

Prehľad zn. Nanogen pre odbornú verejnosť
vypracoval Toby Cobbledick

Abstrakt

Vychádzajúce výskumy v proteomike a prístup systémovej biológie k molekulárnej biológii výrazne zvýšili naše chápanie bunkového vývoja ako aj procesov zahrnutých v riadení bunkového cyklu. Uvedené výskumy potvrdili dôležitosť a význam cytokínov. Konkrétne VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) hrá významnú rolu v celom vývoji a „živote“ vlasových folikulov. Nielen v spustení rastu, ale i v stanovení diferenciácie, štruktúry a trvania rastu. Vhodné využitie VEGF v oblasti liečby vypadávania vlasov je tiež považované za spôsob ako prekonať obavy z bezpečnosti a realizovateľnosti cytokínovej terapie.

Úvod

V priebehu dejín medicíny sme sa sústredili na objavovanie vonkajších chemických molekúl alebo prvkov a ich aplikovanie do organizmu s cieľom vyvolať určité fyziologické zmeny.

Je to len nedávno, čo pokroky v molekulárnej biológii a čiastočne i proteomike komplexne popísali využitie medzibunkových signálov. Teraz vieme, že bunkové funkcie od mitózy a diferenciácie až po apoptózu sú značne riadené skupinou signalizačných molekúl – cytokínov.

Čo je prekvapujúce ohľadom cytokínov nie je ich existencia, pre medicínu známa už veľmi dlhý čas, ale intenzita a rozsah ich režimu pôsobenia. Účinok cytokínov alebo „rastových faktorov“ ako sú bežne známe je tak výrazný a dôležitý, že by mali obrovské využitie ak by boli izolované a aplikované správne ako terapeutický prvok.

Liečba cytokínmi je špecifická tiež z pohľadu alergických reakcií a nepredvídateľných vedľajších účinkov, ktoré sú v tomto prípade absolútne nepravdepodobné. Každý neurčitý účinok môže byť jasne popísaný signálnou akciou a môžeme ho predpokladať. Keďže cytokíny sú rozsiahlo pôsobiace molekuly, môžu sa veľmi efektívne zamerať i na malé oblasti.

VEGF a Vlasový Cyklus

Za účelom tvorby vlasového orgánu z buniek latentnej kožnej papily musí dôjsť k trom kľúčovým procesom.

Bunkové šírenie (proliferácia)

Bunky papily a druhotné vlasové zárodky sa musia veľmi rýchlo rozmnožovať. Najprv sa epiteliálny pruh sformuje do dermy a množenie sa následne obráti smerom von k pokožke. Akonáhle dôjde k sformovaniu, kmeňové bunky sa zo zatiaľ neurčitého zdroja šíria a diferencujú do buniek vlasového matrixu, identifikovateľných prostredníctvom vysokej úrovne LEF-1 prejavu.

Úloha VEGF v Anagéne nie je známa, pokusy ukázali, že bunky kožnej papily vykazujú vysoké hladiny VEGF mRNA v Anagéne. Toto môže spúšťať angiogénne procesy nevyhnutné pre vlas ako orgán,

ktorý neskôr udržiava daný cyklus, avšak je tiež možné, že VEGF môže mať proliferačné účinky v určitých bunkách, avšak iných ako endoteliálnych bunkách.

Ďalším hľadiskom je kontrola LEF-1 prejavu, keďže proliferácia je riadená cez množstvo rôznych cestičiek vrátane MAPKinázy. Cesta MAPKinázy je stimulovaná cez podnet závislý od vápnika prostredníctvom VEGF. Je tiež možné, že VEGF nepriamo pôsobí ako kontrolór neriadenej proliferácie.

Presun buniek (bunková migrácia)

Proliferácia buniek bez organizácie a presunu nebude schopná vytvoriť vlas či akýkoľvek iný orgán. Tvorba vlasu je zložitá konštrukcia, ide o presun keratínocytov zameraný na rozlíšenie rozmnožených vrstvených línií vlasovej osi ako aj vlasovej cibulky a vlasového matrixu.

Druhá cesta pre pôsobenie VEGF je všeobecne známa a usmerňuje Akt/PKB gény s cieľom zabrániť apoptóze. Avšak, ďalšia funkcia reguluje eNOS produkujúci oxid dusnatý. Tento podnet spôsobuje vazodilatáciu a priepustnosť membrán a existuje názor, že umožňuje bunkovú migráciu a medzibunkovú komunikáciu cez ostatné cytokíny.

V množstve a rozmanitosti buniek VEGF tiež ovplyvňuje bunkový presun prostredníctvom stimulácie preskupenia aktínu a obratu fokálnej teda ústrednej adhézie. Táto reorganizácia cytoskeletu je nevyhnutná pre presun každej bunky. Podobná cesta je stimulovaná Wnt11 v ostatných bunkách a taktiež využíva MAPKinázu regulovanú VEGF pre zvýšenie génovej transkripcie nevyhnutnej pre migráciu.

Angiogenéza

Kľúčom k podpore a zachovaniu rastu vlasov je nepochybne dostatočný prísun kyslíka a esenciálnych aminokyselín. Toto si vyžaduje krv. Ako už bolo preukázané opakovanými pokusmi, zvyšujúci sa prietok krvi a tvorba ciev vo vlasových folikuloch zlepšuje a podporuje rast vlasov, bez toho sa rast vlasov jednoducho zastaví.

VEGF je cytokín výhradne zodpovedný za tvorbu krvných ciev. Cez VEGFR2 receptor VEGF stimuluje cievne bunky k proliferácii s cieľom

rozšíriť cievy, presunúť sa resp. migrovať a zorganizovať tvorbu orgánu. Toto rýchlo rozširuje nové cievy do oblastí, ktoré vyžadujú prísun krvi. VEGF tiež stimuluje eNOS k tvorbe oxidu dusnatého, stimuláciou krvných ciev a priepustnosti bunkovej membrány pre následný efektívny prenos živín. VEGF je užitočný a prospešný predovšetkým z toho dôvodu, že regulácia VEGF a mnohých súvisiacich ciest je stimulovaná hypoxiou čiže pôsobí tam, kde je to potrebné.

Apoptóza

Dihydrotestosterón bol dlho skúmaný ako hlavná príčina vypadávania vlasov. Je to hormonálny podnet, ktorý preniká do folikulu a spôsobuje reguláciu Bcl-2 vedúcu k apoptóze. Bcl-2 pôsobí vzájomne s Bax a Bad génmi s cieľom zabrániť apoptóze a tak zníženie koncentrácie Bcl-2 umožňuje Bax a Bad podporovať apoptózu rovnakou cestou.

VEGF blokuje konverziu Bad génu udržiavajúc pre-apoptotický stav. To znamená, že Bcl2 má gén Bax len na interakciu a tým predchádza apoptóze v nižších koncentráciách. VEGF tiež vedie k regulovaniu kaspázy, čím skracuje rôzne apoptotické cesty. VEGF má jasnú úlohu v prevencii skorej apoptózy prostredníctvom týchto dvoch ciest resp. spôsobov a taktiež v prevencii hypoxie a oxidačného napätia. Toto vedie k udržaniu Anagénu po dlhšiu dobu.

Korelácie ošetrujúcich prípravkov

Minoxidil

Minoxidil je voľbou väčšiny lekárov v prípade liečby vypadávania vlasov. Je však prekvapujúce koľko módov aktivity roztoku bolo predmetom teórie, no žiaden z nich nebol dokázaný.

Za základnú aktivitu minoxidilu je považovaný účinok oxidu dusnatého. Táto plynná signalizačná molekula je dobre známa tým, že spôsobuje vazodilatáciu a zlepšuje krvný obeh. Podnety oxidu dusnatého sa veľmi rýchlo odbúravajú prostredníctvom voľných radikálov, preto mnohé liečby využívajú antioxidanty na predĺženie daného podnetu resp. signálu. Významným antioxidantom je superoxid dismutáza, ako enzým s vysokým tempom fluktuácie dokáže odstrániť reaktívne formy kyslíka a účinne tak redukovat' členenie oxidu dusnatého.

Výrazne spoľahlivá, novšia teória je, že účinky minoxidilu otvárajúce kanál Na⁺/K⁺ATPázy podporujú rast vlasov; toto bolo preukázané klasifikáciou dvoch kanálových podtypov vo vlasovom folikule, z ktorých jeden je otváraný práve minoxidilom. Ak bol otvorený iným špecifickým otváračom kanálu, rast vlasov sa zlepšil, pokiaľ bol použitý kanálový inhibítor, rast vlasov bol zamedzený.

Kanál Na⁺/K⁺ATPáza má ďalšiu funkciu, a to reguláciu hladín iónov Ca²⁺. Trvalé otváranie kanálov by spôsobilo ustálenie hladín iónov Ca²⁺. Keďže proliferačné a eNOS stimulačné účinky VEGF sú sprostredkované prostredníctvom Ca²⁺ existuje dôkaz, že udržanie hladín iónov Ca²⁺ je nevyhnutné preto, aby prenos podnetu VEGFR2 bol efektívny. Z toho dôvodu môže minoxidil zvyšovať efektívnosť VEGF podnetu a zvýšiť jeho medzibunkový účinok.

Zaujímavým dôsledkom možnosti pôsobenia minoxidilu spolu s alebo cez VEGF je fakt, že minoxidil upravuje prejav VEGF v bunkách kožnej

papily v Anagéne. Táto regulácia zaistí primeranú vaskularizáciu folikulu cez fázu Anagén a je pravdepodobné, že ide o časť mechanizmu pôsobenia minoxidilu.

Prostaglandíny

Prostaglandíny sú ďalšou veľmi skúmanou možnosťou liečby. Výskum naznačuje, že prostaglandíny sú aktívne vo veľmi skorých stupňoch Anagénu, možno dokonca v úplne úvodnom kroku ako je uvádzané v niekoľkých klinických štúdiách rastu očných rias. Prostaglandínový systém je zložitý, vytvorený z množstva rozličných prostaglandínov a pritom stále nie je plne preskúmaný.

Bolo preukázané, že VEGF vyvoláva produkciu prostaglandínu I(2) v epiteliálnych bunkách. Je nepravdepodobné, že prostaglandín I(2) stimuluje rast nových vlasov, avšak receptory prostaglandínu I(2) špecifickým spôsobom pôsobia vo vrstve vlasovej pokožky, pričom hrajú dôležitú úlohu pri diferenciacii vlasových buniek s cieľom tvoriť vonkajšiu pokožku. Táto vonkajšia vrstva je základom pre konečnú tvorbu vlasov.

Tento fakt môže tiež pomôcť objasniť nevyhnutnosť VEGF usmernenia v skorom štádiu anagénu, ktorý bude diskutovaný neskôr.

Diphencyprone

Výrazne odporúčaný ako najúspešnejšia liečba alopecie areata je diphencyprone ďalším liečivom bez jednoznačného či určitého mechanizmu. Keďže sa jedná o silný alergén, lokálna aplikácia diphencypronu ako imunoterapeutického prvku podnecuje reakciu a vedie k normalizácii vlasového rastu.

Nedávne práce ukazujú, že táto „reakcia“ je trojnásobná. Najprv je známy pomer buniek CD4/CD8, aby bolo možné podstatne rozlíšiť pacientov s alopeciou areata. Diphencyprone stimuluje normalizáciu tohto pomeru vzhľadom k normálnemu stavu tkaniva pokožky hlavy. Diphencyprone tiež usmerňuje pôsobenie survivínu. Toto napomáha predchádzať predčasnej apoptóze príznačnej pre pacientov trpiacich alopeciou areata. Napokon reguluje pôsobenie VEGF v keratinocytoch vlasového folikulu udržiavajúc prísun živín a kyslíka. VEGF má taktiež anti-apoptotickú úlohu, a to regulovanie génov Casp9 a Bad, ktoré sú kľúčové pre apoptózu folikulov.

Zatiaľ čo partenogenéza alopecie areata je stále neznáma, VEGF objasňuje časť účinnosti a úspechu najúspešnejšej liečby vypadávania vlasov.

Stručne povedané, je dobre známe, že ošetrovanie minoxidilom a antidihydrotestosterónom je účinné proti androgénnej alopecii a diphencyprone je vhodný na liečbu alopecie areata. Cytokíny a čiastočne VEGF predstavujú alternatívu týchto druhov liečby, prípadne sú podpornými prostriedkami všetkých týchto známych terapeutických možností.

Použitie

Možnosti VEGF sú nepochybne rozmanité, ako vo forme samostatného liečiva, tak aj ako doplnok minoxidilu pri liečbe androgénnej alopecie alebo diphencypronu pri liečbe alopecie areata. Keďže úloha v stimulácii vaskularizácie je zrejmá, je tiež pravdepodobné, že roztok s obsahom VEGF napomáha udržaniu transplantátu a hojeniu jaziev po chirurgickom zákroku.

Predpokladá sa tiež, že VEGF môže byť pridávaný samostatne prípadne s ostatnými rastovými faktormi k liečbe autológnym rastovým faktorom ako je Platelet Rich Plasma terapia.

VEGF je pomerne rozsiahla molekula a pri lokálnej aplikácii na normálnu ľudskú epidermu jeho penetrácia býva nízka. Výskum v oblasti penetrácie molekúl ukázal, že penetrácia cez vlasový kanálik je možná. Penetrácia cez tenšiu pokožku okolo pórov je dostatočná, aby umožnila fungovanie resp. pôsobenie VEGF v užitočnom množstve.

Ako už bolo patrične diskutované, spôsob ako zaistiť penetráciu akejkoľvek väčšej molekuly cez pokožku hlavy je použiť stimulačný valček s mikroihičami. Pole mikroihič vytvára rýchlo sa hojace kanáliky cez rohovú vrstvu, umožňujúc penetráciu až viac ako 5krát väčšieho množstva molekúl, vrátane proteínov ďaleko väčších ako VEGF. Tento postup dodá účinné hladiny VEGF z roztokov s obsahom 1ppm sh-VEGF.

Bezpečné, legálne vlasové rastové faktory

Existuje mnoho bezpečnostných a etických obáv v súvislosti s cytokínmi, avšak tieto môžu byť prekonané dôsledným výberom zdrojov a dôkladnými čistiacimi postupmi.

Tieto obavy boli výrazne skúmané médiami uisťujúc, že nie je to len postoj lekára, ktorý je dôležitý. Pacienti majú svoj vlastný názor na problém a posúdia svojho lekára vo svetle daných informácií a postojov. Žiaľ, je to pravda napriek tomu, že názor pacienta bol významne ovplyvnený médiami, a preto pacient nemôže komplexne porozumieť svedectvám, dôkazom a logickým dôvodom z pozície lekára. Vzhľadom na túto skutočnosť sú dôležité nasledujúce hľadiská.

Embryológia

Najzrejmejším zdrojom ľudských rastových faktorov sú ľudské bunky. Tieto úspešne rastú z ľudských embryí a kmeňové bunky môžu byť využité, prípadne vedené k diferencovaniu do primeraných bunkových línií. Nasledne sa udržiavajú v podmienkach podporujúcich produkciu rastových faktorov, ktoré sú potom extrahované a čistené.

Napriek výhodám je táto metóda nákladná. Mnoho ľudí odsudzuje využívanie embryí pre výskum a v skutočnosti medzinárodné moratórium deklaruje obmedzený výskum ľudských buniek. Okrem etických hľadísk je tiež v mnohých krajinách nezákonné používať akékoľvek ľudské tkanivo pre lekárske účely, s výnimkou transplantácie orgánov.

Ďalšou úvahou ohľadom použitia ľudských rastových faktorov je nebezpečenstvo v podobe priónových bielkovín. Ohrozenie spočíva

v tom, že spôsobuje Creutzfeldt-Jakobovu chorobu. Nebezpečná prítomnosť priónových bielkovín je možná v ktoromkoľvek tkanive, a je teda hlavným dôvodom rozšíreného zákazu využívania ľudských produktov.

Bakteriálne zdroje

Jedným z riešení tohto problému by mohlo byť použitie rekombinantnej baktérie ako *E. coli* na produkciu požadovaného rastového faktoru. Je tu však niekoľko nevýhod bakteriálnych systémov.

Rekombinantná technológia využíva ľudskú DNA a začleňuje ju cez plazmid alebo virálny vektor do bakteriovej bunky. Bakteriálna bunka obsahuje ľudskú DNA a hoci je čistená, konečný produkt môže stále obsahovať jej stopy, čím vytvára ľudský produkt s mnohými súvisiacimi ohrozeniami a prekážkami.

Baktérie sú prokaryotické a ako také nemajú dostatok bunkových komponentov eukaryotických buniek, predovšetkým tých, ktoré zodpovedajú za zloženie komplexu bielkovín. Preto i geneticky dokonalý proteín je často nesprávne zostavený, prejavujúci sa nižšou prípadne žiadnou biologickou aktivitou.

Cytotoxíny sú bežne produkované zbytkové produkty väčšiny prokaryoténov. Sú to zväčša malé, rozpustné glykoproteíny a ostatné molekuly, ktoré v malých množstvách nepoškodzujú organizmus; na druhej strane môžu mať viditeľný účinok na ľudský organizmus. Vzhľadom k ich charakteru a vlastnostiam nie sú cytotoxíny odstránené čistiacimi procesmi a preto zostávajú v konečnom produkte. Týmto môžu spôsobovať vedľajšie účinky, prípadne brániť cytokínom správne fungovať a pôsobiť *in vivo*.

Kvasinky

Huby sú ďalším známym zdrojom tvorby rekombinantných rastových faktorov. Jedná sa o eukaryotény veľmi podobné ľudským bunkám, a tak produkujú aktívne proteíny veľmi podobné ľudskej verzii.

Stále tu však zostáva problém drobných stôp ľudského materiálu, čo znamená, že mnohé kvasinkové produkty sú zákonné výlučne pre výskumné účely.

Napriek tomu, že obavy sú v tomto prípade menšie, kvasinkové bunky produkujú cytotoxíny ako bakteriálne systémy. Ako bakteriálne cytotoxíny môžu spôsobovať vedľajšie účinky a reakcie alergického typu.

Dokonca stopy hubového tkaniva v čistenom médiu rastového faktoru majú potenciál stimulovať imunitné reakcie. Je to obzvlášť dôležité, keďže ľudské epiteliálne tkanivá reagujú silno na mnoho druhov húb, čo je vyvinutá reakcia na hubové infekcie. Stimulácia prostredia imunitných reakcií môže zmeniť prípadne zrušiť resp. skrátiť účinky liečby rastovým faktorom.

sh-VEGF

Syntetický ľudský VEGF alebo sh-VEGF v skutočnosti nie je chemicky syntetizovaný, je vyrábaný pre Nanogen s využitím jedinečného rastlinného systému a metódy.

Najprv je ľudský gén imobilizovaný a usporiadaný, sekvencia je *de-novo* syntetizovaná a zopakovaná PCR. Toto vytvárajú len novo

syntetizované gény bez molekúl pochádzajúcich z ľudského organizmu.

PCR kopíruje gény, ktoré sú čistené a transfekované do semien rastliny *Hordeum vulgare*. Rastliny sú potom pestované hydroponicky s cieľom zabezpečiť dokonalé podmienky pre produkciu VEGF a zabrániť modifikovaným génom rozšíriť sa do prostredia. *H. vulgare* s vysokým výnosom sa následne zozbiera a VEGF očistí.

Keďže rastlina je tiež eukaryotická, identický VEGF proteín je správne produkovaný a zložený, teda je zhodný s pôvodným ľudským proteínom a vysokou aktivitou.

H. vulgare neprodukuje cytotoxíny ako baktérie a kvasinky a nestimuluje imunitnú odpoveď. Týmto predchádza vedľajším účinkom a reakciám, zabezpečujúc pacientovi bezpečnosť a výsledky.

Nanogen sh-VEGF Komplex™

Bezpečný, získaný z rastlín bol sh-VEGF vyvinutý výlučne so spoločnosťou Nanogen ako výskumným partnerom. Všetky Nanogen ošetrojúce produkty obsahujú patentovaný Nanogen sh-VEGF Komplex™, komplex sh-VEGF a ciclopirox olamine. Ciclopirox olamine podporuje pôsobenie VEGF, usmerňuje prejav VEGF v hypoxických bunkách kde je VEGF najviac potrebný. Navyše, ciclopirox olamine môže udržiavať hladiny Ca^{2+} iónov v bunke pričom zabezpečuje prenos signálu z VEGFR2 receptora v celej bunke.