

# Djelovanje i upotreba ciklosporina A i obilježja *Tolypocladium inflatum* (W.Gams, 1971) - gljive koja ga proizvodi

---

Miličić, Paula

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:166:693021>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-11**

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Science](#)



Sveučilište u Splitu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Odjel za biologiju

Paula Miličić

**Djelovanje i upotreba ciklosporina A i obilježja  
*Tolypocladium inflatum* (W.Gams, 1971) – gljive  
koja ga proizvodi**

Završni rad

Split, 2024.

Sveučilište u Splitu

Završni rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Odjel za biologiju

Ruđera Boškovića 33, 21 000 Split, Hrvatska

## **Djelovanje i upotreba ciklosporina A i obilježja *Tolypocladium inflatum* (W.Gams, 1971) – gljive koja ga proizvodi**

Paula Miličić

### **Sažetak**

Ciklosporin A (CsA) dobiven iz gljive *Tolypocladium inflatum* koju odlikuje produkcija velikog broja sekundarnih metabolita, iznimno je bitan immunosupresivni lijek. Mehanizam biosinteze ovog spoja u *Tolypocladium inflatum* tek je nedavno pobliže opisan, no njegova struktura kao i mehanizam djelovanja podrobno su istraženi te se zna da se on zbog učinkovitog formiranja kompleksa s citosolnim proteinom ciklofilinom veže na kalcineurin te koči njegovu funkciju, čime se zaustavlja aktivacija T stanica u organizmu. Zahvaljujući ovom mehanizmu CsA je izuzetno efektivan immunosupresiv koji se u suvremenoj medicini koristi nakon transplantacije organa kako bi se smanjila mogućnost odbacivanja novog organa zbog imunološke reakcije. Brojna istraživanja dokazala su njegovu efektivnost i kod tretiranja raznih imunoloških bolesti kao što su reumatoidni artritis i lupus, a učinkovitost je pokazao i kod ublažavanja simptoma brojnih dermatoloških bolesti (psorijaze, atopijskog dermatitisa, lichen planusa).

**Ključne riječi:** *Tolypocladium inflatum*, ciklosporin A, immunosupresiv, transplantacija, imunološke bolesti

**Rad sadrži:** 26 strana, 4 grafička prikaza, 40 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Ana Maravić, Prirodoslovno – matematički fakultet Split

**Neposredna voditeljica:** Mia Dželalija, mag. edu. biol. et chem.

**Ocjenjivači:** izv. prof. dr. sc. Ana Maravić, *Prirodoslovno – matematički fakultet Split*

izv. prof. dr. sc. Željana Fredotović, *Prirodoslovno – matematički fakultet Split*

doc. dr. sc. Ivica Šamanić, *Prirodoslovno – matematički fakultet Split*

**Rad prihvaćen:** lipanj, 2024.

University of Split

Bachelor thesis

Faculty of science

Biology department

Ruđera Boškovića 33, 21 000 Split, Croatia

## **Mode of action and use of cyclosporin A and characteristics of *Tolypocladium inflatum* (W.Gams, 1971) - the fungus that produces it**

Paula Miličić

### **Abstract**

Cyclosporin A (CsA), derived from the fungus *Tolypocladium inflatum*, which is characterized by the production of a large number of secondary metabolites, is an extremely important immunosuppressive drug. The biosynthetic mechanism of this compound in *Tolypocladium inflatum* has only recently been elucidated in detail. However, its structure and mechanism of action have been thoroughly researched. It is known that CsA effectively forms a complex with the cytosolic protein cyclophilin, binding to calcineurin and inhibiting its function, thereby preventing T-cell activation in the body. Due to this mechanism, CsA is an exceptionally effective immunosuppressant used in modern medicine to reduce the risk of organ rejection following transplantation due to the immune response. Numerous studies have proven its effectiveness in treating various immune-related diseases such as rheumatoid arthritis and lupus, and it has also shown efficacy in alleviating symptoms of numerous dermatological conditions (psoriasis, atopic dermatitis, lichen planus).

**Key words:** *Tolypocladium inflatum*, Cyclosporin A, Immunosuppressive, Transplantation, Immune Diseases

**Work contains:** 26 pages, 4 figures, 40 references. Original language: Croatian

**Supervisor:** Ana Maravić, PhD, Assoc. Prof., *Faculty of Science University of Split*

**Assistant Supervisor:** Mia Dželalija, M.Sc. in Biology and Chemistry Education

**Reviewers:** Ana Maravić, PhD, Assoc. Prof., *Faculty of Science University of Split*

Željana Fredotović, PhD, Assoc. Prof., *Faculty of Science University of Split*

Ivica Šamanić, PhD, Asst. Prof., *Faculty of Science University of Split*

**Thesis accepted:** June, 2024.

*Ovaj rad, izrađen u Splitu 2024. godine, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ane Maravić i neposredne voditeljice Mie Dželalije, mag. edu. biol. et chem. predan je na ocjenu Odjelu za biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja „prvostupnica biologije“.*

## IZJAVA

Kojom izjavljujem s punom materijalnom i moralnom odgovornošću da sam završni rad s naslovom „Djelovanje i upotreba ciklosporina A i obilježja *Tolypocladium inflatum* (W.Gams, 1971) – gljive koja ga proizvodi“ izradila samostalno pod voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Ane Maravić i neposredne voditeljice - Mie Dželalije mag. edu. biol. et chem. U radu sam primjenila metodologiju znanstvenoistraživačkog rada i koristila literaturu koja je navedena na kraju završnog rada. Tuđe spoznaje, stavove, zaključke, teorije i zakonitosti koje sam izravno ili parafrazirajući navela u završnom radu na uobičajen, standardan način citirala sam i povezala fusnotama s korištenim bibliografskim jedinicama. Rad je pisan u duhu hrvatskog jezika.

Studentica:

Paula Miličić

# Sadržaj

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. RAZRADA TEME.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. POVIJESNI PREGLED UPOTREBE GLJIVA U MEDICINSKE SVRHE.....</b>	<b>2</b>
<b>2.2. TOLYPOCLADIUM INFLATUM (W. GAMS, 1971) .....</b>	<b>4</b>
2.2.1 Nazivlje i obilježja .....	4
2.2.2 Produkcija metabolita i patogenost .....	6
2.2.3 Genom .....	7
<b>2.3. CIKLOSPORIN A .....</b>	<b>8</b>
2.3.1 Struktura i biosinteza.....	8
2.3.2 Mehanizam djelovanja.....	11
<b>2.4. CIKLOSPORIN A U MEDICINI .....</b>	<b>14</b>
2.4.1 Upotreba u transplantaciji organa .....	14
2.4.2 Upotreba u liječenju autoimunih bolesti .....	16
2.4.3 Ciklosporin A u dermatologiji .....	18
2.4.4 Nuspojave.....	20
<b>3. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>22</b>
<b>4. LITERATURA .....</b>	<b>23</b>

# 1.UVOD

Tijekom cijele ljudske povijesti brojne vrste gljiva korištene su u medicinske svrhe. Danas se komercijalno koriste pripravci i lijekovi dobiveni od gljiva zbog njihove sposobnosti proizvodnje raznolikih sekundarnih metabolita koji pokazuju fiziološku aktivnost u ljudskom organizmu. Jedna od često upotrebljivanih gljiva u medicinske svrhe danas je *Tolypocladium inflatum*. Otkrivena krajem dvadesetog stoljeća u Norveškoj, ubrzo nakon samog otkrića (unatoč nesuglasicama oko njene sistematike) stekla je veliku ekonomsku važnost.

Proizvodi mnoštvo kemijskih spojeva koji igraju bitnu ulogu u njezinoj fiziološkoj i ekološkoj funkciji, a najzastupljeniji su spojevi iz skupina ciklosporina i efrapeptina [1].

Za medicinsku upotrebu najvažniji kemijski spoj dobiven iz ove gljive je ciklosporin A (CsA), imunosupresiv koji već desetljećima ima nezamjenjivu ulogu u tretmanu pacijenata nakon transplantacije organa. Transplantacija organa često je jedini način liječenja kod zatajenja organa, ali u prošlosti su postojali veliki problemi s odbacivanjem organa donora zbog imunološke reakcije primatelja. Većina pokušaja transplantacije je nažalost završavala smrtnim ishodom za veliki broj pacijenata. Razvoj imunosupresivnih lijekova poput ciklosporina A spasio je život iznimno velikom broju ljudi te značajno povećao broj uspješnih transplantacija organa diljem svijeta. Danas se ciklosporin A ne koristi samo u transplantacijskoj medicini, već i u liječenju raznih autoimunih bolesti.

Cilj ovog završnog rada je pružiti uvid u značajke *Tolypocladium inflatum*, kao i u imunosupresiv ciklosporin A koji se dobiva iz nje, uključujući njegovu strukturu, mehanizam djelovanja i primjenu u suvremenoj medicini, posebno u liječenju bolesti kod kojih olakšava simptome oboljelima.



## 2. RAZRADA TEME

### 2.1. POVIJESNI PREGLED UPOTREBE GLJIVA U MEDICINSKE SVRHE

Brojne vrste gljiva koristile su se kroz povijest u različite medicinske svrhe, posebice u tradicionalnoj medicini u raznolikim kulturama diljem svijeta [1]. U tradicionalnoj kineskoj medicini vrste poput reishi (*Ganoderma lucidum*), shiitake (*Lentinula edodes*) i maitake gljive (*Grifola frondosa*) korištene su već tisućama godina za jačanje imunološkog sustava, promicanje dugovječnosti i poboljšanje cjelokupnog zdravlja. Reishi je osobito cijenjena gljiva zbog svojih adaptogenih svojstava te se često koristi za pojačavanje metabolizma. U mnogim kulturama autohtonih Amerikanaca koristile su se gljive za koje se znalo da posjeduju tvari koje mogu poboljšati zacjeljivanje rana, a vrste roda *Psilocybe* upotrebljavale su se ceremonijalno zbog svog halucinogenog djelovanja zahvaljujući kojima su kolokvijalno poznate kao „čarobne gljive“ te se za njih vjerovalo da potiču duhovna iskustva i iscjeljenje [2]. U Europi su se gljive poput muhare (*Amanita muscaria*) koristile u tradicionalnoj narodnoj medicini, iako je danas poznato da ih njihova toksična svojstva čine opasnim i neprikladnim za medicinsku upotrebu. Druge netoksične vrste kao što je pureći rep (*Trametes versicolor*) kroz povijest su se koristile zbog svojih svojstava jačanja imuniteta [3].

Gljive sadrže niz bioaktivnih spojeva kao što su polisaharidi, beta-glukani, triterpeni i antioksidansi koji su proučavani zbog svoje potencijalne zdravstvene dobrobiti. To uključuje protuupalna, antimikrobna, imunomodulatorna, pa čak i svojstva protiv raka [4]. Iako je u mnogim povijesnim kulturama postojalo razumijevanje da određene vrste gljiva sadrže spojeve s povoljnim učincima na ljudsko zdravlje, izolacija i proučavanje ovih spojeva relativno su novi u suvremenoj znanosti. Prva kemijska analiza tvari dobivenih iz gljiva najvjerojatnije se odvila tijekom kraja dvadesetog stoljeća. Iako gljive imaju dugu povijest upotrebe u tradicionalnoj medicini, važno je napomenuti da nisu sve sigurne za konzumaciju, a neke mogu biti otrovne ili čak smrtonosne. Stoga je ključno točno identificirati gljive i potražiti smjernice od upućenih izvora prije njihove upotrebe ili konzumacije [1].

Jedan od prvih kemijskih spojeva ekstrahiranih iz gljiva koji se danas koristi u suvremenoj medicini je penicilin dobiven od zelene plijesni kistca (*Penicillium chrysogenum*) (slika 1). Početkom dvadesetog stoljeća (1928. godine) otkrio ga je škotski bakteriolog Alexander Fleming koji je uočio njegova antibiotska svojstva. Ovo otkriće obilježilo je početak ere antibiotika i revolucionariziralo medicinu [5]. Suvremena medicinska istraživanja nastavljaju proučavati potencijalne koristi i rizike povezane s tretmanima temeljenim na gljivama. Posljednjih godina došlo je do ponovnog porasta interesa za ljekovita svojstva spomenutih tvari, što je dovelo do brojnih znanstvenih studija koje istražuju njihovu potencijalnu terapijsku primjenu. Na primjer, spojevi ekstrahirani iz određenih gljiva mogli bi pomoći u liječenju raka, HIV-a, autoimunih bolesti i neuroloških poremećaja [6].



Slika 1: Petrijeva zdjelica koja sadrži medij na kojem se može uočiti efekt penicilina na bakterijske kolonije (izvor: <https://collection.sciencemuseumgroup.org.uk/objects/co425573/petri-dish-showing-the-effect-of-penicillin-on-bacteria-united-kingdom-1944-petri-dish>)

## 2.2. *TOLYPOCLADIUM INFLATUM* (W. GAMS, 1971)

### 2.2.1 Nazivlje i obilježja

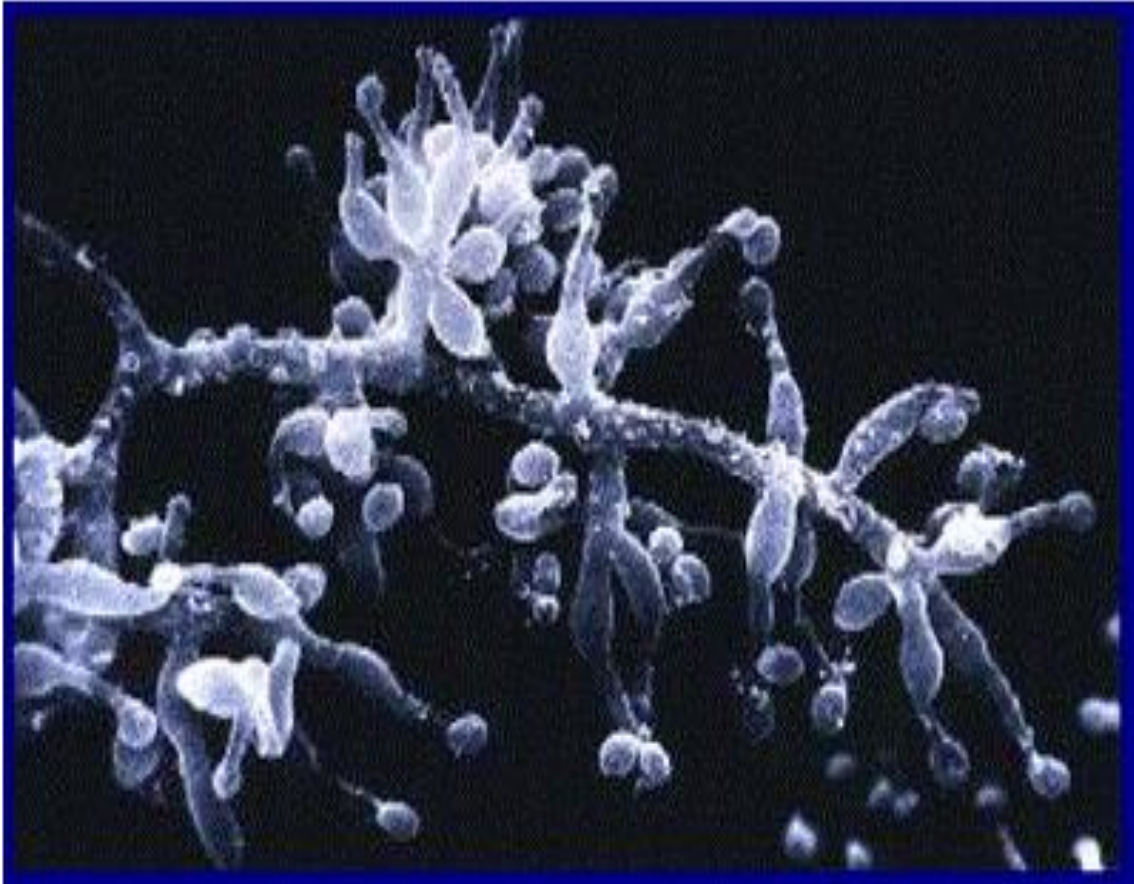
Ovu mikrogljivu otkrio je Hans Peter Frey 1969. godine u uzorku zemlje uzetom s planinske visoravni Hardangervidda u Norveškoj, te je odnio uzorak u Švicarsku na farmaceutsku analizu. Naknadno je utvrđeno da *Tolypocladium inflatum* proizvodi ciklosporin, imunosupresiv s pozitivnim učinkom na pacijente s transplantiranim organima [7]. U spolnom stadiju (teleomorf) parazit je na skarabejima te formira mali, složeni askokarp koji nastaje iz ostataka kukca domaćina. U nespolnom stadiju (anamorf) uočena je kao bijela plijesan koja raste na tlu te je ovaj oblik puno zastupljeniji i izvorno je upravo on dobio naziv *Tolypocladium inflatum*.

Godine 1971. austrijski mikolog, Walter Gams, ponovno je identificirao prvotno otkriveni izolat kao prethodno nepoznatu mikrogljivu koja pripada redu *Hypocreales*. Predložio je rod *Tolypocladium* kako bi u njega smjestio izolat kojeg je nazvao *Tolypocladium inflatum* Gams [8]. Kanadski mikolog John Bissett ponovno je ispitao soj 1983., otkrivši da odgovara vrsti *Pachybasium niveum*, gljivici opisanoj prije rada Waltera Gamsa. Prema pravilima o prioritetu objavljivanja za botaničku nomenklaturu, bila je predložena kombinacija imena - *Tolypocladium niveum*. Međutim, zbog ekonomske važnosti gljive za farmaceutsku industriju i činjenice kako se netočan naziv već dobro ustalio, napravljen je i prihvaćen prijedlog da se naziv *Tolypocladium inflatum* formalno sačuva u odnosu na ranija imena [8].

Unatoč brojnim nesuglasticama i predlaganjima novih imena za ovu vrstu, njena obilježja su detaljno i suglasno opisana. *Tolypocladium inflatum* najčešće se nalazi u gornjim slojevima zemlje u hladnim, planinskim područjima. Razlikuje se od srodnih vrsta po gotovo sferično nabreklih fialidama i malim, subgloboznim konidijama. Konidiofori su složeni razgranati nego kod većine drugih bliskih vrsta, a fialide su često raspoređene u zbijenim vertikulama (slika 2).

Osim u Norveškoj, ova vrsta zabilježena je u Sjedinjenim Američkim Državama, Zapadnoj Njemačkoj te u Danskoj [8]. Osm sojeva uz neotip izolirano je 1968. i 1971. iz alpskog tla Mt. Allen na nadmorskoj visini od 1900 i 2530 metara. Znanstvenici su izolirali *Tolypocladium*

*inflatum* iz površinskog dijela mezičnog livadskog tla na otoku Devon, N.W.T., Kanada [8]. Vrsta je izolirana i iz tla u planinskom području Makal u Nepalu, a pronađena je i u uzorcima planinskog tla u Čehoslovačkoj [8].



Slika 2: Prikaz strukture *Tolypocladium inflatum* pod elektronskim mikroskopom  
(izvor: <https://alchetron.com/Tolypocladium-inflatum>)

## 2.2.2 Produkcija metabolita i patogenost

Većina gljiva je poznata po prolifichnoj produkciji metabolita koji su od izuzetne važnosti u komercijalno bitnim proizvodima kao što su razni farmaceutski proizvodi, antibiotici te mikoinsekticidi. *Tolypocladium inflatum* pripada redu gljiva *Hypocreales* te proizvodi mnoštvo raznolikih sekundarnih metabolita, a među njima se posebno ističu dvije važne skupine, ciklosporini i efraptini [9]. Imunosupresivni spoj ciklosporin A intenzivno se koristi za sprječavanje odbacivanja transplantiranih organa i ima potencijalnu primjenu u liječenju raznih autoimunih bolesti te također ima antifungalna i insekticidna svojstva [9]. Efraptini su snažni inhibitori mitohondrijskih i drugih prokariotskih ATPaza te također imaju antifungalno i insekticidno djelovanje. Uloga ovih moćnih spojeva u ekologiji vrste *Tolypocladium inflatum* malo je shvaćena.

Uz ciklosporine i efraptine, ova gljiva sintetizira niz drugih proizvoda putem neribosomalno sintetiziranih peptida (NRPS) i poliketid sintetaza (PKS), druge klase multimodularnih enzima uključenih u proizvodnju sekundarnih metabolita u bakterijama i gljivama. Poznato je da druge hipokrealne gljive proizvode NRPS ili PKS proizvode s djelovanjem protiv insekata, kao što su destruksini i ergot alkaloidi. Mnogi od ovih spojeva također imaju farmaceutsku primjenu i/ili ulogu u antibiozi, patogenezu i kompetitivnim interakcijama između organizama [10].

Budući da u spolnom stadiju *Tolypocladium inflatum* parazitira na kukcima, neki su znanstvenici sugerirali da je prvotno bila patogen insekata te naknadno evoluirala i uspjela preživjeti u nespolnom stadiju fakultativnog saprobionta. Iako se nije pokazalo da utječe na nematode, istraživači su pretpostavili da bi vrsta *Tolypocladium inflatum* mogla imati oblike kao alternativnog domaćina [9]. Također je dokazana proizvodnja tvari koje inhibiraju *in vitro* rast niza gljivičnih vrsta. Neki također sugeriraju sposobnost inhibiranja određenih gljivičnih biljnih patogena u kolonizaciji njihovih domaćina, na primjer, *Tolypocladium inflatum* je imao mali, ali značajan učinak na inhibiciju stvaranja mikorize u eksperimentu u kojem se testirala sposobnost vrsta ovog roda da inhibiraju rast drugih vrsta gljiva [11]. Nadalje, sekundarni metaboliti izolirani iz sirovog ekstrakta navedene gljive pokazali su umjerenu citotoksičnost protiv osam staničnih linija ljudskih tumora uključujući A549 (ljudski adenokarcinom pluća), A375 (ljudski maligni melanom) i MCF-7 (ljudski rak dojke) [11].

### 2.2.3 Genom

Istraživanje genoma jednog sekvenciranog uzorka *Tolypocladium inflatum* NRRL 8044 (ATCC 34921) pokazalo je da ova gljiva posjeduje 6 kromosoma veličine od 3,8 do 6,6 Mb i mali prekobrojni kromosom od 1 Mb s ukupnom veličinom genoma od približno 30,45 Mb [12]. Prosječna duljina gena (1,67 kb), duljina egzona (570 bp) i duljina introna (77,5 bp) slična je procjenama za druge vrste *Ascomycota*, ali *Tolypocladium inflatum* ima viši prosječni GC sadržaj (58%) i kompaktniji genom s većom gustoćom gena (329 gena/Mb) od blisko srodnih filamentnih askomiceta [12]. Ima relativno kompaktan genom budući da je udio ponavljajućih sekvenci otprilike 1.24% u novijim studijama, dok se u starijim eksperimentima ovaj podatak navodi kao 1%, oba broja su relativno niska u usporedbi s drugim nitastim askomicetama. Ukupno *Tolypocladium inflatum* sadržava nešto veći broj retrotranspozona u usporedbi s DNA transpozonomima [13].

Istraživanja su pokazala da ova gljivična vrsta sadrži velik broj jedinstvenih gena, uključujući one s molekularnom funkcijom aktivnosti transportera (čak 7%), kao i veći udio gena jedinstvenih za vrstu povezanih s transportom (11% u odnosu na 3-4%), ali manji udio gena uključenih u transkripciju ovisnu o DNA (7% naspram 18-23 %) gledajući druge vrste patogene za insekte [14]. Velik udio gena koji se razlikuju unutar reda *Hypocreales* povezan je s membranama, osobito endomembranskim sustavima, što je u skladu s važnošću izlučenih proteina u tim gljivama te ukazuje na prilagodbe gljiva na parazitiranje tijekom života (ili dijela života) na određenoj vrsti kukaca [14].

Ciklosporin A najistraživaniji je spoj ove vrste gljive, sastoji se od 11 različitih komponenti koje proizvodi gen *simA*. Ovaj gen ima modularnu strukturu tipičnu za gene koji stvaraju spojeve u gljivama. Prethodna studija otkrila je da je *simA* vjerojatno evoluirao unutar gljiva te da nije bio prenesen iz bakterija [15]. Razne gljive unutar roda *Hypocreales* proizvode slične ciklosporine, dok samo nekoliko gljiva izvan ove skupine, poput *Aspergillus terreus*, proizvode ciklosporin A. Geni odgovorni za proizvodnju ovih spojeva evoluirali su kroz složen proces dupliranja i spajanja modula. Na primjer, neki dijelovi gena slični su kod različitih gljiva, što ukazuje na zajedničku evolucijsku povijest. Međutim, postoje i razlike koje sugeriraju da svaka gljiva proizvodi svoju jedinstvenu verziju spoja [15].

## 2.3. CIKLOSPORIN A

### 2.3.1 Struktura i biosinteza

Ciklosporin (CSN) prvi je put izoliran i strukturno identificiran kao ciklički undekapeptidni metabolit iz gljivice *Tolypocladium inflatum* ranih 1970-ih. Ciklosporin A razvijen je i odobren kao imunosupresiv koji se koristi u transplantaciji organa 1983. godine, a danas je identificirano više od 30 analoga CsA s različitim biološkim djelovanjem, uključujući imunosupresivna, antifungalna, antivirusna i antiparazitska svojstva [16].

Zbog visoke komercijalne vrijednosti CsA, znanstvenici već desetljećima pokušavaju otkriti njegov biosintetski mehanizam. Početkom 1990-ih kloniran je gen za neribosomalnu peptidnu sintetazu (NRPS) (nazvan *simA*) i funkcionalno je potvrđena njezina uloga u biosintezi CSN-a. Međutim, biosintetski put CSN-a je još uvijek nejasan [17]. CsA (slika 3) sastoji se od 11 aminokiselina, uključujući dva neproteinogena supstrata d-alanin (d-Ala) i (4R)-4-[(E)-2-butenil]-4-metil-l-treonin (Bmt). Alanin racemaza (AlaR) s visokom aktivnošću u pretvorbi l-Ala u d-Ala u jednom istraživanju je bila izolirana iz *Tolypocladium inflatum* i pokazalo se da ima ulogu u biosintezi CSN-a [17]. Na temelju različitih metoda predikcije i analize ekspresije gena predloženo je 10, 14 ili 22 gena za CsA biosintetski klaster gena.

CsA je isprva bio okarakteriziran kao antifungalni spoj koji pomaže *Tolypocladium inflatum* u obrani od drugih organizama no služi i kao faktor virulencije u njenom parazitskom stadiju [18]. Zbog ovih obilježja proizvodnja CsA može biti toksična za samu gljivu koja proizvodi ovaj spoj. Jedan od načina na koji se sprječava negativni učinak spoja na organizam koji ga producira je njegovo vezanje na ciklofilin A (CypA). CypA je vrsta proteina poznata kao peptidil-prolil cis-trans izomeraza (PPIaza), koja katalizira interkonverziju cis i trans izomera prolinskih ostataka u proteinima [18]. Ova je aktivnost važna za pravilno savijanje i funkcioniranje mnogih proteina u stanicama. Kada se CsA veže za CypA, formira se kompleks koji ometa normalnu funkciju CypA. Točnije, CsA blokira aktivno mjesto CypA, sprječavajući ga da katalizira izomerizaciju prolinskih ostataka u ciljnim proteinima. Ova inhibicija aktivnosti CypA ima važne posljedice za stanične procese, uključujući regulaciju imunološkog odgovora [18]. Nije poznato postoji li neki drugi gen

(npr. membranski transporter) koji također doprinosi samotoleranciji/detoksikaciji CsA. Višestruki geni ciklofilina prisutni su u različitim organizmima i utvrđeno je da imaju različite biološke uloge, uključujući toleranciju na stres, prijenos signala, regulaciju gena i patogenezu. Okarakterizirano je 11 gena ciklofilina koji alternativno posreduju u gljivičnoj konidijaciji, otpornosti na toplinu, virulenciji i osjetljivosti/otpornosti na CsA kod patogena na insektima - *Beauveria bassiana*, bliskog rođaka *Tolypocladium inflatum* [18].

Unatoč brojnim pretpostavkama o putu biosinteze ciklosporina A, bolji uvid u nastajanje ovog spoja znanstvenici su dobili tek prije nekoliko godina [19]. Odabrali su deset gena za studije gubitka funkcije isključivanjem krivo označenog artefakta i četiri hipotetska gena. Potvrdili su da faktor transkripcije tipa bZIP (TF) *simL*, ali ne i TF TINF00183, posreduje u regulaciji proizvodnje ciklosporina specifičnoj za put u *Tolypocladium inflatum*. Stoga bi prekomjerna ekspresija *simL*-a mogla znatno povećati biosintetski titar CSN-ova u gljivici, a malo je vjerojatno da geni koji se nalaze uzvodno od *simA* i nizvodno od *simL* pripadaju CsA biosintetskom klasteru [17] [19]. Biosintetski put uključuje višestruke enzimske korake posredovane raznim enzimima kodiranim specifičnim genima. Na primjer, *simA* kodira poliketid sintazu (PKS) odgovornu za sastavljanje ciklosporinske okosnice.

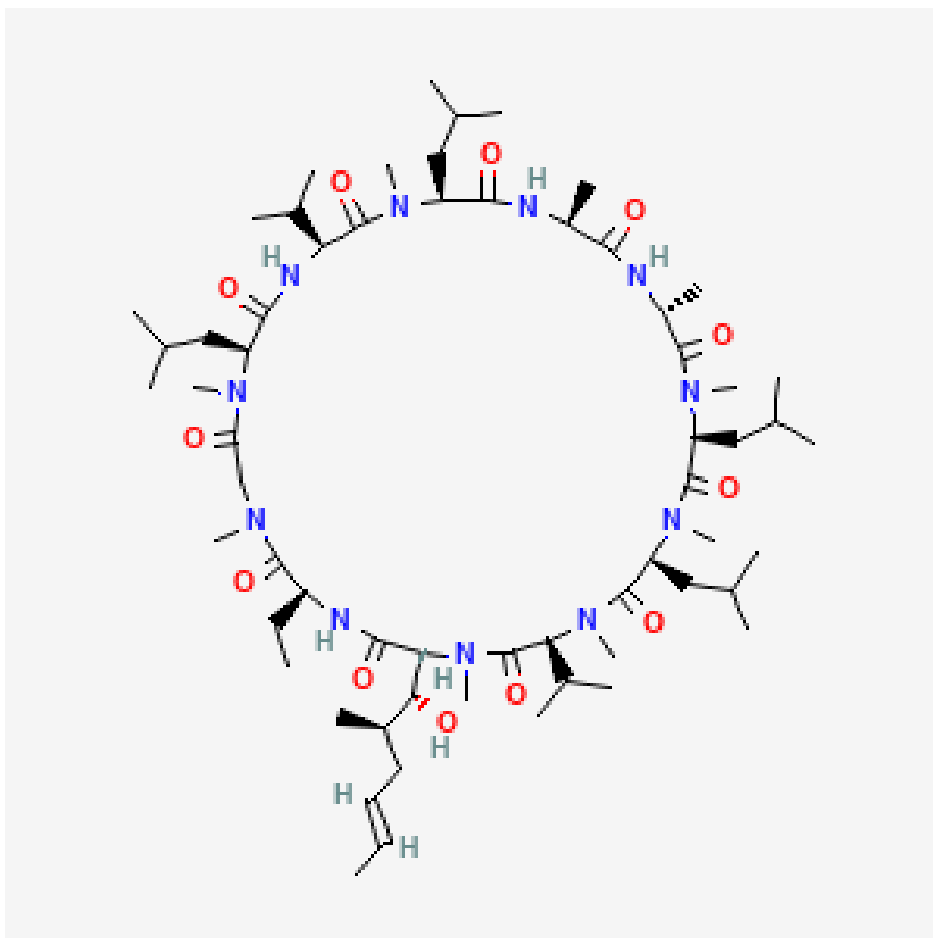
Otkrili su kako brisanje gena *simE* sličnog tioesterazi (TE) nije imalo očigledan učinak na proizvodnju CSN-a u *Tolypocladium inflatum* dok je kod bakterija brisanje slobodnog TE gena unutar klastera značajno smanjilo proizvodnju metabolita. Unatoč ovome, slobodni TE gen može ispuniti funkciju uređivanja tijekom biosinteze metabolita [19].

Devet od jedanaest aminokiselina u CsA su neproteinogene, uključujući d-Ala, Bmt, l-aminomaslačnu kiselinu (Abu), sarkocin (Sar) (N-metilglicin) i N-metilirani leucin i metilvalin. In situ N-metilacija može biti posredovana NM domenama kodiranim u odgovarajućim modulima *simA*. Novo istraživanje genoma pokazalo je da je jedna kopija *AlaR* gena (*simB*) prisutna u genomu ove gljive [20]. Stoga, u skladu s biokemijskom studijom koja je koristila pročišćeni enzim AlaR, testovi brisanja gena i hranjenja supstratom potvrdili su da *simB* doprinosi pretvorbi d-Ala koji ima važnu ulogu u ovom biokemijskom putu jer regulira ekspresiju gena uključenih u samu proizvodnju.



Geni koji kodiraju membranske prijenosnike također mogu biti uključeni u biosintezu ciklosporina, pridonoseći samozaštiti ili detoksikaciji spoja unutar *Tolypocladium inflatum*.

Prikupljeni dokazi dosadašnjih istraživanja pokazuju kako male molekule koje proizvode različite gljive i bakterije igraju važnu ulogu u prilagodbi na okoliš i konkurentskoj prednosti organizama koji proizvode te iste molekule. Međutim, osim uočenih bioloških svojstava, ekološka važnost mnogih metabolita uglavnom je nepoznata [20]. U skladu s imunološkom inhibicijom i insekticidnim učinkom CsA na insekte, brojni biološki testovi na njima otkrili su da je ukidanje proizvodnje CSN-a oslabilo virulentnost gljivica protiv insekata domaćina [19].



Slika 3: Prikaz kemijske strukture ciklosporina A

(izvor: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/cyclosporin-A>)

### 2.3.2 Mehanizam djelovanja

Ciklosporin A naširoko se koristi u medicini kako bi se spriječilo odbacivanje transplantiranih organa ili tkiva. Rane biološke studije otkrile su da CsA inhibira aktivaciju T stanica blokiranjem transkripcije gena citokina (uključujući one IL-2 i IL-4). Nakon ulaska u T stanice, CsA se s visokim afinitetom veže za ciklofiline, posebno za citosolni 17 kDa ciklofilin A koji je najzastupljeniji u T stanicama [21]. Ciklofilini su sveprisutni citosolni proteini koji posjeduju peptidil-prolin-cis-trans izomerazu (PPIazu). Iako CsA inhibira aktivnost PPIaze ciklofilina, inhibicija PPIaze nije uključena u mehanizam imunosupresije jer neki od analoga CsA koji ne uspijevaju blokirati T staničnu aktivaciju još uvijek mogu inhibirati aktivnost PPIaze. Ciklofilin-CsA kompleks, ali ne i sami ciklofilin, može se povezati s drugim citosolnim proteinom – kalcineurinom [22]. Ovaj protein, poznat još i kao PP2B, pripada obitelji serintreonin fosfataza te je njegova aktivnost strogo regulirana količinom kalcija u stanici. Kalcineurin ima ključnu ulogu u regulaciji transkripcijskog faktora NF-AT tijekom aktivacije T-stanica, te u posredovanju odgovora organizama na kationski stres. Sastoji se od dvije podjedinice: katalitičke podjedinice CnA i regulatorne podjedinice CnB. Nakon uključivanja T-staničnog receptora (TCR) s njegovim ligandom, unutarstanične razine kalcija rastu, aktivirajući kalmodulin. Aktivirani kalmodulin tada stupa u interakciju s CnA, otpuštajući njegovu autoinhibitornu domenu i time aktivirajući aktivnost fosfataze kalcineurina. Ovaj aktivacijski korak ključan je za inicijaciju nizvodnih signalnih događaja u aktivaciji T stanica [23].

Interakcija između ciklofilina i CsA tvori kompleks koji se izravno veže na CnA, učinkovito inhibirajući njegovu aktivnost fosfataze. Dodatno, CsA utječe na aktivnosti faktora transkripcije kao što su AP-1, NF- $\kappa$ B i NFAT, koji su ključni za regulaciju transkripcije gena uključenih u imunološke odgovore. Pokazalo se da CsA blokira i p38 signalne putove, koji su bitni za odgovore T stanica. Inhibicijom ovih putova, CsA ometa aktivaciju transkripcijskih faktora kao što je AP-1, čime utječe na obrasce ekspresije gena kritične za aktivaciju i proliferaciju T stanica [23].

Jedna od primarnih meta CsA je NFAT obitelj transkripcijskih faktora. Kada se T stanice aktiviraju antigenima, NFAT proteini se aktiviraju i translociraju u jezgru, gdje se vežu na specifične DNA sekvence koje se nazivaju NFAT elementi odgovora. Ovo vezanje dovodi do transkripcije gena uključenih u razne imunološke funkcije, kao što su proizvodnja citokina, stanična proliferacija i

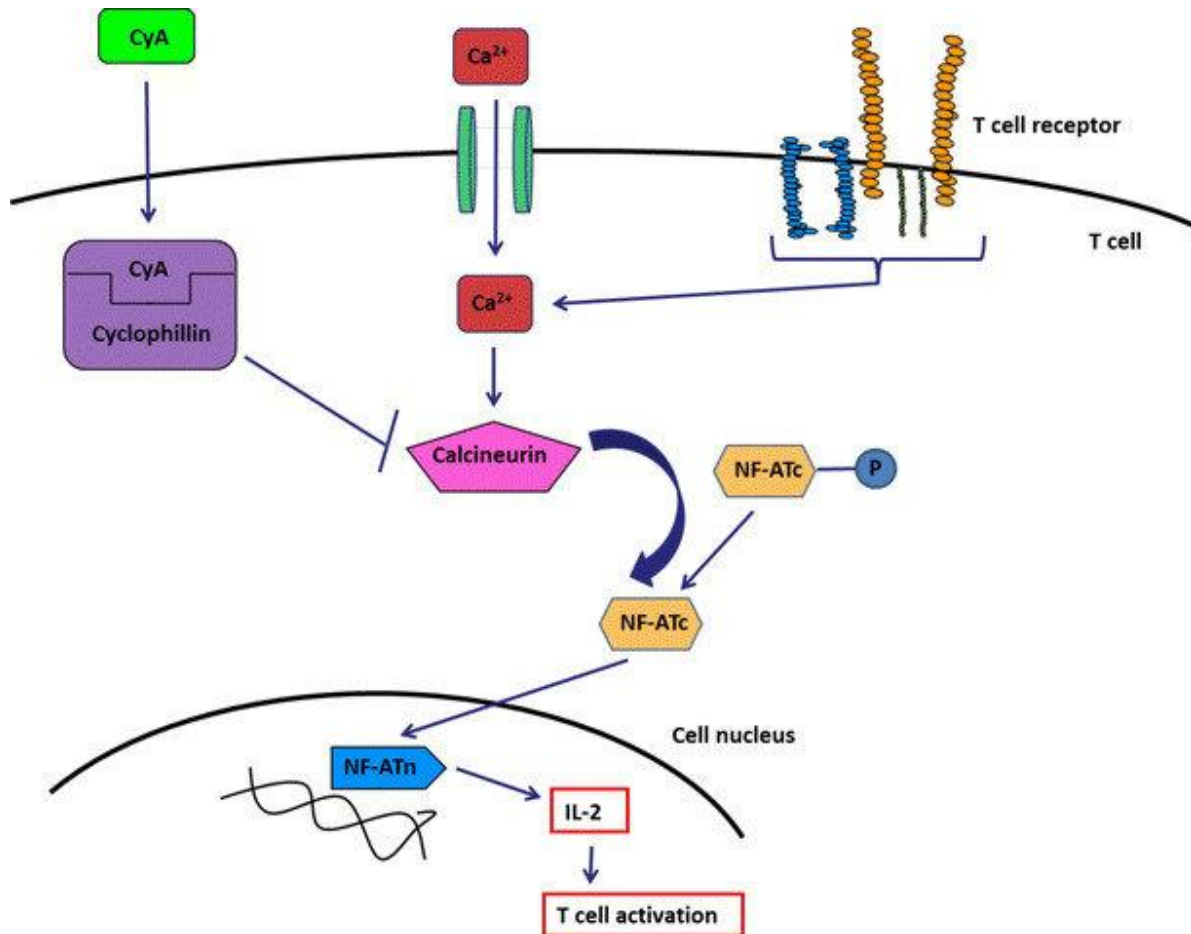
diferencijacija. NFAT proteini su bitni za orkestriranje adaptivnog imunološkog odgovora i regulirani su signalnim putovima kalcija koji se pokreću tijekom aktivacije T stanica.

CsA sprječava defosforilaciju NFAT proteina kalcineurinom, inhibirajući njihovu nuklearnu translokaciju i naknadnu ekspresiju gena. Ova inhibicija NFAT-posredovane transkripcije gena je ključni mehanizam koji leži u osnovi imunosupresivnih učinaka CsA [24]. Unatoč svojim širokim učincima na signalne putove T stanica, CsA ne ometa ERK put. Ova specifičnost omogućuje CsA da selektivno cilja imunološke odgovore posredovane T-stanicama, dok štedi druge stanične procese. Još jedan bitan protein u ovom mehanizmu jest IL-2 (interleukin – 2) koji je ključan u održavanju imunološke homeostaze. Ciklosporin A ispoljava svoje imunosupresivne učinke djelomičnom inhibicijom proizvodnje i signalizacije IL-2, što dovodi do supresije aktivacije i proliferacije T stanica. Ovaj mehanizam pomaže spriječiti odbacivanje kod transplantacije organa i liječiti autoimune bolesti prigušivanjem pretjeranih imunoloških odgovora [23].

Ukratko, CsA ispoljava svoje imunosupresivne učinke ciljanjem višestrukih signalnih putova uključenih u aktivaciju i funkciju T stanica. Njegova specifičnost u inhibiciji imunološkog odgovora naglašava njegovu učinkovitost kao imunosupresivnog sredstva u različitim kliničkim okruženjima [24].

JNK aktivacija odnosi se na proces kojim se protein kinaza JNK (c-Jun N-terminalna kinaza) aktivira unutar stanice. JNK je član obitelji protein kinaze aktivirane mitogenom (MAPK) i igra ključnu ulogu u staničnom odgovoru na stres, upalu i apoptozu. Aktivacija JNK tipično se događa kao odgovor na različite podražaje, uključujući stresore iz okoliša, citokine i faktore rasta [25]. Nakon što se aktivira, JNK fosforilira ciljane proteine nizvodno, što dovodi do modulacije različitih staničnih procesa kao što su ekspresija gena, stanična proliferacija i preživljavanje stanica. Aktivacija JNK je strogo regulirana i uključena je u različite fiziološke i patološke procese.

Aktivacija JNK u T stanicama može biti posredovana različitim putevima, uključujući HPK1 put, koji je neovisan o Rac1. CsA može poremetiti ovaj put, ističući potencijalni terapijski cilj za imunosupresiju [25]. FK506, još jedan inhibitor kalcineurin-NFAT puta, također blokira aktivaciju JNK i p38, što ukazuje na uključenost kalcineurina u ove signalne kaskade. Studije su pokazale da aktivacija kalcineurina u kombinaciji s PKC- $\beta$  dovodi do aktivacije JNK, što ukazuje na složeno međudjelovanje između ovih puteva [25].



Slika 4: mehanizam djelovanja ciklosporina A. Ciklosporin A, Ca<sup>2+</sup> kalcij, NF-ATc-P fosforilirani citoplazmatski nuklearni faktor aktiviranih T stanica, NF-ATc citoplazmatski nuklearni faktor aktiviranih T stanica, NF-ATn nuklearni faktor aktiviranih T stanica, IL-2 interleukin 2 (izvor:[https://www.researchgate.net/figure/Mechanism-of-action-of-cyclosporine-A-CyA-cyclosporine-A-Ca2-calcium-NF-ATc-P\\_fig1\\_306047439](https://www.researchgate.net/figure/Mechanism-of-action-of-cyclosporine-A-CyA-cyclosporine-A-Ca2-calcium-NF-ATc-P_fig1_306047439))

## 2.4. CIKLOSPORIN A U MEDICINI

### 2.4.1 Upotreba u transplantaciji organa

Krajem dvadesetog stoljeća odvijali su se prvi eksperimenti transplantacije posredovane ciklosporinom u životinja, te su pokazali izuzetno dobre rezultate (posebno kod presađivanja dijelova srčanog tkiva u svinja) [26].

Prva uspješna transplantacija ljudskog bubrega zahvaljujući ciklosporinu odvila se 1978. godine u Cambridgeu. Ciklosporin je bio prvi pojedinačni lijek kojim se moglo kontrolirati odbacivanje novog organa/tkiva. Unatoč tome, naknadno praćenje zdravstvenog stanja prvotnih pacijenata tretiranih ciklosporinom pokazalo je brojne negativne učinke za koje se danas smatra da su bili uzrokovani prevelikom dozom samog spoja (25 mg/kg/dan naspram doza koje se trenutno koriste – otprilike 2 do 6 mg/kg/dan) [26]. Kasnije studije pokazale su da je korištenje ciklosporina u kombinaciji s drugim lijekom, prednizonom, smanjilo smrtnost te vrijeme oporavljanja u pacijenata nakon presađnje bubrega. Kod transplantacije jetre, studije su pokazale da je 71% pacijenata preživjelo operaciju te prihvatilo donorski organ bez veće imunološke reakcije uz upotrebu CsA, naspram samo 32% pacijenata koja su imala jednako pozitivan rezultat bez upotrebe istog (u prijašnjim zahvatima) [26]. Jako dobri rezultati postignuti su i u transplantaciji koštane srži te srca. Broj transplantacija srca nakon što je u medicinsku praksu ušla upotreba CsA narastao je s manje od 100 slučajeva godišnje na preko 2000 slučajeva diljem cijelog svijeta. Dokazano je da je ciklosporin bolji lijek od dotadašnjih imunosupresiva zbog manje mijelotoksičnosti i bržeg hematološkog oporavka [26].

Tijekom godina medicinske upotrebe, došlo je do promjena u formulaciji samog lijeka. Prvotna formula bila je bazirana na ulju, dok se danas najviše upotrebljava mikroemulzijska formulacija (Neoral) koja ima veću bioraspoloživost te predvidljiviju brzinu otpuštanja unutar organizma. Uljna formula generalno je imala lošiju stopu uspješnosti zbog veće varijacije djelovanja kod pacijenata kao i pretežno manje bioraspoloživosti [27].

Dodatna poboljšanja nastupila su kada je postalo moguće nadgledati točnu koncentraciju ciklosporina u organizmu dva sata nakon svake doze. Interakcija s drugim lijekovima i spojevima može izuzetno jako utjecati na bioraspoloživost CsA kroz inhibiciju ili indukciju enzima koji su

uključeni u njegov metabolizam. Razinu ciklosporina povećavaju: oralni kontraceptivi, danazol, alopurinol, nikardipin, metoklopramid i amiodaron, dok razinu istog u organizmu smanjuju barbiturati, karbamazepin, rifampicin i bosentan [27]. Transplantacija čitavog organa ključni je tretman za krajnji stadij zatajenja srca, pluća, jetre i bubrega, no odbacivanje ostaje značajan rizik. Današnja istraživanja fokusirana su na poboljšavanje starih i pronalazak novih imunosupresiva, jedni od kojih su inhibitori Janus kinaze (JAK) - učinkoviti u autoimunim bolestima, obećavaju u sprječavanju odbacivanja [28]. U studiji na potpuno nepodudarnim modelima presatka kože i srca, kombinacija baricitiniba s ciklosporinom A značajno je produžila preživljavanje presatka. Kombinacija je smanjila specifičnu populaciju T stanica, izmijenila profile ekspresije imunoloških stanica i potpuno spriječila odbacivanje u presadcima kože 111 dana i srca 28 dana. Ovo ukazuje na potencijal CsA u kombinaciji JAK inhibitora u transplantaciji organa, te današnje studije smatraju da se da ljnji napredak u korištenju CsA može postići kombiniranjem istog s drugim lijekovima [28].

Zbog značajnog utjecaja ovog kalcineurinskog inhibitora na transplantacijsku medicinu, danas je poznato da se ona dijeli na “eru prije ciklosporina” te na “eru ciklosporina” [27].

## 2.4.2 Upotreba u liječenju autoimunih bolesti

Ciklosporin (komercijalno poznat kao Neoral, Sandimmune, Gengraf) koristi se u liječenju reumatoidnog artritisa, lupusa, psorijaze i drugih autoimunih bolesti. Ciklosporin pomaže u liječenju simptoma artritisa, ali također smanjuje napredovanje stanja čime se smanjuje rizik od dugotrajnog oštećenja zglobova i invaliditeta [29]. Pokazao se učinkovitim u liječenju bolesnika s reumatoidnim artritisom koji nisu dobro reagirali na druge lijekove. Također se koristi za liječenje onih s drugim reumatskim stanjima, upalnim bolestima oka i teškim oblicima psorijaze i drugih autoimunih poremećaja kože. Ciklosporin je dostupan u intravenoznoj, oralnoj i topikalnoj formulaciji te je dostupan u oralnoj nemodificiranoj formulaciji (Sandimmune) pri čemu apsorpcija ovisi o žučnim solima, stoga ima ograničenu i nedosljednu bioraspoloživost, međutim, oralno modificirana formula (Neoral) ima veću bioraspoloživost jer apsorpcija ne ovisi o enterohepatičnoj cirkulaciji. Zbog ovoga se ne preporučuje mijenjanje formulacije ako je pacijent stabiliziran na bilo kojem obliku [29]. Oralna bioraspoloživost je samo oko 20-30% zbog metabolizma prvog prolaza kroz jetru i enzimske destrukcije u sluznici crijeva, a izlučivanje se odvija putem žuči i izmeta.

Reumatoidni artritis (RA) autoimuna je bolest koju karakterizira aktivacija T limfocita i povećanje količine interleukina. U RA, poznato je da je ciklosporin učinkovit kao antireumatski agens za modificiranje bolesti, posebno kada drugi tretmani kao što su injekcija s otopinom zlata, D-penicilamin ili antimalarici nisu učinkoviti [30]. Novije istraživanje dokazalo je efektivnost CsA u smanjenju bolova i otečenih zglobova koji nastaju kao rezultat ove bolesti. Studija je uključivala 318 pacijenata te je znatno smanjenje simptoma doživjela samo grupa koja je dobivala imunosupresiv CsA. Kod placebo grupe nije bilo poboljšanja kliničke slike, no nisu razvili ni negativne simptome povezane s upotrebom ciklosporina A [30].

Jedan od oblika artritisa je i sistemski juvenilni idiopatski artritis koji čini 25-30% svih podtipova juvenilnog artritisa u azijskim zemljama. Značajan broj djece koja pate od ove bolesti razvije kroničnu invalidnost i loš funkcionalni ishod [31]. Glukokortikoidi korisni su u kontroli simptoma bolesti, ali se ne preporučuju kao monoterapija dulje od 2 tjedna zbog popratnih nuspojava. Predloženi su i neki noviji, napredniji lijekovi no liječnici koji se brinu za potrebe ove djece u

okruženjima sa siromašnim resursima često se suočavaju s dilemom odabira pristupačne alternative skupljim lijekovima [31]. Zbog ovih razloga, ciklosporin A - inhibitor kalcineurina, može biti alternativna opcija. Inhibicija kalcineurina rezultira smanjenom regulacijom različitih proupalnih citokina; IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$  i time suzbijanje upale posredovane T stanicama. CsA pripada pedijatrijskim antireumaticima i trenutno se koristi i za juvenilni dermatomiozitis. Utvrđeno je da je ciklosporin vrlo učinkovit u poboljšanju sistemskih značajki ove bolesti te da je relativno pristupačan lijek koji može uvelike pomoći u poboljšanju simptoma bolesti [31].

Lupusni nefritis je oblik lupusa kod kojeg imunološki sustav “napada” bubrege, što dovodi do upale i potencijalnog oštećenja bubrežnog tkiva. Ovo stanje može rezultirati različitim simptomima, uključujući proteinuriju (bjelančevine u mokraći), hematuriju (krv u mokraći), hipertenziju (visoki krvni tlak) i oslabljenu funkciju bubrega [32]. Ako se ne liječi, lupusni nefritis može napredovati do zatajenja bubrega, zbog čega je ključno da se osobe s lupusom podvrgavaju redovitom praćenju i liječenju kako bi se pratili i ublažili simptomi bolesti. Mehanizam CsA je dokazano iznimno bitan u ublažavanju proizvodnje autoantitijela i taloženja imunoloških produkata u glomerulima čime se smanjuje progresija ove bolesti. Novija otkrića sugeriraju da CsA ima ulogu u stabilizaciji aktina citoskeleta, čime se jača integritet barijere glomerularne filtracije i tako smanjuje proteinurija [32]. U pedijatrijskim slučajevima lupus nefritisa, CsA se pokazao obećavajućim, studije pokazuju njegovu učinkovitost u smanjenju proteinurije i suzbijanju aktivnosti bolesti. Na primjer, kod djece otporne na citotoksičnu terapiju, niske doze CsA bile su učinkovite, iako su zabilježeni recidivi nakon prekida. Slično, u djece s teškim lupusnim nefritisom, CsA u kombinaciji s pulsnom terapijom visokim dozama metilprednizolona pokazao je značajne antiproteinuričke učinke i supresiju aktivnosti bolesti [32].

Međutim, i dalje postoji zabrinutost u pogledu dugoročne sigurnosti CsA i optimalnih strategija doziranja. Dok su primjena jednom dnevno i niže doze CsA pokazale potencijal u smanjenju toksičnosti uz održavanje učinkovitosti, opravdana su daljnja istraživanja, osobito dugotrajna istraživanja koja uključuju veće kohorte, kako bi se potvrdila sigurnost i učinkovitost CsA u pedijatrijskih pacijenata s lupus nefritisom [32].



### 2.4.3 Ciklosporin A u dermatologiji

Ciklosporin se primjenjuje kao lijek u tretiranju više kožnih bolesti, uključujući psorijazu, atopijski dermatitis, kroničnu spontanu urtikariju, *pyoderma gangrenosum*, *lichen planus*, *alopeciu areatu* i *granulomu annulare* [33].

Psorijaza je kronično autoimuno stanje kože koje karakteriziraju dijelovi kože koji su crveni, ljuskasti i zadebljali. Posljedica je napada imunološkog sustava na zdrave stanice kože, što dovodi do hiperprodukcije stanica. Psorijaza dobro reagira na ciklosporin A, posebno u umjerenim do teškim slučajevima. Studije su pokazale da je CsA supresorski odgovor na T stanice učinkovit kod pustularne i eritrodermijske psorijaze. CsA se smatra prvom linijom za generaliziranu pustularnu psorijazu, a niske doze učinkovite su za eritrodermijsku psorijazu [33]. Doziranje se obično kreće od 2,5 mg/kg/dan do 5 mg/kg/dan tijekom 12 do 16 tjedana. Uobičajena je kombinirana terapija s drugim sistemskim lijekovima poput acitretina i metotreksata, ali fototerapiju treba izbjegavati zbog rizika od raka kože. Ciklosporin A također pokazuje učinkovitost u liječenju psorijatičnog artritisa, psorijaze noktiju i kontinuiranog akrodermatitisa.

Ciklosporin A kao lijek za atopijski dermatitis nije dovoljno proučavan no istraživanja su pokazala da se CsA može odabrati kao prva linija liječenja na kratko vrijeme kada se kontrola simptoma ne može postići konvencionalnom lokalnom terapijom ili kada fototerapija nije dostupna ili je kontraindicirana [33]. Dulje liječenje se obeshrabruje s obzirom na štetne učinke i smatra se da ga treba ograničiti na najviše jednu godinu. CsA se pokazao učinkovitim u liječenju kronične spontane urtikarije (CSU), stanja obilježenog osipom s crvenim ispupčenjima na koži, osobito kada standardne terapije poput steroida ne uspiju. Niske doze (2,5-3 mg/kg/dan) tijekom 4-6 tjedana pokazale su se učinkovitim [33]. Osim toga, studije pokazuju da kombiniranje CsA s cetirizinom tijekom 16 tjedana značajno poboljšava kontrolu bolesti. Kod gangrenozne pioderme (PG), CsA u dozi od 5 mg/kg/dan, samostalno ili s kortikosteroidima, preporučena je opcija liječenja. Istraživanja pokazuju slične rezultate kao i steroidi, što omogućuje odabir liječenja na temelju preferencija pacijenata i profila sigurnosti lijekova. Uobičajene početne doze kreću se od 4 do 5 mg/kg/dan, nakon čega slijede doze održavanja do jedne godine [33].

CsA je testiran za ozbiljne slučajeve *Lichen planusa* (LP) otporne na liječenje. *Lichen planus* je kronično upalno stanje koje zahvaća kožu, sluznice, kosu i nokte [34]. Obično se pojavljuje poput više izbočina s ravnim vrhom, ljubičaste ili crvenkaste boje koje svrbe i mogu biti sjajne i imati bijele linije. Studije su pokazale da je oralna primjena ciklosporina A učinkovita, s potpunim odgovorom postignutim kod teškog LP unutar 8 tjedana liječenja. Topikalni CsA također je obećavajući kod hipertrofične LP, poboljšavajući ljuskanje, plakove i iritaciju. Dodatno, CsA vodica za ispiranje usta pokazala je stopu potpunog odgovora od 35% kod pacijenata s retikularnim oblikom oralnog LP-a [34].

Za alopeciju areatu (autoimuna bolest koju odlikuje iznenadni gubitak kose), imunološki i modulacijski učinci ciklosporina A pokazali su izuzetno dobre rezultate, a studije su pokazale bolji klinički odgovor u usporedbi s terapijom betametazonom [35]. Također je utvrđeno da CsA inhibira razvoj katagena u folikulima dlake, povećavajući proizvodnju vlasi kose. Klinička ispitivanja su pokazala učinkovitost CsA u smanjenju akutnosti alopecije areate, s kombiniranom terapijom koja je pokazala značajan rast kose u teškim slučajevima [35]. Kod *granuloma annulare* (kroničnog stanja kože kod kojeg je karakterističan rast crvenih izbočina koje formiraju oblik kruga) oralni ciklosporin A uspješno je korišten, s povlačenjem uočenim unutar tjedna liječenja u mnogim slučajevima [36].

#### 2.4.4 Nuspojave

Premda je ciklosporin A izuzetno učinkovit lijek u sprječavanju nepoželjnih imunoloških reakcija organizma, postoje ozbiljne nuspojave asocirane s njegovom upotrebom. Jedna od njih je povećana koncentracija kreatinina u krvnom serumu koja je reverzibilna unatoč negativnom učinku na organizam (implicira poremećen rad bubrega). Neke druge česte nuspojave su tremori, grčevi u mišićima, mučnina, povećana količina magnezija u organizmu i abdominalni bolovi [26].

Najopasniji učinak ovog imunosupresiva na ljudsko zdravlje nedvojbeno je razvoj nefrotoksičnosti. Negativan učinak na bubrege je mnogo češći u pacijenata kod kojih se CsA koristio za liječenje imunoloških bolesti od onih kod kojih se koristio za sprječavanje odbacivanja donorskog organa nakon transplantacije [37]. Mogu se razlikovati tri različita oblika nefrotoksičnosti ciklosporina: reverzibilna akutna bubrežna disfunkcija, hemolitičko-uremijski sindrom i ireverzibilna kronična nefrotoksičnost. Ovaj posljednji oblik uzrokuje ireverzibilne morfološke promjene u bubregu te je glavni nedostatak za širu upotrebu CsA. Iako je omjer rizika i koristi terapije CsA u transplantacijskoj medicini jasno u korist njegove primjene, upitno je vrijedi li to i za sve oblike autoimunih bolesti [37]. Neki od glavnih razloga su samo trajanje liječenja koje se kod upotrebe nakon transplantacije većinom svodi na ograničen period (uglavnom 6 mjeseci do godinu dana) [38]. Nasuprot tome, autoimune bolesti često zahtijevaju doživotno liječenje, a produljena izloženost povećava rizik od kumulativnih toksičnih učinaka. Bitan je i sami kontekst bolesti – autoimune bolesti uključuju neregulirane imunološke reakcije protiv vlastitih tkiva u tijelu pacijenta, što dovodi do kronične upale. Ova kronična i stalna imunološka aktivacija mogu pogoršati štetne učinke CsA u usporedbi s relativno akutnim imunološkim odgovorom kod transplantacije [39].

Dokumentirano je kod pacijenata s transplantiranim organima da se ireverzibilne bubrežne histološke lezije mogu pojaviti već nakon šest mjeseci terapije visokim dozama CsA s progresijom tijekom vremena čak i nakon smanjenja doze ciklosporina A. Jednoglasnost ne postoji u pogledu dugotrajnog nefrotoksičnog učinka režima niske doze koji se koriste u autoimunim bolestima. Kod autoimunih bolesti često je potrebna terapija održavanja s niskom dozom CsA ( $\leq 5$  mg/kg/dan) za održavanje remisije same bolesti tj. njenih negativnih učinaka na organizam. Rizik od

nefrotoksičnosti doveo je do smjernica za doziranje, uključujući gornju granicu doze od 5 mg/kg/dan, kao i smanjenje doze ako se serumski kreatinin povisi za više od 30% vrijednosti prije liječenja [40].

Pregledom literature očito je kako terapija s CsA u bolesnika s autoimunim bolestima nije bez rizika. Izuzetno se preporučuje procjena omjera rizika i koristi za svakog bolesnika, uz strogo praćenje serumskog kreatinina i najniže razine CsA tijekom liječenja. Biopsije bubrega tijekom liječenja moraju se ozbiljno uzeti u obzir u bolesnika koji razviju čak i blago oštećenje bubrežne funkcije, osobito kada se daje produljena terapija dulja od jedne godine, čak i s niskom dozom CsA ( $\leq 5$  mg/kg/dan) [37].

### 3. ZAKLJUČAK

Ubrzo nakon otkrića *Tolypocladium inflatum* znanstvenici su istražili njen genom i spojeve koje proizvodi te otkrili ciklosporin A. Za ovaj spoj se vrlo brzo pokazalo da je odličan imunosupresiv s nezamjenjivom ulogom u inhibiciji reakcija imunološkog sustava putem sprječavanja fosfatazne aktivnosti kalcineurina i samim tim sprječavanja aktivacije T stanica. Ciklosporin A se koristi kao iznimno učinkoviti lijek ne samo u transplantacijskim pothvatima u kojima je značajno smanjio smrtnost i negativne reakcije primatelja novog organa/tkiva, već i u tretiranju različitih autoimunih bolesti kao što su lupus, reumatoidni artritis i čitavi spektar dermatoloških autoimunih bolesti.

Unatoč ovome, sam lijek rangira po bioraspoloživosti u tijelu ovisno o tome u kojem obliku ga pacijent uzima, te su česte nuspojave koje rangiraju u svojoj akutnosti te utjecaju na zdravlje osobe. Neke blaže nuspojave uključuju mučninu te abdominalnu bol, dok se kao najteža navodi oštećenje bubrega i smanjenje njihove učinkovitosti. Ova nuspojava je zabilježena najčešće kod osoba koje su ciklosporin koristile na duže vrijeme kod liječenja raznih imunoloških bolesti. Zbog ovoga je potrebno svaki medicinski slučaj razmatrati zasebno te strogo kontrolirati stanje pacijenta koji koristi ciklosporin A kao imunosupresiv.

Premda je moguće pojavljivanje izrazito negativnih nuspojava, CsA ima nezamjenjivu ulogu u medicini te je njegovo pozitivno djelovanje neupitno. U budućnosti je, osim opreznog nadgledanja svih pacijenata koji se tretiraju ovim imunosupresivom, potrebno usavršavanje doziranja ovog lijeka kao i daljnja istraživanja o miješanju s drugim imunosupresivnim lijekovima budući da je ovo pokazalo jako dobre učinke.

## 4. LITERATURA

1. Chang, S., & Buswell, J. (2023). Medicinal Mushrooms: Past, Present and Future. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 184(2), [https://doi.org/10.1007/10\\_2021\\_197](https://doi.org/10.1007/10_2021_197)
2. Reingardiene, D., Vilcinskaitė, J., & Lazauskas, R. (2005). Hallucinogenic mushrooms. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 41(12), <https://doi.org/10.2307/j.ctvs32r8v.16>
3. Molitoris, H. P. (1994). Mushrooms in medicine. *Folia Microbiologica*, 39(2), <https://doi.org/10.1007/BF02906801>
4. Anusiya, G., Gowthama Prabu, U., Yamini, N. v., Sivarajasekar, N., Rambabu, K., Bharath, G., & Banat, F. (2021). A review of the therapeutic and biological effects of edible and wild mushrooms. *Bioengineered*, 12(2), <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.2001183>
5. Fielding, J., & Tyrer, P. J. (1980). HISTORY OF PENICILLIN. *The Lancet*, 315(8158), [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(80\)90580-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(80)90580-2)
6. Venturella, G., Ferraro, V., Cirlincione, F., & Gargano, M. L. (2021). Medicinal mushrooms: Bioactive compounds, use, and clinical trials. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), <https://doi.org/10.3390/ijms22020634>
7. Dhillon, S. S., Svarstad, H., Amundsen, C., & Bugge, H. C. (2002). Bioprospecting: Effects on environment and development. *Ambio*, 31(6), <https://doi.org/10.1579/0044-7447-31.6.491>
8. Bissett, J. (1983). Notes on Tolypocladium and related genera. *Canadian Journal of Botany*, 61(5), <https://doi.org/10.1139/b83-139>
9. Hodge, K. T., Krasnoff, S. B., & Humber, R. A. (1996). Tolypocladium inflatum is the anamorph of Cordyceps subsessilis. *Mycologia*, 88(5), <https://doi.org/10.2307/3760965>
10. Bushley, K. E., Raja, R., Jaiswal, P., Cumbie, J. S., Nonogaki, M., Boyd, A. E., Owensby, C. A., Knaus, B. J., Elser, J., Miller, D., Di, Y., McPhail, K. L., & Spatafora, J. W. (2013). The Genome of Tolypocladium inflatum: Evolution, Organization, and Expression of the Cyclosporin Biosynthetic Gene Cluster. *PLoS Genetics*, 9(6), <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003496>
11. SUMMERBELL, R. C. (1987). THE INHIBITORY EFFECT OF TRICHODERMA SPECIES AND OTHER SOIL MICROFUNGI ON FORMATION OF MYCORRHIZA BY LACCARIA BICOLOR IN VITRO. *New Phytologist*, 105(3), <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1987.tb00881.x>
12. Kempken, F., Schreiner, C., Schörgendorfer, K., & Kück, U. (1995). A Unique Repeated DNA Sequence in the Cyclosporin-Producing Strain of Tolypocladium inflatum (ATCC 34921). *Experimental Mycology*, 19(4), <https://doi.org/10.1006/emyc.1995.1037>
13. Kempken, F., & Kück, U. (1996). restless , an Active Ac -like Transposon from the Fungus Tolypocladium inflatum : Structure, Expression, and Alternative RNA Splicing . *Molecular and Cellular Biology*, 16(11), <https://doi.org/10.1128/mcb.16.11.6563>
14. Gao, Q., Jin, K., Ying, S. H., Zhang, Y., Xiao, G., Shang, Y., Duan, Z., Hu, X., Xie, X. Q., Zhou, G., Peng, G., Luo, Z., Huang, W., Wang, B., Fang, W., Wang, S., Zhong, Y., Ma, L. J., st. Leger, R. J., ... Wang, C. (2011). Genome sequencing and comparative transcriptomics of the

- model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. *PLoS Genetics*, 7(1), <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001264>
15. Bushley, K. E., & Turgeon, B. G. (2010). Phylogenomics reveals subfamilies of fungal nonribosomal peptide synthetases and their evolutionary relationships. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-26>
  16. Survase, S. A., Kagliwal, L. D., Annapure, U. S., & Singhal, R. S. (2011). Cyclosporin A - A review on fermentative production, downstream processing and pharmacological applications. *Biotechnology Advances*, 29(4), <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.03.004>
  17. MIHATSCH, M. J., & WOLFF, K. (1992). Consensus Conference on cyclosporin A for psoriasis February 1992. *British Journal of Dermatology*, 126(6), <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1992.tb00112.x>
  18. Wang, P., & Heitman, J. (2005). The cyclophilins. *Genome Biology*, 6(7), <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-7-226>
  19. Yang, X., Feng, P., Yin, Y., Bushley, K., Spatafora, J. W., & Wang, C. (2018). Cyclosporine biosynthesis in *Tolypocladium inflatum* benefits fungal adaptation to the environment. *MBio*, 9(5), <https://doi.org/10.1128/mBio.01211-18>
  20. Spittler, P. (2015). Chemical ecology of fungi. *Natural Product Reports*, 32(7), <https://doi.org/10.1039/c4np00166d>
  21. Mi, H., Kops, O., Zimmermann, E., Jäschke, A., & Tropschug, M. (1996). A nuclear RNA-binding cyclophilin in human T cells. *FEBS Letters*, 398(2-3), [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(96\)01248-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(96)01248-3)
  22. Creamer, T. P. (2020). Calcineurin. *Cell Communication and Signaling*, 18(1), <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00636-4>
  23. Russell, G., Graveley, R., Seid, J., Al-Humidan, A. K., & Skjodt, H. (1992). Mechanisms of action of cyclosporine and effects on connective tissues. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 21(6-3), [https://doi.org/10.1016/0049-0172\(92\)90009-3](https://doi.org/10.1016/0049-0172(92)90009-3)
  24. Metcalfe, S., Alexander, D., & Turner, J. (1994). FK506 and cyclosporin A each inhibit antigen-specific signaling in the T cell line 171 in the absence of a calcium signal. *Cellular Immunology*, 158(1), <https://doi.org/10.1006/cimm.1994.1255>
  25. Schaeffer, H. J., & Weber, M. J. (1999). Mitogen-Activated Protein Kinases: Specific Messages from Ubiquitous Messengers. *Molecular and Cellular Biology*, 19(4), <https://doi.org/10.1128/mcb.19.4.2435>
  26. Colombo, D., & Ammirati, E. (2011). Cyclosporine in transplantation - A history of converging timelines. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 25(4).
  27. Graeb, C., Arbogast, H., Guba, M., Jauch, K. W., & Land, W. (2004). Cyclosporine: 20 Years of experience at the university of munich. *Transplantation Proceedings*, 36(2-3), <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2004.01.046>
  28. Abboud, R., Kim, S., Staser, K., Jayasinghe, R. G., Lim, S., Amatya, P., Frye, C. C., Kopecky, B., Ritchey, J., Gao, F., Lavine, K., Kreisel, D., DiPersio, J. F., & Choi, J. (2023). Baricitinib with cyclosporine eliminates acute graft rejection in fully mismatched skin and heart transplant models. *Frontiers in Immunology*, 14(1), <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1264496>

29. Csaszar, T., & Patakfalvi, A. (1992). Treatment of polyglandular autoimmune syndrome with Cyclosporin-A. *Acta Medica Hungarica*, 49(3–4).
30. Wells, G. A., Hagenauer, D., Shea, B., Suarez-Almazor, M. E., Welch, V., Tugwell, P., & Peterson, J. (1998). Cyclosporine for treating rheumatoid arthritis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2010(7), <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001083>
31. Bagri, N. K. (2019). Cyclosporine for Systemic Onset Juvenile Idiopathic Arthritis: Current Stand and Future Directions. *Indian Journal of Pediatrics*, 86(7), <https://doi.org/10.1007/s12098-019-02985-6>
32. Tanaka, H. (2012). Treatment of young patients with lupus nephritis using calcineurin inhibitors. *World Journal of Nephrology*, 1(6), <https://doi.org/10.5527/wjn.v1.i6.177>
33. Sadovsky, R. (1997). Cyclosporine in the treatment of dermatologic disease. *American Family Physician*, 55(6), [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1167-4\\_27](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1167-4_27)
34. Kuhn, A., Ruland, V., & Bonsmann, G. (2011). Cutaneous lupus erythematosus: Update of therapeutic options: Part II. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 65(6).
35. Jang, Y. H., Kim, S. L., Lee, K. C., Kim, M. J., Park, K. H., Lee, W. J., Lee, S. J., & Kim, D. W. (2016). A comparative study of oral cyclosporine and betamethasone minipulse therapy in the treatment of alopecia areata. *Annals of Dermatology*, 28(5), <https://doi.org/10.5021/ad.2016.28.5.569>
36. Filotico, R., Vena, G. A., Coviello, C., & Angelini, G. (1994). Cyclosporine in the treatment of generalized granuloma annulare. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 30(3), [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(08\)81946-9](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(08)81946-9)
37. Vercauteren, S. B., Bosmans, J. L., Elseviers, M. M., Verpooten, G. A., & de Broe, M. E. (1998). A meta-analysis and morphological review of cyclosporine-induced nephrotoxicity in auto-immune diseases. *Kidney International*, 54(2), <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1998.00017.x>
38. Kahan, B. D. (1993). Cyclosporine: The base for immunosuppressive therapy - Present and future. *Transplantation Proceedings*, 25(1).
39. DerSimonian, R., & Laird, N. (2015). Meta-analysis in clinical trials revisited. *Contemporary Clinical Trials*, 45(10), <https://doi.org/10.1016/j.cct.2015.09.002>
40. MIHATSCH, M. J., & WOLFF, K. (1992). Consensus Conference on cyclosporin A for psoriasis February 1992. *British Journal of Dermatology*, 126(6), <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1992.tb00112.x>