

Fosfolipidoza indukowana lekami – przyczyny, skutki, identyfikacja

Agnieszka Katarzyna Gonet-Surówka¹, Patrycja Dynarowicz-Łątka¹, Mariola Ciechacka¹

¹Zakład Chemii Ogólnej, Wydział Chemii, Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, Polska

Farmacja Polska, ISSN 0014-8261 (print); ISSN 2544-8552 (on-line)

Drug-induced phospholipidosis – causes, effects, identification

Adverse reactions of drugs are a significant problem in pharmacotherapy. The observed side effects may have multiple causes. They may depend on the dose and type of medicine used. They can occur during therapy or appear with a delay, after its completion. They may disappear after discontinuation of treatment or persist. In this review, we summarize the vast literature in the area of phospholipidosis, which is a major consequence of the use of cationic amphiphilic drugs (CAD). Their specific chemical structure causes the accumulation of phospholipids inside the lysosomes, which affects their proper function, however, the mechanism of phospholipidosis at the molecular level is not fully understood. Several hypotheses on the mechanism of phospholipidosis formation have been put forward – they mainly concern: the formation of complexes between phospholipids and CAD drugs, competitive inhibition of lysosomal phospholipases by CAD and increased biosynthesis of phospholipids and cholesterol under the influence of the drug. As a result of the accumulation of phospholipids in lysosomes, the so-called lamellar bodies may appear in tissues days or weeks after *in vivo* CAD administration, and this process is dose-dependent. Phospholipidosis is believed to be a reversible process and is assumed to be an adaptive – but not toxic – response to drugs. If the concentration of CAD or a toxic substance accumulated in lysosomes exceeds a critical value, apoptosis and autophagy may be activated. Phospholipidosis can also be caused by drugs other than CAD, oxysterols and some nanoparticles. Phospholipidosis is one of the least known complications of pharmacotherapy – methods of its detection at the initial stage as well as the full spectrum of functional disorders of the body are still being sought. Identification of phospholipidosis in cells is possible by means of electron microscopy studies confirming the presence of lamellar bodies in tissues from biopsies or by means of real-time PCR techniques examining the expression of genes correlated with the occurrence of phospholipidosis. A potential biomarker detecting this process in the blood and urine of patients is bis(monoacylglycero) phosphate (BMP). Drug-induced phospholipidosis can be detected at the preclinical stage. However, the accumulation of phospholipids and the formation of lamellar bodies found in *in vitro* or in animal studies does not necessarily mean organ damage in the human body. In recent

Adres do korespondencji

Agnieszka Katarzyna Gonet-Surówka,
Zakład Chemii Ogólnej, Wydział Chemii,
Uniwersytetu Jagiellońskiego,
ul. Gronostajowa 2, 30-387 Kraków, Polska;
e-mail: agnieszka.gonet-surowka@uj.edu.pl

Źródła finansowania

Nie wskazano źródeł finansowania.

Konflikt interesów

Nie istnieje konflikt interesów.

Otrzymano: 2022.11.22

Zaakceptowano: 2023.03.30


Opublikowano on-line: 2023.04.05

DOI

10.32383/farmpol/162831

ORCID

Agnieszka Katarzyna Gonet-Surówka

–  0000-0001-7232-1821


Patrycja Dynarowicz-Łątka –  0000-0002-9778-6091

Mariola Ciechacka –  0000-0002-0722-3958

Copyright

© Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne

To jest artykuł o otwartym dostępie,

na licencji CC BY NC 

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Fosfolipidoza wywołana przez kationowe leki amfifilowe

Fosfolipidoza, objawiająca się akumulacją fosfolipidów – w szczególności w płucach, nerkach, wątrobie, może upośledzać przede wszystkim działanie komórek układu odpornościowego, wątroby czy też uszkodzić rogówkę oka [1]. Fosfolipidoza została po raz pierwszy zaobserwowana przez Nelsona i Fitzhugh'a w 1948 r. [2] podczas badań na szczurach, którym podawano przez dłuższy czas lek przeciwalaryczny – chlorochinę. Autorzy zaobserwowali tworzenie „piankowatych” makrofagów (*ang. foamy macrophages*). Wówczas zjawisko fosfolipidozy nie było znane, ale późniejsze badania potwierdziły, że obserwowane struktury powstają w wyniku akumulacji fosfolipidów [3, 4]. Dalsze badania doprowadziły do wniosku, że nie tylko chlorochina, ale także wiele innych leków również wywołuje fosfolipidozę i schorzenie to zostało nazwane fosfolipidozą indukowaną lekami (*ang. Drug-Induced Phospholipidosis, DIPL*). Wspólną cechą leków wywołujących fosfolipidozę jest ich struktura, zaobserwowano, że są to związki o budowie amfifilowej (amfipatycznej), posiadające diblokową strukturę – zawierają w obrębie cząsteczki część apolarną (hydrofobową), zazwyczaj o strukturze pierścieni aromatycznych, oraz fragment polarny (hydrofilowy) o ładunku dodatnim (zwykle są to grupy aminowe o różnej rzędowości – zwykle jest to pierwszorzędowy, drugorzędowy lub trzeciorzędowy atom azotu N związany z węglem C łańcucha alkilowego) [5]. Połączenia te nazwane zostały kationowymi lekami amfifilowymi (*ang. Cationic Amphiphilic Drugs, CAD*), do których należy również chlorochina. Do tej pory CAD są najlepiej poznanyymi czynnikami wywołującym to schorzenie. Amfifilowa struktura tych leków i obecność dużej, hydrofobowej części apolarnej

years, there has been an increase in interest in the mechanism of the phospholipidosis and in the study of new drugs in terms of causing this undesirable effect. This review presents an overview of the most important studies to date related to the mechanism of phospholipidosis formation, methods of its identification and effects at the cellular level as well as on the whole organism.

Keywords: phospholipidosis, cationic amphiphilic drugs, lamellar bodies.

© Farm Pol, 2022, 78 (11): 628–637

umożliwia ich wbudowywanie się w strukturę błon komórkowych, a następnie ich przenikanie przez membrany lipidowe i wnikanie do wnętrza organeli komórkowych, np. lizosomów. W tym procesie dwa parametry fizykochemiczne odgrywają zasadniczą rolę: stała protonowania grupy zasadowej (wyrażona wartością pK) oraz współczynnik podziału leku (P) pomiędzy dwa niemieszające się ze sobą rozpuszczalniki (zwykle n-oktanol i wodę; wyrażany jako log P), będący miarą hydrofobowości (w literaturze można znaleźć zarówno eksperymentalne, jak i obliczone wartości log P, te ostatnie oznaczane jako Clog P (*ang. Calculated log P*)). Większość leków CAD to związki hydrofobowe (log P powyżej 1, zazwyczaj w granicach od 2 do 9) o charakterze zasadowym. Wysoka zasadowa wartość pK_a (średnio powyżej 9) wskazuje, że substancje te są głównie protonowane przy niskich wartościach pH. Sprotonowana w kwaśnym środowisku lizosomów (pH 4,5–5) grupa aminowa i powstała w ten sposób forma jonowa leku, nie mogąc ponownie przekroczyć błony lizosomalnej, ulega zatrzymaniu wewnątrz lizosomu [6], co prowadzi do akumulacji leku (proces ten nosi nazwę lizosomotropizmu) [7]). Lizosomalne nagromadzenie

Tabela 1. Przykłady kationowych leków amfifilowych wywołujących fosfolipidozę.

Table 1. Chemical structures of representative groups of cationic amphiphilic drugs.

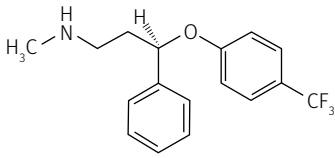
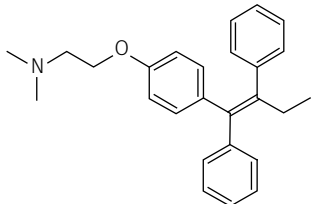
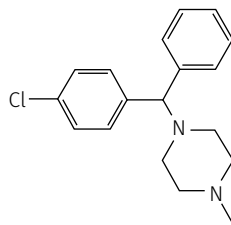
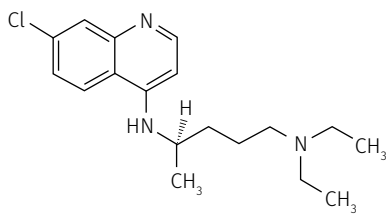
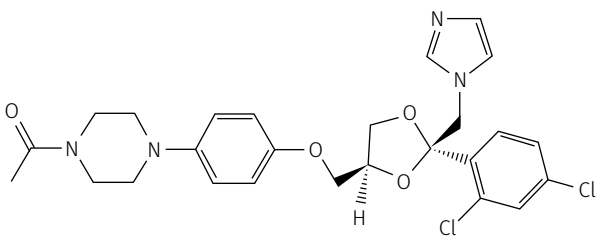
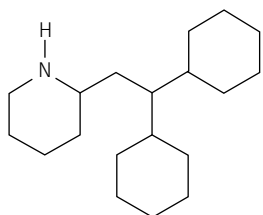
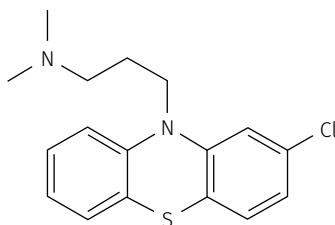
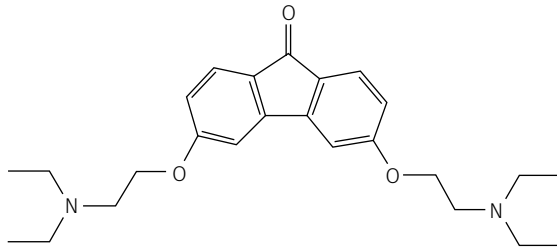
| Grupa leków, przykład leku i dawkowanie | Wzór strukturalny leku |
|--|--|
| Antydepresyjne: Fluoksetyna – 20 mg/dobę |  |
| Antyestrogenowe: Tamoksyfen – 20–40 mg/dobę |  |

Tabela 1. Przykłady kationowych leków amfifilowych wywołujących fosfolipidozę (cd.).
Table 1. Chemical structures of representative groups of cationic amphiphilic drugs (cont.).

| Grupa leków, przykład leku i dawkowanie | Wzór strukturalny leku |
|--|--|
| Antyhistaminowe: Chlorcyklizyna – 25 mg/dobę |  |
| Antymalaryczne: Chlorochina – 250–1500 mg/dobę |  |
| Przeciwgrzybicze: Ketokonazol – 200–400 mg/dobę |  |
| Przeciwkaszłowe: Perheksylina – 100–300 mg/dobę |  |
| Przeciwpsychotyczne: Chlorpromazyna – 40–300 mg/dobę |  |
| Przeciwvirusowe: Tiloron – 50 mg/kg masy ciała/dobę |  |

leków zostało potwierdzone dla wielu CAD, m.in. dla chlorochiny, mepakryny, chlorpromazyny, chlorofenterminy [8]. Proces ten wywołuje zmiany w środowisku lizosomów i w ich funkcjonowaniu,

co w konsekwencji doprowadza do nagromadzenia fosfolipidów i powstania charakterystycznych struktur, tzw. ciałek blaszkowatych, omówionych szczegółowo w dalszej części pracy.

Do kationowych leków amfifilowych, uznawanych za jednych z podstawowych sprawców wystąpienia fosfolipidozy indukowanej lekami w komórkach zwierzęcych zarówno *in vivo*, jak i *ex-vivo*, należy wiele powszechnie stosowanych leków z grupy antyarytmicznych, antydepresyjnych, antypsychotycznych, a także niektóre antybiotyki, leki przeciwmalaryczne i przeciwwirusowe. Przedstawiciele leków z ww. grup przedstawia **tabela 1**. Szersze spektrum leków wywołujących fosfolipidozę można znaleźć w pracach przeglądowych [9–11]. Obecnie znanych jest ponad 50 leków, u których potwierdzono występowanie fosfolipidozy u ludzi.

Fosfolipidoza wywołana lekami CAD charakteryzuje się czterema podstawowymi cechami: nadmierną akumulacją fosfolipidów w komórkach różnych tkanek – różne leki indukują ten proces w rozmaitych organach; proces ten jest zależny od szeregu czynników, takich jak rodzaj leku, dawka, wiek pacjenta [12]; obecnością błoniastych struktur tzw. ciałek blaszkowatych (*ang. lamellar bodies*), głównie pochodzenia lizosomalnego; akumulacją leku indukującego zwiększoną akumulację fosfolipidów; odwracalnością zmian po zaprzestaniu leczenia.

Ciałka blaszkowate

Nagromadzone w lizosomach fosfolipidy, po osiągnięciu pewnego poziomu, organizują się w charakterystyczne, koncentrycznie ułożone struktury blaszkowate lub krystaloidalne, otoczone błoną, które można łatwo wyróżnić w macierzy lizosomalnej. W zależności od tkanki i organizmu, ciała blaszkowate mogą różnić się budową. Mogą występować jako struktury jedno- lub wieloblaszkowate, a ich rozmiar waha się od 100 do 2400 nm [12] i są traktowane jako morfologiczna cecha fosfolipidozy. Z czasem struktury te zwiększają swój rozmiar, a następnie tracą otaczającą je błonę. Najczęściej spotykana struktura przypomina przekrój osłonki mielinowej komórki nerwowej (*ang. myelin figure*) lub występuje w postaci pęcherzyków wewnątrz lizosomalnych (nieposiadających wielowarstwowej struktury), prowadząc do zmienionej morfologii lizosomów.

Należy zaznaczyć, że ciała blaszkowate występują także w warunkach fizjologicznych, pełniąc rolę miejsca magazynowania lipidów. Przykładowo – fizjologiczne ciała blaszkowate, występują w pneumocytach typu II, magazynują dipalmitoilofosfatydylocholinę (DPPC), główny składnik surfaktantów płucnych. Ciała blaszkowate znaleziono również w komórkach nabłonka oddechowego, a także w komórkach układu pokarmowego. W stanie fizjologicznym główną rolą ciałek

blaszkowatych jest magazynowanie i dostarczanie składników lipidowych, będących komponentami zewnątrzkomórkowej bariery ochronnej. Ciała blaszkowate mają zdolności fuzyjne, biorą również udział w szlakach biosyntezy i transportu lipidów [12].

Przyjmuje się, że DIPL stanowi adaptacyjną, a nie toksyczną, reakcję na leki CAD. Komórka dostosowuje się do ekspozycji na lek poprzez jego sekwestrację w ciałkach blaszkowatych, zmniejszając w ten sposób potencjalną toksyczność leku dla struktur wewnątrzkomórkowych. Jednak w takim procesie stężenie leku w ciałkach blaszkowatych może osiągnąć nawet poziom milimolowy [13].

Ciała blaszkowate mogą pojawić się w tkankach w kilka dni lub tygodni po podaniu CAD *in vivo* i jest to proces dawko-zależny. Jeżeli lek podany jest do hodowli komórkowej, to już nawet po kilku godzinach można zaobserwować zmiany wskazujące na fosfolipidozę. W obrębie tego samego gatunku lub tej samej grupy wiekowej skutki działania CAD i nasilenie procesu fosfolipidozy może się różnić znacząco i jest trudne do przewidzenia. Działanie leków wywołujących fosfolipidozę może być odwracalne, badania na zwierzętach wykazały, że efekty działania CAD znikają całkowicie, taki proces trwa od kilku tygodni do kilku miesięcy [14].

Ciała blaszkowate powstałe na skutek fosfolipidozy wywołanej lekami zawierają kompleksy fosfolipid-lek oraz podwyższony poziom cholesterolu. Fenotypowo komórka ulegająca fosfolipidozie objawia się w postaci tzw. komórki piankowej (*ang. foam cell*), którą charakteryzuje obecność wielu ciałek blaszkowatych w cytoplazmie komórki. Ciała blaszkowate często podlegają egzocytozie [15].

Mechanizmy molekularne fosfolipidozy wywołanej przez kationowe leki amfifilowe

Nagromadzenie fosfolipidów w komórce w procesie fosfolipidozy zachodzi głównie w lizosomach pod wpływem nagromadzenia się leków CAD [8, 14], które mogą przenikać na drodze dyfuzji lub aktywnego wiązania się z glikoreceptorami obecnymi w błonie. Wywołuje to zahamowanie aktywności hydrolaz lizosomalnych. Enzymy, których zahamowanie aktywności po podaniu leków amfifilowych potwierdzono, to między innymi fosfolipaza A2, fosfolipaza A1, fosfolipaza C, a także fosfodiesteraza sfingomieliny [15], co prowadzi do kumulacji jednego lub – częściej – kilku różnych fosfolipidów w organelli. Istnieje kilka teorii tłumaczących to zjawisko.

Pierwsza z hipotez dotyczy tworzenia kompleksów pomiędzy fosfolipidami a lekami CAD, które nie mogą zostać rozłożone przez fosfolipazy liposomalne [8]. Istnieją niepodważalne dowody na wiązanie się leków CAD z fosfolipidami (PL) [9, 16] wewnątrz lizosomów, co schematycznie prezentuje **rycina 1**.

W tworzeniu kompleksów biorą udział zarówno przyciągające oddziaływania hydrofobowe, jak i oddziaływania elektrostatyczne między przeciwnie naładowanymi ugrupowaniami polarnymi. W wyniku tych oddziaływań tworzy się wewnętrznie zubożony, nierozpuszczalny kompleks, który nie może zostać zdegradowany enzymatycznie, gdyż działanie fosfolipaz ogranicza się do wolnych fosfolipidów z ujemnym ładunkiem na grupie fosforanowej [17]. Leki CAD mogą oddziaływać z różnymi fosfolipidami, a więc akumulacja lipidów dla każdego z nich może być specyficzna. Różnice w kompozycji akumulowanych fosfolipidów pojawiają się również między różnymi tkankami i organizmami.

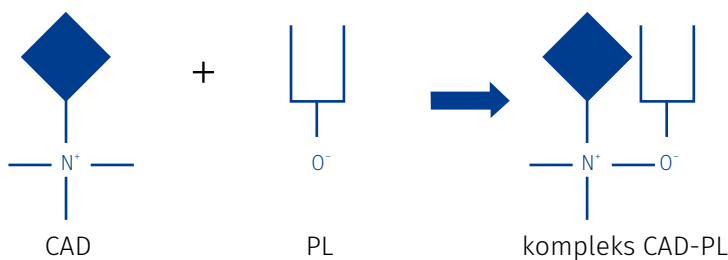
Druga hipoteza sugeruje kompetycyjną inhibicję lizosomalnych fosfolipaz przez leki CAD poprzez tworzenie kompleksów leku z częścią białkową enzymu [18]. W tym procesie lek konkuruje z fosfolipidami o miejsca wiązania enzymu, w wyniku czego znacząco maleje aktywność enzymatyczna, i fosfolipidy czy sfingolipidy nie są skutecznie degradowane, ulegając akumulacji [19].

Trzecim możliwym mechanizmem jest zwiększona biosynteza fosfolipidów i cholesterolu. Badania ekspresji genów przeprowadzone po 24 godzinach od inkubacji komórek linii hepatoma z CAD wykazały zahamowanie ekspresji genów związanych z aktywacją lizosomalnej fosfolipazy oraz transportem enzymów lizosomalnych. Stwierdzono natomiast zwiększenie ekspresji genów odpowiadających za indukcję biosyntezy cholesterolu i fosfolipidów, co powoduje zwiększoną aktywność enzymów regulujących poziom cholesterolu: syntazy lanosterolu oraz reduktazy

HMG-CoA (reduktaza 3-hydroksy-3-metyloglutarylokoenzymu A). Reduktaza HMG-CoA jest obecna w cytoplazmie **hepatocytów**, kontrolując poziom cholesterolu we krwi. Wykazano, że niektóre antybiotyki, jak na przykład amoksylicyna i pefloksacyna, powodują zwiększenie stężenia cholesterolu we krwi badanych zwierząt oraz fosfolipidozę [20].

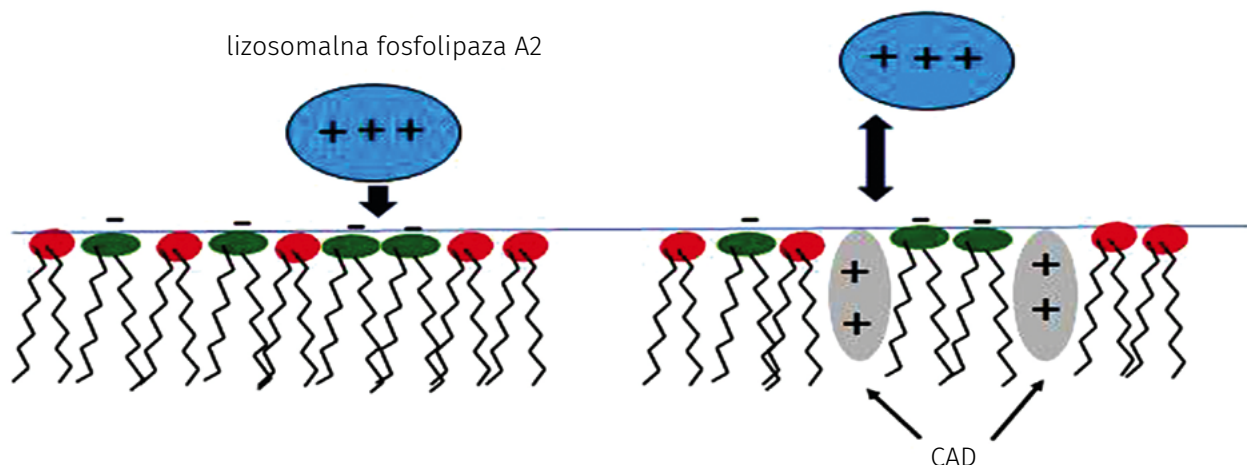
Omawiając mechanizmy prowadzące do fosfolipidozy nie można pominąć roli, jaką może odgrywać anionowy glicerofosfolipid: bis(monoacyloglicero)fosforan (*ang. bis(monoacylglycerol)phosphate*, BMP). Jest to fosfolipid występujący wyłącznie w błonie lizosomów (90%) i późnych endosomów (10%) i dlatego jest uważany za główny anionowy fosfolipid, który wiąże hydrolazy lizosomalne [21]. BMP jest izomerem strukturalnym fosfatydyloglicerolu, który wykazuje nietypową stereokonfigurację sn1:sn1', opartą na pozycji ugrupowania fosforanowego na jego dwóch jednostkach acyloglicerolowych. Ta struktura powoduje, że BMP jest oporny na działanie fosfolipaz. Stężenie BMP normalnie jest niewielkie, ale pod wpływem leków CAD lub w niektórych chorobach spichrzeniowych (np. Niemann-Picka) następuje indukcja akumulacji BMP w błonach, który może osiągnąć poziom nawet do 30% wszystkich fosfolipidów, co zostało oszacowane w komórkach wątroby. W lizosomach aktywność enzymów rozkładających tłuszcze (w tym fosfolipaz) jest niska przy braku anionowych fosfolipidów (takich jak BMP czy też np. fosfatydyloinozytolu - PI), natomiast wzmacnia się w ich obecności. Przyczyną tego faktu należy upatrywać w przyciągających oddziaływaniach elektrostatycznych pomiędzy enzymami (ładunek dodatni) a ujemnie naładowanymi anionowymi fosfolipidami w błonie, co skutkuje adsorpcją enzymu na powierzchni błony lizosomu, co zwiększa ich aktywność [21]. Gdy kationowe leki wiążące fosfolipidy są obecne w lizosomach w wysokich stężeniach, neutralizują anionowe fosfolipidy, powodując zmianę ładunku błony. W konsekwencji aktywacja lipaz lizosomalnych zostaje utracona, co prowadzi do zmniejszonej degradacji fosfolipidów i ich akumulacji w komórkach (**rycina 2**).

Niektóre substancje mogą przeciwdziałać fosfolipidozie; na przykład potwierdzono, że DIPL wywołaną CAD można zahamować poprzez działanie witaminy E (α -tokoferol). Tokoferol zapobiegał akumulacji dezipraminy w komórkach fibroblastów *in vitro*. Przeciwdziałanie fosfolipidozie wywołanej CAD przez witaminę E jest dawko-zależne. Mechanizm takiego działania opiera się najprawdopodobniej na przywróceniu płynności błon komórkowych zaburzonych przez



Rycina 1. Schemat tworzenia kompleksu leku CAD z PL (na podstawie [8]).

Figure 1. Model of the cationic amphiphilic drug-phospholipid complex formation (based on [8]).



Rycina 2. Schemat przedstawiający oddziaływania elektrostatyczne enzymu lizosomalnego fosfolipazy A2 (ładunek dodatni) z błoną lizosomu oraz blokowanie tego oddziaływania poprzez wbudowanie leku CAD. Ujemnie naładowane anionowe fosfolipidy oznaczono kolorem zielonym, amfoteryczne – czerwonym.

Figure 2. Model of the electrostatic interaction of lysosomal cationic phospholipase A2 with lysosomal membrane of untreated and CAD-treated cells. Negatively charged anionic phospholipids are marked in green, amphoteric – in red.

CAD oraz zapobieganiu akumulacji kompleksów PL-CAD [22].

Apoptoza, autofagia – a fosfolipidoza

Lizosomy komórkowe pełnią istotną rolę w procesach apoptozy i autofagii. Autofagia to proces prowadzący do degradacji i recyklingu materiału wewnątrzkomórkowego. Podczas autofagii usuwane są białka cytoplazmy, a także uszkodzone organelle komórkowe, czy pozostałości błon lipidowych. W strukturach tych jest charakterystyczne kwaśne środowisko (pH 4,5–5,0) oraz obecność ok. 60 hydrolitycznych enzymów lizosomalnych, wśród których znajdują się lipazy, fosfolipazy, sulfatazy, proteazy czy nukleazy. Lizosomy zawierają również około 50 różnych białek transmembranowych, które biorą udział w rozpoznaniu i degradacji uszkodzonych fragmentów komórek [23].

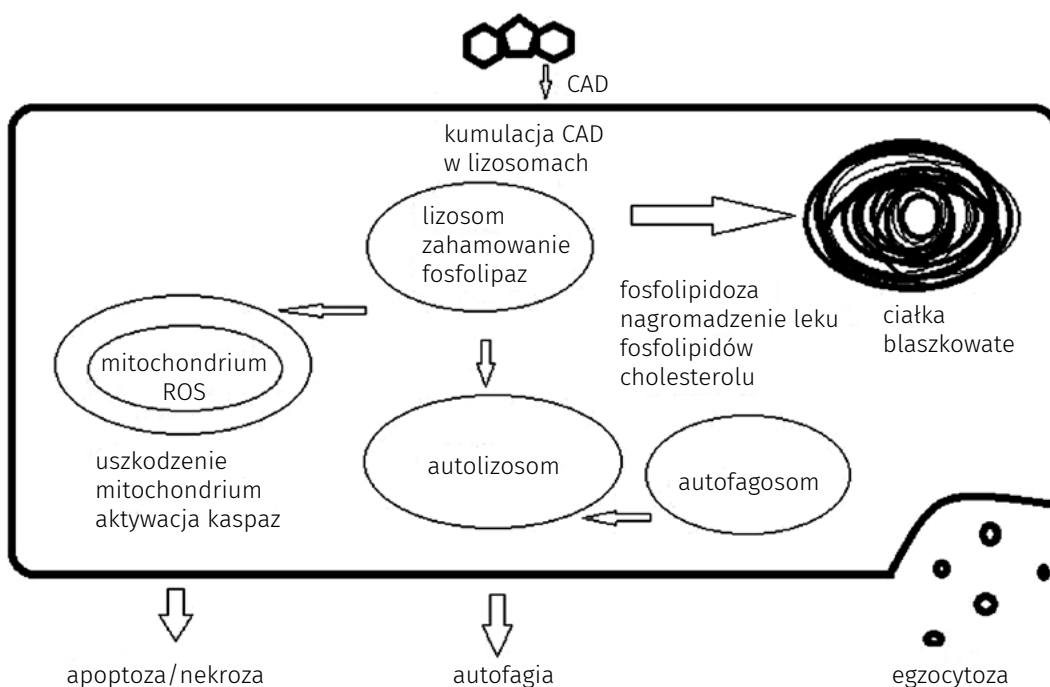
Proces autofagii i wydzielania pęcherzyków ułatwia przebudowę błon komórkowych i jej naprawę. Także podczas procesu fosfolipidozy dochodzi do egzocytozy ciałek blaszkowatych zawierających lek, co może ułatwiać przetrwanie komórki poprzez uwolnienie CAD. Jedna z hipotez zakłada, że fosfolipidoza może być mechanizmem obronnym; dopóki leki nie mogą wydostać się z lizosomów, nie mają toksycznego wpływu na komórki. Następnie przez proces egzocytozy mogą być eliminowane z komórki i usuwane z organizmu przez makrofagi. Proces autofagii i fosfolipidozy zachodzi głównie w lizosomach i może mieć wiele wspólnych powiązań szlaków przekazywania sygnałów wewnątrzko-

mórkowych, także tych dotyczących apoptozy (rycina 3) [24].

Jeśli stężenie CAD lub toksycznej substancji skumulowanej w lizosomach przekroczy wartość krytyczną, może dojść do uwolnienia enzymów proteolitycznych do cytoplazmy i aktywacji kaspaz. Kaspazy są proteazami cysteinowymi, aktywowanymi podczas procesu apoptozy; doprowadzają do fragmentacji jądra komórkowego i powstania ciałek apoptotycznych w procesie programowanej śmierci komórki. W przypadku niektórych leków z grupy CAD stwierdzono działanie cytotoksyczne na komórki hodowlane *in vitro*, co może tłumaczyć niewydolność niektórych narządów, obserwowaną podczas stosowania leków wywołujących fosfolipidozę.

Nie tylko CAD

Indukowanie fosfolipidozy jest uwarunkowane szeregiem parametrów fizykochemicznym, które mogą pomóc przewidzieć możliwe ryzyko wystąpienia tego skutku ubocznego. Podstawowym czynnikiem jest zdolność leku do wbudowania się w strukturę błon komórkowych, warunkującą wystąpienie oddziaływań leku ze składnikami błony. Jak wykazano w pracy [25], badanie penetracji leku do sztucznych błon komórkowych, za pomocą techniki monowarstw Langmuira, pozwala na modelowanie określonego składu błony i wyznaczenie mocy oddziaływań lek-błona, co pozwala przewidzieć wystąpienie i natężenie zjawiska fosfolipidozy. Dzięki tym badaniom potwierdzono efekt fosfolipidozy nie tylko dla CAD, ale także dla tobramycyny i azytromycyny,



Rycina 3. Schemat możliwych procesów wewnątrzkomórkowych zachodzących pod wpływem działania CAD.

Figure 3. Schematic pathway of intercellular processes caused by CAD accumulation.

wskazując na istotną rolę procesu wiązania leku z błoną w procesie fosfolipidozy. Inne parametry, takie jak typowa dla CAD amfifilowa struktura, zasadowy charakter (wysoka wartość pK_a) i wartość współczynnika podziału P między oktanol i wodę powyżej 1, mogą z dużym prawdopodobieństwem sugerować wystąpienie fosfolipidozy, choć zaobserwowano ją również dla farmaceutyków o innej strukturze, a także nanocząstek. Ich wspólną cechą jest: zdolność wniknięcia do komórek, akumulacja w lizosomach i hamowanie aktywności fosfolipazy lizosomalnej A i/lub C. Na przykład potwierdzono, że lek antybakteryjny, gentamycyna, która jest związkiem polarnym, bardzo dobrze rozpuszczalnym w wodzie, o wartości $\log P < 1$, również wywołuje fosfolipidozę. Choć większość leków indukujących fosfolipidozę posiada wartość $\log P > 1$, to jednak badania wykazały [26], że leki o niskich wartościach $\log P$ również mogą wywoływać fosfolipidozę, ale tylko w pojedynczej tkance. Wraz ze wzrostem wartości $\log P$, odsetek leków, które powodują fosfolipidozę w wielu różnych tkankach, zwiększa się. Dobrą metodyką badawczą, która może być stosowana, aby przewidzieć występowanie fosfolipidozy są symulacje komputerowe [27], które mogą mieć szczególne zastosowanie w badaniach przedklinicznych.

Leki przeciwpsychotyczne, które nie są klasyfikowane jako CAD, takie jak: perfenazyna, flufenazyne, flupentylksol, czy też lek przeciwmalaryczny

– amodiachina, również wykazują skutki uboczne, których następstwem może być fosfolipidoza komórek. Mechanizm działania tych leków może być podobny do działania CAD – poprzez blokadę enzymów lizosomalnych zwiększają stężenie fosfolipidów, co skutkuje nagromadzeniem ciałek blaszkowatych [28]. Zjawisku fosfolipidozy wywołanej przez te leki może towarzyszyć hamowanie kwaśnej sfgomielinazy oraz dobra przenikalność przez barierę krew-mózg.

Innym rodzajem czynników wywołujących fosfolipidozę są niektóre typy nanocząstek. Pod wpływem tych struktur obserwowano wzrost syntezy fosfatydylocholino, powstanie ciałek blaszkowatych, zmiany w ekspresji genów oraz zwiększenie produkcji surfaktantu przez komórki nowotworowe płuc [29].

Interesującym przykładem związków powodujących fosfolipidozę są oksysterole – utlenione formy cholesterolu. Ponieważ oksysterole, tak samo jak CAD, są związkami amfifilowymi, uważa się, że mechanizmy indukowania fosfolipidozy są podobne. Oksysterole są produkowane w organizmie na dwa sposoby. Pierwszy z nich dotyczy utleniania z udziałem enzymów takich jak: oksydoreduktazy, hydrolazy czy transferazy. Prowadzą one do powstania pochodnych z dodatkową grupą polarną w łańcuchu bocznym m.in. 24-hydroksycholesterolu lub 27-hydroksycholesterolu. Oksysterole mogą również powstać na drodze nieenzymatycznej, indukowanej przez reaktywne

formy tlenu (ROS), np. rodnik hydroksylowy (OH·), gdzie dochodzi do utlenienia w układzie pierścieniowym. W taki sposób powstają m.in. 7β-hydroksycholesterol, a także 7-ketocholesterol (**rycina 4**). W warunkach fizjologicznych stężenie utlenionych form cholesterolu jest zwykle trzykrotnie mniejsze niż stężenie samego cholesterolu. Oksysterole w porównaniu z cząsteczką cholesterolu mają większą aktywność biologiczną, a kierunek ich działania zależy od struktury i stężenia oraz od rodzaju tkanki czy komórki [30]. Oksysterole mogą często wywoływać procesy toksyczne dla komórek, w tym także proces fosfolipidozy. Najlepiej zbadanym oksysterolem, który indukuje powstanie ciałek blaszkowatych jest 7-ketocholesterol. Pod wpływem 7-ketocholesterolu obserwuje się gromadzenie fosfolipidów i cholesterolu oraz powstawanie ciałek blaszkowatych w komórkach hodowlanych *in vitro*. Stwierdzono także kumulację oksysteroli w lizosomach komórkowych [8]. Działanie oksysteroli wiąże się z zaburzeniami gospodarki lipidowej i pojawieniem się fosfolipidozy w komórkach, która ostatecznie może spowodować śmierć komórki na drodze tzw. oksyapoptozacji [31]. Szczególnie aktywne, wywołujące fosfolipidozę cytotoksyczne oksysterole, to oprócz wyżej wspomnianego 7-ketocholesterolu, 7β-hydroksycholesterol. Ponadto, podobnie jak cholesterol, oksysterole znajdujące się w błonie lipidowej wpływają na jej elastyczność i płynność. Zmiana płynności błon komórkowych może z kolei spowodować zmianę konformacji receptorów błonowych i szlaków wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnałów [32]. Badania pokazały, że 7-ketocholesterol powoduje fosfolipidozę komórek linii glioblastoma U-251. Inkubacja komórek z tym oksysterolem wywołuje zmiany w właściwościach nanomechanicznych błon komórkowych, zaobserwowanych pod mikroskopem AFM (*Atomic Force Microscope*), a także spadek żywotności komórek wywołany apoptozą lub nekrozą [33].

Podobnie jak w przypadku działania CAD, tokoferol przeciwdziała fosfolipidozie i apoptozie komórek wywołanej przez 7-ketocholesterol poprzez wpływ na wewnątrzkomórkowe szlaki przekazywania sygnałów i hamowanie aktywacji enzymów proapoptotycznych [32].

Fosfolipidoza w chorobach

Fosfolipidoza jest często objawem lizosomalnych chorób spichrzeniowych, których główną przyczyną jest uszkodzenie genów kodujących enzymy lizosomalne. Choroby spichrzeniowe są związane z akumulacją różnych lipidów, głównie sfingolipidów i cholesterolu w lizosomach.

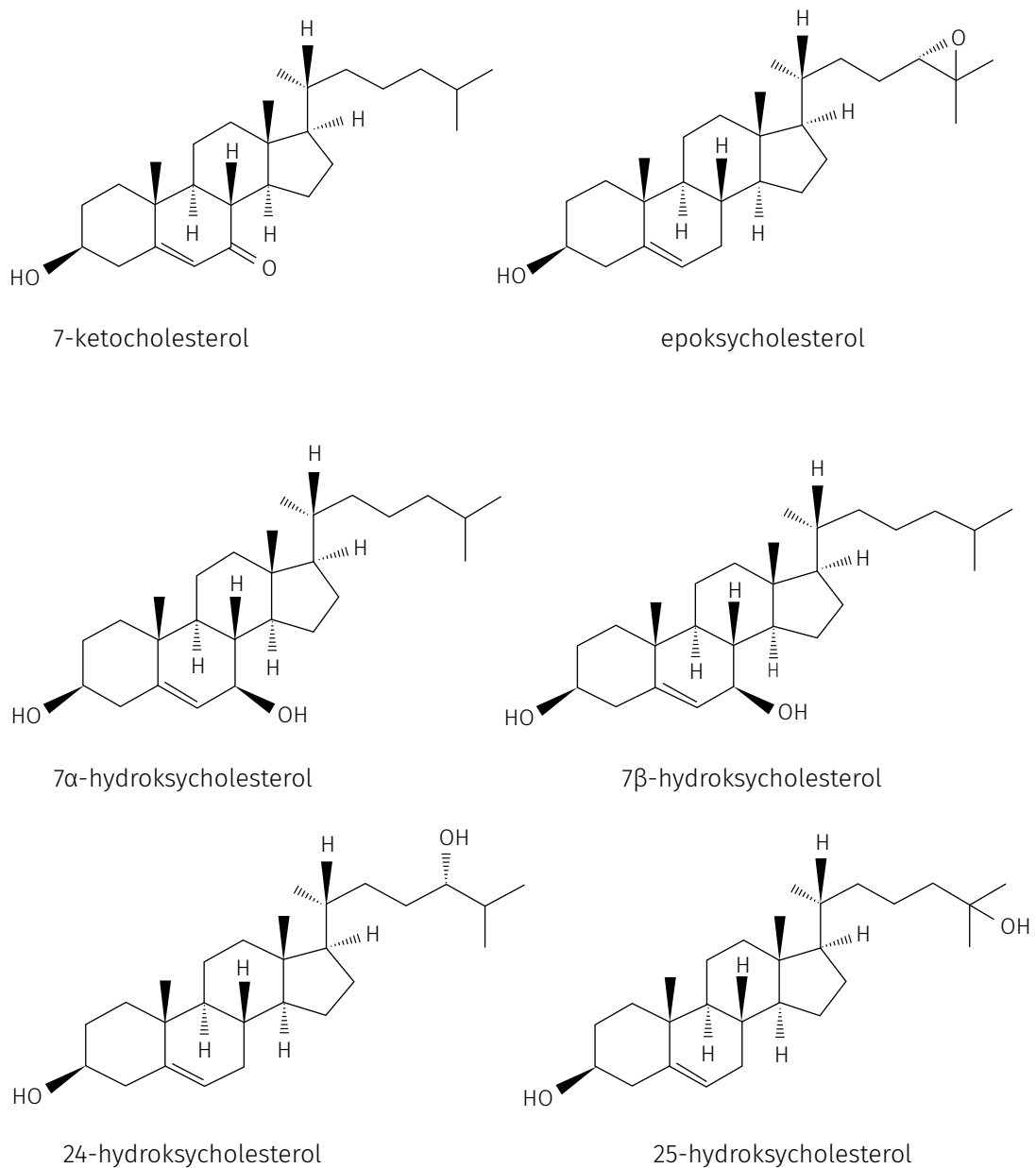
Przykładem takiego schorzenia są choroby: Tay-Sachsa, choroba Pompego czy choroba Danona. Objawem choroby Niemann-Picka, związanej z deficytem sfingomielinazy i odkładaniem sfingomieliny jest pojawienie się komórek piankowatych w tkankach i narządach, czego następstwem jest przewlekły stan zapalny i dysfunkcja wielu narządów. Obraz mikroskopowy z wycinków z narządów pacjentów chorych na te schorzenia jest bardzo podobny do obrazów fosfolipidozy z widocznymi ciałkami blaszkowatymi [34].

Czy fosfolipidoza może być korzystna?

Niektóre kationowe leki amfifilowe indukujące fosfolipidozę wykazują również działanie antywirusowe i antynowotworowe. Potwierdzono, że amiodaron czy chlorochina są potencjalnymi lekami o działaniu anty-SARS-CoV-2 namnażanego w warunkach hodowli *in vitro*. Efektu tego nie udało się jednak potwierdzić *in vivo* [35]. Innym, korzystnym efektem CAD jest indukcja apoptozy komórki – procesu pożądanego w chemioterapii nowotworów. Co bardzo interesujące, proces fosfolipidozy może potęgować efekt cytotoksyczny w komórkach nowotworowych. W badaniach *in vitro* stwierdzono taki efekt w przypadku działania niektórych CAD i oksysteroli [11]. Komórki nowotworowe zawierają bowiem większą ilość lizosomów i o większych rozmiarach oraz mają zwiększoną aktywność katepsyny w porównaniu z komórką prawidłową. Leczenie CAD prowadzi do zmniejszonej aktywności kwaśnej sfingomielinazy, co powoduje śmierć komórek nowotworowych. Przyczyną jest wypieranie przez CAD kwaśnej sfingomielinazy z błon i jej degradację proteolityczną, co prowadzi do zwiększonego poziomu sfingomieliny w błonach lizosomalnych. Indukuje to wzrost przepuszczalności błon i uwolnienie z błony lizosomalnej katepsyn do cytozolu, powodując śmierć komórek [36].

Identyfikacja fosfolipidozy

Podstawową metodą wykrywania fosfolipidozy są badania w mikroskopii elektronowej TEM (*Transmission Electron Microscopy*) stwierdzające obecność ciałek blaszkowatych w komórkach lub tkankach pochodzących z biopsji. Inną metodą jest badanie nagromadzenia w komórkach hodowlanych *in vitro* fosfolipidów, poprzez ich znakowanie fluorescencyjne. Problemem w tej metodzie są nagromadzone leki CAD, które w większości zawierają ugrupowania aromatyczne, a także podstawniki halogenowe, które skutecznie wygaszają fluorescencję, co może prowadzić do zaniżonych wyników badań. Zahamowanie aktywności



Rycina 4. Przykłady oksysteroli.

Figure 4. Chemical structures of oxysterols.

lizosomalnych fosfolipaz jest również jednym z objawów fosfolipidozy, które może zostać zmierzona i przeanalizowane podczas badań *in vitro* [37].

W celu wykrycia fosfolipidozy w komórkach czy tkankach można badać ekspresję genów skorelowanych z tym procesem. Wytypowano już przeszło 17 różnych genów ulegających aktywacji podczas fosfolipidozy, które można badać za pomocą techniki real-time PCR [38].

Potencjalnym biomarkerem związanym z fosfolipidozą i chorobami spichrzeniowymi jest, wspomniany już wcześniej, BMP. Stężenie tego

anionowego lipidu wzrasta we krwi i moczu pacjentów w przebiegu chorób spichrzeniowych lub fosfolipidozy wywołanej przez CAD. Obok BMP badane są także inne fosfolipidy lizosomalne, takie jak: fosfatydylocholina, fosfatydyloinozytol, jako potencjalne markery fosfolipidozy.

Lista leków i produktów leczniczych wywołujących fosfolipidozę może wzrastać, dlatego ważne jest poszukiwanie nowych markerów fosfolipidozy wywołanej lekami, a także substancji, które mogłyby przeciwdziałać fosfolipidozie i łagodzić skutki zażywania CAD. Choć leki, które indukują fosfolipidozę są często toksyczne, znane

są także leki nietoksyczne wywołujące ten proces [39]. Ostatnie prace sugerują, że sama fosfolipidoza wywołana lekami prawdopodobnie nie ma żadnych poważnych konsekwencji patologicznych. Niemniej jednak istnieje korelacja pomiędzy hepatotoksycznością i nefrotoksycznością a fosfolipidozą i dlatego w 2004 r. agencja FDA (*Food and Drug Administration*) zwróciła uwagę na ten problem i powołała specjalną grupę badającą ten proces. Fosfolipidoza wywołana działaniem substancji leczniczej może zostać wykryta na etapie badań przedklinicznych [40]. Jednak akumulacja fosfolipidów i powstanie ciałek blaszkowatych stwierdzone w badaniach *in vitro* czy w badaniach na zwierzętach, nie musi oznaczać uszkodzenia narządów w organizmie człowieka. Fosfolipidoza powinna być potwierdzona w badaniach klinicznych na grupach pacjentów; w zależności od dawki, stopnia odwracalności procesu i z rozważeniem bilansu zysków i strat działania leku.

Podsumowanie

Znaczenie fosfolipidozy jest nadal niejasne. Obecnie nie ma przekonujących dowodów na to, że fosfolipidoza *per se* jest w jakikolwiek sposób szkodliwa, ani też, że nie jest całkowicie nieszkodliwa. W literaturze można znaleźć wiele prac dotyczących działania leków CAD *in vitro* na komórki czy zwierzęta laboratoryjne. Zdecydowanie mniej artykułów dotyczy objawów fosfolipidozy u pacjentów zażywających lek, jej wpływu na metabolizm człowieka i ewentualnych długotrwałych skutków. Również jedynie nieliczne publikacje dotyczą wywoływania fosfolipidozy przez nowe leki nieklasyfikowane jako CAD czy też nanocząstki. Chociaż zjawisko fosfolipidozy jest znane od połowy ubiegłego wieku, dokładne zrozumienie mechanizmu tego procesu, jak i jego skutków na poziomie molekularnym i całego organizmu, wymaga dalszych kompleksowych badań.

Piśmiennictwo

- Halliwell WH. Cationic amphiphilic drug-induced phospholipidosis. *Toxicol Pathol.* 1997; 25: 53–60. doi: 10.1177/019262339702500111.
- Nelson AA, Fitzhugh OG. Chloroquine: pathological changes observed in rats which for two years had been fed various proportions. *Arch Pathol.* 1948; 4S: 454–462.
- Reasor MJ. Drug-induced lipidosis and the alveolar macrophage. *Toxicology.* 1981; 20: 1–33. doi: 10.1016/0300-483x(81)90102-5.
- Franken G, Luallmann H, Siegfriedt A. The occurrence of huge cells in pulmonary alveoli of rats treated by an anorexic drug. *Arzneimittelforschung.* 1970; 20: 417.
- Przybylak KR, Cronin MTD. In silico studies of the relationship between chemical structure and drug induced phospholipidosis. *Mol Inform.* 2011; 30: 415–429. doi:10.1002/minf.201000164.
- Seo I, Jha BK, Lim JG, et al. Identification of lysosomotropic compounds based on the distribution and size of lysosomes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 450: 189–194. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.091.
- De Duve C, De Barsy T, Poole B, et al. Commentary. Lysosomotropic agents. *Biochem Pharmacol.* 1974; 23: 2495. doi:10.1016/0006-2952(74)90174-9.
- Lullmann H, Lullmann-Rauch R, Wassermann O. Lipidosis induced by amphiphilic cationic drugs. *Biochem Pharmacol.* 1978; 27: 1103–1108. doi: 10.1016/0006-2952(78)90435-5.
- Kodavanti UP, Mehendale HM. Cationic amphiphilic drugs and phospholipid storage disorder. *Pharmacol Re.* 1990; 42: 327–354.
- Reasor MJ. Cationic amphiphilic drugs. *Toxicol Respir System.* 1997; 555–566.
- Breiden B, Sandhoff K. Emerging mechanisms of drug-induced phospholipidosis. *Biol Chem.* 2020; 401(1): 31–46. doi: 10.1515/hsz-2019-0270.
- Schmitz G, Muller G. Structure and function of lamellar bodies, lipid-protein complexes involved in storage and secretion of cellular lipids. *J Lipid Res.* 1991; 32: 1539–1570.
- Hostetler KY. Molecular studies of the induction of cellular phospholipidosis by cationic amphiphilic drugs. *Fed Proc.* 1984; 43: 2582–2585.
- Kacew S, Reasor MJ. Drug-induced phospholipidosis: are there functional consequences? *Exp Biol Med.* 2001; 226(9): 825–830. doi: 10.1177/153537020122600903.
- Reasor MJ, Hastings KL, Ulrich RG. Drug-induced phospholipidosis: issues and future directions. *Expert Opin Drug Saf.* 2006; 5(4): 567–583. doi:10.1517/14740338.5.4.567.
- Ma JYC, Ma JKH, Weber KC. Fluorescence studies of the binding of amphiphilic amines with phospholipids. *J Lipid Res.* 1985; 26: 735–744. doi: 10.1016/S0022-2275(20)34331-5.
- Dawson RMC, Bangham AD. Form and function of phospholipids. *Biochem J.* 1959; 72: 493.
- Kubo M, Hostetler, KY. Mechanism of cationic amphiphilic drug inhibition of purified lysosomal phospholipase A1. *Biochemistry.* 1985; 24: 6515–6520. doi:10.1021/bi00344a031.
- Kacew S. Role of age in amphiphilic drug-induced pulmonary morphological and metabolic responses. *Fed Proc.* 1984; 43: 2592–2596.
- Rotimi SO, Ojo DA, Talabi OA, et al. Amoxicillin- and pefloxacin-induced cholesterologenesis and phospholipidosis in rat tissues. *Lipids Health Dis.* 2015; 21. doi: 10.1186/s12944-015-0011-8.
- Shayman JA, Abe A. Drug-induced phospholipidosis. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1831: 602–611. doi:10.1016/j.bbali.2012.08.013.
- Marenchino M, Alpstag-Wohrle AL, Christen B, et al. Alpha-tocopherol influences the lipid membrane affinity of desipramine in a pH-dependent manner. *Eur J Pharm Sci.* 2004; 21: 313–321. doi: 10.1016/j.ejps.2003.10.022.
- Anderson N, Borlak J. Minireview Drug-induced phospholipidosis. *FEBS Letters.* 2006; 580: 5533–5540. doi: 10.1016/j.febslet.2006.08.061.
- Nonoyama T, Fukuda R. Drug-induced Phospholipidosis – pathological aspect and its prediction. *J Toxicol Pathol.* 2008; 21: 9–24. doi: 10.1293/tox.21.9.
- Ceccarelli M, Germani R, Massari S, et al. Phospholipidosis effect of drugs by adsorption into lipid monolayers. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2015; 136: 175–184. doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.09.003.
- Greene J, Gehlhaar D, Tilloy-Ellul A, et al. Evaluation of a published in silico model and construction of a novel Bayesian model for predicting phospholipidosis inducing potential. *Chem Inf Model.* 2007; 47: 1196–1205. doi: 10.1021/ci6004542.
- Lepri S. Synthesis and phospholipidosis effect of a series of cationic amphiphilic compounds: a case study to evaluate in silico and in vitro assays. *Med Chem Res.* 2018; 27: 679–692. doi: 10.1007/s00044-017-2093-5.
- Muehlbacher M, Tripal P, Roas F, et al. Identification of drugs inducing phospholipidosis by novel in vitro data. *Chem Med Chem.* 2012; 7: 1925–1934. doi: 10.1002/cm.201200306.
- Kononenko V. Harmful at non-cytotoxic concentrations: SiO₂-SPIONs affect surfactant metabolism and lamellar body biogenesis in A549 human alveolar epithelial cells. *Nanotoxicology.* 2017; 1743–5390. doi:10.1080/17435390.2017.1309704.
- Kulig W, Cwiklik L, Jurkiewicz P, et al. Cholesterol oxidation products and their biological importance. *Chem Phys Lipids.* 2016; 199: 144–160. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2016.03.001.