

It's a long way to Tipperary...

Z Profesorem Janem Potempą
rozmawia Andrzej M. Kobos

(część I)

Andrzej M. Kobos [AMK] – *Panie Profesorze, otrzymał Pan Nagrodę Fundacji na rzecz Nauki Polskiej 2011 w obszarze nauk o życiu i o Ziemi „za scharakteryzowanie nowej rodziny proteinaz bakteryjnych oraz wykazanie ich roli w rozwoju chorób przyzębia”. Zaczniemy, proszę, naszą rozmowę od komentarza na temat wywoływanej przez nie paradontozy.*

Jan Potempa [JP] – Paradontoza jest chorobą występującą u bardzo dużej liczby ludzi, znacznie bardziej skomplikowaną niż wiele innych chorób o podłożu infekcyjnym. Jest powodowana przez bakterie, które rosną na powierzchni zębów, ale poniżej linii dziąseł. Następuje zapalenie dziąseł w warunkach beztlenowych poniżej tej linii. To są idealne warunki dla takich bakterii, jak *Porphyromonas gingivalis*, jak również dla szeregu innych bakterii anerobowych, rozpoznawanych jako periopatogeny. Te bakterie o metabolizmie fermentacyjnym namnażają się w beztlenowej niszy stworzonej przez inne mikroorganizmy, które rosnąc, konsumują cały tlen. W warunkach beztlenowych *Porphyromonas gingivalis* świetnie sobie radzi.



fot. Andrzej Kobos

700 różnych gatunków mikroorganizmów żyje w naszej jamie ustnej – większość na powierzchni zębów. Dlaczego zęby są tak atrakcyjne dla bakterii? Zęby się nie złuszcza. Nabłonek, na przykład, złuszcza się i bakterie ciągle muszą niejako zmieniać „dom”. Natomiast bakterie na powierzchni zębów mają tę powierzchnię zagwarantowaną na całe życie zęba – tym bakteriom bardzo dobrze się dzieje. Niektóre są np. odpowiedzialne za próchnicę zębów, ale większość okazuje się „dobrymi” bakteriami. Natomiast w momencie, w którym dojdzie do wykształcenia się stanu beztlenowego, następuje zmiana flory bakteryjnej, pojawiają się bezwzględnie beztlenowce. Większość tych bakterii jest w taki czy inny sposób zaangażowana w tworzenie się poddziąsłowej płytki nazębnej, która ulega kalcyfikacji, a na zewnątrz ciemnemu przebarwieniu. Periodycznie należy to mechanicznie usuwać, tego nie da się zrobić szczoteczką, niezależnie, jak starannie myłoby się zęby. Następuje rozwój paradontozy.

Problem pojawia się, kiedy flora bakteryjna wymieni się na złą florę. Po angielsku ta choroba nazywa się nawet „microbiota shift disease”. *Porphyromonas gingivalis* jest bakterią kluczową dla wywołania stanu zapalnego. Dlaczego? Jak mawiał mój amerykański mentor, prof. Jim Travis, „*Porphyromonas gingivalis* jest jak pierś matki – karmi inne bakterie”. W 1985 r., gdy zjawilem się z Krakowa na stażu podoktorskim w jego laboratorium w University of Georgia, Athens, GA, zaczęliśmy od badania serpin; tematyka paradontozy przyszła później.

AMK – Czy wcześniej wiadano o istnieniu i działaniu bakterii *Porphyromonas gingivalis*?

JP – O tej bakterii było wiadomo od dosyć dawna, tylko nie było wiadomo, że jest jedną z bakterii zaangażowanych w paradontozę. Kiedy ja się tym zainteresowałem, ta bakteria była znana jako *Bacteroides melanogenicus*, a później *Bacteroides gingivalis*, a następnie nazwano ją *Porphyromonas gingivalis*. W 1990 r. zaczęła się moja przygoda z *Porphyromonas gingivalis*. Dostałem te bakterie od Maude Wikström z Göteborga w Szwecji. Przywiozłem je do Krakowa, a później wylądowałem z nimi w Georgii u Jima Trávisa. Tam zaczęliśmy nad nimi pracować. Później dostaliśmy inne szczepy tej bakterii z Emory University, Atlanta, GA.

AMK – Ustalono, że paradontoza przyczynia się do ryzyka chorób serca i stawów. Czy to Pan stwierdził ten związek?

JP – To szło powoli. Byłbym bardzo dumny, gdybym to ja zrobił. W zależności od kryteriów przyjmuje się, że od 10 do 80 procent dorosłej populacji ludzi na Ziemi cierpi na paradontozę. Po pięćdziesiątce, sześćdziesiątce, prawie każdy ma trochę ubytku kości zębodołowej, kieszonki przyzębne, obniżenie dziąseł i obnażenie szyjek zębowych. Aparat zawieszenia zębów ulega uszkodzeniu, powoli zapada się, przestaje trzymać zęby, bo brakuje tkanki, która zostaje strawiona przez sfrustrowaną odpowiedź immunologiczną niemogącą sobie poradzić z *Porphyromonas gingivalis*. Zaawansowaną paradontozę ma 10 procent populacji – to jest bardzo ostrożna ocena, ale i bardzo duża liczba ludzi. W dodatku paradontoza była traktowana jako choroba wieku podeszłego; wypadanie zębów uważano za normalny proces starzenia się. Teraz wiemy, że jest to poważna choroba, nie tylko dlatego, że wypadają zęby – a życie bez zębów jest trudne – ale paradontoza jest chorobą, która powiązana jest również z chorobami systemowymi, w szczególności z chorobami krążenia i reumatoidalnym zapaleniem stawów. To są dwie różne choroby, które mają różną etiologię, a na poziomie klinicznym są powiązane z paradontozą.

Klinicyści zaobserwowali, że osoby, które mają zaawansowaną paradontozę mają często więcej problemów z miazdzą; podobnie jak i z reumatoidalnym zapaleniem stawów. Korelacja jest tak silna, iż praktycznie świadczy o tym, że jedna choroba napędza drugą. Więcej, cukrzyca typu II także wydaje się skorelowana z paradontozą, również przedwczesne porody u kobiet, niedowaga płodu. Są publikacje łączące paradontozę z chorobą Alzheimera. ▶

► Wracając do korelacji, jest jakiś czynnik genetyczny paradontozy, którego jeszcze nie znamy. Ciekawe, wieloletnie badania przeprowadził Robert Genco w Sri Lance, gdzie praktyki mycia zębów na ogół nie ma. Okazało się, że jeżeli porównać spektrum paradontozy u ludzi, którzy nie dbają o higienę jamy ustnej, z takim u Amerykanów, którzy wyjątkowo starannie o nią dbają, częstotliwość występowania paradontozy jest niemal identyczna. Czyli jest jeszcze jakiś inny czynnik...

AMK – Rozumiem, że w paradontozie, w reakcji na bakterie *Porphyromonas gingivalis* następuje swoista odpowiedź immunologiczna organizmu.

JP – Układ immunologiczny, oczywiście, rozpoznaje te bakterie i toczy z nimi wojnę. Mamy na zębach bakterie, które układ immunologiczny próbuje zwalczyć. Problem jest ten, że nie może poradzić sobie z tymi bakteriami i po prostu ulega frustracji. Nie mogąc ich pokonać, uszkadza okoliczne tkanki.

Nazwijmy to „collateral damage” – amerykańskim określeniem. Paradontoza jest to collateral damage spowodowane przez układ odpornościowy, zwłaszcza przez wrodzoną odpowiedź immunologiczną, zależną od leukocytów, granulocytów, makrofagów. Układ nie może sobie poradzić. Wywiązuje się chroniczny stan zapalny, w którym produkowane są cytokiny prozapalne – zaburza się regulacja tych mediatorów stanu zapalnego, które prowadzą do resorpcji tkanki kości zębodołowej. Następuje aktywacja osteoklastów, inhibicja osteoblastów, uwalnianych jest bardzo dużo enzymów proteolitycznych z granulocytów, makrofagów, które degradowują kolagenowe wiązadła łączące korzeń zęba z dziąsłem – aparat łączący kość z korzeniem zęba, powodując rozchwianie zęba, prowadzące później do jego wypadnięcia. To jest chroniczny stan zapalny, który ciągnie się latami, przez 30–40 lat.

AMK – Skąd połączenie paradontozy z miażdżycą?

JP – Są dwie teorie tego, dlaczego paradontoza powiązana jest z miażdżycą. Pierwsza przyjmuje, że miażdżycą jest również chorobą zapalną, wywołaną stanem zapalnym naczyń. Chroniczny stan zapalny – paradontoza – niejako pobudza stan zapalny naczyń krwionośnych. Jest to sytuacja, w której jeden stan zapalny przenosi się w drugi. Mechanizm może być podobny, gdyż obie choroby są zapalne, produkują prozapalne cytokiny. Markerem chronicznych zapaleń jest podwyższony poziom niektórych cytokin, fibrynogenu – to może mieć przkładnię na rozwój czy pogorszenie miażdżycy. To jest wspólna etiologia tych dwóch chorób, jeżeli przyjmujemy, że miażdżycą jest chorobą zapalną. Chore dziąsła powodują zaostrzenie stanu zapalnego w naczyniach krwionośnych, stąd rozwój miażdżycy i w konsekwencji zawały serca czy wylewy do mózgu. Są liczne publikacje, które bezpośrednio wskazują na znaczenie bakterii *Porphyromonas gingivalis* w miażdżycy.

Drugą teorią jest, że bakterie, które są w paradontozie, bezpośrednio trafiają do płytki miażdżycowej, powodują jej wzrost i w końcu pęknięcie i zawały serca; czyli jest bezpośrednia rola tych bakterii. U ludzi, którzy mają miażdżycę, w płytce miażdżycowej znajduje się specyficzne DNA bakterii *Porphyromonas gingivalis*, i to dość go sporo. Istnieje więc jakiś przepływ i te bakterie tam trafiają. Ale krytycy tej teorii twierdzą, że płytka miażdżycowa jest swego rodzaju śmietnikiem, do którego trafia wiele rzeczy, będących w krwioobiegu – więc i bakterie z kieszonki przyzębnej dostają się do krwioobiegu i ich DNA tam pozostaje. Zaprzecza to bezpośredniej roli tych bakterii.

AMK – A połączenie z chorobami reumatoidalnymi?

JP – Ciekawe jest powiązanie między paradontozą a reumatoidalnym zapaleniem stawów. To może być związek przyczynowo-skutkowy, w którym *Porphyromonas gingivalis* jest główną bakterią odpowiedzialną za inicjację ciągu wydarzeń, prowadzącego do powstania odpowiedzi autoimmunologicznej przeciwko zmienionym białkom w stawach i stąd do rozwoju choroby reumatoidalnej.

To jest bardzo ciekawa teoria, którą kiedyś przegapiłem. Miałem możliwość włączenia się do tego typu badań na wcześniejszym etapie, bowiem w 1995 r. opisaliśmy enzym, zwany deiminaza peptylidoargininy, który modyfikuje argininę do cytruliny: arginina – dodatnio naładowany aminokwas – staje się neutralną cytruliną. Ten enzym występuje w *Porphyromonas gingivalis*. Jednakże wtedy nie było żadnych doniesień o powiązaniu między zapaleniem stawów a cytrulinowanymi antygenami, ani o tym, że taki enzym jest ważnym czynnikiem w wirulencji *Porphyromonas gingivalis*. Odłożyliśmy to na wiele lat.

Aż tu w 2008 r. Patrick Venables z Londynu przysłał mi e-mail, pytając, czy byłbym zainteresowany współpracą w badaniu powiązania przyczynowo-skutkowego między zapaleniem stawów a paradontozą, poprzez tenże enzym w *Porphyromonas gingivalis*? Patrick Venables jest jednym z liderów badań molekularnych przyczyn rozwoju paradontozy i molekularnego rozwoju reumatoidalnego zapalenia stawów. Pracuje w The Kennedy Institute of Rheumatology w Londynie. Od tego zaczął się mój powrót do wspomnianego enzymu.

Ten enzym występuje wyłącznie w *Porphyromonas gingivalis* i organizmach eukariotycznych, w tym oczywiście u ludzi. Nie ma go w żadnej innej bakterii poza *Porphyromonas gingivalis*. Enzym z *Porphyromonas gingivalis* działa tak samo jak ludzkie enzymy, które cytrulinują – czyli modyfikują argininę do cytruliny w wielu białkach i peptydach. W tej chwili przyjmuje się, że przyczyną reumatoidalnego zapalenia stawów jest załamanie się tolerancji immunologicznej wobec cytrulinowanych białek. To jest mocno osadzona teoria, w której pokazuje się, że przeciwciała przeciwko cytrulinowanym białkom i peptydom pojawiają się już dziesięć lat przed pierwszymi objawami zapalenia stawów. Diagnostyczna wartość tych przeciwciał jest ogromna.

Następuje załamanie odpowiedzi immunologicznej. Białka cytrulinowane powstają w wielu sytuacjach: są w skórze, w osłonkach mielinowych nerwów. Przy każdym stanie zapalnym powstaje taka modyfikacja białek. Ale my nie mamy przeciwciał przeciwko tym białkom. Co jest przyczyną, że układ immunologiczny nagle rozpoznaje je jako obce, jako coś, co trzeba wyeliminować?

W sposób okrężny prowadzę do tego, jak to jest z *Porphyromonas gingivalis*. Jedną bardzo silną – zbadaną na jednojajowych bliźniakach – korelacją jest palenie papierosów i reumatoidalne zapalenie stawów. Paląc papierosy, mamy w płucach ciągle niski stan zapalny, wynikający z irytacji. Podrażnienie dymem tytoniowym, nikotyna, smoła, wywołują reakcję obronną organizmu, mamy nacieki neutrofilii. Jeżeli jest zamieszanie, łatwo się pomylić – następuje *collateral damage*. W stanie ciągłego podrażnienia, lekkiego zapalenia, układ immunologiczny myli się, dochodzi do uwalniania tych enzymów modyfikujących i powstają takie przeciwciała.

Pomyślmy teraz o paradontozie. Mamy w niej również chroniczny stan zapalny, cały czas toczy się walka pomiędzy układem immunologicznym a bakteriami. Jednym z ważniejszych elementów po stronie bakterii *Porphyromonas gingivalis* jest enzym, który cytrulinuje nie tylko siebie, swoje białka, ale również białka ludzkie – gospodarza. W pewnym momencie może dojść do pomyłki układu immunologicznego. Aktywowane są limfocyty, powstają przeciwciała, które rozpoznają cytrulinowane peptydy i białka jako obce – ►

- do zniszczenia. To jest nie tyle *collateral damage*, ile zdrada. Układ immunologiczny zdradza nas i zamiast tolerować te cytrulinowane peptydy i białka jako normalne, rozpoznaje w nich wrogów i atakuje. To, po latach, prowadzi do stanu zapalnego w stawach i rozwoju choroby.

AMK – Czy w tej chwili tym głównie się Pan zajmuje?

JP – W tej chwili nas to z Patrickiem bardzo interesuje. Kilka lat temu dostałem grant FNP „Team”, właśnie na badanie powiązania między paradontozą a zapaleniem stawów.

AMK – Czy to jest to, za co dostał Pan Nagrodę FNP?

JP – Nagrodę FNP dostałem za odkrycie i charakterystykę gingipain. To są enzymy proteolityczne, czyli degradujące białka, produkowane przez *Porphyromonas gingivalis*, które stanowią główny oręż tej bakterii w jej walce z układem immunologicznym. Gingipainy mogą totalnie degradować białka do małych peptydów, ale w wielu przypadkach działają z ogromną precyzją, w śladowych ilościach aktywują komplement, koagulację, szlak uwalniania kinin, interleukinę-8. Zmieniają funkcję układu immunologicznego, który zamiast bronić, atakować bakterie, obraca się przeciwko własnemu organizmowi. To – uważam – jest jedna z ciekawszych prac¹, którą w całości zrobiliśmy w Krakowie. Oczywiście mamy wielu współpracowników zagranicznych, ale ta praca poczęła się i sfinalizowała w Krakowie.

AMK – Czyli w Krakowie można zrobić coś istotnego... Wróćmy do tego za chwilę.

JP – W tej chwili już wszystko można zrobić w Polsce. W tej pracy o gingipainach wykazaliśmy ciekawą rzecz o granulocytach. Granulocyt jest po to, aby zabijać bakterie; zabija, zabija bakterie, a potem popełnia samobójstwo i zostaje usunięty przez makrofagi albo inne komórki, nawet nie przez profesjonalne fagocyty. Granulocyt, potraktowany gingipainami, jest rozpoznawany już jako apoptotyczny. Zdrowy, świeży granulocyt jest nagle rozpoznawany jako komórka apoptotyczna i usuwany przez makrofagi. Dochodzi do wyłączenia, ubytku aktywnych komórek immunologicznych, które powinny zwalczać bakterie. Kolejnym takim przykładem jest proteoliza immunoglobulin, efektorowych cząsteczek odpowiedzi immunologicznej – bez nich nie ma obrony. Przez jedną z gingipain są rozcinane w rejonie zawiasowym, co oddziela część efektorową od części rozpoznającej antygen. Co ciekawsze, my widzimy te zdegradowane formy immunoglobulin bezpośrednio w kieszonkach przyzębnych. Obecność tych form koreluje z obecnością gingipain. To świadczy o tym, że bakterie proteazy są i działają w tych miejscach.

AMK – Mówi się o leku przeciwko bakteriom *Porphyromonas gingivalis* i stąd przeciw paradontozie.

JP – Opracowanie każdego nowego leku jest bardzo trudne. Kwestia jest taka: W paradontozie stan zapalny wywołany jest przez bakterie *Porphyromonas gingivalis* w płytce podziąsłowej; to jest gruba warstwa bakterii, otoczona śluzem, do której antybiotyk praktycznie nie dotrze. Usunięcie bakterii *Porphyromonas gingivalis* zatrzymuje rozwój choroby.

W tej chwili nie ma lepszego sposobu niż mechaniczne ich zdarcie. Z reguły dodaje się antybiotyk, pochodną tetracykliny, aby wybić resztę bakterii i zapobiec rekolonizacji, zanim to miejsce się zagoi. Ale antybiotyk sam w sobie nie dotrze na miejsce, bo te bakterie nie rosną w zawieszynie. Trzeba ją zdrapać mechanicznie i, aby zapobiec powrotowi bakterii, podaje się antybiotyk.

Można pomyśleć o innych lekach, które będą obezwładniać bakterie, czyli czynić je podatne na atak układu immunologicznego. Takim lekiem mogą być inhibitory enzymów proteolitycznych, gingipain *Porphyromonas gingivalis*. Jeżeli *Porphyromonas gingivalis* jest główną bakterią wywołującą paradontozę, to gdy wyeliminujemy gingipainy przez ich specyficzne zahamowanie, to ta bakteria stanie się podatna na zniszczenie przez układ immunologiczny.

AMK – Bez tinkering – majstrowania – z układem immunologicznym, które nie zawsze dobrze się kończy...

JP – Właśnie bez tinkering z układem immunologicznym... Po prostu usuniemy to, co chroni bakterię przed zabiciem przez układ immunologiczny, taki, jaki jest. To jest piękna teoria... Stworzenie takiego inhibitora może być trudne. Nie może mieć on działania ubocznego, musi działać tylko bezpośrednio na gingipainy. A sceptycy powiedzą: OK, *Porphyromonas gingivalis* jest jedną z wielu bakterii tam obecnych i odpowiedzialnych za paradontozę.

Dlatego w centrum mojego zainteresowania jest układ sekrecji tych białek. Wszystkie gingipainy i 30 innych białek *Porphyromonas gingivalis*, jak również białka dwóch innych ważnych bakterii *Prevotella intermedia* i *Tannerella forsythia*, są sekrecjonowane jedną drogą i uwalniane na zewnątrz. Ten aparat sekrecji występuje tylko u tych periopatogennych bakterii. Możemy sobie wyobrazić, że jeżeli znajdziemy coś, co zablokuje ten aparat, i nie będzie sekrecji tych czynników wirulencji, to po prostu te trzy bakterie będą bezbronne wobec układu immunologicznego. To jest drugi kierunek badań, który w tej chwili jest bardziej obiecujący niż inhibitory gingipain, z tego względu, że praktycznie eliminowałby sekrecję znacznej większości czynników wirulentnych tej grupy bakterii. Odpowiednio dobrane inhibitory tej sekrecji nie wpływałyby na inne – dobre – bakterie, czyli kolosalna flora bakterii nie byłaby zabijana przy okazji, jak jest zabijana przez antybiotyki. W takim podejściu można dopatrzeć się wielu pozytywnych cech. Przedstawiłem to ostatnio na Seventh General Meeting of the International Proteolysis Society w San Diego, CA. Ale droga jest długa. It's a long way to Tipperary...

Nigdy leku nie obiecuję, bo wiem, że jest to bardzo trudne. Jim Travis obserwował doniesienia prasowe z wielkich uniwersytetów: „Opracowali cudowny lek”. Chyba w 99 procentach z tych medialnych bomb nic konkretnego się nie wykluczało. Do tego potrzeba pieniędzy idących w miliardy dolarów. Natomiast obiecuję charakterystykę czegoś, co może być celem opracowania leku. Tego może podjąć się firma farmaceutyczna, która ma do tego środki, ludzi i możliwości. W naszych warunkach stworzenie leku jest niemożliwe, natomiast badania podstawowe – tak.

Rozmowa w Krakowie 22 listopada 2011;
tekst autoryzowany.

¹ Guzik, K., Bzowska, M., Smagur, J., Krupa, O., Sieprawska, M., Travis, J., & Potempa, J. (2007) New trait in bacterial pathogenicity: Gingipains divert apoptotic cell recognition and clearance. *Cell Death Differ.* 14: 171–182.