



**MARINEX**

23 LATA BADAŃ NAUKOWYCH

NAD EFEKTAMI ODŻYWIANIA ZGODNEGO Z GENETYKĄ I FIZJOLOGIĄ ORGANIZMU CZŁOWIEKA

## Wiadomości medyczne nr 30

— 5 stycznia 2022 r. —

# Opracowanie dotyczące wolnych kwasów tłuszczowych i receptorów dla nich

Wykonano na podstawie: Kimura I, Ichimura A, Ohue-Kitano R, Igarashi M. Free Fatty Acid Receptors in Health and Disease. *Physiol Rev.* 2020 Jan 1;100(1):171-210. doi: 10.1152/physrev.00041.2018. Epub 2019 Sep 5. PMID: 31487233.



## Streszczenie:

- Wolne kwasy tłuszczowe dzielone są na grupy, w zależności od długości łańcucha węglowego;
- W organizmie wykorzystywane są jako źródło energii oraz cząsteczki regulujące wiele procesów, głównie metabolicznych;
- Oddziałują w organizmie poprzez 4 główne grupy receptorów: FFAR1, FFAR2, FFAR3, FFAR4;
- Fakt, że poprzez receptory te regulowanych jest wiele procesów sprawia, że poszukuje się syntetycznych ich agonistów i antagonistów, które stać się mogą potencjalnymi lekami, szczególnie do stosowania w przebiegu chorób metabolicznych.

Wolne kwasy tłuszczowe (FFA) są ważnym źródłem energii dla większości tkanek organizmu i są klasyfikowane według długości łańcucha alifatycznego:

- krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe mają mniej niż 6 atomów węgla,
- średniołańcuchowe kwasy tłuszczowe mają mniej mają 6-12 atomów węgla,
- długołańcuchowe kwasy tłuszczowe mają 12 lub więcej atomów węgla.

FFA są wykorzystywane przez organizm:

- jako źródło energii;
- w sygnalizacji receptorowej;
- w regulacji ekspresji genów;
- w utrzymaniu homeostazy energetycznej.

## FFA jako metabolity żywieniowe

Nadmierne spożycie żywności i niebilansowana dieta powodują występowanie zespołu metabolicznego, do którego należą: otyłość, cukrzyca typu 2, choroby układu krążenia, stłuszczenie wątroby i inne zaburzenia pokrewne. Otyłość jest obecnie jednym z najpoważniejszych problemów zdrowotnych na świecie, zwłaszcza w krajach zachodnich, ze względu na zwiększoną śmiertelność i przyczynianie się do szeregu objawów, określanym wspólnym mianem zespołu metabolicznego, który obejmuje otyłość, nadciśnienie tętnicze, hiperglikemię, dyslipidemię i insulinooporność.

Otyłość powstaje w wyniku długotrwałego zaburzenia równowagi energetycznej w organizmie, co wpływa na szlaki efektorowe różnych metabolitów i hormonów.

## FFA

Kwasy tłuszczowe (FA) są kwasami karboksylowymi o długich nasyconych lub nienasyconych łańcuchach węglowych. Większość naturalnych FA składa się z nierozgałęzionego łańcucha o parzystej liczbie atomów węgla (od 4 do 28). FA są powszechnie obecne w organizmach w postaci:

- triglicerydów,
- fosfolipidów,
- estrów cholesterolu.

W każdej z tych postaci są one ważnym źródłem pokarmu dla zwierząt i ważnymi składnikami strukturalnymi komórek. Nasycone FA nie mają podwójnych wiązań węgiel-węgiel, podczas gdy nienasycone FA mają jedno lub więcej podwójnych wiązań węgiel-węgiel.

Wiązania podwójne węgiel-węgiel umożliwiają nienasyconym FA występowanie w izomerach cis lub trans, przy czym izomer cis jest konfiguracją dominującą dla większości naturalnie występujących nienasyconych FA. Konfiguracja trans FA nie jest konfiguracją naturalnie występującą, a tłuszcze trans są produkowane w procesie sztucznej syntezy. Różnice w geometrii pomiędzy różnymi rodzajami nienasyconych FA oraz pomiędzy nasyconymi i nienasyconymi FA odgrywają ważną rolę w różnych procesach biologicznych oraz w budowie struktur biologicznych, takich jak błony komórkowe. Gdy w osoczu krwi krążącej występują w postaci niezestryfikowanej, nazywane są wolnymi kwasami tłuszczowymi (FFA). FFA są zawsze związane z białkiem transportowym, takim jak np. albumina.

### **Metabolizm FFA**

U zwierząt, FA są syntetyzowane głównie z węglowodanów w wątrobie, tkance tłuszczowej i gruczołach mlecznych. Synteza jest procesem wieloetapowym, katalizowanym przez szereg różnych enzymów. Pierwszy jej etap zachodzi w mitochondriach, kolejne w cytozolu. Po zakończonej syntezie FA niemal zawsze wiążą się z glicerolem, tworząc trójglicerydy, które są ważnym źródłem energii dla człowieka i zwierząt. FA wchodzi również w skład fosfolipidów, tworzących dwuwarstwę błon komórkowych.

Wolne kwasy tłuszczowe w osoczu powstają w wyniku lipolizy trójglicerydów. Ponieważ FFA są nierozpuszczalne w wodzie, są transportowane poprzez wiązanie się z albuminami osocza. Tak więc poziom FFA w osoczu jest ograniczony dostępnością miejsc wiążących albuminy. FFA mogą być pobierane z osocza przez wszystkie komórki zawierające mitochondria, i są metabolizowane przez  $\beta$ -oksydację, w wyniku której uwalniana jest duża ilość energii w postaci ATP.

Zaznaczyć należy, że choć komórki ośrodkowego układu nerwowego (OUN) posiadają mitochondria, głównym źródłem energii w mózgu ssaków jest glukoza. Synteza FA z węglowodanów w tych rejonach zachodzi, jednak głównie po to, aby umożliwić utrzymanie i produkcję fosfolipidów niezbędnych do budowy błon komórkowych i organelli. Jednocześnie, FFA mogą być transportowane z osocza do mózgu przez barierę krew-mózg; mechanizmy transportu zależą od długości łańcucha węglowego FFA.

FFA pochodzące z pokarmów tłuszczowych lub z trójglicerydów zgromadzonych w tkance tłuszczowej są rozprowadzane do komórek, gdzie służą jako paliwo do skurczu mięśni i metabolizmu ogólnoustrojowego.

### **Dieta i FFA**

FA w pożywieniu, zwłaszcza długo- (LCFA) i średniołańcuchowe (MCFA), zawarte są głównie w trójglicerydach pochodzących z tłuszczów zwierzęcych i olejów roślinnych, podczas gdy krótkołańcuchowe FA (SCFA) są produktami końcowymi fermentacji włókien pokarmowych przez mikroorganizmy jelitowe, występują również w żywności fermentowanej. SCFAs i MCFAs są wchłaniane bezpośrednio do krwi przez naczynia jelitowe i przechodzą przez żyłę wrotną wraz z innymi wchłoniętymi składnikami odżywczymi.

W przeciwieństwie do nich, LCFAs nie są uwalniane bezpośrednio do naczyń jelitowych; zamiast tego są wchłaniane przez kosmki jelitowe i ponownie łączone w trójglicerydy. Trójglicerydy, wraz z cholesterolem i białkiem, tworzą apolipoproteiny, zwane chylomikronami. Chylomikrony są następnie transportowane przez układ limfatyczny do miejsc z większymi naczyniami krwionośnymi, głównie w pobliżu serca, gdzie uwalniają FA, dostarczając energii, lub je magazynują.

## 1. LCFA

Niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe, takie jak kwas linolowy i  $\alpha$ -linolenowy, muszą być pozyskiwane z pożywienia, ponieważ nie mogą być syntetyzowane *de novo*. Kwas  $\alpha$ -linolenowy (ALA; C18:3) posiada wiązania podwójne oddzielone trzema atomami węgla od końca metylowego (omega-3 FA), natomiast kwas linolowy (LA; C18:2) posiada wiązania podwójne oddzielone sześcioma atomami węgla od końca metylowego (omega-6 FA). Te FA w dużych ilościach występują w olejach roślinnych. Człowiek nie ma jednak zdolności do wprowadzania wiązań podwójnych w FA o liczbie atomów powyżej 9 i 10, licząc od strony kwasu karboksylowego. ALA i LA mogą być przekształcane do form o dłuższych łańcuchach, takich jak kwas eikozapentaenowy (EPA) i kwas dokozaheksaenowy (DHA) omega-3 oraz kwas arachidonowy omega-6 poprzez serię etapów desaturacji i wydłużania. Uważa się, że wydajność konwersji ALA do EPA i DHA jest bardzo niska, dlatego EPA i DHA winny być dostarczane poprzez spożycie ryb. Kwasy tłuszczowe omega-3 i omega-6 są prekursorami eikozanoidowych mediatorów zapalenia, takich jak leukotrieny (LT), prostaglandyny (PG), tromboksany (TX) i rezolwiny. Produkty eikozanoidowe, syntetyzowane z kwasu arachidonowego pochodzącego z LA, są silniejszymi mediatorami zakrzepowo-zatorowymi niż te powstałe z kwasów omega-3.

## 2. MCFA

Średniołańcuchowe triglicerydy (MCT), trójglicerydy składające się z MCFA, są unikatową formą tłuszczu pokarmowego. MCT są dostępne głównie jako składnik masła, oleju kokosowego i innych naturalnych źródeł. MCT dostarczają ~10% mniej kalorii niż długołańcuchowe triglicerydy. Ponadto, ze względu na krótszą długość łańcucha węglowego niż w przypadku LCFA, MCFA są szybciej wchłaniane w jelicie ze względu na ich rozpuszczalność w wodzie i są szybciej metabolizowane, ponieważ są transportowane bezpośrednio do wątroby. W wyniku tej przyspieszonej przemiany metabolicznej, kalorie zawarte w MCFA zamiast być magazynowane w postaci tłuszczu, są bardzo wydajnie przekształcane w paliwo do natychmiastowego wykorzystania przez organy i mięśnie.

MCFA wykazują takie właściwości zwiększające energię, ponieważ nie wymagają obecności karnityny jako nośnika (w przeciwieństwie do LCFAs) i mogą być szybko transportowane przez podwójną błonę mitochondrialną. Dlatego też MCFA są szybko degradowane, w wyniku czego powstaje nadmiar acetylo-CoA, przekształcanego do ciał ketonowych. Dlatego MCT są dobrym wyborem dla osób o wysokim zapotrzebowaniu na energię, takich jak osoby starsze, sportowcy, czy osoby po ciężkich zabiegach.

## 3. SCFA

Człowiek nie posiada enzymów niezbędnych do trawienia błonnika pokarmowego, dlatego też niestrawne węglowodany nie są wchłaniane w przewodzie pokarmowym. Trafiają stąd do jelita grubego, gdzie podlegają fermentacji przez mikroorganizmy beztlenowe. W wyniku tych procesów powstają różne metabolity, z których główną grupę stanowią SCFA.



Mikroby jelitowe wytwarzają SCFA jako produkty końcowe swoich procesów metabolicznych, aby utrzymać równowagę redoks w beztlenowym środowisku jelita. SCFA są nasyconymi kwasami organicznymi z 1-6 atomami węgla, a najczęściej występującymi SCFA (95%) są octan (C2), propionian (C3) i maślan (C4), które są obecne w stosunku molowym ~60:20:20 w okrężnicy i kale. W zależności od diety, całkowite stężenie SCFA zmienia się od 70-140 mM w okrężnicy proksymalnej do 20-70 mM w okrężnicy dystalnej. W kątnicy i okrężnicy 95% produkowanych SCFA jest szybko wchłaniane przez kolonocyty, a pozostałe 5% jest zatrzymywane w kale. Spożywanie błonnika pokarmowego, pośrednio dostarczającego SCFA, zmniejsza ryzyko otyłości, cukrzycy, nieswoistych zapaleń jelit, raka jelita grubego oraz chorób układu krążenia.

Ostatnie badania wskazują również, że zmiany w środowisku jelitowym, a szczególnie w składzie mikrobioty jelitowej, są ściśle związane z zaburzeniami metabolicznymi i chorobami immunologicznymi. Analiza metagenomiczna mikrobiomu jelitowego u otyłych myszy i ludzi wykazała, że dominuje w nim ekspresja genów zaangażowanych w metabolizm węglowodanów. Ponadto, przeszczepienie mikrobioty jelitowej z myszy otyłych do myszy o prawidłowej budowie ciała istotnie zwiększało ryzyko otyłości u myszy biorców. Dodatkowo, w europejskich i chińskich badaniach kohortowych, pomimo różnic etnicznych i dietetycznych, pacjenci z cukrzycą typu 2 wykazywali niższą produkcję maślanu i wyższy odsetek Clostridiales, bakterii nie produkujących maślanu. SCFAs otrzymywane poprzez metabolizm mikrobiomu jelitowego wpływają również na odporność gospodarza i stan zapalny, ponieważ SCFA są zaangażowane w jelitową homeostazę immunologiczną ze względu na ich rolę w regulacji polaryzacji komórek T. Dodatkowo, SCFA pełnią funkcje zarówno hamujące, jak i stymulujące względem neutrofilii oraz wpływają na immunomodulację monocytów i makrofagów. W ludzkich monocytach, SCFA zmniejszają produkcję czynnika martwicy nowotworów (TNF) i białka chemotaktycznego monocytów-1 oraz zwiększają produkcję PGE2.

Udowodniono, że SCFA (maślan, propionian i octan) chronią przed indukowaną dietą otyłością i insulinoopornością, poprzez zwiększenie wydzielania hormonów jelitowych i zmniejszenie pobierania pokarmu. Propionian i maślan promują również glukoneogenezę jelitową poprzez oś jelitowo-mózgową. Doustne podawanie SCFA może poprawić upośledzony metabolizm glukozy i dysfunkcję immunologiczną u ludzi. W rzeczywistości, badania kliniczne wykazały, że podawanie SCFA było skuteczne w leczeniu choroby Leśniowskiego-Crohna, biegunki związanej z antybiotykami, wrzodziejącego zapalenia jelita grubego i otyłości. Mikrobiota jelitowa odgrywa więc ważną rolę w fermentacji błonnika pokarmowego w celu uwolnienia SCFA, które są ważnymi czynnikami metabolizmu energetycznego i odpornościowego. ważnymi czynnikami metabolizmu energetycznego i homeostazy immunologicznej.

## **Receptory dla FFA**

FFA są nie tylko źródłem energii, ale organizm wykorzystuje je również jako cząsteczki sygnalizacyjne, które regulują różne procesy komórkowe i funkcje fizjologiczne, w zależności od ich długości łańcucha węglowego. W organizmie oddziałują poprzez receptory dla FFA (FFAR) sprzężone z białkiem G (GPCR). Receptory FFAR1 i FFAR4 są aktywowane przez MCFA i LCFA, natomiast FFAR3 i FFAR2 są aktywowane przez SCFA. GPCR są receptorami transmembranowymi, stanowiącymi dużą rodzinę receptorów proteinowych, które wykrywają cząsteczki zewnątrzkomórkowe, a następnie aktywują wewnątrzkomórkowe szlaki transdukcji sygnału i ostatecznie odpowiedzi komórkowej.

W momencie aktywacji GPCR przez ligandy, podjednostki heterotrimerycznych białek G sprzężone z receptorem odłączają się i oddziałują na wewnątrzkomórkowe białka sygnalizacyjne lub bezpośrednio na funkcjonalne proteiny, w zależności od rodzaju podjednostek. Efektem podjednostek Gs i Gi/o jest cyklaza adenylanowa, enzym związany z generacją cAMP. Oddziaływanie z podjednostką Gs promuje wytwarzanie cAMP, podczas gdy interakcja z podjednostkami Gi/o hamuje ten proces.

Drugim czynnikiem efektorowym, związanym z Gq/11 jest fosfolipaza C (PLC). Jej aktywacja sprzyja hydrolizie 4,5-disfosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP2) do diacyloglicerolu i 1,4,5-trifosforanu inozytolu (IP3). Następnie aktywacja receptorów IP3 zlokalizowanych w siateczce śródplazmatycznej prowadzi do uwolnienia jonów wapnia z siateczki śródplazmatycznej. Ważny jest również szlak sygnalizacyjny podjednostki Gβγ. Jej efektorami G są różne cząsteczki, w tym izoformy cykazy adenylanowej czy kanały jonowe.

Ważną rolę w sygnalizacji i funkcjach fizjologicznych GPCR odgrywają również modulatory allosteryczne GPCR. Modulatory allosteryczne oddziałują z miejscami wiążącymi, które zlokalizowane są w innych miejscach, niż obszary rozpoznawane przez endogenne ligandy. Modulatory allosteryczne będą wpływają na konformację receptora, przez co zmieniać się może jego odpowiedź farmakologiczna. Receptory GPCR mogą również łączyć się w dimery bądź większe oligomery, co również w sposób fizyczny wpływa na konformację.

## **Receptor FFAR1/GPR40**

FFAR1 jest receptorem sprzężonym z białkiem Gq, który aktywuje PLC, powodując wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia lub fosforylację kinazy białkowej C. Obecnie wiadomo już, że sygnalizacja ta jest bardziej złożona niż pierwotnie przypuszczano i może obejmować zarówno aktywację podjednostki Gs, jak i Gi.

W 2003 roku ustalono, że FFAR1 jest receptorem aktywowanym przez MCFA i LCFA. Nienasycone kwasy tłuszczowe mogą aktywować FFAR1 w większym stopniu niż nasycone kwasy tłuszczowe. DHA jest najsilniejszym agonistą FFAR1 spośród nienasyconych kwasów tłuszczowych, a kwas palmitynowy spośród nasyconych.

FFAR1 ulega ekspresji w komórkach produkujących insulinę, w jelicie, w komórkach odpornościowych, kubkach smakowych i OUN. Tak szerokie rozpowszechnienie wpływa na zróżnicowane funkcje biologiczne i fizjologiczne tego receptora.

- **wydzielanie insuliny**

Wykazano, że FFAR1 biorą udział w stymulowanej glukozą sekrecji insuliny (GSIS). Oznacza to, że LCFA, takie jak LA i DHA, promują wydzielanie insuliny.

FFA mogą również stymulować uwalnianie hormonów z komórek wydzielniczych w obrębie jelit. Po aktywacji FFAR1 produkowane i wydzielane są glukagonopodobny peptyd-1 (GLP-1) i glukozozależny peptyd insulinotropowy (GIP). Wykazano, że doustne podanie tłuszczu myszom stymuluje zarówno wydzielanie GLP-1, jak i GIP u zwierząt typu dzikiego, a reakcja taka nie występuje u myszy z niedoborem FFAR1; dlatego też myszy z niedoborem FFAR1 wykazywały niskie stężenie insuliny i wysokie stężenie glukozy. Po stymulacji przez FFA w jelitach wydzielana jest także cholecystokinina.

Mechanizmy te poprawiają metabolizm węglowodanów.

- **Percepcja smaku**

Receptory FFAR1 i FFAR4 ulegają ekspresji w kubkach smakowych i odgrywają kluczową rolę w wykrywaniu smaku tłuszczów. W badaniach na zwierzętach wykazano, że myszy pozbawione FFAR1 i FFAR4 wykazywały zmniejszoną preferencję do kwasów tłuszczowych. Jak dotąd, ekspresja FFAR1 nie została jednak potwierdzona w ludzkich kubkach smakowych.

- **Mechanizmy przeciwzapalne**

FFAR1 jest zaangażowany w reakcje przeciwzapalne indukowane przez kwasy tłuszczowe. Ostatnio wykazano również, że kwas 17,18-ep- oksyeikosatetraenowy, metabolit kwasu eikozatetraenowego, działa jako ligand FFAR1 i wykazuje działanie przeciwalergiczne i przeciwzapalne poprzez hamowanie ruchliwości neutrofilów w modelach nadwrażliwości kontaktowej u myszy i makaków.

- **Ośrodkowy układ nerwowy**

FFAR1 ulega szerokiej ekspresji w komórkach nerwowych, w tym w neuronach kory mózgowej, hipokampa, ciała migdałowatego, podwzgórza, mózdzku i rdzenia kręgowego. Wykazano, że DHA indukuje różnicowanie neuronów oraz zwiększa wzrost aksonów i ich rozgałęzianie w badaniach *in vitro*. Udowodniono także, że DHA aktywuje FFAR1 w ludzkich komórkach neuroblastoma oraz że aktywacja FFAR1 indukuje fosforylację białka wiążącego element odpowiedzi cAMP (CREB) i ERK1/2. Wiadomo, że sygnalizacja CREB reguluje ekspresję genów promujących plastyczność synaptyczną i neuronalną, w tym genu dla BDNF. Ponadto, w kilku badaniach wykazano znaczenie FFAR1 w określonych zachowaniach gryzoni. Udowodniono m.in., że śródmózgowe wstrzyknięcie agonisty i allosterycznego modulatora FFAR1 oraz pełnego agonisty FFAR4 u myszy znacząco zmniejszyło czas bezruchu w teście pływania wymuszonego, co sugeruje, że aktywacja FFAR1/FFAR4 osłabiała zachowania podobne do depresji. Co więcej, wcześniejsze badania wykazały, że FA, które są endogennymi ligandami FFAR1, mogą modulować zachowania emocjonalne, ale działanie sygnalizacji FFAR1 może zależeć od ligandów. Na przykład, gryzonie karmione dietą z niską zawartością kwasów omega-3 wykazywały zachowania agresywne i depresyjne, podczas gdy gryzonie narażone na wysoki poziom nasyconych kwasów tłuszczowych wykazywały zachowania lękowe i podobne do agresji. Wyniki te sugerują zatem, że sygnalizacja FFAR1 jest związana z patologią zaburzeń neuropsychiatrycznych, w tym zaburzeń lękowych i depresji.

- **Łagodzenie bólu**

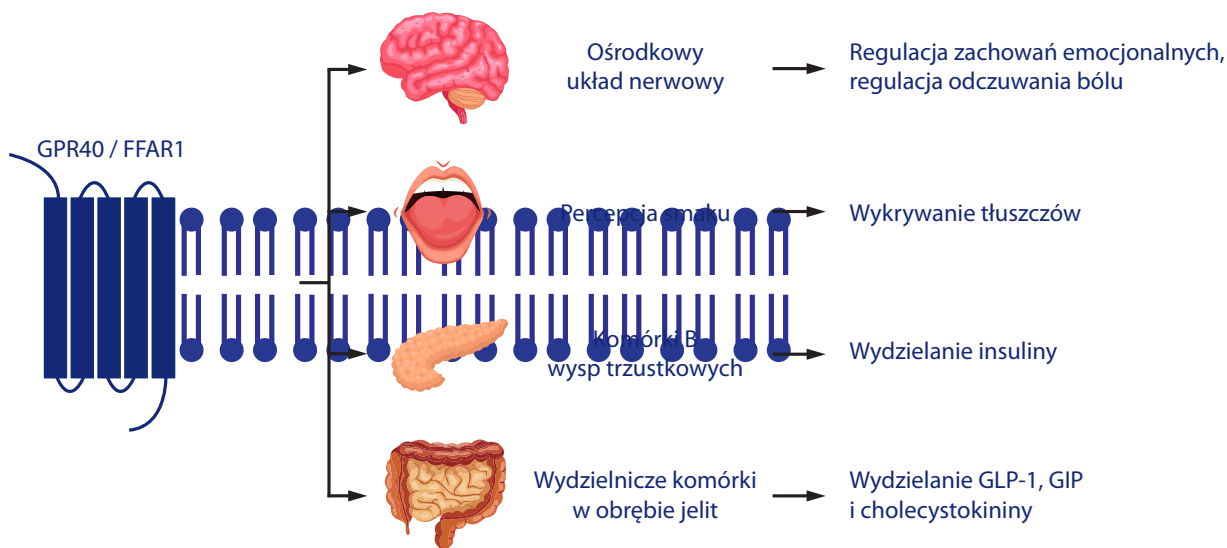
FFAR1 ulega ekspresji w OUN, w tym w regionach mózgu związanych z bólem. Wykazano, że domózgowe wstrzyknięcie DHA znacząco osłabia ból wywołany formaliną u myszy. Co więcej, zahamowanie sygnalizacji FFAR1 przez podawanie antagonisty FFAR1 GW1100 nasilało u myszy allodynię mechaniczną. Ponadto stwierdzono zwiększone stężenie kilku FFA, w tym DHA, w podwzgórzu i śródmózgowiu myszy podczas wczesnej fazy bólu wywołanego nacięciem podbródka. W jednym z badań sugerowano również, że DHA oraz jego metabolity są generowane w mózgu podczas ustępowania ostrego stanu zapalnego. Dlatego też aktywacja FFAR1 przez DHA i inne FFA podczas stymulacji bólowej może być odpowiedzią kompensacyjną w celu tłumienia bólu.

## **Zastosowanie terapeutyczne**

Odkąd wykazano, że aktywacja FFAR1 sprzyja wydzielaniu insuliny i tolerancji glukozy, zaczęto poszukiwać syntetycznych agonistów FFAR1 jako celu terapeutycznego w leczeniu cukrzycy typu 2 i otyłości. Odkryto

wiele związków ukierunkowanych na FFAR1, które sugerowano jako potencjalne leki, a kilka z nich poddano badaniom klinicznym, jednak żaden z nich nie został jeszcze zatwierdzony do stosowania klinicznego.

Informacje na temat fizjologicznego działania receptora FFAR1 zebrano na rysunku 1.



Rysunek 1. Fizjologiczne oddziaływanie receptora FFAR1.

## Receptor FFAR4/GPR120

Liczne badania wskazują, że FFAR4 jest sprzężony z białkiem Gq i że aktywacja FFAR4 przez ligandy powoduje wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia. W przeciwieństwie do FFAR1, w żadnym z badań nie potwierdzono sprzężenia FFAR4 z białkami Gi lub Gs. Udowodniono, że aktywacja FFAR4 przez agonistów, takich jak syntetyczne ligandy i LCFA, zwiększa wewnątrzkomórkowy poziom  $Ca^{2+}$  bez produkcji cAMP w ludzkich lub mysich komórkach wykazujących ekspresję FFAR4, co sugeruje, że FFAR4 jest sprzężony z białkiem Gq, ale nie z białkami Gi/o lub Gs. FFAR4 preferuje C18 PUFA jako endogenne ligandy.

Chociaż FFAR4 ulega szerokiej ekspresji w różnych tkankach i typach komórek, wyższą jego ekspresję zaobserwowano w jelicie, komórkach układu odpornościowego, kubkach smakowych i adipocytach. Zgodnie z wzorcem ekspresji, FFAR4 jest zaangażowany w różne funkcje biologiczne i fizjologiczne.

- **Wydzielanie hormonów jelitowych**

Stymulacja FFAR4 przez FFA promuje wydzielanie GLP-1 (in vitro lub in vivo) oraz zwiększa stężenie krążącej insuliny u myszy. Zgodnie z tym, ekspresja FFAR4 została potwierdzona w komórkach enteroendokrynnych, wykazujących ekspresję GLP-1 w okrężnicy myszy. Liczne inne badania potwierdzają tezę, że aktywacja FFAR4 wiąże się z wydzielaniem hormonów inkretynowych, w tym GLP-1 i GIP, jednak zrozumienie mechanizmów leżących u podstaw tego zjawiska wymaga dalszych badań.

Wiadomo jednak, że działanie takie wpływa na metabolizm węglowodanów.

- **Działanie przeciwzapalne**

FFAR4 ulega wysokiej ekspresji w tkance tłuszczowej i makrofagach prozapalnych, co wskazuje na istotną rolę FFAR4 w tych tkankach i typach komórek. Wykazano przeciwzapalne funkcje FFAR4 w obecności ligandów DHA i EPA w monocytarnych komórkach RAW264.7 oraz w pierwotnych makrofagach



wewnątrztrzewnowych. Wykorzystując system *in vitro*, autorzy wykazali również, że mechanizm leżący u podstaw hamowanej przez DHA odpowiedzi przeciwzapalnej, takiej jak hamowanie szlaków sygnałowych TLR i TNF, za pośrednictwem FFAR4 polega na hamowaniu fosforylacji TAK1 poprzez efekt zależny od białka wiążącego  $\beta$ -arrestyna-2/TAK1. Udowodniono także, że kwas eikozatetraenowy łagodzi indukowany palmitynianem wzrost ekspresji genów zapalnych i fosforylacji NF- $\kappa$ B w adipocytach 3T3-L1, ale wyciszenie FFAR4 za pomocą siRNA tłumi przeciwzapalne działanie EPA. Ponadto suplementacja EPA zmniejsza transdukcję sygnału zapalnego i fenotyp makrofagów w tkance tłuszczowej myszy karmionych dietą wysokotłuszczową i wysokobłonnikową, nie potwierdzono jednak, czy efekt ten jest wywoływany przez FFAR4.

Wykazano, że FFAR4 ulega ekspresji w dojrzałych osteoklastach i osteoblastach, co wskazuje na regulację masy kostnej przez sygnalizację FFAR4; jednakże delecja FFAR4 nie spowodowała zmian w masie kostnej myszy.

- **Adipogeneza**

FFAR4 ulega szerokiej ekspresji w adipocytach i tkance tłuszczowej, ale nie został wykryty w preadipocytach. Wykazano, że myszy z niedoborem FFAR4 karmione dietą wysokokaloryczną (HFD, 60 kcal% tłuszczu) wykazują fenotyp otyłości z obniżonym poziomem różnicowania adipocytów i lipogenezy w porównaniu do myszy typu dzikiego karmionych HFD, co sugeruje kluczową rolę FFAR4 w wyczuwaniu lipidów i kontroli energii. Udowodniono również, że FFAR4, ale nie FFAR1, ulega wysokiej ekspresji w białej tkance tłuszczowej (podskórnej, okołonerkowej, krezkowej i najądrzowej) u myszy i że poziom jej ekspresji jest podwyższony w tkankach tłuszczowych myszy karmionych HFD.

- **Percepcja smaku**

W porównaniu z FFAR1, FFAR4 jest ważniejszym elementem systemu odpowiedzi smakowej. Wykazano, że myszy z niedoborem FFAR4 wykazywały zmniejszoną preferencję do FA. Sugeruje to, że nadekspresja FFAR4 w kubkach smakowych może prowadzić do nadmiernego spożycia lipidów, a w konsekwencji do otyłości.

- **Układ nerwowy**

Pomimo wykrycia ekspresji FFAR4 w OUN, jego rola pozostaje słabo poznana. Odpowiedź zapalna podwzgórza spowodowana nadmiernym spożyciem energii jest związana z indukcją otyłości i rozwojem cukrzycy typu 2. Wykazano, że domózgowe wstrzyknięcie agonisty FFAR4 GPR120 III zmniejsza pobór pokarmu i hamuje działanie nagradzające diety wysokotłuszczowej u myszy. W związku z tym sygnalizacja FFAR4 może poprawić zachowania żywieniowe i homeostazę energetyczną poprzez osłabienie neurozapalenia, chociaż wiadomo, że obwodowy FFAR4 kontroluje te funkcje poprzez regulację wydzielania hormonów jelitowych.

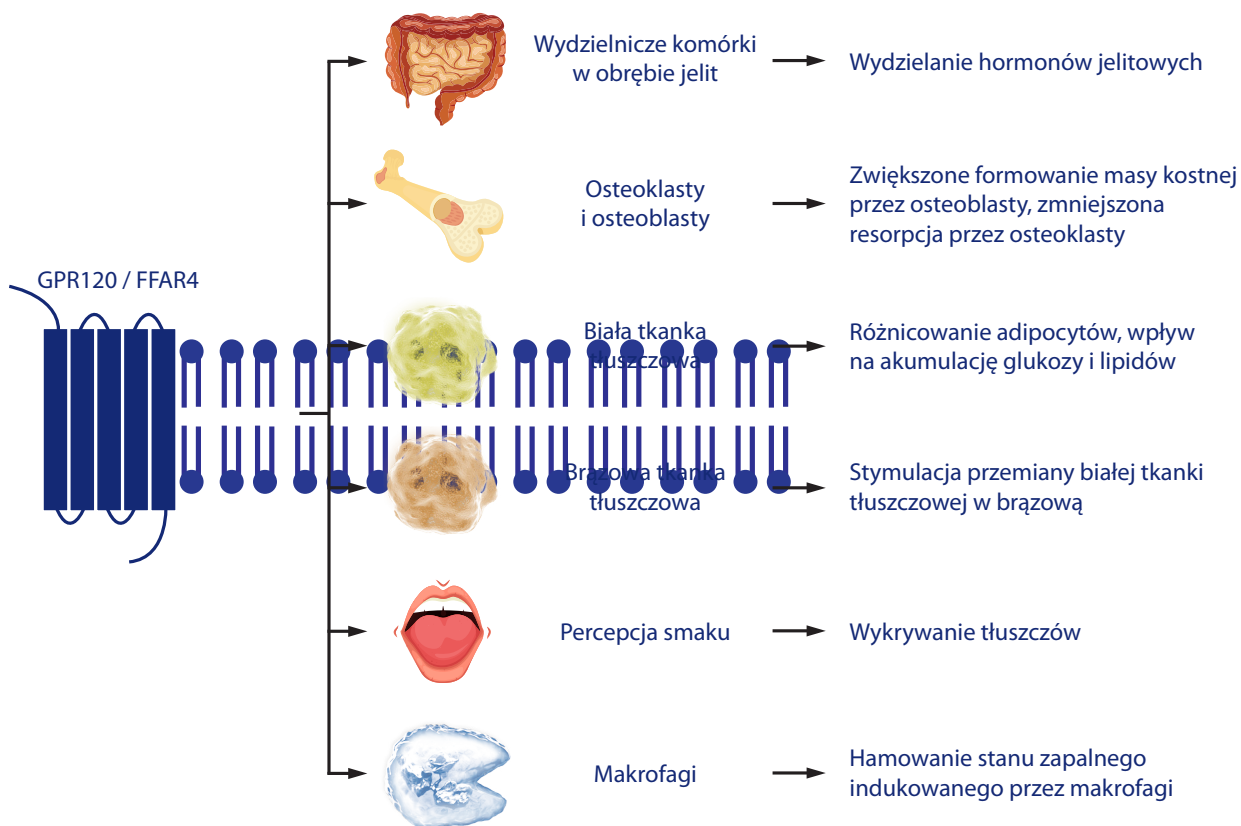
## **Zastosowanie terapeutyczne**

Wykazano, że w porównaniu z myszami typu dzikiego karmionymi HFD, myszy karmione w ten sam sposób, ale z niedoborem FFAR4, wykazywały poważne fenotypy otyłości, w tym zwiększoną masę ciała, stłuszczenie wątroby, lipogenezę i zwiększony stan zapalny w obrębie tkanki tłuszczowej. Co więcej, ekspresja FFAR4 w tkance tłuszczowej jest istotnie wyższa u osób otyłych niż u szczupłych. Sugeruje to, że FFAR4 jest potencjalnym celem dla leków w otyłości i cukrzycy typu 2.

Ponieważ wiele badań wskazuje, że FFAR4 odgrywa istotną rolę we wrażliwości na insulinę, syntetyczne ligandy FFAR4, takie jak TUG-891 i GW9508, są wskazywane jako potencjalne środki lecznicze w cukrzycy i otyłości; jak dotąd nie rozpoczęto jednak badań klinicznych. Zarówno TUG-891, jak i GW9508 mogą zwiększać wychwyt dezoksyglukozy w adipocytach myszy, jednak efekty te były niewielkie w porównaniu z działaniem insuliny i nie zależały od obecności insuliny. Wyniki te sugerują możliwość addytywnego lub nawet synergistycznego działania tych ligandów FFAR4 z insuliną w leczeniu otyłości lub cukrzycy.

GSK137647 z kolei jest silnym i selektywnym agonistą FFAR4, który wykazuje ponad 50-krotnie wyższą selektywność dla FFAR4 niż dla FFAR1 u różnych gatunków. Wykazano, że GSK137647 i DHA zwiększają uwalnianie insuliny z komórek gryzoni, poprawiając poposiłkową hiperglikemię u myszy z cukrzycą.

Wyniki te przemawiają za tym, że agoniści FFAR4 mogą być wykorzystywani jako leki uwrażliwiające na insulinę w leczeniu zaburzeń metabolicznych, takich jak otyłość i cukrzyca, jednak dalsze badania są niezbędne do skutecznego ich rozwoju.



Rysunek 2. Fizjologiczne oddziaływanie receptora FFAR4.

## Receptor FFAR2/GPR43

FFAR2 jest aktywowany przez SCFA: octan (C2), propionian (C3) i maślan (C4). Siła działania poszczególnych SCFA w aktywacji FFAR2 u ludzi jest uporządkowana jako  $C2 = C3 > C4 > \text{inne SCFA}$ . Aktywacja FFAR2 przez SCFA za pośrednictwem rodziny Gi/o białek G hamuje produkcję cAMP i aktywuje kaskadę ERK, podczas gdy aktywacja FFAR2 przez SCFA za pośrednictwem rodziny Gq białek G powoduje wzrost poziomu wapnia i promuje aktywację kaskady MAPK. Sygnalizacja FFAR2 hamuje translokację jądrową NF- $\kappa$ B, zmniejszając w ten sposób ekspresję cytokin zapalnych, takich jak IL-1 i IL-6 w komórkach HeLa transfekowanych FFAR2.

- **Wydzielanie hormonów jelitowych**

W jelitach FFAR2 bierze udział w regulacji apetytu i sygnalizacji insulinowej. Jelito pełni kluczową rolę w homeostazie energetycznej poprzez wydzielanie hormonów inkretynowych i wchłanianie składników odżywczych. Wykazano, że myszy pozbawione FFAR2 i FFAR3 wykazywały zmniejszoną sekrecję GLP-1 indukowaną SCFA i upośledzoną tolerancję glukozy. Stymulacja wydzielania GLP-1 przez FFAR2 kontroluje homeostazę energetyczną i może być wykorzystana w leczeniu zaburzeń metabolicznych, takich jak otyłość i zespół metaboliczny.

- **Adipogeneza i kumulacja lipidów**

FFAR2 ulegają ekspresji w adipocytach, gdzie regulują adipogenezę i patogenezę chorób, chociaż w literaturze istnieją sprzeczne doniesienia co do dokładnych mechanizmów leżących u podstaw tych efektów. Ostatnie badania wykazały, że FFAR2 jest zaangażowany w regulację akumulacji energii w tkankach tłuszczowych i przyczynia się do rozwoju otyłości. Podjęto próbę wyjaśnienia roli FFAR2 w adipocytach i wykazano, że ekspresja FFAR2 w białej tkance tłuszczowej myszy z otyłością indukowaną HFD (41 kcal% tłuszczu) była znacząco wyższa niż u myszy karmionych standardowo. Ponadto, chociaż aktywacja FFAR2 poprzez dootrzewnowe wstrzyknięcie octanu sodu prowadziła do szybkiego obniżenia poziomu FA w osoczu *in vivo*, efekt ten był wyeliminowany u myszy pozbawionych FFAR2.

SCFA są wytwarzane w wyniku mikrobiologicznej fermentacji błonnika pokarmowego w jelitach. U myszy z niedoborem FFAR2 karmionych HFD (60 kcal% tłuszczu) indukowana jest otyłość, podczas gdy myszy z nadekspresją FFAR2 w tkance tłuszczowej były szczupłe w normalnych warunkach. Jednakże antybiotykoterapia eliminowała te cechy u obu szczepów myszy. Co więcej, aktywacja FFAR2 przez SCFA zmniejszała sygnalizację insulinową i hamowała gromadzenie tłuszczu w tkance tłuszczowej. Niewprowadzona glukoza i lipidy były wykorzystywane głównie przez tkankę mięśniową. Tak więc szlak FFAR2-insulina może odgrywać kluczową rolę w tkance tłuszczowej, służąc jako fizjologiczny mechanizm regulacji równowagi energetycznej. Wyniki te wskazują, że FFAR2 jest potencjalnie istotny w leczeniu otyłości i T2D. FFAR2 może wywierać fizjologiczne efekty w zależności od warunków energetycznych i stanu odżywienia organizmu, a tym samym przyczyniać się do utrzymania homeostazy energetycznej.

- **Działanie przeciwzapalne**

Wstępne badania wykazały, że FFAR2 ulega ekspresji w tkankach układu odpornościowego, takich jak śledziona, oraz w komórkach układu odpornościowego, takich jak neutrofile, co sugeruje, że SCFA odgrywają ważną rolę w odpowiedzi immunologicznej. Ekspresja FFAR2 jest również zwiększona w okresie dojrzewania pewnych typów komórek odpornościowych. Chociaż w kilku badaniach wykazano udział FFAR2 w zwalczaniu stanu zapalnego, to wyniki tych badań były rozbieżne co do potencjalnego udziału FFAR2 w chorobach zapalnych. Z jednej strony wykazano, że myszy z niedoborem FFAR2 wykazywały pogorszenie stanu zapalnego w mysich modelach zapalenia stawów, zapalenia jelita grubego i astmy, podczas gdy myszy typu dzikiego wykazywały odpowiednio zaostrożony stan zapalny. Wyniki te wyraźnie wskazują, że FFAR2 pośredniczy w korzystnym wpływie SCFA, które są obecne w diecie wysokobłonnikowej, na układ odpornościowy i stan zapalny. Co więcej, FFAR2 może odgrywać rolę w rekrutacji komórek zapalnych. W kilku badaniach wykazano, że FFAR2 jest związany z migracją leukocytów i wydzielaniem cytokin, co również sugeruje, że przeciwzapalne działanie SCFA jest mediowane przez FFAR2.

Wykazano również, że interakcje SCFA–FFAR2 w komórkach nabłonka jelitowego pośredniczą w ochronnym działaniu diety i mikrobioty poprzez modulację odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Wykazano, że wiązanie SCFA z FFAR2 na komórkach nabłonka jelita grubego łagodzi zapalenie w jego obrębie. Ostatnie badania wykazały również, że SCFA, produkowane przez mikrobiotę jelitową jako produkty fermentacji błonnika pokarmowego, promowały produkcję IL-10 przez komórki Th1, hamując w ten sposób patogenne zapalenie jelita grubego.

- **Układ nerwowy**

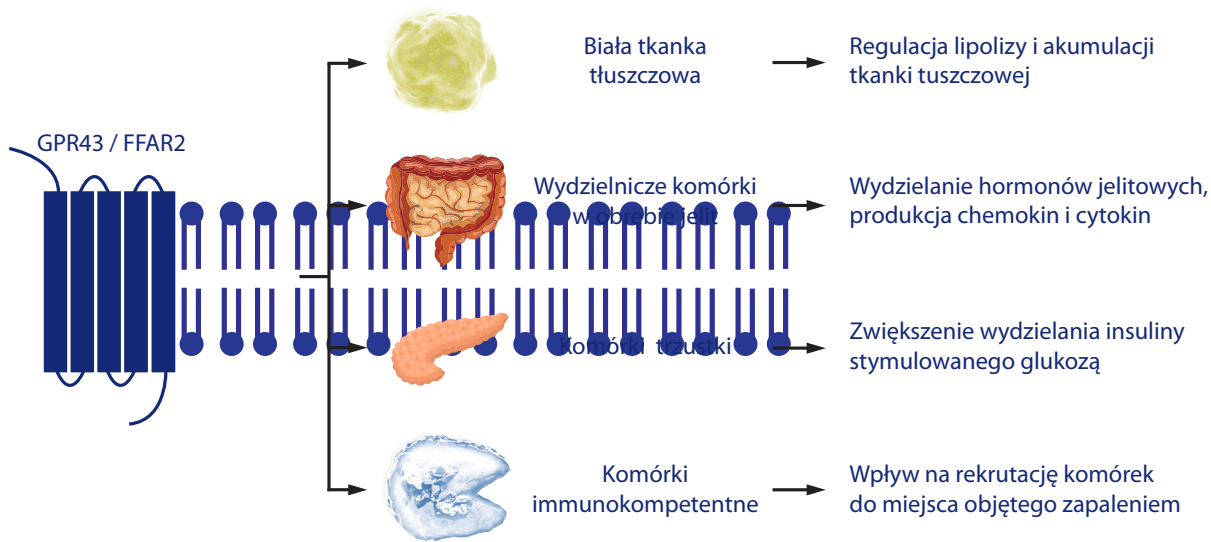
Układ nerwowy jest zaangażowany w homeostazę metaboliczną poprzez wyczuwanie obwodowych cząsteczek sygnałowych pochodzących z przyjmowanego pokarmu. Ostatnie badania sugerują, że SCFA i ciała ketonowe wpływają na funkcjonowanie mózgu poprzez stymulację obwodowego układu nerwowego lub odbudowę środowiska immunologicznego w mózgu. Propionian zwiększa wychwyt noradrenaliny, podczas gdy  $\beta$ -hydroksymaślan hamuje aktywność współczulnego układu nerwowego. Co więcej, istnieje wiele dowodów na to, że SCFA silnie wpływają na stan immunologiczny w mózgu. Obwodowe komórki immunologiczne wykazujące ekspresję FFAR2 mogą przedostawać się do mózgu przez barierę krew-mózg po przyjęciu SCFA, co sugeruje, że interakcje SCFA-FFAR2 są potrzebne do prawidłowego funkcjonowania mózgu. Warto zauważyć, że SCFA bezpośrednio przekraczają barierę krew-mózg i regulują funkcję lub dojrzewanie mikrogleju w mózgu. Dlatego też SCFA mogą kontrolować aktywność mikrogleju poprzez inne obwodowe komórki mieloidalne wykazujące ekspresję FFAR2. Zależny od FFAR2 wpływ SCFA na funkcje fizjologiczne gospodarza znacznie wybiega poza samo oddziaływanie na OUN.

## **Zastosowanie terapeutyczne**

Stymulacja FFAR2 przez propionian powoduje wydzielanie GLP-1 i PYY. Ponadto, traktowanie adipocytów octanem hamuje lipolizę i uwalnianie glicerolu, a aktywacja FFAR2 przez dootrzewnowe wstrzyknięcie octanu sodu prowadzi do szybkiego wzrostu stężenia FA w osoczu in vivo. Szczegółowe zbadanie funkcji FFAR2 w chorobach było dotychczas trudne ze względu na małą siłę działania jego endogennych ligandów. Jednakże, w kilku badaniach zidentyfikowano i scharakteryzowano związki selektywne dla FFAR2, co umożliwiło opracowanie selektywnych agonistów lub antagonistów FFAR2. GLPG0974, cząsteczka opracowana przez firmę Galapagos (Mechelen, Belgia), jest dostępnym doustnie inhibitorem FFAR2 o małej cząsteczce, który znalazł się w II fazie badań klinicznych w leczeniu nieswoistych zapaleń jelit. Niektórzy z tych agonistów i/lub antagonistów FFAR2 mogą w niedalekiej przyszłości znaleźć zastosowanie terapeutyczne w leczeniu cukrzycy typu 2.

Zaprojektowanie selektywnych modulatorów FFAR2 wymaga scharakteryzowania ortosterycznych i allosterycznych miejsc wiążących, w tym zidentyfikowania wymagań selektywnego działania FFAR2 (a nie FFAR3). Stwierdzono, że obecność dwóch arginin i jednej histydyny jest kluczowa dla rozpoznawania SCFA przez ludzkie ortologi obu receptorów. SCFA wywierają różnokierunkowe działania za pośrednictwem wielu szlaków, dlatego też konieczne jest opracowanie selektywnych agonistów i antagonistów FFAR2 w celu zidentyfikowania korzystnych efektów, które mogą być zależne od wiązania SCFA z FFAR2 oraz zbadania potencjału terapeutycznego modulacji aktywności FFAR2.





Rysunek 3. Fizjologiczne oddziaływanie receptora FFAR2.

## Receptor FFAR3/GPR41

FFAR3, o którym donoszono, że przyczynia się do regulacji homeostazy energetycznej został w pełni zidentyfikowany w 2003 roku jako receptor dla SCFA. FFAR3 jest aktywowany przez SCFA takie jak propionian (C3), maślan (C4) i walerian (C5), które są wytwarzane w wyniku bakteryjnej fermentacji błonnika pokarmowego w jelicie grubym. Jednakże FFAR3 wykazuje silniejszą odpowiedź na dłuższe SCFA, takie jak walerian i kapronian (C6), niż ta wykazywana przez FFAR2. Stymulacja FFAR3 za pomocą SCFA hamuje produkcję cAMP i promuje fosforylację ERK1/2. Co więcej, odpowiedzi te są hamowane przez leczenie toksyną krztuścową, co wskazuje, że FFAR3 jest sprzężony z Gi/o. Ponadto stwierdzono, że FFAR3 ulega ekspresji w różnych tkankach organizmu, w tym w tkance tłuszczowej, jelitach, obwodowym układzie nerwowym i komórkach układu odpornościowego, oraz że pośredniczy w systemowej homeostazie energetycznej poprzez sygnalizację indukowaną SCFA.

- **Wydzielanie adipokiny**

Aktywacja FFAR3 przez propionian (C3) prowadzi do uwalniania leptyny przez tkanki tłuszczowe. Przeciwnie, wyciszenie mRNA FFAR3 przez siRNA zmniejszało wydzielanie leptyny przez tkanki tłuszczowe. Wykazano również, że zależny od propionianu wzrost sekrecji leptyny może być zahamowany przez wstępne podanie inhibitora proteiny Gi/o - toksyny krztuścowej. W toku badań odkryto, że octan, ale nie maślan, stymuluje uwalnianie leptyny przez krezkowe adipocyty u myszy. FFAR3 jest aktywowany zarówno przez octan, jak i maślan z równą siłą, podczas gdy FFAR2 jest aktywowany przez octan, a nie maślan. Odkrycia te wskazują, że stymulowane przez SCFA wydzielanie leptyny odbywa się za pośrednictwem FFAR2.

- **Wydzielanie hormonów jelitowych**

Ekspresja FFAR3 została potwierdzona w kilku typach komórek w jelitach. W porównaniu z myszami typu dzikiego, myszy pozbawione FFAR3 wykazywały zmniejszoną masę ciała i masę tłuszczu. Różnice te zostały wyeliminowane u myszy pozbawionych mutacji, co wskazuje, że funkcja FFAR3 zależy od SCFA produkowanych w wyniku fermentacji błonnika przez mikrobiotę jelitową. FFAR3 ulega również ekspresji w komórkach enteroendokrynych L wydzielających peptyd YY (PYY, pobudzający uczucie sytości). Wykazano bowiem, że wydzielanie GLP-1 i PYY było zmniejszone u myszy pozbawionych FFAR3, chociaż delecja FFAR3 nie miała wpływu na ilość pokarmu spożywanego przez myszy.

Wykazano także, że doustne podanie węglowodanów hamuje wydzielanie białka GIP na szlaku mikrobiota/SCFA/FFAR3. Uważa się, że mechanizmy indukowanego węglowodanami wydzielania obu inkretyn: GLP-1 i GIP są podobne. Chociaż jednocześnie podawanie maltozy i inhibitora: glukozydazy miglitolu zwiększało stężenie SCFA w osoczu, myszy wykazywały przeciwstawne odpowiedzi sekrecyjne w odpowiedzi na jednocześnie podawanie maltozy i miglitolu, stymulujące dla GLP-1, ale hamujące dla GIP. Tłumienie GIP przez maltozę plus miglitol nie było obserwowane u myszy z niedoborem FFAR3, ale u myszy z niedoborem FFAR2. Co więcej, poziom chemokin i cytokin wzrastał po stymulacji komórek nabłonka jelitowego SCFA, a rekrutacja leukocytów i skuteczna aktywacja komórek T były indukowane u myszy z niedoborem FFAR3.

- **Układ nerwowy**

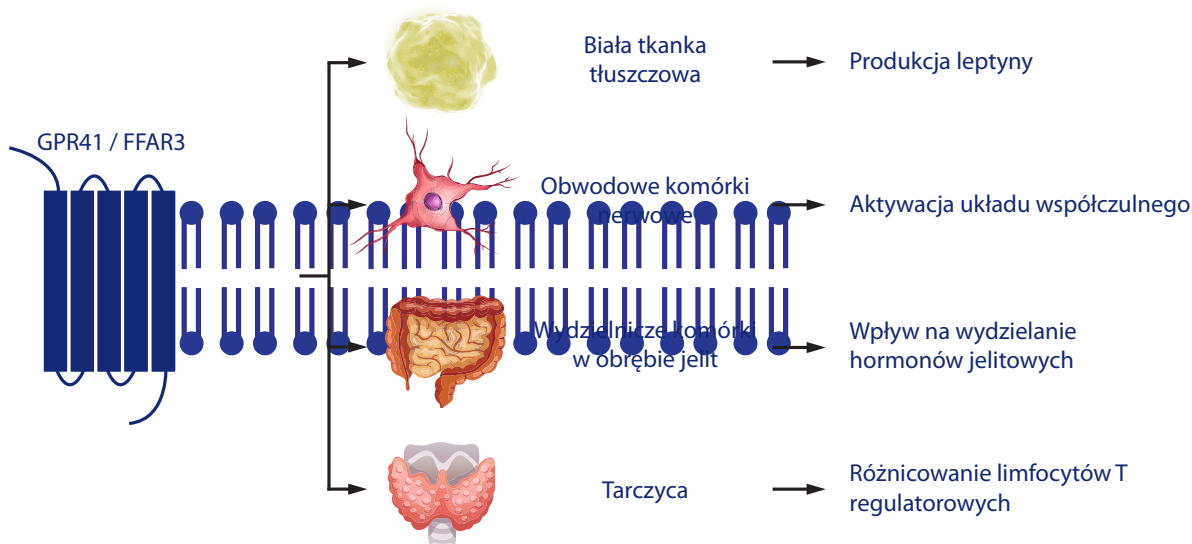
Wykazano, że FFAR3 w dużej ilości występuje w układzie współczulnym myszy. U dorosłych myszy z niedoborem FFAR3 obserwowano zmniejszenie uwalniania noradrenaliny i częstości akcji serca. Co więcej, podawanie propionianu zwiększało wydatek energetyczny i częstość akcji serca u dorosłych myszy typu dzikiego, czego nie obserwowano u myszy z niedoborem FFAR3. Co więcej, wpływ propionianu na częstość akcji serca był tłumiony przez wstępne leczenie blokerem receptorów  $\beta$ -adrenergicznych. Obserwacje te sugerują, że propionian działa na współczulny układ nerwowy za pośrednictwem. FFAR3 zwiększa również wrażliwość na insulinę poprzez obwód neuronalny jelitowo-mózgowy, co wiąże się z aktywacją nerwu obwodowego FFAR3 przez SCFA produkowane przez mikrobiotę jelitową z pożywienia. FFAR3 ulega również ekspresji w komórkach trzustki mysiej i ludzkiej, jak również w linii komórek trzustki mysiej MIN6 i ludzkiej linii komórek trzustki EndoC-H1, co sugeruje, że bezpośrednio reguluje wydzielanie insuliny. Tak więc SCFA wywierają korzystny wpływ na metabolizm za pośrednictwem FFAR3 poprzez obwodowy układ nerwowy i wydzielanie insuliny w komórkach trzustki.

- **Układ odpornościowy**

Ekspresję FFAR3 obserwuje się również w śledzionie oraz w niektórych komórkach odpornościowych biorących udział we wrodzonej i nabytej odporności. SCFA, takie jak propionian, mogą wywierać wpływ na ogólnoustrojowe komórki wrodzone i podkreślają silny związek pomiędzy spożyciem błonnika pokarmowego a wieloma rodzajami odpowiedzi immunologicznej stymulowanej przez komórki dendrytyczne i makrofagi. Wykazano, że sygnalizacja FFAR3 przez SCFA zmienia hematopoezę szpiku kostnego, co następnie wpływa na rozwój komórek Th2 i zapalenie dróg oddechowych w modelach choroby alergicznej. Potwierdzono również rolę propionianu i jego receptora FFAR3 w generowaniu prekursorów makrofagów i komórek dendrytycznych. Udowodniono również, że zmiany metaboliczne i funkcjonalne w komórkach T CD8+ są częściowo mediowane przez SCFA za pośrednictwem FFAR3. Sugeruje się, że SCFA pochodzące z błonnika pokarmowego chronią przed przewlekłym stanem zapalnym i zapobiegają infekcjom wirusowym za pośrednictwem FFAR3.

## **Zastosowanie terapeutyczne**

FFAR3 przyczynia się do zachowania homeostazy energetycznej poprzez modulację aktywności współczulnej. W celu dokładnego określenia potencjału FFAR3 jako celu terapeutycznego w cukrzycy typu 2 konieczne jest opracowanie selektywnych ligandów FFAR3.



Rysunek 4. Fizjologiczne oddziaływanie receptora FFAR3.

## Podsumowanie

Ostatnie dowody wskazują, że różne zaburzenia metaboliczne i immunologiczne są związane z dietą i składem mikrobioty jelitowej. Wiele badań dowiodło, że FFAR są sensorami składników odżywczych ulegającymi ekspresji w różnych tkankach i komórkach oraz że regulują one zarówno metabolizm energetyczny, jak i odpowiedź immunologiczną. Ligandy wykazują szeroki zakres metabolitów, ponieważ FFAR są aktywowane głównie przez FFA, które pochodzą z pożywienia i odpowiednich produktów trawienia lub produktów fermentacji mikrobiologicznej w przewodzie pokarmowym. Ponadto, mimo różnych powinowactw, kilka FFA może aktywować ten sam FFAR, podczas gdy jeden FFA może aktywować kilka FFAR. Badania *in vitro* i *in vivo* wykazały, że fizjologiczne funkcje FFAR ostatecznie przyczyniają się do regulacji metabolizmu i układu odpornościowego. Zmiany w stanie odżywiania, takie jak dieta, post i otyłość, mogą zmieniać proporcje i ilości FFA. Dlatego FFAR utrzymują homeostazę organizmu poprzez regulację procesów biologicznych i wyczuwanie stanów odżywiania.

Podsumowując, dalsza analiza receptorów FFAR może być istotna dla lepszego zrozumienia procesów odżywiania i opracowania związków terapeutycznych do leczenia chorób immunologicznych i zaburzeń metabolizmu energetycznego, takich jak otyłość i cukrzyca typu 2. Mimo że udział FFAR w korzystnym wpływie określonych diet pozostaje niejasny, to poznanie mechanizmów leżących u podstaw zależności między dietą a zdrowiem może doprowadzić do opracowania nowych strategii terapeutycznych.



NAD EFEKTAMI ODŻYWIANIA ZGODNEGO Z GENETYKĄ I FIZJOLOGIĄ ORGANIZMU CZŁOWIEKA

- 46 wielośrodkowych badań naukowych u pacjentów
- 52 ekspertyzy i opinie naukowe
- 5 300 pisemnych opinii pacjentów
- infekcje • nowotwory • paradontoza • RZS • łuszczyca • AZS • alergia • choroba wieńcowa • schizofrenia