisku padaczkowym, jak i odogniskowe rozprzestrzenianie się wyładowań padaczkowych [95, 96] (**rycina 5**).

Kolejnymi kanałami jonowymi, na które działają leki przeciwpadaczkowe są kanały wapniowe. W badaniach na modelach zwierzęcych wykazano, że antagoniści kanałów wapniowych typu L: nifedypina, nimodypina hamowali drgawki oraz działali

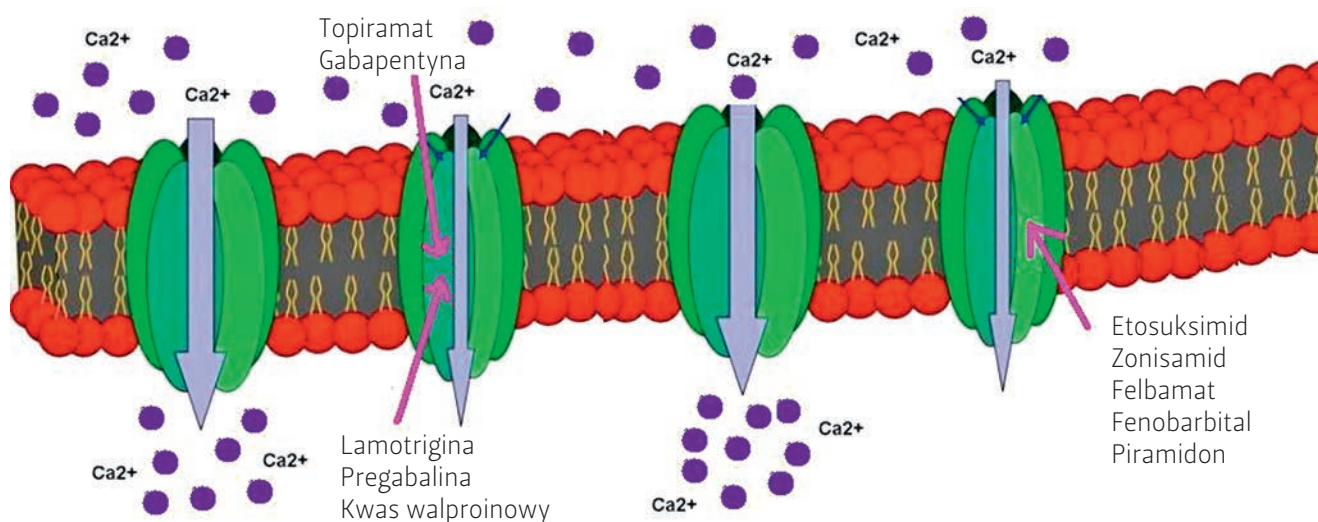
synergistycznie z antagonistami receptorów glutaminergicznych. Leki blokujące kanały wapniowe typu L działają poprzez zmniejszanie częstotliwości i czasu otwarcia kanałów. Należy zaznaczyć, że próby zastosowania tych związków w padaczkę lekoopornej nie przyniosły pozytywnych rezultatów. Ważną grupą kanałów wapniowych, których aktywność można wykorzystać do stymulacji napadów padaczkowych stanowią kanały T. Kanały tego typu odgrywają zasadniczą rolę w mechanizmie wzgórzowo-korowej aktywności i tworzenia wyładowań padaczkowych [97] (**rycina 6**).

Oksykabazepina

Jest to ketonowa pochodną karbamazepiny i jednocześnie prolek, który po podaniu zostaje uaktywniony na drodze biotransformacji do 10-monohydrosypochodnej (MHD). Właściwości przeciwdrgawkowe tego związku są związane z blokowaniem i stabilizacją przez MHD aktywności kanałów sodowych, co ogranicza wyładowania neuronów, a być może jest również związane z modyfikowaniem procesów neurotransmisji poprzez oddziaływanie na kanały potasowe i wapniowe [98]. Wykazano, że lek ten hamuje uwalnianie glutaminianu, a w badaniach na zwierzętach zwiększa uwalnianie serotoniny i dopaminy w hipokampie zwierząt [99]. Na modelu zwierzęcym padaczki metabolit oksykabazepiny (MHD) redukuje napięciowo-zależne prądy wapniowe w prążkowie (striatum) i korze mózgowej. Blokada kanałów wapniowych przez ten lek hamuje wydzielanie pobudzających aminokwasów [100]. Oksykabazepina skutecznie antagonizuje napady padaczkowe wywołane elektrowstrząsami u gryzoni, jak również drgawki toniczne stymulowane pentylenotetrazolem. Oksykabazepina jest skuteczna w leczeniu padaczki lekoopornej, a w monoterapii wykazuje siłę



Rycina 5. Schemat działania leków na kanały sodowe



Rycina 6. Schemat działania leków na kanały wapniowe

działania odpowiadającą walproinianom lub fenytoinie [101, 102].

Felbamat (dikarbaminian 2-fenyl-1,3-propanodiolu)

Dane eksperymentalne wykazują, że lek ten blokuje zależne od napięcia kanały sodowe i podjednostkę NR2B receptora NMDA [103, 104]. Wykazano również, że felbamat hamuje glutaminergiczną neurotransmisję poprzez receptory kainowe, receptory AMPA i zwiększa GABA-ergiczne hamowanie poprzez podobny do barbituranów efekt modulacyjny na receptor $GABA_A$ [105, 106]. Felbamat skutecznie hamuje napady padaczkowe wywołane pentylenotetrazolem, pikrotoxiną, kwasem NMDA, natomiast nie hamuje drgawek wywołanych bikkuliną i strychniną [107]. Kliniczne zastosowanie tego leku jest obecnie ograniczone, ponieważ istnieją doniesienia wskazujące na możliwość wystąpienia aplastycznej anemii oraz możliwość powstania niewydolności wątroby [108]. Prawdopodobieństwo wystąpienia anemii można w dużym stopniu wyeliminować, ponieważ pacjenci z niewydolnością szpiku kostnego lub istniejącymi wcześniej zaburzeniami immunologicznymi nie są poddawani terapii tym lekiem [107]. Natomiast hepatotoksyczność wywołana tym lekiem nie różni się znacząco od tej, która powstaje w wyniku stosowania walproinianu sodu [109]. Stosowanie felbamatu jest ograniczone do terapii padaczki opornej na inne leki przeciwpadaczkowe i zespołu Lennox-Gastaut [110, 111].

Zonisamid (1-(1,2-benzoksazol-3-yl)-metanosulfonamid)

Jest wydalany z moczem w postaci glukuronianów. Lek ten blokuje zależne od napięcia kanały sodowe i redukuje prądy wapniowe w wyniku blokowania kanałów typu T. W stężeniach

terapeutycznych zwiększa zarówno dopaminergiczną i serotonergiczną neurotransmisję oraz hamuje przewodnictwo glutaminergiczne. Unikalny mechanizm działania tego leku polega na zmniejszeniu nadprodukcji tlenu azotu i wolnych rodników, które mogą być związane z jego działaniem przeciwdrgawkowym i neuroprotektynym. Wydaje się, że zonisamid nie ingeruje w neurotransmisję GABA-ergiczną [112]. Ze względu na obecność wielokierunkowego mechanizmu działania zonisamid posiada szerokie spektrum aktywności przeciwdrgawkowej. Jest on skuteczny wobec napadów wywołanych przy pomocy chemicznych związków prokonwulsyjnych. Ostatnie dane kliniczne wskazują, że zonisamid jest skuteczny w zaburzeniu dwubiegunowym i ostrej manii. Istnieją również dowody, że lek ten może złagodzić objawy choroby Parkinsona. Działanie to jest związane z hamowaniem przez ten lek aktywności monoaminoooksydazy typu B (MAO-B) [112]. Jego możliwe efekty przeciwmigrenowe mogą być związane z tym samym mechanizmem działania [101].

Stiripentol

Innym lekiem wprowadzonym do terapii jest stiripentol (4,4-dimetylo-1-[3,4-(metylenodiosy)fenyl]-1-penten-3-ol). Związek ten należy do nielicznych związków bezazotowych, który znalazł zastosowanie w terapii dużych napadów padaczkowych i napadów nieświadomości. Stiripentol podnosi poziom GABA w strukturach mózgu i szczeliny synaptycznej.

Pregabalina

Pregabalina jest lekiem o szerokim spektrum działania klinicznego. Mechanizm działania tego leku wiąże się z powinowactwem do podjednostki $\alpha 2\delta$ napięciowo-zależnych kanałów wapniowych.

Tabela 1. Potencjalne zastosowanie leków przeciwpadaczkowych II generacji

Lek	Potencjalne zastosowanie w zależności od typu napadu padaczkowego
Wigabatryna	wskazaniem do stosowania wigabatryny jest padaczka z napadami częściowymi złożonymi lub bez uogólnienia, w przypadkach opornych na inne leki przeciwpadaczkowe; dotyczy to również wtórnie uogólnionych napadów kloniczno-tonicznych; poza padaczką lek ten może być stosowany w późnych dyskinezach i spastyczności mięśni szkieletowych
Lamotrigina	stosuje się głównie w napadach częściowych i uogólnionych jako lek pierwszego lub drugiego rzutu oraz w napadach toniczno-klonicznych, gdy leki podstawowe nie wykazują pożądanych efektów; próbuje się zastosować ten lek w stabilizacji nastroju, zapobiegając stanom maniakkalnym
Gabapentyna	stosuje się głównie w napadach częściowych jako lek drugiego rzutu
Felbamat	stosuje się w przypadkach opornych na inne leki, w napadach częściowych lub bez wtórnego uogólnienia, w zespole Lennox-Gastaut u dzieci
Topiramet	stosuje się jako lek pomocniczy we wszystkich rodzajach napadów padaczkowych przy braku skuteczności innych leków przeciwpadaczkowych; stosuje się w napadach częściowych w monoterapii i w napadach uogólnionych jako lek dodatkowy
Tiagabina	lek ten może być skuteczny we wszystkich rodzajach napadów padaczkowych
Inhibitory anhidazy węglanowej – Acetazolamid	acetazolamid jest skuteczny w zapobieganiu wszystkim napadom padaczkowym, jest również stosowany w napadach nieświadomości opornych na inne leki; szybki rozwój tolerancji na ten lek ogranicza jego skuteczność
Sultiam	sultiam w połączeniu z innymi lekami przeciwpadaczkowymi jest stosowany w terapii padaczki częściowej; wydaje się, że lek ten powoduje zwolnienie metabolizmu jednocześnie z nim stosowanych leków przeciwpadaczkowych, co jest bezpośrednio odpowiedzialne za jego działanie przeciwpadaczkowe
Oksykarba-zepina	stosowana w napadach częściowych i napadach toniczno-klonicznych
Lewetiracetam	wskazaniem są napady częściowe, wtórne uogólnione, miokoniczne i napady nieświadomości
Zonisamid	skuteczny we wszystkich typach napadów padaczkowych

Podjednostka ta reguluje uwalnianie neuroprzebieżników o działaniu pobudzającym z pęcherzyków presynaptycznych, szczególnie w neuronach wykazujących nadmierne wyładowania. Przypuszcza się, że lek ten zwiększa ilość GABA w mózgu, ale nie wiadomo, jaki jest mechanizm tego zjawiska [112]. Pregabalina jest lekiem o szerokim spektrum działania klinicznego i znalazła zastosowanie w leczeniu padaczki oraz bólu neuropatycznego, jest ona również skuteczna w leczeniu uogólnionych zaburzeń lękowych.

Lamotrigina (6-(2,3-dichlorofenyl)-3,5-diamino-1,2,4-triazyna))

Lek ten wykazuje podobny mechanizm działania do konwencjonalnych leków przeciwpadaczkowych, takich jak: karbamazepina i fenytoina. Związek ten wiąże się do nieaktywnych form zależnych od napięcia kanałów sodowych, ogranicza degradację neuronów bez żadnego istotnego wpływu na

normalną aktywność synaptyczną [113]. Ponadto lamotrigina redukuje prądy wapniowe poprzez oddziaływanie na napięcie-wrażliwe kanały wapniowe [113]. Związek ten jest antagonistą receptorów glutaminergicznych NMDA, a jego aktywność przeciwpadaczkowa jest następstwem zmniejszenia presynaptycznego uwalniania aminokwasów pobudzających, głównie glutaminianu i asparaginianu, poprzez hamowanie zależnych od napięcia kanałów sodowych [114]. Lek ten hamuje wyładowania i zmniejsza pobudliwość błony neuronalnej. Badania wykazały, że związek ten zmniejsza stężenie serotoniny i dopaminy w hipokampie [115]. Jego kliniczne spektrum jest szerokie – lek jest skuteczny wobec uogólnionych napadów toniczno-klonicznych, częściowych i w przypadku braku drgawek [116, 117]. Spośród nowych leków jest niewątpliwie związkiem o dużej aktywności i wydaje się wykazywać nawet większą skuteczność w napadach pierwotnie uogólnionych, w tym zwłaszcza w napadach nieświadomości (absence). Dowiedziono także jego znaczącą aktywność w monoterapii padaczek lekoopornych. Z takim przeznaczeniem do stosowania został już zarejestrowany w wielu krajach [118]. Wprowadzanie leków przeciwpadaczkowych wg zasady powolnego, stopniowego budowania dawki ostatecznej (start low, go slow) znajduje tu dobitne uzasadnienie. Lamotrigina nie zaburza procesów poznawczych i, jak się wydaje, może korzystnie oddziaływać na emocje, jako lek stabilizujący nastrój [119]. Działanie tego leku jest często związane z występowaniem zespołu Stevensa-Johnsona lub toksycznej nekrozy naskórki. Jednakże szczegółowa analiza tego problemu wykazała, że inne leki przeciwpadaczkowe, jak: karbamazepina, fenobarbital lub fenytoina mogą także powodować podobne skutki uboczne [120]. Lamotrigina może powodować wysypkę, oczywiście zależną od dawki, która może w ciężkich przypadkach prowadzić do przerwania leczenia tym lekiem (u około 4% pacjentów) [121]. Tak jak w przypadku innych nowych leków przeciwpadaczkowych, częstość występowania niepożądanych działań może być zmniejszona w wyniku zmniejszenia dawki początkowej (**tabela 2, ryciny 7 i 8**) [122].

Leki III generacji

Pomimo szerokiego wyboru leków przeciwpadaczkowych, trwają obecnie intensywne badania nad zastosowaniem leków nowej generacji. Ponieważ wiele nowych związków zostało przebadanych jako potencjalne leki przeciwpadaczkowe, zaproponowano wprowadzenie nowego terminu określającego je jako leki przeciwpadaczkowe trzeciej generacji. Do leków tych zalicza się następujące związki: brivaracetam, karisbamat, octan eslikarbazepiny,

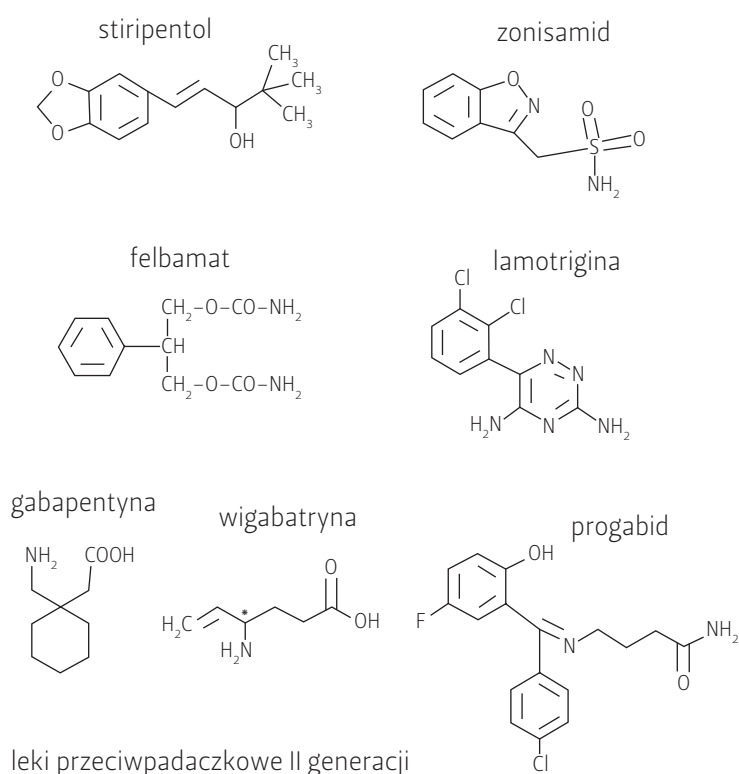
ganaksolon, lakosamid, retigabina, rufinamid, safinamid, soretolid i tonabersat. Niektóre z tych nowych leków przeciwpadaczkowych przeszły już przedkliniczne i kliniczne badania, a takie leki, jak: lakozamid, octan eslikarbazepiny, ganaksolon zakończyły już fazę II i III badań klinicznych i próbuje się je zastosować w terapii [123]. Trwają również badania nad innymi substancjami o działaniu przeciwdrgawkowym. Ze związków tych, które przechodzą kolejne fazy badań, można wymienić: brivaracetynę, flurfelbamat, seletracetam. Niektóre z tych nowych leków są to modyfikacje obecnie stosowanych związków, natomiast inne charakteryzują się nową budową chemiczną i nowym mechanizmem działania [124].

Ganaksolon

Związek ten należy do neuroaktywnych steroidów i jego główny mechanizm działania przeciwpadaczkowego obejmuje wzrost przepuszczalności kanału chlorkowego w kompleksie receptora GABA_A. Neurosteroid ten wiąże się do specyficznego miejsca steroidowego obecnego w kompleksie receptora GABA_A. Sugeruje się, że związek ten może wykazywać kilka mechanizmów działania. Wydaje się, że ganaksolon oprócz działania na receptory GABA_A może również hamować zależne od napięcia kanały wapniowe i zmniejszać pośrednictwo receptorów NMDA w powstawaniu napadów padaczkowych. Ganaksolon był aktywny przeciwpadaczkowo na różnych modelach zwierzęcych padaczki i łagodzi napady padaczkowe wywołane za pomocą maksymalnych elektrowstrząsów, pentetrazolem, bikukuliną i pikrotoksyną. Był on jednak nieskuteczny w napadach wywołanych przez strychninę i w przypadku napadów wywołanych stymulacją receptorów NMDA. Warto zauważyć, że ganaksolon w hamowaniu drgawek wywołanych pentetenotetrazolem był skuteczniejszy niż diazepam i walproinian sodu [125]. W badaniach klinicznych wykazano potencjalną aktywność tego związku wobec napadów częściowych, złożonych mioklonicznych i toniczno-klonicznych. Związek ten jest bezpieczniejszy w działaniu w porównaniu do konwencjonalnych leków przeciwpadaczkowych pod względem niepożądanych skutków ubocznych w przedziale ich przeciwdrgawkowych dawek [126].

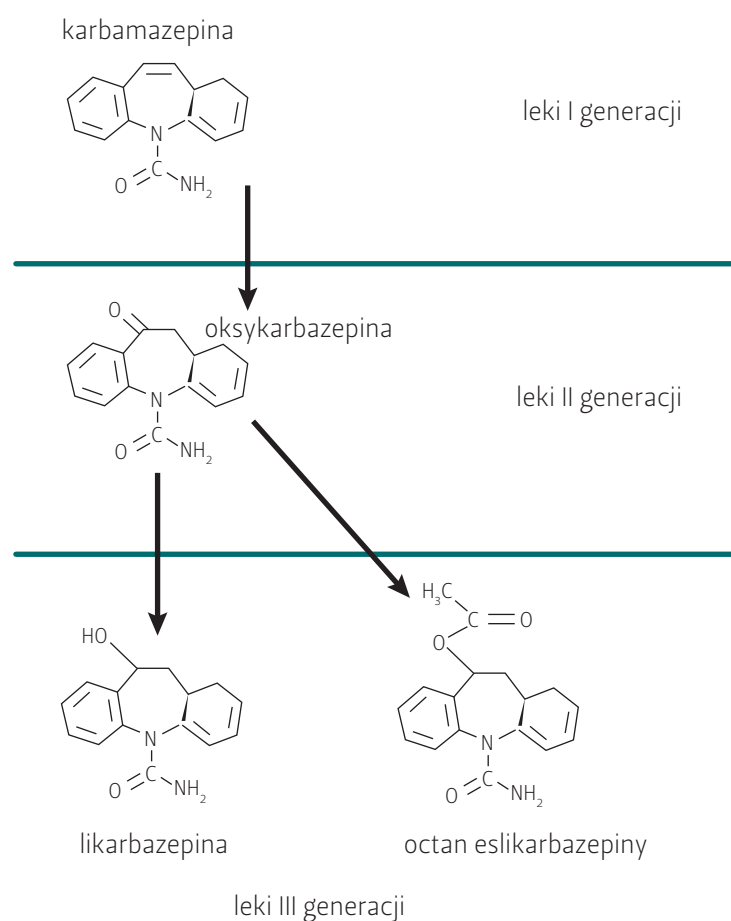
Retigabina (Retigabine, RTG)

Retigabina, ester etylowy kwasu (N-[2-amino-4-(4-fluorobenzylamino)-fenylo]karbamidowego, wykazuje silne działanie przeciwdrgawkowe na różnych modelach zwierzęcych napadów padaczkowych [127], hamuje on napady wywołane maksymalnym wstrząsem elektrycznym, pentetenotetrazolem oraz drgawki indukowane



leki przeciwpadaczkowe II generacji

Rycina 7. Schemat leków przeciwpadaczkowych II generacji



Rycina 8. Schemat leków przeciwpadaczkowych I, II i III generacji

pikrotoksyną, kwasem kainowym i kwasem N-metylo-D-asparaginianem (NMDA), natomiast nie działa na drgawki wywołane strychniną i bikukuliną. W doświadczeniach *in vitro* wykazano, że retigabina zwiększa natężenie przepływu jonów chlorkowych na skutek oddziaływania na receptory GABA_A oraz zwiększa syntezę GABA w neuronach i komórkach gębowych [128]. Ten wzmacniacz neurotransmisji GABA-ergicznej wpływa również na otwieranie kanałów potasowych oraz słabo oddziałuje na kanały sodowe i wapniowe [129]. Retigabina powoduje otwarcie neuronalnych, zależnych od napięcia kanałów potasowych typu M, co powoduje zwiększenie natężenia prądu potasowego. Prądy potasowe wzbudzone przez retigabinę stanowią podprogowe prądy, który kontrolują neuronalną pobudliwość poprzez stabilizowanie potencjałów błonowych. M-kanały potasowe składają się z heteromerycznych lub homologicznych zespołów zbudowanych z różnych podjednostek KCNQ1, KCNQ2, KCNQ3, KCNQ4 i KCNQ5. Lek ten selektywnie podwyższa prąd potasowy M przez oddziaływanie z heteromerycznymi kanałami KCNQ2 / 3 i kanałami KCNQ3/5, jak również z homomerycznymi kanałami KCNQ5 [55, 130, 131]. Mutacje produktów genowych dla tych kanałów potasowych mogą powodować syndromy padaczki znane jako łagodne rodzinne drgawki noworodków [145]. Dlatego też kanały potasowe mogą odgrywać integralną rolę w kontrolowaniu padaczki podobnych napadów. Podobnie jak ganaxolon, retigabina skutecznie hamuje rozwój napadów, co wskazuje, że związek ten może hamować proces epileptogenezy [131].

Octan eslikarbazepiny (Eslicarbazepine acetate, ESL)

Dokładny mechanizm działania ESL nie jest całkowicie poznany, ale elektrofizjologiczne badania w warunkach *in vitro* wykazały, że związek ten wykazuje konkurencyjną interakcję z nieaktywnym stanem zależnym od napięcia kanałem sodowym i zapobiega powrotowi do stanu aktywnego [132]. Głównym mechanizmem działania tego leku jest wpływ na aktywność zależnych od napięcia kanałów sodowych. Mechanizm powinowactwo ESL do kanału sodowego w stanie spoczynku jest podobny do działania karbamazepiny, ale powinowactwo tego związku do kanału jest około trzy razy większe, co prawdopodobnie sugeruje wyższą hamującą selektywność ESL na neurony [133]. Wcześniejsze badania wykazały, że ESL działa podobnie do karbamazepiny i oksykarbazepiny w hamowaniu uwalniania neuroprzekaźników lub neuromodulatorów, takich jak: glutaminian, kwas gamma-aminomasłowy (GABA) i dopamina w prądkowi [134]. Związek ten blokuje toniczne napady

wywołane elektrowstrząsami oraz napady kloniczne wywołane pentetrazolem (PTZ), bikukuliną i pikrotoksyną [134].

Lakozamid (lacosamide, LCM)

Lakozamid, (R)-2-acetamido-N-benzyl-3-metoksypropionamid, to nowy lek przeciwpadaczkowy. Związek ten jest aminokwasem z funkcjonalną grupą aminową, która decyduje o aktywności przeciwdrgawkowej [135]. Dokładny mechanizm działania lakozamidu nie jest w pełni poznany. Sugeruje się, że LCM zwiększa powolną inaktywację zależnych od napięcia kanałów sodowych. Ostatnie dowody sugerują, że lakozamid może również hamować anhidrazę węglanową. Klasyczne leki przeciwdrgawkowe, takie jak: karbamazepina, fenytoina i lamotrygina działają na szybkość inaktywacji zależnych od napięcia kanałów sodowych [136]. LCM wykazuje silne działanie przeciwdrgawkowe w szerokim zakresie na modelach zwierzęcych częściowej padaczki, w drgawkach uogólnionych tonicznie-klonicznych, jak również na stan padaczkowy. LCM posiada niski potencjał interakcji lekowych oraz minimalną zdolność wiązania białek osocza, co wpływa na niski potencjał wypierania innych leków przeciwpadaczkowych z połączeń białkowych, takich jak: karbamazepina, gabapentyna, lamotrygina, lewetiracetam, topiramata i zonisamid (tabela 2) [136].

Podsumowanie

Terapia farmakologiczna należy do podstawowych metod leczenia chorych na padaczkę. Żaden ze stosowanych obecnie leków przeciwpadaczkowych nie eliminuje zmian organicznych w układzie nerwowym, stanowiących podłoże schorzenia. Stosowane leki mogą jedynie ograniczyć liczbę napadów lub znieść je całkowicie. Obecnie stosowane leki przeciwpadaczkowe posiadają różne mechanizmy działania. Nowsze leki o wielokierunkowym mechanizmie działania są z reguły lepiej tolerowane dzięki mniejszej toksyczności oraz korzystniejszym własnościom farmakokinetycznym. Wśród nowych leków przeciwpadaczkowych, które wprowadzono do leczenia w ostatniej dekadzie nadal jednak nie ma jednego leku, który niezależnie od typu napadów padaczkowych i dodatkowych uwarunkowań eliminowałby całkowicie ich występowanie, nie wywołując przy tym żadnych objawów ubocznych. Jednak z całą pewnością leki nowej generacji, dzięki wysokiej skuteczności i dobrej tolerancji, w istotny sposób poprawiają możliwości leczenia padaczki. Największą rolę w powstawaniu padaczki odgrywa układ glutaminergiczny i GABA-ergiczny. Związane jest to oczywiście z faktem, że właśnie te neuroprzekaźniki są wykorzystywane

Tabela 2. Mechanizm działania leków przeciwpadaczkowych

Lek	Kanał jonowy	Mechanizm pobudzający	Mechanizm hamujący	Inne
Leki I generacji				
Benzodiazepiny			wzrost stężenia GABA	
Karbamazepina	blokowanie kanałów Na i Ca (typu L)			
Etosuksymid	blokowanie kanałów Na i Ca (typu T)			
Fenobarbital	wzrost transportu jonów Cl		wzrost stężenia GABA	
Fenytoina	blokowanie kanałów Na			
Kwas walprainowy	blokowanie kanałów Na i Ca (typu L)			
Leki II generacji				
Felbamat	blokowanie kanałów Na i Ca	antagonizm wobec receptorów NMDA		
Gabapentyna	blokowanie kanałów Ca (typ N i P/Q)		zwiększenie synaptycznego uwalniania GABA	
Lamotrygina	blokowanie kanałów Na i Ca (typ N i P/Q oraz R i T)	hamowanie uwalniania synaptycznego glutaminianu i asparaginianu	Wzrost stężenia GABA	
Lewetiracetam	blokowanie kanałów K i Ca (typu N)		Wzrost stężenia GABA	wiązanie do peptydu SV2A
Oksykarbazepina	blokowanie kanałów Na i Ca (typu N i P)			
Pregabalin	blokacja kanałów Ca (typu N, P/Q)			
Rufinamid	przedłużona inaktywacja kanałów Na			
Tiagabina			hamowanie wychwyty zwrotnego GABA	
Topiramát	blokowanie kanałów Na	blokowanie receptorów glutaminergicznych typu AMPA i kainowych	aktywacja receptorów GABA _A	hamowanie aktywności anhidrazy węglowej
Wigabatryna			hamowanie aminotransferazy GABA	
Zonisamid	blokowanie kanałów Na/Ca (typu N, P, T)			hamowanie aktywności anhidrazy węglowej
Leki III generacji				
Ezogabina	wzrost przewodnictwa potasowego typu M			
Lakosamid	inaktywacja kanałów Na			
Perampanel		blokowanie receptorów AMPA		

przez ponad 90% synaps w ośrodkowym układzie nerwowym, które odpowiadają za przewodnictwo pobudzające lub hamujące oraz pełnią ważną rolę we wzajemnej interakcji komórek glejowych i neuronów. Wydaje się zatem, z powyższych względów, że największe znaczenie w hamowaniu napadów posiadają związki nasilające przekazywanie GABA-ergiczne, hamujące układ glutaminergiczny oraz blokujące kanały sodowe i wapniowe. Aktywność padaczkowa prowadzi z czasem do utraty komórek nerwowych na skutek neurodegeneracji, co może powodować zwyrodnienia sieci neuronalnej. Wydaje się, że niektóre leki przeciwpadaczkowe wykazują aktywność neuroprotekcijną wobec tych zmian, należy zatem przed ustaleniem terapii wybrać leki przeciwpadaczkowe o tych neuroprotekcyjnych właściwościach. Dane doświadczalne wskazują, że zwłaszcza, topiramát, lamotrygina i tiagabina zapewniają znaczną neuroprotekcję w modelach doświadczalnych padaczki. Należy zatem w pierwszym etapie leczenia zastosować te leki w celu hamowania apoptozy neuronów i zmianach w sieci neuronalnej. Potencjalnym

punktem uchwytu dla nowych leków przeciwpadaczkowych mogą być związki wiążące się receptorami jono- i metabotropowymi dla kwasu glutaminowego. Antagoniści NMDA hamują drgawki, jednak ze względu na działania niepożądane (m.in. zaburzenie funkcji ruchowych i pamięciowych) nie znalazły zastosowania w terapii. Atrakcyjną grupę substancji stanowią związki wiążące się z receptorami metabotropowymi dla kwasu glutaminowego, a także substancje wiążące się z receptorami neuropeptydowymi i adenozynowymi. Nowe mechanizmy działania leków przeciwpadaczkowych mogą doprowadzić w przyszłości do skuteczniejszego leczenia oraz kontrolowania napadów drgawkowych u ludzi chorych na padaczkę.

Otrzymano: 2014.07.31 · Zaakceptowano: 2014.08.26

Piśmiennictwo

1. Jędrzejczak J., Zwoliński P., Liberski W.: Choroby układu nerwowego. Warszawa. PZWL. 2004: 442–466.
2. Kwan P., Brodie M.: Early identification of refractory epilepsy. Engl. J. Med. 2000, 342: 314–319.

3. Perucca E.: Development of new antiepileptic drugs. *Lancet Neurol.* 2007, 6: 793–804.
4. Czapirński P.: Leczenie padaczki u osób dorosłych: wybór leku i prowadzenie terapii w padaczce nowozdiagnozowanej. *Neurol. i Psych.* 2004, 1: 60–66.
5. Deckers C.P., Czuczwar S.J.: Selection of antiepileptic drug polytherapy based on mechanism of action: the evidence reviewed. *Epilepsia.* 2000, 41: 1364–1374.
6. Sobieszek G., Borowicz K.K., Czuczwar S.J.: Zonisamide: A new antiepileptic drug. *Pol. J. Pharmacol.* 2003, 55: 683–689.
7. Antkiewicz-Michaluk L.: Receptor and voltage-operated ion channels in the central nervous system. *Pol. J. Pharmacol.* 1996, 33: 253–264.
8. Kostowski W.: Recent advances in the GABA-A-benzodiazepine receptor pharmacology. *Pol. J. Pharmacol.* 1995, 47: 237–246.
9. Enz R., Cutting G.R.: Molecular composition of GABAC receptors. *Vision Res.* 1998, 38: 1431–1441.
10. Czuczwar S.J.: Effect of combined with dopaminergic and GABA-ergic drugs on the threshold for maximal electroconvulsions in mice. *Pol. J. Pharmacol.* 1981, 33: 25–35.
11. Bialer M., Johannessen S.I., Kupferberg H.J.: Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the fourth Eilat conference (EILAT IV). *Epilepsy Res.* 1999, 34: 1–41.
12. Patsalos P.N.: New antiepileptic drugs. *Ann. Clin. Biochem.* 1999, 36: 10–19.
13. Löscher W., Hönack D., Taylor C.P.: Gabapentin increases aminooxyacetic acid-induced GABA accumulation in several regions of rat brain. *Neurosci. Lett.* 1991, 120: 150–154.
14. Meldrum B.S.: Update on the mechanism of action of antiepileptic drugs. *Epilepsia.* 1996, 37(Suppl. 6): S4–S11.
15. Gee N.S., Brown J.P., Woodruff G.N.: The novel anticonvulsant drug, gabapentin (neurontin), binds to the $\alpha_2\delta$ subunit of a calcium channel. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 5768–5776.
16. Meldrum B.S.: Mechanism of action of antiepileptic drugs. *Epilepsia* 1998, 47(Suppl. 6): 33–38.
17. Ticku M.K., Kamatchi G.L., Sofia R.D.: Effect of anticonvulsant felbamate on GABAA receptor system. *Epilepsia* 1991, 32: 389–391.
18. Chmielewska B.: Miejsce nowych leków przeciwpadaczkowych w farmakoterapii padaczki. *Przew. Lek.* 2001, 4: 70–77.
19. Meldrum B.S.: GABAergic mechanisms in the pathogenesis and treatment of epilepsy. *Br J Clin Pharmacol* 1989, 27: 3–17.
20. Pitkanen A., Tuunanen J., Halonen T.: Vigabatrin and carbamazepine have different efficacies in the prevention of status epilepticus induced neuronal damage in the hippocampus and amygdala. *Epilepsy Res.* 1996, 24: 29–45.
21. Mecarelli O., De Feo M.R., Del Priore D.: Vigabatrin versus carbamazepine and phenytoin in kainic acid-treated pubescent rats. *Pharmacol. Res.* 1997, 36: 87–93.
22. Engelborghs S., Pickut B.A., D'Hooge R.: Behavioral effects of vigabatrin correlated with whole brain gamma-aminobutyric acid metabolism in audiogenic sensitive rats. *Arzneimittelforschung* 1998, 48: 713–716.
23. Mazurkiewicz M., Sirvio J., Riekkinen P.: Effects of single and repeated administration of vigabatrin on the performance of nonepileptic rats in a delayed non-matching to position task. *Epilepsy Res.* 1993, 15: 221–227.
24. Sheth R.D., Buckley D., Penney S.: Vigabatrin in childhood epilepsy: comparable efficacy for generalized and partial seizures. *Clin. Neuropharmacol.* 1996, 19: 287–304.
25. Provinciani L., Bartolini M., Mari F.: Influence of vigabatrin on cognitive performances and Mechanisms of Action of Antiepileptic Drugs Current Topics in Medicinal Chemistry, 2005, 5(113).
26. Sills G.J., Butler E., Thompson G.G.: Vigabatrin and tiagabine are pharmacologically different drugs. A pre-clinical study. *Seizure* 1999, 8: 404–411.
27. Bialer M., Johannessen S.I., Kupferberg H.J.: Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the fourth Eilat conference (EILAT IV). *Epilepsy Res.* 1999, 34: 11–41.
28. Dalby N.O., Nielsen E.B.: Comparison of the preclinical anticonvulsant profiles of tiagabine, lamotrigine, gabapentin and vigabatrin. *Epilepsy Res.* 1997, 28(1): 63–72.
29. Brodie M.: Tiagabine pharmacology in profile. *Epilepsia.* 1995, Suppl. 6: 7–9.
30. Pitkanen A., Tuunanen J., Halonen T.: Vigabatrin and carbamazepine have different efficacies in the prevention of status epilepticus induced neuronal damage in the hippocampus and amygdala. *Epilepsy Res.* 1996, 24: 29–45.
31. Hosford D.A., Wang Y.: Utility of the lethargic mouse model of absence seizures in predicting the effects of lamotrigine, vigabatrin, tiagabine, gabapentin, and topiramate against human absence seizures. *Epilepsia.* 1997, 38: 408–414.
32. Tuer M.S., Rhoney D.H.: Tiagabine: a novel antiepileptic drug. *Ann. Pharmacother.* 1998, 32: 1173–1180.
33. Knake S., Hamer H.M., Schomburg U.: Tiagabine-induced absence status epilepticus in idiopathic generalized epilepsy. *Seizure* 1999, 8: 314–317.
34. Smith P., Wallach S.: Leczenie padaczek.: Padaczka – kliniczny przewodnik. Wyd. 1 polskie. ALFA – Medica Press, Bielsko-Biała 2003: 128–164.
35. Jóźwiak S.: Postępy w badaniach nad genetyką molekularną padaczki. *Neurol. Neurochir. Pol.* 2005, 39: 497–508.
36. Bernasconi R., Kle M., Martin P.: The specific protective effect of diazepam and valproate against isoniazid-induced seizures is not correlated with increased GABA levels. *J. Neural Transm.* 1985, 63: 169–189.
37. Hill D.R., Siman-Chanham N., Woodruff G.N.: Autoradiographical detection of (3H)-gabapentin binding sites in rodent brain. Abstract. *Br J. Clin. Pharmacol.* 1991, 104: 72–77.
38. Bialer M., Johannessen S.I., Kupferberg H.J., Levy R.H., Loiseau P., Perucca E.: Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the Sixth Eilat Conference (EILAT VI). *Epilepsy Res.* 2002, 51(12): 31–71.
39. Schlicker E., Reimann W., Göthert M.: Gabapentin decreases monoamine release without affecting acetylcholine release in the brain. *Arzneimittelforschung.* 1985, 35(9): 134–139.
40. Cunningham M.O., Woodhall G.L., Thompson S.E., Dooley D.J.: Dual effects of gabapentin and pregabalin on glutamate release at rat entorhinal synapses in vitro. *Eur. J. Neurosci.* 2004, 20(6): 156–176.
41. Czapinski P., Blaszczyk B., Czuczwar S.J.: Mechanism of action of antiepileptic drugs, *Curr. Top. Med. Chem.* 2005, 5(1): 3–14.
42. Gee N.S., Brown J.P., Woodruff G.N.: The novel anticonvulsant drug, gabapentin (neurontin), binds to the subunit of a calcium channel. *J. Biol. Chem.* 1996, 271: 5768–5776.
43. De Sarro G., Spagnolo C., Gareri P.: Gabapentin potentiates the antiseizure activity of certain anticonvulsants in DBA/2 mice. *Eur. J. Pharmacol.* 1998, 349: 179–185.
44. Borowicz K.K., Swiader M., Czuczwar S.J.: Effect of gabapentin on the anticonvulsant activity of antiepileptic drugs against electroconvulsions in mice: An isobolographic analysis. *Epilepsia.* 1992, 43: 956–963.
45. Kalviainen R., Keranen T., Riekkinen P.J.: Place of newer antiepileptic drugs in the treatment of epilepsy. *Drugs* 1993, 46: 1009–1024.
46. Grzesiak A., Zalewska-Kaszburska J.: Topiramate, antiepileptic drug of second generation – new applications *Farmakoterapia w psychiatrii i neurologii*, 2011, 2: 67–74.
47. White H.S., Brown S.D., Woodhead J.H.: Topiramate enhances GABA-mediated chloride flux and GABA-evoked chloride currents in murine brain neurons and increases seizure threshold. *Epilepsy Res.* 1997, 28: 167–179.
48. Gibbs J.W., Sombati S., DeLorenzo R.J.: Cellular actions of topiramate: blockade of kainate-evoked inward currents in cultured hippocampal neurons. *Epilepsia.* 2000, 41(Suppl. 1): 10–16.
49. Taverna S., Sancini G., Mantegazza M.: Inhibition of transient and persistent Na⁺ current fractions by the new anticonvulsant topiramate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999, 288: 960–968.
50. Zhang X., Velumian A.A., Jones O.T.: Modulation of high-voltage-activated calcium channels in dentate granule cells by topiramate. *Epilepsia.* 2000, 41(Suppl. 1): 52–60.
51. Herrero A.I., Del Olmo N., Gonzalez-Escalada J.R.: Two new actions of topiramate: inhibition of depolarizing GABA(A)-mediated responses and activation of a potassium conductance. *Neuropharmacol.* 2002, 42: 210–20.
52. Dodgson S.J., Shank R.P., Maryanoff B.E.: Topiramate as an Inhibitor of Carbonic Anhydrase Isoenzymes. *Epilepsia.* 2000, 41(Suppl. 1): 35–39.
53. Borowicz K.K., Luszczyk J.J., Duda A.M., Czuczwar S.J.: Effect of topiramate on the anticonvulsant activity of conventional antiepileptic drugs in two models of experimental epilepsy. *Epilepsia.* 2003, 44: 640–646.
54. Swiader M., Kotowski J., Gasior M., Kleinrok Z., Czuczwar S.J.: Interaction of topiramate with conventional antiepileptic drugs in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 2000, 399: 35–41.
55. Cross H.: Topiramate monotherapy for childhood absence seizures: an open label pilot study. *Seizure* 2002, 11: 406–410.
56. Parker A.P., Agathonikou A., Robinson R.O., Panayiotopoulos C.P.: Inappropriate use of carbamazepine and vigabatrin in typical absence seizures. *Dev. Med. Child. Neurol.* 1998, 40: 517–519.
57. Elger C.E.: Modern concept and basic data derived from human brain tissue. *Epilepsia.* 2003, 44 (Suppl. 5): 9–15.
58. Czuczwar S.J., Turski L., Turski W., Kleinrok Z.: Effects of some antiepileptic drugs in pentetrazol-induced convulsions in mice lesioned with kainic acid. *Epilepsia.* 1981, 22: 407–414.
59. Czuczwar S.J., Turski L., Kleinrok Z.: Anticonvulsant action of phenobarbital, diazepam, carbamazepine, and diphenylhydantoin in the

- electroshock test in mice after lesion of hippocampal pyramidal cells with intracerebroventricular kainic acid. *Epilepsia*. 1982, 23: 377–382.
60. Gasior M., Borowicz K., Kleinrok Z., Czuczwar S.J.: Chronic caffeine and the anticonvulsant potency of antiepileptic drugs against maximal electroshock. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1996, 54: 639–644.
61. Czuczwar M., Kis J., Czuczwar P., Turski W.: Nicotine diminishes anticonvulsant activity of antiepileptic drugs in mice. *Pol. J. Pharmacol.* 2004, 55: 799–802.
62. Kaufman K.R., Sachdeo R.C.: Caffeinated beverages and decreased seizure control. *Seizure*. 2003, 12: 519–521.
63. Vergnes M., Boehrer A., Simler S.: Opposite effects of GABAB receptor antagonists on absences and convulsive seizures. *Eur. J. Pharmacol.* 1997, 332: 245–255.
64. Getova D., Froestl W., Bowery N.G.: Effects of GABAB receptor antagonism on the development of pentylenetetrazolinduced kindling in mice. *Brain Res.* 1998, 809: 182–188.
65. Getova D., Bowery N.G., Spassov V.: Effects of GABAB receptor antagonists on learning and memory retention in a rat model of absence epilepsy. *Eur. J. Pharmacol.* 1997, 320: 9–13.
66. Swiader M., Czuczwar S.J.: Interactions of lamotrigine with topiramate and first-generation antiepileptic drugs in the maximal electroshock test in mice: An isobolographic analysis. *Epilepsia*. 2003, 44: 1003–1013.
67. Meldrum B.S.: Amino acid neurotransmitters and new approaches to anticonvulsant drug action. *Epilepsia*. 1984, 25: 140–149.
68. Czuczwar S.J., Frey H.-H., Löscher W.: Antagonism of N-methyl-D,L-aspartic acid-induced seizures by antiepileptic drugs and other agents. *Eur. J. Pharmacol.* 1985, 108: 273–280.
69. Huxtable R.J., Laird H., Lippincott S.E., Wolson P.: Epilepsy and the concentration of plasma amino acids in humans. *Neurochem. Int.* 1983, 5: 125–135.
70. Turski L., Jacobsen P., Honoré T.: Relief of experimental spasticity and anxiolytic/anticonvulsant actions of the amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionate antagonist 2, 3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(F)-quinoxaline. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1992, 260: 742–747.
71. Mayer M.L., Armstrong N.: Structure and function of glutamate receptor ion channels. *Ann. Rev. Physiol.* 2004, 66: 161–181.
72. Kohr G., De Koninck Y., Mody I.: Properties of NMDA receptor channels in neurons acutely isolated from epileptic (kindled) rats. *J. Neurosci.* 1993, 13(8): 3612–3627.
73. Graves T.D.: Ion channels and epilepsy. *QJM*. 2006, 99(4): 201–217.
74. Vanmolkot K.R., Kors E.E., Hottenga J.J.: Novel mutations in the Na⁺, K⁺-ATPase pump gene ATP1A2 associated with familial hemiplegic migraine and benign familial infantile convulsions. *Ann. Neurol.* 2003, 54(3): 360–366.
75. Chapman A.G.: Glutamate and epilepsy. *J. Nutr.* 2000, 130(suppl 4): 1043–1045.
76. Steffens M., Huppertz H.J., Zentner J., Feuerstein T.J.: Unchanged glutamine synthetase activity and increased NMDA receptor density in epileptic human neocortex: implications for the pathophysiology of epilepsy. *Neurochem. Int.* 2005, 47(6): 379–384.
77. Lukomska N.Y., Rukoyatkin N.I., Magazanik L.G.: Studies of the roles of NMDA and AMPA glutamate receptors in the mechanism of corasole convulsions in mice. *Neurosci. Behav. Physiol.* 2004, 34(8): 783–789.
78. Prince H.C., Tzingounis A.V., Levey A.I.: Functional down-regulation of GluR2 in piriform cortex of kindled animals. *Synapse*. 2000, 38(4): 489–498.
79. Mathern G.W., Pretorius J.K., Peacock W.J.: Human hippocampal AMPA and NMDA mRNA levels in temporal lobe epilepsy patients. *Brain*. 1997, 120(11): 1937–1959.
80. Hikiji M., Yomita H., Ono M.: Increase of kainate receptor mRNA in the hippocampal CA3 of amygdala-kindled rats detected by in situ hybridization. *Life Sci.* 1993, 53(10): 857–864.
81. Mulle C., Sailer A., Perez-Otano I.: Altered synaptic physiology and reduced susceptibility to kainate-induced seizures in GluR6-deficient mice. *Nature*. 1998, 392(6676): 601–605.
82. Hosford D.A., Crain B.J., Cao Z., Okazaki M.M.: Increased AMPA-sensitive quisqualate receptor binding and reduced NMDA receptor binding in epileptic human hippocampus. *J. Neurosci.* 1991, 11: 428–434.
83. Stoop R., Conquet F., Pralong E.: Determination of group I metabotropic glutamate receptor subtype involved in the frequency of epileptiform activity in vitro using mGluR1 and mGluR5 mutant mice. *Neuropharmacology*. 2003, 6: 123–145.
84. Cartmell J., Schoepp D.D.: Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. *J. Neurochem.* 2000, 75(3): 889–907.
85. Chapman A.G., Yip P.K., Meldrum B.S.: Anticonvulsant actions of LY 367385 ((+)-2-methyl-4-carboxyphenylglycine) and AIDA ((RS)-1-aminoindan-1,5-dicarboxylic acid). *Eur. J. Pharmacol.* 1999, 368(1): 170–179.
86. Schoepp D.D., Jane D.E., Monn J.A.: Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology*. 1999, 38(10): 1431–1476.
87. Bordini F., Ugolini A.: Group I metabotropic glutamate receptors: implications for brain diseases. *Prog. Neurobiol.* 1999, 59(1): 55–79.
88. Chapman A.G., De Sarro G., Meldrum B.S.: Glutamate metabotropic receptors as targets for drug therapy in epilepsy. *Eur. J. Pharmacol.* 2003, 476(1–2): 3–16.
89. Kłodzinska A., Bijak M., Chojnacka-Wójcik E., Czuczwar S.J.: Roles of group II metabotropic glutamate receptors in modulation of seizure activity. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 2000, 361(3): 283–288.
90. Ghauri M., Chapman A.G., Meldrum B.S.: Convulsant and anticonvulsant actions of agonists and antagonists of group III mGluRs. *Neuroreport*. 1996, 7(9): 146–155.
91. Shigemoto R., Kinoshita A., Mizuno N.: Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *J. Neurosci.* 1997, 17(19): 7503–7522.
92. Shigemoto R., Kulik A., Roberts J.D.: Target-cell-specific concentration of a metabotropic glutamate receptor in the presynaptic active zone. *Nature*. 1996, 381(6582): 523–525.
93. Czuczwar S.J., Borowicz K.K.: Polytherapy in epilepsy: the experimental evidence. *Epilepsy Res.* 2002, 52(1): 15–23.
94. Watkins J.C., Krosgaard-Larsen P., Honoré T.: Structure activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.* 1990, 11: 25–33.
95. Zorumski C.F., Thio L.L.: Properties of vertebrate glutamate receptors: calcium mobilization and desensitization. *Prog. Neurobiol.* 1992, 39: 295–336.
96. Czuczwar S.J., Gasior M., Turski W.A., Kleinrok Z.: Influence of a Ca²⁺ channel agonist, BAY k-8644, on the anticonvulsant activity of NMDA and non-NMDA receptor antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* 1994, 264: 103–106.
97. Turski L., Niemann W., Stephens D.N.: Differential effects of antiepileptic drugs and carbolines on seizures induced by excitatory amino acids. *Neuroscience*. 1990, 39: 799–807.
98. Pin J.P., Duvoisin R.: The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology*. 1995, 34: 1–26.
99. Nakanishi S., Nakajima Y., Okada M.: Glutamate receptors: brain function and signal transduction. *Brain Res. Rev.* 1998, 26: 230–235.
100. Goa K.: Lamotrigine: a review of its pharmacological properties and clinical efficacy in epilepsy. *Drugs* 1993, 2: 31–37.
101. Goldin A.: Mechanisms of sodium channel inactivation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2003, 3: 284–290.
102. Rhodes T.: Noninactivating voltage-gated sodium channels in severe myoclonic epilepsy of infancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, 101: 11147–11152.
103. Errington A.C., Stöhr T., Less G.: Voltage-gated ion channels: targets for anticonvulsant drugs. *Epilepsia*. 2005, 5(1): 15–30.
104. McLean M.S., Schmutz M., Wamil A.W.: Oxcarbazepine: mechanism of action. *Epilepsia*. 1994, 35(suppl.3): 5–9.
105. Wellington K., Goa K.L.: Oxcarbazepine. An update of its efficacy in the management of epilepsy. *CNS Drugs* 2001, 15: 137–163.
106. Yamakawa K.: Epilepsy and sodium channel gene mutations: gain or loss of function? *Neuroreport*. 2005, 8: 17–25.
107. Dam M., Ekberg R., Löyning Y.: A double-blind study comparing oxcarbazepine and carbamazepine in patients with newly diagnosed, previously untreated epilepsy. *Epilepsy Res.* 1989, 3: 70–76.
108. Reinikainen K.J., Keranen T., Halonen T.: Comparison of oxcarbazepine and carbamazepine: a double-blind study. *Epilepsy Res.* 1987, 1: 284–299.
109. Hartley T.P., Rogawski M.A.: Felbamate block of recombinant N-methyl-D-aspartate receptors: selectivity for the NR2B subunit. *Epilepsy Res.* 2000, 39: 47–55.
110. Tagliatella M., Ongini E., Brown A.M.: Felbamate inhibits cloned voltage-dependent Na⁺ channels from human and rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* 1996, 316: 373–377.
111. DeSarro A., Ongini E., Bertorelli R.: Excitatory amino acid neurotransmission through both NMDA and non-NMDA receptors is involved in the anticonvulsant activity of felbamate in DBA/2 mice. *Eur. J. Pharmacol.* 1994, 262: 11–15.
112. Rho J.M., Donevan S.D., Rogawski M.A.: Mechanism of action of the anticonvulsant felbamate: opposing effects on N-methyl-D-aspartate and γ-aminobutyric acid A receptors. *Ann. Neurol.* 1994, 35: 229–236.
113. Ebert U., Reissmüller E., Löscher W.: The new antiepileptic drugs lamotrigine and felbamate are effective in phenytoin-resistant kindled rats. *Neuropharmacology*. 2000, 39: 1893–1903.
114. Harden C.L.: New antiepileptic drugs. *Neurology* 1994, 44, 787–795.

115. Pellock J.M.: Felbamate in epilepsy therapy: evaluating the risk. *Drugs*. 1999, 21: 225–239.
116. Mellick G.A.: Hemifacial spasm: successful treatment with felbamate. *J. Pain Sympt. Manag.* 1995, 10: 392–395.
117. Winkler S.R., Luer M.S.: Antiepileptic drug review: part 2. *Surg. Neurol.* 1998, 49: 566–568.
118. Sobieszek G., Borowicz K.K., Bimber-Trojan Z., Czuczwar S.J.: Zonisamide: A new antiepileptic drug. *Pol. J. Pharmacol.* 2003, 55: 683–689.
119. Macdonald R.L., Greenfield L.J.: Mechanisms of action of new antiepileptic drugs. *Curr. Opin. Neurol.* 1997, 10: 121–128.
120. Ahmad S., Fowler L.J., Whitton P.S.: Effects of acute and chronic lamotrigine treatment on basal and stimulated extracellular amino acids in the hippocampus of freely moving rats. *Brain Res.* 2004, 1029–1033.
121. Binnie C.D., Debets R.M., Engelsman M.: Double-blind, cross-over trial of lamotrigine (Lamictal) as add-on therapy in intractable epilepsy. *Epilepsy Res.* 1989, 4: 222–229.
122. Loiseau P., Yuen A.W., Duche B.: A randomised double-blind placebo-controlled crossover add-on trial of lamotrigine in patients with treatment with treatment resistant partial seizures. *Epilepsy Res.* 1990, 7: 136–145.
123. Crowder K.M., Gunther J.M., Jones T.A.: Abnormal neurotransmission in mice lacking synaptic vesicle protein 2A (SV2A). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2006, 96: 15268–15273.
124. Klitgaard H., Pitkänen A.: Antiepileptogenesis, neuroprotection, and disease modification in the treatment of epilepsy: focus on levetiracetam. *Epileptic Disord.* 2003, 5(Suppl. 1): 9–16.
125. Dooley M., Plosker G.L.: Levetiracetam. A review of its adjunctive use in the management of partial onset seizures. *Drugs*. 2000, 60: 871–893.
126. Abou-Khalil B., Lazenby B.: Long-term experience with levetiracetam. *Epileptic Disord.* 2003, 5 (Suppl.1): 33–37.
127. Pollard J.R., French J.: Antiepileptic drugs in development. *Lancet Neurol.* 2006, 5(12): 106–114.
128. Gasior M., Carter R.B., Witkin J.M.: Neuroactive steroids: potential therapeutic use in neurological and psychiatric disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* 1999, 20: 107–112.
129. Gasior M., Beekman M., Carter R.B.: Antiepileptogenic effects of the novel synthetic neuroactive steroid, ganaxolone, against pentylenetetrazol-induced kindled seizures: comparison with diazepam and valproate. *Drug. Dev. Res.* 1998, 44: 21–33.
130. Dailey J.W., Cheong J.H., Ko K.H.: Anticonvulsant properties of D-20443 in genetically epilepsy-prone rats: prediction of clinical response. *Neurosci. Lett.* 1995, 195: 77–80.
131. Rundfeldt C., Rohlf A., Netzer R.: Multiple actions of the new anticonvulsant D-23129 on voltage-gated inward currents and GABA-mediated currents in cultured neuronal cells. *Arch. Pharmacol.* 1995, 35: 160–165.
132. Dost R., Rundfeldt C.: The anticonvulsant retigabine potently suppresses epileptiform discharges in the low Ca^{++} and low Mg^{++} in the hippocampal slice preparation. *Epilepsy Res.* 2000: 123–139.
133. Rundfeldt C., Netzer R.: The novel anticonvulsant retigabine activates M-currents in Chinese hamster ovary-cells transfected with human KCNQ2/3 subunits. *Neurosci. Lett.* 2000, 282: 73–76.
134. Lerche C., Scherer C.R., Seebach G.: Molecular cloning and functional expression of KCNQ5, a potassium channel subunit that may contribute to neuronal M-current diversity. *J. Biol. Chem.* 2000, 275: 22395–22400.
135. Kharkovets T., Hardelin J.P., Safieddine S.: KCNQ4, a K^{+} channel mutated in a form of dominant deafness, is expressed in the inner ear and the central auditory pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004, 97: 4333–4338.
136. Singh N.A., Charlier C., Stauffer D.: A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat Genet.* 1998, 18: 25–29.

Parametry metrologiczne wag nieautomatycznych stosowanych w laboratoriach farmaceutycznych

Wojciech T. Chyla

Adres do korespondencji: Wojciech T. Chyla, Al. Niepodległości 132/136 m. 30, 02-554 Warszawa, e-mail: chylawt@wp.pl

Wstęp

Przyrząd pomiarowy dający dokładne wskazania jest ideałem, do którego konstruktorzy instrumentów pomiarowych mogą jedynie dążyć. Wyniki pomiaru są zawsze obciążone pewnym błędem (niepewnością pomiaru), którego źródłem może być sam przyrząd pomiarowy, jak również jego użytkownik oraz wpływ środowiska zewnętrznego.

Każdy rodzaj przyrządu pomiarowego jest scharakteryzowany przez pewien zestaw parametrów technicznych, których wartość liczbową stanowi praktyczną miarę jego dokładności oraz zakresu stosowalności. Wartości najważniejszych parametrów technicznych podawane są na stronach internetowych producentów sprzętu pomiarowego. Z punktu widzenia nabywcy i użytkownika instrumentu pomiarowego, główne parametry techniczne przyrządu powinny być ustalone w Specyfikacji Wymagań Użytkownika (*User Requirements Specification*, URS) przed ogłoszeniem przetargu na jego zakup, a następnie zweryfikowane po jego instalacji (*Installation Qualification*, IQ), a przed oddaniem go do użytku (*Performance Qualification*, PQ). Część parametrów technicznych musi być okresowo testowana w trakcie użytkowania przyrządu pomiarowego (*Performance Verification*, PV lub *Performance Checks*, PC), zgodnie z wymogami systemu jakości, który obowiązuje w danym laboratorium i w całej organizacji.

W niniejszym artykule omówimy najważniejsze parametry elektronicznych wag nieautomatycznych, a mianowicie czułość, liniowość, powtarzalność, centryczność i odczytowość, które wpływają bezpośrednio na dokładność wskazań wagi (niepewność pomiaru masy). Przedyskutujemy również inne parametry techniczne wag elektronicznych, które mogą pośrednio wpływać na dokładność odczytu lub są ważne dla użytkownika z innych powodów. Na zakończenie omówimy zagadnienie

Metrological parameters of non-automatic balances used in pharmaceutical laboratories

The article discusses notions of sensitivity, linearity, repeatability, eccentricity and readability of non-automatic electronic balances, which must be periodically tested to assure accuracy of weighing and satisfy requirements of the quality system in pharmaceutical laboratories. Other parameters of interest to users of balances are also considered.

Keywords: weights and measures, laboratory manuals.

© Farm Pol, 2014, 70(11): 651–661

parametrów technicznych w ofercie na zakup wagi oraz kwestie techniczne w sytuacji audytu wewnętrznego i zewnętrznego.

Czułość i odchyłka czułości wagi (*sensitivity, sensitivity offset*)

Zgodnie z definicją podaną w Międzynarodowym Słowniku Metrologicznym (VIM), czułość przyrządu pomiarowego jest to stosunek zmiany *wskazania* danego przyrządu do zmiany *wartości* wielkości mierzonej [1]. Definicja ta jest sformułowana w sposób tak ogólny, aby można ją było zastosować do wszelkiego rodzaju instrumentów pomiarowych; praktyczna realizacja tej definicji wymaga uwzględnienia specyfiki danego rodzaju przyrządu. W tej sekcji rozważymy pojęcie czułości w przypadku elektronicznej wagi nieautomatycznej.

Załóżmy, że na szalce wagi kładziemy odważnik testowy o masie bliskiej obciążeniu maksymalnemu wagi (*maximum capacity* lub *maximum load*) $M_{\max}$; niech masa tego odważnika wynosi *dokładnie* $M_0 \leq M_{\max}$. Wyświetlacz wagi, która przecież nie jest idealna, wskaże wartość M tym bliższą M_0 , im waga jest lepsza. Zgodnie z VIM, czułość wagi S zdefiniowana jest jako stosunek

$$S = M/M_0 \quad (1).$$

Oznaczając różnicę między wskazaniem wagi (odczytem) i masą odważnika testowego jako

$$\Delta M = M - M_0 \quad (2)$$

otrzymujemy

$$S = 1 + \Delta M/M_0 \equiv 1 + \Delta S \quad (3)$$

gdzie wielkość

$$\Delta S = \Delta M/M_0 \quad (4)$$

nazywamy odchyłką czułości lub przesunięciem czułości (*sensitivity offset*). Czułość wagi idealnej wynosi z definicji $S_0 \equiv 1$; zatem przesunięcie czułości wagi można określić również jako różnicę między czułością danej wagi rzeczywistej i czułością wagi idealnej

$$\Delta S = S - S_0 \equiv S - 1 \quad (5).$$

Ponieważ czułość wagi rzeczywistej może być większa lub mniejsza od 1, to odchyłka czułości ΔS może być dodatnia lub ujemna.

Rycina 1a ilustruje przedstawione powyżej wielkości: obciążenie wagi (*load*) M_0 , faktyczny odczyt masy na wyświetlaczu (*reading*) M oraz różnicę między tymi wielkościami ΔM (dla ustalenia uwagi

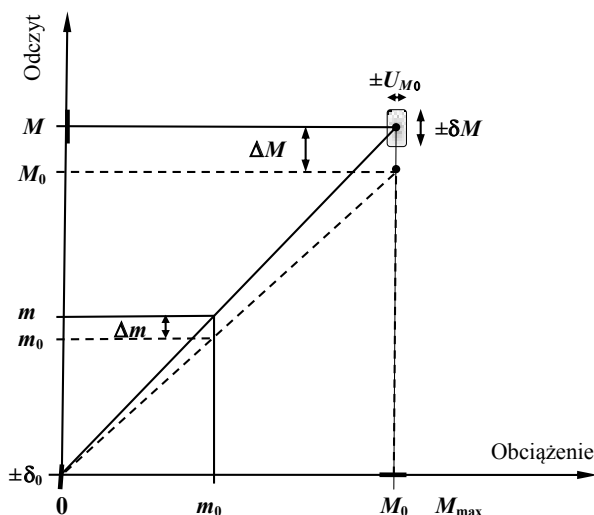
przyjęliśmy, że odchyłka czułości jest wielkością dodatnią). Linie ciągłe na tej rycinie odnoszą się do wagi rzeczywistej, a linie przerywane do wagi idealnej. W przypadku wagi idealnej odczyt jest dokładnie równy masie odważnika postawionego na szalce. Fakt ten symbolizuje prosta łącząca początek układu współrzędnych $(0, 0)$ z punktem (M_0, M_0) . W przypadku wagi rzeczywistej masa odważnika postawionego na szalce wagi i odczyt jego masy na wyświetlaczu różnią się, co ilustruje prosta łącząca punkt $(0, 0)$ z punktem (M_0, M) . Różnica między ukośną linią ciągłą i ukośną linią przerywaną na **rycinie 1a** jest miarą różnicy między wagą rzeczywistą a wagą idealną z punktu widzenia czułości wagi.

W przypadku ważenia masy $m_0 < M_0$ odchyłka czułości ΔS daje wkład do błędu pomiaru masy, który jest liniowo zależny od masy ważonej m_0

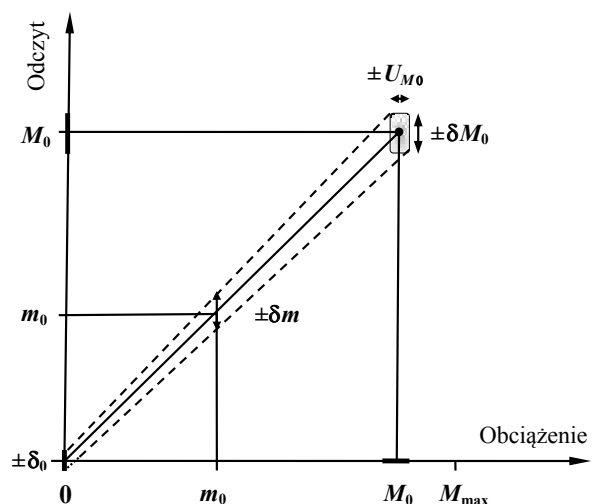
$$\Delta m = m_0 \times \Delta S \quad (6).$$

Błąd czułości Δm jest zatem tym mniejszy, im mniejsza jest masa ważona.

Skoro badanie wagi odważnikiem testowym M_0 daje (teoretycznie) ściśle określoną odchyłkę czułości ΔS i pozwala obliczyć poprawkę $\Delta m = m_0 \times \Delta S$ dla każdej masy $m_0 \leq M_0$, to wydawałoby się, że nic prostszego, niż wprowadzić tę poprawkę na stałe do oprogramowania wagi elektronicznej, by w ten sposób wyeliminować całkowicie błąd



Rycina 1a. Badanie czułości wagi masą M_0 i poprawka na stały składnik przesunięcia czułości ΔM . Linie ciągłe odnoszą się do wagi rzeczywistej, a linie przerywane symbolizują wagę idealną. Wartość poprawki Δm maleje proporcjonalnie do ważonej masy m_0 . Niepewność masy testowej $\pm U_{M_0}$, niepewność odczytu $\pm \delta M$ i niepewność w zerze $\pm \delta_0$ (oznaczone grubymi kreskami na obu osiach) są źródłem „rozmycia” pomiaru czułości (przedstawionego symbolicznie w postaci szarego prostokąta), które uniemożliwia całkowitą eliminację błędu czułości



Rycina 1b. Błąd czułości po uwzględnieniu stałej poprawki ΔM wynika z „rozmycia” wielkości występujących w pomiarze czułości: niepewności wartości masy testowej $\pm U_{M_0}$, niepewności odczytu $\pm \delta M_0$ i niepewności w zerze $\pm \delta_0$, symbolizowanych grubymi kreskami na obu osiach i prostokątem błędów wokół punktu (M_0, M_0) . Błąd czułości $\pm \delta m$ jest mniejszy dla mniejszych mas $m = m_0$

czułości. **Rycina 1b** ilustruje relację między obciążeniem wagi i jej wskazaniem (odczytem) po wprowadzeniu takiej poprawki. Niestety, w ten sposób nie usuniemy całego błędu czułości, bowiem poprawka Δm uwzględnia (i eliminuje) tylko stały składnik błędu czułości, odpowiadający zmierzonej wartości ΔM , która jest ściśle określona tylko przy założeniu, iż masy M_0 i M są dokładnie znane. Wartości tych dwu wielkości traktowaliśmy jako dokładne po to, by jak najprościej wyjaśnić istotę pojęć czułości i odchyłki czułości wagi elektronicznej; w rzeczywistości wielkości te są zawsze obciążone pewną niepewnością. Przejdźmy zatem do rozważenia wpływu nieoznaczoności mas M_0 i M na wynik badania czułości wagi.

W rzeczywistości masa M_0 każdego wzorca testowego, nawet najwyższej klasy, określona jest tylko z pewną skończoną dokładnością; w świadectwie wzorcowania podana jest zawsze niepewność (*uncertainty*) $\pm U_{M_0}$ z jaką masa danego wzorca została określona ($M_0 \pm U_{M_0}$). Na **rycynach 1a i 1b** zaznaczono symbolicznie niepewność masy testowej $\pm U_{M_0}$ za pomocą poziomego odcinka (*horizontal error bar*) wokół wartości M_0 . W szczególnym przypadku, gdy na szalce wagi nie położymy żadnej masy, to niepewność tej wartości ($M_0 = 0$) jest z definicji zerowa (tzn. poziomy odcinek błędu w punkcie (0, 0) na **rycynach 1a i 1b** jest z definicji zerowy).

Również odczyt wartości masy na wyświetlaczu nie jest idealnie dokładny, chociażby ze względu na niedoskonałość wagi, wpływ środowiska zewnętrznego oraz odczytowość (rozdzielczość) wyświetlacza wagi, określoną przez wielkość jego działki elementarnej d . Ów niezerowy błąd odczytu masy (niepewność $\pm \delta M_0$) symbolizowany jest na **rycynie 1b** za pomocą pionowego odcinka wokół wartości masy M_0 (*vertical error bar*). Zauważmy też, że błąd (niepewność) $\pm \delta_0$, jakim obciążony jest odczyt zera (0, 0) jest niezerowy ze względu na niezerową wartość d , co symbolicznie pokazano na **rycynach 1a i 1b** za pomocą krótkiego pionowego odcinka wokół tego punktu. Z analizy statystycznej wynika, że niepewność odczytu zera wynikająca ze skończonej wartości działki elementarnej wynosi $\delta_0 = d/\sqrt{12} \approx 0,29 d$.

Ograniczoną dokładność badania czułości wagi za pomocą wzorca o masie $M_0 \pm U_{M_0}$ symbolizuje zatem prostokąt błędów¹ wokół punktu (M_0 , M) oraz odcinek błędów wokół punktu (0, 0) na **rycynie 1a**. Po wprowadzeniu poprawki na stałą część błędów czułości (związaną z ΔM) ów prostokąt błędów zostaje scentrowany na punkcie (M_0 , M_0), jak pokazano to na **rycynie 1b**.

Wskutek nieoznaczoności wartości masy testowej i ograniczonej dokładności wskazania wagi

(odczytu), czułość wagi i związana z nią odchyłka czułości są wielkościami *rozmytymi*, bowiem każda prosta przechodząca przez dowolny punkt odcinka błędów w zerze i dowolny punkt prostokąta błędów dla masy testowej M_0 równie dobrze charakteryzuje czułość wagi rzeczywistej. Rozmycie błędów czułości uniemożliwia zatem całkowite jego usunięcie (można wyeliminować jedynie jego część stałą, jak wspomniano wcześniej). Na **rycynie 1b** pokazano ukośną linią przerywaną dwie skrajne proste maksymalizujące oszacowanie „rozmytej” części błędów czułości wagi.

Błąd czułości jest liniowo zależny od masy ciała ważonego. Choć błąd ten może dać znaczny wkład do niepewności pomiaru „dużych” mas (tzn. gdy m_0 jest bliskie $M_{\max}$), to jest on praktycznie zanedbywalny jako źródło błędów w przypadku ważenia bardzo małych mas m_0 ; dlatego w przypadku określania odważki minimalnej pomijamy błąd czułości, a uwzględniamy tylko dominujące efekty powtarzalności i odczytowości wagi.

Metodologia doświadczalnego badania czułości wagi, a w szczególności statystycznego oszacowania przesunięcia czułości stanowi *trick of the trade* producentów wag oraz usługowych firm wzorcujących i nie jest podawana do publicznej wiadomości. Ze względu na statystyczny charakter „rozmycia” odchyłki czułości znak tej wielkości nie jest określony, a producenci, firmy wzorcujące i użytkownicy wag operują tylko wartością absolutną tej wielkości.

Czułość (odchyłka czułości) jest jednym z najważniejszych parametrów technicznych wag. W przypadku wag elektronicznych wysokiej klasy odchyłka czułości jest wielkością bardzo małą (rzędu paru lub co najwyżej kilku działek elementarnych d), ale ze względu na wielką dokładność współczesnych wag może ona zauważalnie wpłynąć na wynik pomiaru masy, a przede wszystkim na niepewność otrzymanej wartości, szczególnie w przypadku ważenia dużych mas (bliskich $M_{\max}$). W warunkach laboratoryjnych czułość wagi powinna być okresowo badana, zwykle podczas wzorcowania wagi, raz lub dwa razy rocznie, natomiast sprawdzenia czułości wagi wykonywane są częściej, zgodnie z wewnętrznymi procedurami w laboratorium, wynikającymi z analizy ryzyka (*risk analysis*).

Badanie czułości wagi ma charakter „globalny” w tym sensie, że opiera się na analizie właściwości wagi przy dwu skrajnych obciążeniach: zerowym i bliskim maksymalnemu. Natomiast badanie odpowiedzi wagi na obciążenie szalki masą m o wartości pośredniej, $0 < m < M_0$, zależy od jej „lokalnej” charakterystyki, tzn. od jej właściwości przy konkretnej wartości obciążenia. Tym problemem zajmiemy się w następnej sekcji.

¹ Stosowane jest również pojęcie „elipsy błędów”; dwie osie elipsy odpowiadają wówczas niepewności zastosowanego wzorca masy oraz niepewności wartości wskazanej na wyświetlaczu wagi.

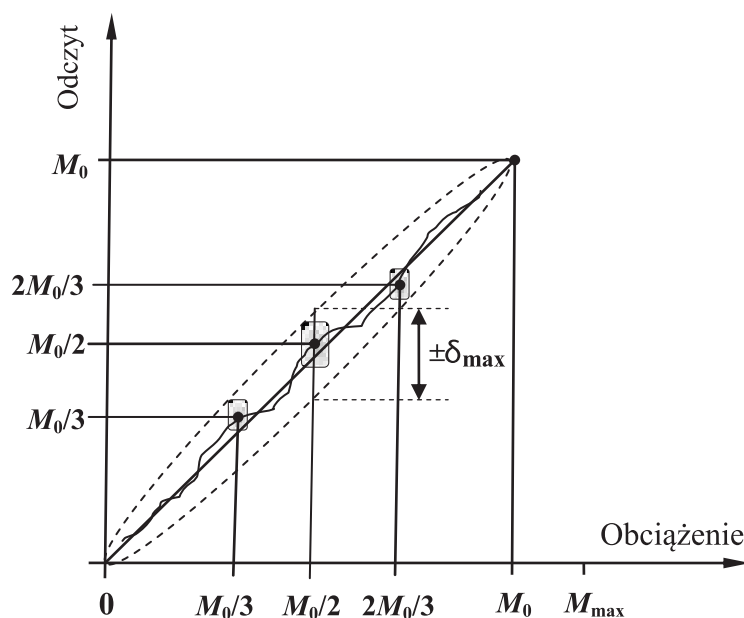
Liniowość wagi i odchylenie od liniowości wagi (linearity, linearity deviation)

Gdyby istniała idealna waga elektroniczna, to wskazywałaby na wyświetlaczu dokładną wartość masy umieszczonej na szalce, w pełnym zakresie dopuszczalnego obciążenia wagi. Na **rycinie 2** sytuację tę odzwierciedla ciągła linia prosta łącząca początek układu współrzędnych $(0, 0)$ z punktem (M_0, M_0) ; prosta ta implikuje równość $m = m_0$ w całym zakresie, aż do maksymalnego udźwigu danej wagi. O takiej (idealnej) wadze mówimy, że jest liniowa.

W przypadku wagi rzeczywistej zależność wskazania wagi od jej obciążenia nie jest funkcją dokładnie liniową, co ilustruje *nieregularna krzywa ciągła* łącząca punkty $(0, 0)$ i (M_0, M_0) na **rycinie 2**. Punkty końcowe linii prostej (symbolizującej wagę idealną) oraz linii krzywej (odpowiadającej wadze rzeczywistej) pokrywają się, ponieważ punkty skrajne są zdeterminowane przez czułość wagi, a poprawkę na czułość i oszacowanie błędu związanego z odchyłką czułości już uwzględniliśmy w stopniu, w jakim było to możliwe.

Przyczyn nieliniowości wagi jest wiele:

1. Skończona rozdzielczość przetwornika analogowo-cyfrowego detektora wagi powoduje, że owa linia „prosta” jest w rzeczywistości linią schodkową. Na przykład, jeżeli przetwornik



Rycina 2. Badanie błędu liniowości wagi przeprowadza się jednym odważnikiem o masie bliskiej połowie obciążenia maksymalnego $M_{\max}/2$ lub dwoma odważnikami o masach $M_{\max}/3$ oraz $2 \times M_{\max}/3$. Ze względu na niepewność masy wzorców użytych w badaniu oraz niepewność odczytu masy i wynikające stąd rozmycie punktów doświadczalnych (symbolizowane prostokątami błędów) zwiększanie liczby punktów doświadczalnych jest niecelowe. Największa wartość odchylenia od liniowości wynosi $\pm \delta_{\max}$.

„rozróżnia” 10^6 dyskretnych wartości, to ów „prosty” odcinek faktycznie składa się z 1 miliona małych „schodków”.

2. Przetwornik nie jest urządzeniem idealnym, więc skok o jednostkę cyfrową odpowiada czasem trochę większej, a czasem trochę mniejszej zmianie sygnału analogowego; owe fluktuacje mają charakter przypadkowy i ich prawdopodobieństwo określa rozkład normalny. Typowe odchylenie standardowe wynikające z niedoskonałości przetwornika analogowo-cyfrowego wysokiej klasy, stosowanego w elektronicznych wagach laboratoryjnych jest rzędu $4 \times 10^{-4} \mu\text{g}$.
3. Inne elementy konstrukcyjne wagi również nie są idealne i dają wkład do przypadkowych fluktuacji wyniku pomiaru.
4. Wpływ na wskazanie wagi mają również statyczne fluktuacje parametrów środowiskowych (temperatury, wilgotności, ciśnienia, drgań mechanicznych i zewnętrznych zaburzeń elektromagnetycznych).
5. Odpowiedź wagi rzeczywistej na zastosowane obciążenie szalki nie jest ściśle liniowa także z powodu niepewności masy odważnika testowego oraz skończonej dokładności odczytu masy na wyświetlaczu wagi. Są to efekty analogiczne do tych występujących przy badaniu czułości wagi.

W praktyce badanie liniowości wagi rzeczywistej wykonujemy najczęściej jednym wzorcem masy o wartości nominalnej $M_0/2$ zbliżonej do połowy obciążenia maksymalnego $M_{\max}$. Test przebiega podobnie jak w przypadku badania czułości, tzn. kładziemy na szalce wzorec masy i odczytujemy wskazanie wagi, otrzymując jeden punkt pomiarowy, który na **rycinie 2** oznaczony jest kropką; rozmycie tego punktu doświadczalnego symbolizuje odpowiadający mu prostokąt błędów. Obszar „rozmycia” odczytu jest największy w pobliżu środka zakresu wagi, ponieważ „rozmycie” w punktach skrajnych zostało już uwzględnione przy okazji badania czułości wagi. Na podstawie tego jednego punktu można oszacować błąd nieliniowości symbolizowany na **rycinie 2** dwiema symetrycznymi liniami przerywanymi (znak odchyłki od liniowości w konkretnym punkcie jest nieokreślony ze względu na statystyczny charakter tego efektu).

Badanie liniowości można przeprowadzić również dwoma wzorcami masy o wartościach nominalnych zbliżonych do $1/3 M_{\max}$ i $2/3 M_{\max}$. Na **rycinie 2** przedstawiono kropkami dwa takie punkty, wraz z towarzyszącymi im prostokątami błędów. Badanie nieliniowości w większej liczbie punktów nie wnosi nic nowego, chociażby ze względu na niepewność, którą obarczone są punkty doświadczalne; dlatego w praktyce wystarczające jest określenie nieliniowości w oparciu o pomiary jednym wzorcem lub ewentualnie dwoma wzorcami

masy. Maksymalna wartość odchylenia od liniowości oznaczona jest na **rycinie 2** jako $\pm \delta_{\max}$.

Szczegóły metodologii badania liniowości wag i statystycznego oszacowania błędu nieliniowości są własnością intelektualną producentów wag i firm wzorcujących; efektywny sposób minimalizacji tego błędu (a także innych błędów) jest dla producenta źródłem przewagi konkurencyjnej na rynku. W przypadku zwykłych elektronicznych wag laboratoryjnych nieliniowość deklarowana przez producentów wynosi na ogół nie więcej niż kilka działek elementarnych d , ale w najwyższej klasy mikrowagach wartość tej wielkości może być mniejsza niż $1d$.

Badanie liniowości wagi przeprowadza się zwykle podczas wzorcowań wagi raz lub dwa razy w roku. Niektóre poradniki zalecają badanie liniowości co tydzień, i to w 10 punktach [2]. Jest to zalecenie nierealistyczne, chyba że wynika ono ze szczególnie wysokiego czynnika ryzyka w danym laboratorium. Warto podkreślić, że badania liniowości wagi nie można utożsamiać z autokalibracją wag, wykonywaną czasem nawet kilka razy dziennie jedną lub dwiema wewnętrznymi masami testowymi; badanie liniowości i autokalibracja to są dwie różne procedury.

Powtarzalność wagi (*repeatability*)

Na proces ważenia może wpływać wiele przypadkowych czynników, na tyle małych i licznych, że nie jesteśmy w stanie ich rozpoznać i przeanalizować indywidualnie. Ocena skumulowanego wpływu takich zaburzeń na wynik ważenia ma charakter statystyczny.

Źródłem przypadkowych zaburzeń procesu pomiarowego mogą być niedoskonałości przyrządu pomiarowego, wpływ środowiska zewnętrznego oraz czynnik ludzki. Jeżeli wielokrotny pomiar tej samej masy wykonuje ten sam, wykwalifikowany operator, w takich samych, ściśle kontrolowanych warunkach środowiskowych, to ewentualny rozrzut wyników ważenia przypisujemy niedoskonałości wagi. Parametr charakteryzujący statystyczny rozrzut wyników wielokrotnego ważenia tego samego ciała nazywamy powtarzalnością lub błędem powtarzalności wagi.

W najprostszym przypadku procedura badania powtarzalności wagi polega na N -krotnym ($N \geq 10$) zważeniu tego samego odważnika testowego², w wyniku czego otrzymujemy zbiór N wartości doświadczalnych $M_1, M_2, \dots, M_N$. Następnie obliczamy masę średnią dla tej serii pomiarów

$$M_{\text{sr}} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N M_i \quad (7)$$

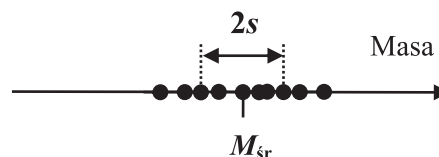
oraz odchylenie standardowe s (*standard deviation*) z próby o licznosci N

$$s = \sqrt{\frac{1}{N-1} \times \sum_{i=1}^N (M_i - M_{\text{sr}})^2} \quad (8),$$

które jest miarą rozrzutu wyników pomiarów masy wskutek niekontrolowalnych, małych zaburzeń przypadkowych. Tak obliczone odchylenie standardowe nazywamy powtarzalnością wagi (lub błędem powtarzalności wagi). Na **rycinie 3** przedstawiono symbolicznie, za pomocą kropek, wyniki ważenia tej samej masy ($N = 10$), średnią arytmetyczną tych wartości pomiarowych, oznaczoną jako M_{sr} , oraz odchylenie standardowe s .

Przedstawiony tu najprostszy sposób oszacowania powtarzalności wagi jest zalecany przez farmakopeę amerykańską USP-NF [3]. Nie jest to jednak jedyna możliwa metoda określenia powtarzalności wagi. Można np. zwiększyć licznosc próby N , wykonać nie jedną, ale kilka serii pomiarów masy tego samego odważnika oraz zastosować bardziej zaawansowaną metodę analizy statystycznej surowych danych pomiarowych. W praktyce, dzięki wykorzystaniu bardziej rozbudowanej i wymyślnej metodyki badania powtarzalności wagi, można obniżyć wartość błędu powtarzalności o ok. 5–10%.

Powtarzalność można też badać więcej niż jednym odważnikiem; najczęściej wykorzystuje się odważnik o masie nominalnej bliskiej obciążeniu maksymalnemu wagi $M_{\max}$, odważnik o połowę lżejszy oraz odważnik o masie rzędu 5% $M_{\max}$, dla którego bezwzględny błąd powtarzalności może być kilkakrotnie mniejszy. W celu określenia odważki minimalnej powtarzalność bada się jeszcze mniejszymi odważnikami, rzędu 0,1–1% $M_{\max}$, ale w tym zakresie wartość powtarzalności praktycznie nie zależy już od masy odważnika testowego. Producenci i firmy wzorcujące na ogół podają, jakim odważnikiem badano powtarzalność wagi. Natomiast w laboratorium wskazane jest okresowe sprawdzanie powtarzalności wagi odważnikiem o masie zbliżonej do masy większości próbek ważonych na danej wadze.



Rycina 3. Badanie powtarzalności wagi polega na co najmniej 10-krotnym ważeniu tego samego odważnika testowego; przykładowe wyniki przedstawione są za pomocą kropek. Średnia arytmetyczna z otrzymanych wartości oznaczona jest jako M_{sr} , a ich rozrzut statystyczny charakteryzuje odchylenie standardowe s , które interpretujemy jako błąd powtarzalności wagi

² Odważnik testowy nie musi być wysokiej klasy i nie musi być wywzorcowany.

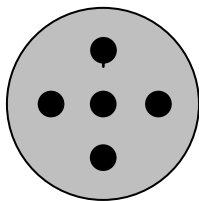
Celem praktycznym skomplikowanych, autor-
skich metod badania powtarzalności wagi jest uży-
wanie (w sposób merytorycznie i statystycznie
uzasadniony) jak najmniejszej wartości błędu po-
wtarzalności, bowiem jest to jeden z najważniej-
szych parametrów wagi, świadczący o jej jakości
i mający duże znaczenie merytoryczne, zarówno sa-
moistne, jak i wtórne, ponieważ mniejszy błąd po-
wtarzalności implikuje mniejszą wartość odważ-
ki minimalnej. Mały błąd powtarzalności ma także
znaczną wartość marketingową. Błąd powtarzal-
ności wag laboratoryjnych wynosi zwykle nie wię-
cej niż 3–5 działek elementarnych d , a w przypadku
wag najwyższej klasy może on wynosić mniej niż 1 d .

Badanie błędu powtarzalności wykonuje się ruty-
nowo podczas okresowego wzorcowania wagi. Na-
tomiaś sprawdzanie powtarzalności wagi w labo-
ratorium farmaceutycznym wykonuje się zwykle co
tydzień, a wynik notuje w karcie kontrolnej przyrządu.

Centryczność i niecentryczność wagi (*eccentricity, eccentricity deviation*)

Niektóre niedoskonałości wagi ujawniają się
w powiązaniu z tzw. czynnikiem ludzkim. Ope-
rator wagi, stawiając ciało ważone na szalce wagi
elektronicznej, nie zawsze umieści je dokładnie na
środku szalki³. Nawet jeżeli naczynko wagowe by-
łoby umieszczone perfekcyjnie centrycznie, to nie-
symetrycznie może być rozmieszczona substancja
ważona w naczynku.

Niecentryczne położenie masy ważonej wytwa-
rza niezerowy moment siły przechylający szalkę, co
może zauważalnie wpłynąć na wynik pomiaru. Błąd
spowodowany tym zjawiskiem nazywamy błędem
niecentryczności lub niecentrycznością wagi. Aby
przetestować centryczność wagi, umieszczamy ten
sam odważnik testowy² o masie co najmniej $M_{\max}/2$
w 5 punktach: na środku szalki oraz w 4 punktach
bliżej obrzeża szalki (co ok. 90°), tak jak pokazano
na **rycinie 4**.



Rycina 4. Badanie centryczności wagi polega na wykonaniu ważenia
tego samego odważnika testowego umieszczonego na środku szalki
(czarna kropka w środku szarego koła) i w 4 punktach na obrzeżu szalki.
Największa różnica wyniku ważenia tego odważnika w środku i na obrzeżu
szalki jest miarą niecentryczności wagi

Największa różnica zaobserwowana między po-
miarem wartości masy umieszczonej na środku
szalki i na jej brzegu określa błąd niecentryczności.
W przypadku dużych mas (porównywalnych z ob-
ciążeniem maksymalnym wagi) niecentryczność
może dać istotny wkład do niepewności pomiaru
masy. Błąd niecentryczności wag laboratoryjnych
wysokiej klasy zwykle nie przekracza 1 do 3 dzia-
łek elementarnych.

Ponieważ moment siły spowodowany nie-
centrycznym ustawieniem próbki na szalce wagi
jest wprost proporcjonalny do ważonej masy, to
w przypadku małych mas (poniżej 1% $M_{\max}$) błąd
niecentryczności jest zaniedbywalnie mały.

Centryczność wagi badana jest zawsze podczas
okresowego wzorcowania wagi, ale sprawdzanie
centryczności wagi „siłami własnymi” labo-
ratorium, zgodnie z procedurami wewnętrznymi, może
odbywać się o wiele częściej (raz na miesiąc, a na-
wet raz na tydzień), a wyniki umieszczane są w kar-
cie kontrolnej przyrządu.

Odczytowość wagi i błąd odczytowości (*readability, readability error*)

Odczytowość wagi elektronicznej jest to naj-
mniejsza działka na jej wyświetlaczu, czyli działka
elementarna d ; w przypadku wag laboratoryjnych
działkę elementarną można utożsamiać z rozdzielczo-
ścią wagi. Na przykład, jeżeli wyświetlacz pokazu-
je masę ciała ważonego (w gramach) z dokładnością
do 5 cyfr po przecinku dziesiętnym, to odczytowość
(działka elementarna) wynosi⁴ $d = 1 \times 10^{-5}$ g.

Ponieważ na wyświetlaczu nie może pojawić się
ułamek działki elementarnej d , to znaczy, że prze-
twornik analogowo-cyfrowy i oprogramowanie wagi
muszą „zaokrąglić” wartość wyświetlaną. Nieznana
wartość „przed zaokrągleniem” może różnić się od
wartości pokazanej na wyświetlaczu o maksymal-
nie $\pm d/2$ i każda wartość z tego zakresu jest równie
prawdopodobna; a zatem, rozkład prawdopodobień-
stwa odpowiadający błędowi zaokrąglenia jest roz-
kładem jednostajnym (prostokątnym) o szerokości d .

Pomiar masy wymaga jednak zawsze dwu od-
czytów: odczyt wskazania początkowego (zera lub
tary) oraz wskazania końcowego. Błąd zaokrągle-
nia odczytu początkowego jest taki sam, jak w przy-
padku każdego innego odczytu i odpowiada mu
prostokątny rozkład prawdopodobieństwa o szer-
okości d . Błędy odczytu wartości początkowej i koń-
cowej są od siebie niezależne; spłot (konwolucja)
dwu niezależnych rozkładów prostokątnych o sze-
rokości d (każdy) daje jeden trójkątny rozkład praw-
dopodobieństwa o szerokości $2d$, którego wariancja

³ Ciało postawione niecentrycznie nie wolno przesuwac na szalce; można je tylko podnieść i położyć jeszcze raz.

⁴ Skala niektórych wag może być zaprojektowana tak, że ostatnia wyświetlana cyfra dziesiętna zmienia się nie o jednostkę, ale co dwie lub pięć jedno-
stek; wówczas odczytowość wynosiłaby odpowiednio $d = 2 \times 10^{-5}$ g lub $d = 5 \times 10^{-5}$ g.

wynosi $d^2/6$. Pierwiastek z wariancji daje odchylenie standardowe, które jest miarą błędu wynikającego z ograniczonej odczytowości wagi (wielkość działki elementarnej d). A zatem, błąd odczytowości wynosi

$$u_D = \frac{d}{\sqrt{6}} = 0,41d \quad (9),$$

czyli ułamek działki elementarnej. Zakładając np., że $d = 1 \times 10^{-5} \text{ g} = 10 \text{ }\mu\text{g}$, otrzymujemy błąd odczytowości $u_D = 0,0041 \text{ mg} = 4,1 \text{ }\mu\text{g}$; w metrologii na ogół przyjmuje się, iż niepewność pomiaru wystarczy obliczyć z dokładnością do 2 cyfr znaczących. Odczytowość d i błąd odczytowości u_D są symbolicznie przedstawione na **rycynie 5**.

Ponieważ błąd odczytowości jest stały dla danej wagi, tzn. niezależny od wartości masy ważonej, to jest on zwykle zaniedbywalny przy ważeniu mas bliskich obciążeniu maksymalnemu, ale może być dominującym składnikiem niepewności pomiaru bardzo małych mas, np. w przypadku odważki minimalnej. Błąd odczytowości wagi, jako zależny tylko od wartości działki elementarnej d , nie wymaga badania doświadczalnego.

Związek głównych parametrów technicznych wagi z niepewnością pomiaru masy

Błędy czułości, nieliniowości, powtarzalności, niecentryczności i odczytowości wagi traktujemy jako niezależne. Jest to oczywiście przybliżenie, bo np. w błędzie czułości, nieliniowości czy niecentryczności jest pewien udział błędu powtarzalności. Założenie to można jednak uczynić, ponieważ (1) próby zastosowania metod analizy statystycznej do lepszego rozdzielenia poszczególnych rodzajów błędów, celem uzyskania niewielkich poprawek do wyników współczesnej, ale tradycją uświęconej, prostej metodyki badania wag, można by podsumować znany powiedzeniem „stękały góry, a urodziła się mysz”; a przede wszystkim (2) założenie niezależności tych pięciu podstawowych źródeł błędu w pomiarach masy *zwiększa* nieco oszacowanie niepewności pomiaru, co wolno zrobić – nie wolno tylko zrobić czegoś przeciwnego, tzn. zaniżyć oszacowanie niepewności pomiaru.

Znając poszczególne składowe niepewności pomiaru masy, które uznajemy za niezależne, możemy obliczyć złożoną niepewność pomiaru (*combined uncertainty*)

$$u = \sqrt{u_S^2 + u_L^2 + u_E^2 + u_R^2 + u_D^2} \quad (10),$$

gdzie poszczególne symbole oznaczają:

u_S – błąd czułości,

u_L – błąd nieliniowości,

u_E – błąd niecentryczności,

u_R – błąd powtarzalności,

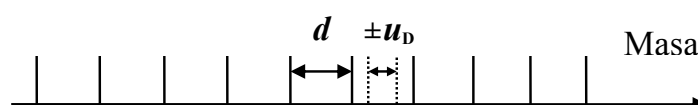
u_D – błąd odczytowości.

W przypadku ważenia dużych mas (porównywalnych z obciążeniem maksymalnym wagi, $M_{\max}$) pierwsze cztery rodzaje błędów dają dominujący wkład do złożonej niepewności pomiaru masy, a błąd odczytowości jest stały i pomijalnie mały. W przypadku ważenia coraz mniejszych mas rola pierwszych trzech składników w równaniu (10) stopniowo maleje, ponieważ są one proporcjonalne do ważonej masy. Czwarty składnik, czyli błąd powtarzalności, początkowo maleje wraz ze zmniejszaniem masy ważonej, ale dla mas rzędu 1% $M_{\max}$ stabilizuje się na pewnym poziomie zależnym od rodzaju oraz jakości wagi i dalej już bardzo słabo zależy od obciążenia wagi. Dlatego niepewność złożona u ważenia bardzo małych mas ($< 1\% M_{\max}$) jest zdominowana przez błąd odczytowości (niezależny od masy ważonej) i błąd powtarzalności (bardzo słabo zależny od masy w tym zakresie).

Równanie (10) można stosować w stałych, ściśle określonych warunkach środowiskowych laboratorium farmaceutycznego. Do badań fundamentalnych właściwości wag wykorzystuje się inne, znacznie bardziej złożone modele ważenia i odpowiadające im wzory, które uwzględniają właściwości poszczególnych elementów elektronicznych i mechanicznych wag, warunki środowiskowe oraz właściwości ciała ważonego (np. jego gęstość). Modele te są dość skomplikowane i w pewnym stopniu autorskie (żeby nie powiedzieć arbitralne), a w praktyce laboratoryjnej nie mają bezpośredniego zastosowania.

Inne parametry techniczne wag, istotne z punktu widzenia URS i użytkownika

Oferta zakupu wagi powinna podawać jako konieczne tylko te wymagania, które są rzeczywiście ważne dla użytkownika; parametry mniej istotne mogą być podane jako wymagania dodatkowe. Podstawowe wymagania techniczne powinny być wyspecyfikowane z pewnym zapasem w stosunku do aktualnych potrzeb laboratorium, ponieważ sprzęt analityczny musi odpowiadać nie tylko na



Rycina 5. Błąd odczytowości wynika z zaokrąglenia ciągłej wartości analogowej do dyskretniej wartości cyfrowej ze względu na określoną stałą wartość działki elementarnej d badanej wagi. Z analizy statystycznej wynika, że błąd odczytowości $\pm u_D$ jest nieco mniejszy od połowy działki elementarnej d

aktualne, ale również na przewidywane potrzeby w przyszłości. Poza tym doświadczony i przemyślny farmaceuta nie pracuje na granicy możliwości technicznych przyrządów pomiarowych, ale woli mieć pewien margines bezpieczeństwa, przysłowiową „stopę wody pod kilem”. W tej sekcji omówimy inne parametry techniczne wag, które mogą być istotne z punktu widzenia użytkownika.

Odważka minimalna (minimum sample weight, MSW)

W praktyce minimalna odważka jest to najmniejsza masa próbki (netto), którą można „dokładnie” zważyć na danej wadze, zgodnie z kryteriami dokładności ważenia sformułowanymi w rozdziałach <41> i <1251> farmakopei amerykańskiej USP-NF [3]. Deklarowana przez producentów wag minimalna odważka dla mikrowag wynosi zwykle od 2 mg do 20 mg, a w przypadku ultra-mikrowag może wynosić mniej niż 1 mg. Ponieważ parametr ten stanowi obecnie (obok czasu stabilizacji wyniku ważenia) główne pole konkurencji rynkowej producentów wag, do wartości deklarowanych MSW należy podchodzić z dużą ostrożnością; najważniejsza jest faktyczna wartość MSW, która musi być określona w miejscu instalacji i użytkowania wagi. Farmakopea amerykańska wprowadziła nowe regulacje w zakresie „dokładnego” ważenia i odważki minimalnej z dniem 1 grudnia 2013 r. Jest to temat szczególnie ważny dla laboratoriów i firm mających bezpośredni lub pośredni kontakt z farmaceutycznym rynkiem amerykańskim; kwestia odważki minimalnej warta jest odrębnego i bardziej szczegółowego potraktowania.

Obciążenie maksymalne, obciążenie dopuszczalne, nośność wagi (maximum capacity, maximum load)

Obciążenie maksymalne mówi, jakie największe masy można ważyć na danej wadze, uzyskując wynik godny zaufania (tj. w granicach błędów deklarowanych przez producenta). Wartość tego parametru jest zwykle „nierówną” liczbą i wynosi np.: 220 g, 110 g, 61 g, 21 g, 6,1 g, 2,1 g, etc., aby zapewnić użytkownikowi możliwość ważenia mas do ok. 200 g, 100 g, 60 g, 20 g, 6 g, czy 2 g z poczuciem bezpieczeństwa wynikającym stąd, iż nie pracuje on na samej granicy możliwości technicznych urządzenia. Obciążenie maksymalne ultra-mikrowag jest najczęściej rzędu 1–3 g, ale są też ultra-mikrowagi o nieco mniejszym lub większym obciążeniu maksymalnym. Typowe obciążenie maksymalne mikrowagi wynosi ok. 20 g, ale zakres ten rozciąga się od 5 g do 30 g. Semi-mikrowagi mają obciążenie maksymalne zwykle do ok. 200 g, wagi analityczne do ok. 1 kg, a wagi precyzyjne do ok. 5 kg, ale różnice między konstrukcjami różnych producentów są znaczne i obciążenia maksymalne wag precyzyjnych dochodzą do 20 kg.

Czas stabilizacji (settling time)

Użytkownicy przywiązują duże znaczenie do czasu pomiaru, czyli czasu stabilizacji wyniku ważenia; w przypadku ultra-mikrowag może on sięgać 10–15 s, w przypadku mikrowag wynosi on zwykle 5–10 s, a pozostałe rodzaje wag analitycznych mają czas stabilizacji 2–5 s. Krótki czas stabilizacji wyniku ważenia ma znaczenie głównie przy ważeniach seryjnych (chodzi przede wszystkim o zapewnienie stałych warunków środowiskowych dla całej serii pomiarów), ale w przypadku wag stosowanych do pojedynczych ważen krótki czas stabilizacji ma znaczenie głównie marketingowe.

Warunki środowiskowe pracy wagi (environmental conditions)

Najważniejsze parametry, na które należy zwrócić uwagę, to zakres temperatur, wilgotności i ciśnienia, w których może pracować waga. Wagi laboratoryjne są przystosowane do pracy w szerokim zakresie temperatur (zwykle od +10°C do +40°C) i wilgotności względnej (zwykle od 40 do 80%); ciśnienie atmosferyczne zmienia się na ogół w niewielkim zakresie, wolniej i ma mały wpływ praktyczny na wynik pomiaru masy (głównie poprzez poprawkę na wypór powietrza). Z punktu widzenia dokładności pomiaru masy najważniejsza jest stabilność warunków środowiskowych, a nie konkretna wartość temperatury, wilgotności i ciśnienia atmosferycznego w trakcie pomiaru. Warunki środowiskowe w klimatyzowanych pomieszczeniach laboratoryjnych, a w szczególności w pokoju wagowym, są ściśle kontrolowane i ich wahania są bardzo małe, toteż praktycznie wszystkie wagi od renomowanych producentów spełniają wymagania użytkownika pod tym względem.

Wymiary szalki i komory ważenia

Ważnym parametrem wymiarowym wagi jest średnica szalki (*weighing pan diameter*); im mniejsze jest obciążenie maksymalne i dokładniejszy ma być pomiar, tym mniejsza powinna być szalka, aby zminimalizować zakłócenia środowiskowe. W grupie mikrowag średnica (kolistej) szalki waha się od 1,6 cm do 2,6 cm. Wymiary komory ważenia (*weighing chamber*) mogą znacznie różnić się w zależności od przeznaczenia wagi, np. mikrowagi stosowane do kalibracji i sprawdzania pipet, a także do ważenia filtrów (grawimetryczne oznaczanie pyłów) mają większą szalkę (może być ażurowa) oraz komorę ważenia, aby swobodnie umieścić ciałoważone i ewentualnie inne zabezpieczenia (stelaż, kurtynę parową). Natomiast wagi laboratoryjne przeznaczone do ważenia większych mas z nieco mniejszą dokładnością, niemające osłony przeciwwiatrowej, mogą mieć dowolnie dużą powierzchnię szalki; najczęściej jest to kwadrat o boku rzędu 20 cm.

Złącza transmisji danych (*interface*)

W celu umożliwienia automatycznego przesyłania danych z wagi elektronicznej do urządzeń zewnętrznych (np. PC, pamięci przenośnej czy drukarki) waga wyposażona jest zwykle w kilka rodzajów złącz. Standardowo stosowane są złącza USB, RS 232 i Ethernet; należy upewnić się, ile takich złącz występuje w danym modelu wagi (powinno ich być co najmniej 4) i czy są dostępne inne, ewentualnie potrzebne rodzaje złącz.

Zasilanie, zasilanie główne (*power supply, mains*)

Zasilanie główne może być przystosowane do prądu przemiennego o napięciu 230 V lub 110 V. Zasilanie prądem stałym wymaga zwykle napięcia w zakresie 12 V–16 V. Moc pobierana przez wagę laboratoryjną wynosi ok. 30 W; ze względu na znaczną ilość ciepła emitowanego przez wagę powinna ona być cały czas włączona, aby pozostawała w trwałej równowadze termicznej z otoczeniem.

Rodzaj czujnika (*sensor*)

W wagach laboratoryjnych odznaczających się największą dokładnością stosuje się czujniki magnetoelektryczne, działające na zasadzie równoważenia siły grawitacji siłą elektrodynamiczną (zasada działania wagi Ampere'a). W wagach przystosowanych do pomiaru większych mas z nieco mniejszą dokładnością stosowane są też czujniki tensometryczne, w których siła grawitacji ważonego ciała przekłada się na naprężenie i proporcjonalną zmianę rezystancji przetwornika tensometrycznego. W sytuacji utrudnionego dostępu do zasilania sieciowego, w warunkach dużej zmienności temperatury oraz w strefach zagrożonych wybuchem stosuje się czujniki wibracyjne; nie są to jednak warunki typowe dla laboratorium farmaceutycznego.

Wyświetlacz (*display*)

Na ogół stosowane są wyświetlacze ciekłokrystaliczne LCD, zwykle kolorowe, czasem monochromatyczne. Wyświetlacze LCD są wyposażone w sterowanie dotykowe, tj. posiadają panel dotykowy (*touchscreen*). Z punktu widzenia użytkownika istotna jest średnica wyświetlacza, który powinien być dostatecznie duży (co najmniej 6 cm), aby ułatwić sterowanie dotykowe wagą i odczyt wszystkich informacji wyświetlanych jednocześnie.

Automatyczne otwieranie i zamykanie komory ważenia (*automatic slide door*)

Wiele typów wag laboratoryjnych, w tym praktycznie wszystkie mikrowagi, są wyposażone w sterowany fotokomórką automat do otwierania i zamykania komory ważenia, aby zminimalizować czynnik ludzki w procesie ważenia.

Tara (*tare*)

Funkcja tary powinna obejmować cały dopuszczalny zakres obciążenia wagi.

Oprogramowanie wagi (*software*)

Z punktu widzenia funkcji, jakie spełnia oprogramowanie można wyróżnić tę część, która steruje elementami wagi oraz jej funkcjami wewnętrznymi i jest wyłączną domeną producenta oraz tę część, która pełni funkcje informacyjne i umożliwia interakcję z użytkownikiem. Ta druga część oprogramowania pozwala użytkownikowi wybierać preferowane opcje (np. jedną z wielu wersji językowych komunikatora, zastosować tarowanie, wybrać preferowany tryb działania filtru i szybkość zatwierdzenia wyniku ważenia), a nawet wprowadzać własne dane, np. listę substancji i ich charakterystycznych właściwości, takich jak ciężar właściwy. Lista funkcji oprogramowania dostępnych dla użytkownika wagi elektronicznej jest bardzo bogata i może znacznie różnić się w zależności od producenta wagi. Na życzenie użytkownika niektóre rutynowe obliczenia mogą być włączone do oprogramowania wagi (np. grawimetryczna kalibracja szkła laboratoryjnego). Nabywca wagi powinien upewnić się, czy producent umożliwia automatyczną aktualizację oprogramowania wagi przez internet.

Akcesoria dodatkowe (*accessories*)

Producenci wag oferują szeroki asortyment dodatkowych urządzeń, np. zestawy antystatyczne (*antistatic kits*), drukarki etykiet (*label printers*), czytniki etykiet (*label scanners*), stelaże (*holders*) do podtrzymywania szkła laboratoryjnego o różnych kształtach, zestawy do miareczkowania (*titration sets*), systemy znakowania pipet (*pipette tagging system*), etc.

Masa wagi brutto (*gross weight of a balance*)

Masa własna mikrowag waha się od 7 kg do 15 kg, masa pozostałych typów wag laboratoryjnych wynosi zwykle od 5 kg do 10 kg. Masa wagi nie ma dużego praktycznego znaczenia; w szczególności duża masa wagi nie jest jej wadą, bowiem sprzyja odporności na zakłócenia mechaniczne.

Wymiary zewnętrzne wagi (*balance dimensions*)

Tradycyjnie podawane są 3 wymiary maksymalne wagi danego typoszerokiego: szerokość, długość i wysokość. Parametry te mogą mieć znaczenie wówczas, gdy dysponujemy stołem wagowym o określonych wymiarach (mikrowagi i ultra-mikrowagi są wąskie, ale dość długie i wymagają szerokiego stołu wagowego) lub wówczas, gdy na jednym stole wagowym chcemy umieścić więcej niż jedną wagę.

Inne parametry techniczne wag

Podczas badania wagi określa się także wiele innych parametrów, które jednak nie są bezpośrednio wykorzystywane przez użytkownika i na ogół nie są wymieniane w specyfikacji technicznej użytkownika (URS); są one jednak badane i podawane przez producentów, bowiem mogą być istotne z punktu widzenia niepewności pomiaru. Takimi parametrami są np. dryft czasowy czułości (*sensitivity stability*, *temporal sensitivity drift*), dryft temperaturowy czułości (*sensitivity temperature drift*), nieliniowość różniczkowa (*differential linearity deviation*), różniczkowa odchyłka niecentryczności (*differential eccentric load deviation*) i inne.

Dyskusja

W laboratorium farmaceutycznym znajduje się zwykle wiele wag przeznaczonych do określonych zadań. Gdy przygotowujemy przetarg na zakup nowego przyrządu pomiarowego, należy najpierw określić cel tego zakupu oraz wynikające stąd najważniejsze dla przyszłego użytkownika parametry techniczne nowej aparatury. Wymagania sprzętowe ustala się z pewnym zapasem, tak aby uniknąć pracy na granicy możliwości technicznych wag. Na tym wstępnym etapie można wspomóc się danymi technicznymi poszczególnych typów wag, podawanymi na stronach internetowych producentów, by sprawdzić, czy dany zestaw wymagań technicznych jest realistyczny, ale przepisywanie do oferty przetargowej danych technicznych z ulotki informacyjnej pewnego, już na wstępie wybranego przyrządu pomiarowego jest oczywiście niedozwolone i wysoce niewskazane ze względów formalnych, merytorycznych i finansowych. Podanie pewnej kombinacji wymagań zasadniczych i dodatkowych (np. dostępność określonych akcesoriów) znalezionych w materiałach informacyjnych jednego producenta może wyeliminować konkurencję i ustawić tego producenta w monopolistycznej względem nas pozycji⁵.

Dokonyując wstępnej oceny przydatności danej wagi do określonego zadania, należy zwrócić uwagę na to, że wartości poszczególnych parametrów tego przyrządu mogą mieć kilka wartości:

1) **Wartości typowe, wartości nominalne (*typical values*, *nominal values*)**. Są to wartości zadeklarowane przez producenta jako charakterystyczne

dla danego typu wagi, bez podania metody użycia tej wartości (wartość „typowa” może być średnią arytmetyczną w całej populacji lub w próbie, średnią ważoną, medianą, a może to być po prostu *educated guess*); z reguły nie ma też informacji na temat rozrzutu statystycznego podanych wartości. Wartość typowa ma charakter wyłącznie orientacyjny, nie stanowiąc zobowiązania wiążącego producenta.

2) **Wartości gwarantowane, wartości graniczne (*guaranteed values*, *limit values*)**. W tym przypadku producent gwarantuje, że żaden egzemplarz danego typu nie będzie miał parametrów gorszych, niż ich wartości gwarantowane. Trick polega na tym, że są one gwarantowane tylko przy założeniu pewnych warunków środowiskowych oraz ich stabilności, ale wymogi te nie są *explicite* podane. Wartości gwarantowane parametrów technicznych są zawsze gorsze od wartości typowych, np. w przypadku mikrowag są one często gorsze o czynnik 2–3 od wartości typowych.

3) **Wartości faktyczne (*actual values*)**. Są to wartości parametrów technicznych ustalone i udokumentowane w miejscu zainstalowania i pracy wagi; wartości te zależą od warunków środowiskowych, w których dane urządzenie pracuje. W umowie na zakup wagi warto zawrzeć klauzulę, iż wartości faktyczne w momencie oddania wagi do użytku nie będą gorsze niż te założone w URS (z odpowiednim zapasem). Aby dostawca nie mógł zrzucić odpowiedzialności za nieuzyskanie wymaganych wartości tych parametrów na niewłaściwe warunki środowiskowe w miejscu eksploatacji danej wagi (lub innej aparatury pomiarowej), należy umożliwić dostawcy sprawdzenie warunków środowiskowych, zanim umowa zakupu zostanie podpisana.

Porównując parametry techniczne wag różnych producentów, zauważymy, iż wartości niektórych parametrów mają formę funkcji zależnej od obciążenia wagi. Są to zależności uzyskane w sposób doświadczalny, w wyniku badania wielu wag danego typu. Aby uzyskać wyobrażenie o faktycznym zakresie zmienności danego parametru, należy obliczyć go zgodnie z podaną funkcją dla obciążenia zerowego i obciążenia maksymalnego danej wagi. Na przykład, jeżeli wartość

⁵ Sytuacja nie jest tak jednoznaczna, gdy chcemy zakupić sprzęt unikatowy, o którym z góry wiadomo, że jest tylko jeden lub dwu liczących się producentów, albo gdy przyrząd musi być wykonany lub dostosowany na indywidualne zamówienie. W takiej sytuacji przetarg wymagany ustawą o zamówieniach publicznych może być z konieczności fikcją. Pracownicy laboratoriów badawczych od dawna podnoszą kwestię nadmiernie rozbudowanych wymogów formalnych przy zakupie aparatury naukowej, ponieważ znacznie opóźnia to prace badawcze i grozi (nieumyślnym) naruszeniem wymogów formalno-prawnych, z trudnymi do przewidzenia konsekwencjami, bowiem w tej dziedzinie pracownicy naukowcy nie są i nie mogą być ekspertami. Środowisko naukowe od dawna postuluje, by beneficjent dotacji na prace badawcze mógł nią swobodnie dysponować (w ramach danego projektu), a rozliczenie formalne (głównie finansowe) oraz merytoryczne (w postaci opublikowanych lub w inny sposób udokumentowanych wyników badań naukowych oraz wdrożeń) było wystarczającą gwarancją właściwego spożytkowania publicznych środków finansowych. W pracy naukowo-badawczej należy unikać przerostu formy nad treścią, a zagrożenie tego środowiska korupcją można ocenić jako znikome w porównaniu z innymi dziedzinami działalności gospodarczej i aktywności społecznej finansowanej ze środków publicznych.

odwagi minimalnej dla ultra-mikrowagi o obciążeniu maksymalnym $M_{\max} = 2,1$ g dana jest wzorem $MSW = 0,3 \text{ mg} + 5 \times 10^{-5} \times M$, gdzie M = masa ważona brutto, to wartość MSW dla takiej wagi wynosi 0,3–0,4 mg, w zależności od masy naczynia wagowego. Należy zwrócić uwagę na to, że wartość niektórych parametrów technicznych zależy od masy brutto, a innych od masy netto.

Procedura badania większości parametrów technicznych wagi nie jest szczegółowo określona w przepisach branżowych, które podają tylko ogólne zalecenia. Producenci wag mają swe własne procedury badania parametrów technicznych i na ogół nie ujawniają firmowych algorytmów, podobnie jak restauratorzy nie wpuszczają swych klientów do kuchni. Szczegóły procedur badania parametrów technicznych bywają dość skomplikowane, bowiem producenci mogą stosować złożone metody statystyczne w dążeniu do minimalizacji błędów, tak aby uzyskać wyniki pokazujące ich produkt w jak najlepszym świetle.

Wzorcowanie wagi u użytkownika przez firmę zewnętrzną wygląda w praktyce tak, iż osoba wzorcująca wagę wykonuje przepisaną procedurę, wprowadza dane do formatki zaprogramowanej w swoim PC, otrzymuje dane wynikowe obliczone przez oprogramowanie działające na zasadzie czarnej skrzynki i przekazuje zleceniodawcy wyniki w postaci świadectwa wzorcowania bez szczegółowych wyjaśnień, jak podane wartości zostały wyliczone. Wynika stąd wniosek, iż parametry tej samej wagi, badane przez różne firmy zewnętrzne oraz siłami własnymi laboratorium (zgodnie z wewnętrznym harmonogramem okresowych sprawdzeń przyrządów pomiarowych), mogą się nieco różnić, choć różnice tych wartości powinny mieścić się w granicach określonych przez niepewność pomiaru.

W przypadku audytu zewnętrznego, w odpowiedzi na pytania nazbyt szczegółowe (np. „Jak określana jest odchyłka czułości?”) wystarczy powiedzieć, że wzorcowanie wagi wykonuje przedstawiciel producenta lub inna certyfikowana firma zewnętrzna oraz przedstawić ostatnie świadectwo wzorcowania. Audytorzy FDA mają swe własne procedury przeprowadzania audytu i znają swe prawa oraz ograniczenia. Natomiast audyt zewnętrzny przeprowadzany w firmie farmaceutycznej na zlecenie nabywcy hurtowego przed podpisaniem dużego kontraktu może obfitować w dość wnikliwe

i szczegółowe pytania, na które firma nie ma obowiązku odpowiedzieć, ale wtedy ryzykuje odstąpieniem od podpisania kontraktu.

W przypadku przetargów (szczególnie tych podlegających ustawie o zamówieniach publicznych) kwestie prawne i finansowe dominują nad zagadnieniami technicznymi i nikt nie wnika w szczególności metodologiczne badania parametrów technicznych wag.

Laboratorium farmaceutyczne, jako część instytutu badawczego lub firmy przemysłowo-handlowej powinno mieć swe własne, wewnętrzne procedury okresowego i incydentalnego sprawdzania wag (oraz innej aparatury pomiarowej), które stanowią część zakładowego systemu jakości, a ich przestrzeganie podlega oczywiście audytowi wewnętrznemu i zewnętrznemu [4–7]. Choć w przypadku audytu zewnętrznego nie ma obowiązku wyjawiania audytorowi szczegółów procedur wewnętrznych, to trzeba (1) umieć wykazać, że procedury te istnieją (wystarczy odwołać się do zakładowego systemu jakości); (2) umieć udowodnić, że przyrząd jest wzorcowany (wystarczy przedstawić ostatnie świadectwo wzorcowania); (3) umieć sprecyzować, jak rozwiązano kwestię okresowych i incydentalnych sprawdzeń wewnętrznych (wystarczy przedstawić karty kontrolne przyrządu); a także (4) umieć wyjaśnić ogólne zasady, na których oparto przyjęte rozwiązania, z analizą ryzyka (*risk analysis*) włącznie.

Otrzymano: 2014.08.29 · Zaakceptowano: 2014.09.21

Piśmiennictwo

1. Vocabulary OIML V 2–200, Edition 2012 (E/F): International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM), 3rd edition. OIML website, 2014.
2. Scorer T., Perkin M., Buckley M.: Measurement good practice guide no. 70. Weighing in the pharmaceutical industry, June 2004 ed. NPL website, 2014.
3. The United States Pharmacopeia and National Formulary, USP–37 and NF–32 ed., Rockville, MD: US Pharmacopeial Convention, 2014.
4. Part 211, Subpart D – Equipment, Sect. 211.68: Automatic, mechanical and electronic equipment, 21CFR211.681, revised April 1, 2013. FDA website, 2014.
5. European Union, Commission Directive 2003/94/EC of 8 October 2003 laying down the principles and guidelines of good manufacturing practice in respect of medicinal products for human use and investigational medicinal products for human use. Official Journal of the European Union, L 262/22, 14.10.2003.
6. International Document OIML D 10 Edition 2007 (E), Guidelines for the determination of calibration intervals of measuring instruments. OIML website, 2014.
7. European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care, Quality management document PA/PH/OMCL (12) 77 7R. Qualification of equipment, Annex 8: Qualification of balances. EDQM website, 2014.