

KAMIL JUROWSKI

Zastosowanie technik chromatograficznych i spektrometrii mas oraz metod biochemicznych do badania zaburzeń lipidowych wywołanych modelowym lekiem z grupy inhibitorów proteazy HIV-1

Leczenie zakażenia wirusem upośledzenia odporności HIV (ang. human immunodeficiency virus) związane było początkowo z monoterapią i terapią dwulekową (1987-1991). Kilka lat później (1995) rozpoczęto badania nad nową grupą leków hamujących proteazę HIV (inhibitory proteazy). Ich efektywność była tak wysoka, że zostały zarejestrowane bardzo szybko (1995–1996) w trybie skróconym. Przełomem w leczeniu AIDS było wprowadzenie terapii związanej z jednoczesnym stosowaniem kilku leków o różnym mechanizmie działania, gdzie już po dwóch latach odnotowano spadek zachorowań i zgonów wśród chorych. Podstawą terapii antyretrowirusowej, stosowanej w przypadku zakażenia HIV - tzw. metodzie HAART (ang. highly active antyretroviral therapy), jest stosowanie mieszanki co najmniej trzech leków przeciwwirusowych w kombinacji zalecanej przez światowych ekspertów. Celem terapii jest długofalowe zahamowanie replikacji wirusa HIV-1. Metoda HAART jest najlepszą znaną obecnie metodą walki z HIV, jednakże niesie za sobą ryzyko wielu powikłań, efektów ubocznych i długoterminowych skutków, spowodowanych głównie interakcją leków i układu immunologicznego. Bardzo ważną komponentą tej terapii jest sakwinawir, stanowiący modelowy lek z grupy inhibitorów proteazy HIV-1. Jednakże, należy zwrócić uwagę, że u pacjentów leczonych inhibitorami proteazy HIV-1 (np. sakwinawirem, indinawirem), najczęściej występującym efektem ubocznym jest tzw. lipodystrofia, która charakteryzuje się ubytkiem podskórnej tkanki tłuszczowej w obrębie twarzy, kończyn oraz zwiększeniem tkanki tłuszczowej w okolicach m.in. brzucha oraz karku.

Molekularne podstawy patomechanizmów i patofizjologii tego typu lipodystrofii w odniesieniu do związków lipidowych oraz potencjalny współdziałanie infekcji HIV w jej powstawaniu, nie są jeszcze wyjaśnione, a ostatnie doniesienia wskazują na pewne aspekty patofizjologii komórek tłuszczowych (adipocytów), które nie były wcześniej brane pod uwagę. Niemniej, brak jest obecnie jakichkolwiek doniesień na temat szczegółowego składu jakościowego i ilościowego komórek tłuszczowych pod kątem związków lipidowych zarówno w układzie fizjologicznym jak i patologicznym.

Nadrzędnym celem rozprawy było badanie zaburzeń lipidowych wywołanych jatrogennym wpływem leku z grupy inhibitorów proteazy HIV-1 - sakwinawiru (SQV) poprzez zastosowanie technik chromatograficznych i spektrometrii mas oraz metod biochemicznych. W ramach badań biochemicznych przeprowadzono eksperyment *in-vitro* na unieśmiertnionej linii ludzkich preadypocytów (Chub-S7) z uwzględnieniem różnicowania oraz jatrogennej wpływu sakwinawiru. W celu identyfikacji i oznaczania kwasów tłuszczowych (FA) zastosowano chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrią mas (GC-MS), a w przypadku innych związków lipidowych (fosfatydylocholin - PC, lizofosfatydylocholin - LPC; fosfatydyloetanolamin - PE; plazmalogenów o podstawie fosfatydyloetanolaminy - PE-pl; fosfatydyloseryn - PS, fosfatydyloinozytoli - PI, sfingomielin - SPM, ceramidów - Cer, cholesterolu niezestryfikowanego - FC oraz estrów cholesterolu - CE) użyto tandemowej spektrometrii mas z jonizacją typu elektrorozpylanie (ESI-MS/MS).

Uzyskane wyniki badań w postaci ilościowych profili związków lipidowych tj.: FA, PC, LPC, PE, PE-pl, PS, PI, SPM, Cer, FC oraz CE, umożliwiły wytypowanie potencjalnych biomarkerów lipodystrofii tj. FA 18:0, FA 20:1-c11(n-9), LPC 20:4, PS 40:5, PS 40:6, CE 16:1 oraz CE 18:1. Wykazano istotne znaczenie jatrogennej wpływu SQV na zaburzenia lipidowe zarówno przed różnicowaniem jak i w trakcie tego procesu.

Oprócz uzyskanych informacji na temat patofizjologii komórek tłuszczowych w badanym modelu lipodystrofii (będącej efektem SQV), uzyskano informacje na temat szczegółowego składu lipidowego komórek tłuszczowych w stanie fizjologicznym. Uzyskane wyniki mają fundamentalne znaczenie w dalszych pracach nad patomechanizmem lipotoksyczności oraz lipidowym modelu patofizjologii lipodystrofii wywołanej lekami stosowanymi w HAART, gdyż wskazują jakie zaburzenia lipidowe powinny być brane pod uwagę – zarówno pod kątem jakościowym jak i ilościowym. Należy również zwrócić uwagę na to, że: 1) nie istnieją badania informujące pacjenta oraz lekarza o prawdopodobieństwie wystąpienia lipodystrofii z jej konsekwencjami metabolicznymi, oraz 2) z uwagi na to, że pierwsze efekty uboczne w postaci zaburzeń lipidowych, wywołanych jatrogennym wpływem SQV, pojawiają się ok. dwa lata po rozpoczęciu HAART, to uzyskane wyniki mają fundamentalne znaczenie do dalszych badań w kierunku poszukiwania biomarkerów tego typu lipodystrofii w innym materiale biologicznym (np. surowica krwi pacjenta) - uzyskane wyniki stanowią cenną przesłankę w doborze terapii jak i wdrożeniu postępowania prewencyjnego poprzez dobór odpowiedniej diety oraz zmianę zestawu leków.