Państwo i Społeczeństwo

ROK XVIII 2018 nr 3

MEDYCYNA I ZDROWIE PUBLICZNE

POD REDAKCJĄ
PIOTRA KOPIŃSKIEGO

Kraków
2018

„Państwo i Społeczeństwo" – czasopismo Krakowskiej Akademii im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego
panstwoispoleczenstwo.pl

Czasopismo punktowane w rankingu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego i Index Copernicus International

Rada Wydawnicza Krakowskiej Akademii im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego: *Klemens Budzowski, Maria Kapiszewska, Zbigniew Maciąg, Jacek M. Majchrowski*

Rada Naukowa: *Maria Kapiszewska, J. Krzysztof Lenartowicz, Zbigniew Maciąg, Grzegorz Zieliński*

Redaktor naczelny: *Jacek M. Majchrowski*

Redaktorzy tematyczni: *Joanna Aksman, Katarzyna Banasik-Petri, Joanna Bierówka, Piotr Kopiński, Małgorzata Leśniak*

Redaktor statystyczny: *Piotr Stefanów*

Sekretarz redakcji: *Halina Baszak-Jaroń*

Sekretarz redakcji numerów „Państwo i Społeczeństwo – Medycyna i Zdrowie Publiczne": *Małgorzata Kalemba-Drożdż*

Adres redakcji:
ul. Gustawa Herlinga-Grudzińskiego 1
30-705 Kraków
tel. (12) 25 24 665, 25 24 666
e-mail: wydawnictwo@kte.pl

Redakcja nie zwraca materiałów niezamówionych. Decyzja o opublikowaniu tekstu uzależniona jest od opinii recenzentów. Redakcja zastrzega sobie prawo skracania tekstów przeznaczonych do druku. Teksty powinny być przesyłane w dwóch egzemplarzach wraz z wersją elektroniczną.

© **Copyright by Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego, 2018**

e-ISSN 2451-0858

ISSN 1643-8299

Redakcja językowa: *Agnieszka Boniatowska*

Korekta abstraktów w języku angielskim: *Michael Timberlake*

Skład i łamanie: *Oleg Aleksejczuk*

Wszystkie numery kwartalnika „Państwo i Społeczeństwo" są dostępne w wolnym dostępie (open access).

Wersją pierwotną czasopisma jest wydanie elektroniczne.

Wydawca:

OFICYNA WYDAWNICZA AFM

ul. G. Herlinga-Grudzińskiego 1, bud. A, pok. 219
30-705 Kraków, e-mail: biuro@kte.pl

Sprzedaż i prenumerata: ksiegarnia@kte.pl

Państwo i Społeczeństwo

ROK XVIII 2018 nr 3

Piotr Kopiński: Wprowadzenie 5

PRACE ORYGINALNE

Agnieszka Cierniak, Magdalena Skubal, Małgorzata Kalemba-Drożdż: Czy galusan epigallokatechiny może być skutecznym polifenolem w terapii skojarzonej z etopozydem w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej? 9
Ewelina Wędrowska, Marek Libura, Maciej Chmielarski, Bartłomiej Grad, Joanna Golińska, Tomasz Senderek, Rafał Wojciechowski, Jakub Siudut, Piotr Kopiński: Obraz cytoimmunologiczny płynu stawowego w reumatoidalnym zapaleniu stawów. Wstępna ocena wpływu leczenia metotreksatem i metyloprednizolonem 29
Magdalena Słapińska, Tomasz Senderek, Filip Gołkowski: Zmienność wyniku pomiaru ciśnienia tętniczego krwi w zależności od procedury jego wykonania u pacjenta z kontrolowanym idiopatycznym nadciśnieniem tętniczym 47

PRACE POGLĄDOWE

Anna M. Roszkowska: Aktualności w diagnostyce i leczeniu stożka rogówki 69
Justyna Chronowska, Andrzej Madej, Sylwia Leks, Renata Chrobot: Bezpieczeństwo przyjmowania niesterydowych leków przeciwzapalnych, cz. I 81
Małgorzata Kalemba-Drożdż: Witamina C w leczeniu nowotworów i profilaktyce chorób niezakaźnych 91
Janusz Ligęza: W poszukiwaniu fontanny młodości – podłoże genetyczne długowieczności oraz procesów starzenia 105
Tomasz Gawlikowski, Anna Bilska-Kos, Leszek Satora: Zatrucia grzybami jadalnymi 119

OPIS PRZYPADKU

Olga Milczarek, Stanisław Kwiatkowski, Marcin Majka, Patrycja Swadźba, Jakub Swadźba: Zastosowanie wielokrotnych podań mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z galarety Whartona w leczeniu niepełnego uszkodzenia rdzenia kręgowego – opis przypadku 135

SPRAWOZDANIA

Małgorzata Kalemba-Drożdż: XVIII Konferencja Naukowa „Państwo. Gospodarka. Społeczeństwo". Sprawozdanie 151
Agata Grzywacz-Kisielewska: IV Międzynarodowy Kongres Polskiego Towarzystwa Uroginekologicznego. Sprawozdanie 153

Instrukcja przygotowania artykułów z zakresu medycyny i zdrowia publicznego 157

Zasady recenzowania publikacji w czasopismach 161

Państwo i Społeczeństwo

2018 (XVIII) nr 3

e-ISSN 2451-0858
ISSN 1643-8299

Piotr Kopiński

WPROWADZENIE

Prezentowany Czytelnikom numer „Państwa i Społeczeństwa", zajmujący się zagadnieniami medycyny i zdrowia publicznego, zawiera trzy prace oryginalne, sześć poglądowych i jeden opis przypadku. Dodatkowo zamieszczono sprawozdania, w tym – w pierwszej kolejności – z konferencji „Państwo, Gospodarka, Społeczeństwo", która odbyła się w Krakowskiej Akademii im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego w dniach 11–12 czerwca 2018 r. W ramach swej aktywności naukowej Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu zaopiekował się sesją pt. „Postępowanie w chorobach rzadkich", tj. tematyką o bardzo istotnych walorach rozwojowych w świetle popularnych haseł o indywidualizacji terapii w wielu dziedzinach klinicznych.

Wszystkie trzy prace badawcze, zgodnie z klasyfikacją, zawierają oryginalne i potencjalnie ważne wyniki. Zespół Cierniak i wsp. wykazał możliwość zmniejszenia toksyczności standardowej terapii cytostatykami w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej w drodze suplementacji pospolitym polifenolem zawartym w herbacie (galusanem epigalloketechiny). Wędrowska i wsp. zaprezentowali profil immunocytologiczny płynu stawowego w reumatoidalnym zapaleniu stawów i podali wstępne dane o modyfikacji tego profilu przez standardowe leczenie. Z kolei z pracy Słapińskiej i wsp. wynikły ciekawe wnioski dotyczące standaryzacji ambulatoryjnych pomiarów ciśnienia tętniczego krwi w populacji chorych z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym, przy czym – jak wykazali autorzy – na zmienność obserwowanych wyników wpływa współwystępowanie innych przewlekłych chorób w przebadanej populacji.

Prace poglądowe rozpoczyna niezwykle nowoczesna publikacja podsumowująca najnowsze techniki leczenia stożka rogówki, a więc czerpiąca z pogranicza kliniki okulistycznej i zdrowia publicznego. Kolejna zespołowa praca podsumowuje aktualną i ważną dla klinicystów wiedzę o działaniach ubocznych w stosowaniu niesteroidowych leków przeciwzapalnych (temat ten ma być przez zespół autorski kontynuowany). Stanowiący przedmiot sporów problem podawania megadawek witaminy C w złośliwych chorobach nowotworowych i niektórych stanach zakaźnych przedyskutowano w odrębnej pracy poglądowej, z przytoczeniem ciekawych danych, właściwie podsumowanych umotywowanymi wnioskami. Odlegle z pracą tą łączy się kolejna publikacja, tym razem z pogranicza genetyki i gerontologii: tytułowa „fontanna młodości" jest tu pretekstem do omówienia genetycznych uwarunkowań procesu starzenia. Tę grupę prac zamyka cenna pozycja o zatruciach grzybami jadalnymi. Otóż należy podkreślić, że jest to zjawisko dotąd w medycynie nazbyt niedokładnie przebadane, zaś ze względu na lekceważenie problemu pozycji literaturowych w tym zakresie praktycznie brak. Wspomniana praca dobrze wypełnia tę lukę.

Opis przypadku dotyczy odzyskiwania funkcji neurologicznych (kończyn dolnych) przez chorego z uszkodzeniem poprzecznym rdzenia kręgowego, możliwego dzięki zastosowaniu komórek macierzystych. Jest to już typowa medycyna XXI wieku i życzylibyśmy sobie, by korzystny efekt terapeutyczny w tym dotychczas nieuleczalnym stanie udało się powtórzyć autorom w większej grupie pacjentów.

PRACE ORYGINALNE

Państwo i Społeczeństwo

2018 (XVIII) nr 3

e-ISSN 2451-0858
ISSN 1643-8299

doi.org/10.31749/pismzp2018/20836

Agnieszka Cierniak[1], Magdalena Skubal[2],
Małgorzata Kalemba-Drożdż[1]

1. Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego,
Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu, Zakład Biochemii
2. Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii,
Zakład Biochemii Ogólnej

CZY GALUSAN EPIGALLOKATECHINY MOŻE BYĆ SKUTECZNYM POLIFENOLEM W TERAPII SKOJARZONEJ Z ETOPOZYDEM W LECZENIU PRZEWLEKŁEJ BIAŁACZKI SZPIKOWEJ?

Autor korespondencyjny:
Agnieszka Cierniak, Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego,
Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu, Zakład Biochemii,
ul. G. Herlinga-Grudzińskiego 1, 30-705 Kraków,
e-mail:acierniak@afm.edu.pl

Streszczenie

Wprowadzenie: Składnik zielonej herbaty – galusan epigallokatechiny (EGCG) – znany jest ze swoich właściwości chemoprewencyjnych i chemoterapeutycznych. Wykazuje silne właściwości antyoksydacyjne i przeciwzapalne, a w stosunku do komórek nowotworowych – działanie antyproliferacyjne lub proapoptotyczne. Etopozyd jest jednym z najczęściej stosowanych leków przeciwnowotworowych, wywołującym jednak wiele skutków ubocznych.

Materiały i metody: W eksperymentach *in vitro* badano potencjalną rolę EGCG w terapii skojarzonej z etopozydem w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej. Komórki ustalonej linii białaczkowej K562 poddano działaniu etopozydu i/lub EGCG w celu określenia wpływu EGCG na przeżywalność komórek, poziom uszkodzeń DNA oraz częstość procesu apoptozy. Poziom uszkodzeń DNA mierzono przy pomocy elektroforezy pojedyn-

czych komórek w żelu agarozowym (test kometowy), natomiast apoptozę oceniano pod mikroskopem fluorescencyjnym z użyciem barwnika Hoechst 33342.
Wyniki: Uzyskane wyniki badań wskazują, że EGCG w stężeniu 50 i 100 μM uwrażliwia komórki białaczkowe na cytotoksyczne działanie etopozydu, zwiększając poziom uszkodzeń DNA i częstość apoptozy.
Wnioski: Dane wskazują, że galusan epigallokatechiny może się okazać skutecznym polifenolem w terapii skojarzonej z etopozydem w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej.

Słowa kluczowe: apoptoza, EGCG, etopozyd, przewlekła białaczka szpikowa, uszkodzenia DNA

Wprowadzenie

Galusan epigallokatechiny

Galusan epigallokatechiny (EGCG, ang. (-)-*epigallocatechin-3-gallate*) należy do grupy flawonoidów określanych mianem katechin. Występuje on w napoju otrzymywanym z liści krzewów herbacianych *Camellia sinensis*, czyli w herbacie – drugim po wodzie najczęściej spożywanym płynem na świecie. Z wszystkich rodzajów herbat odmiana zielona została najlepiej poznana i przebadana pod względem swoich właściwości chemoprewencyjnych oraz chemoterapeutycznych [1]. Pozytywny wpływ zielonej herbaty na zdrowie jest związany głównie z obecnością związków polifenolowych, m.in. flawonoidów. W liściach herbaty około 36% suchej masy stanowią flawonoidy, spośród których aż 80% to katechiny, takie jak: galusan epigallokatechiny (EGCG, ang. (-)-*epigallocatechin-3-gallate*), galusan epikatechiny (ECG, ang. (-)-*epicatechin-3-gallate*), epigallokatechina (EGC, ang. (-)-*epigallocatechin*) oraz epikatechina (EC, ang. (-)-*epicatechin*). Sugeruje się, że to właśnie galusan epigallokatechiny odpowiada za lecznicze właściwości zielonej herbaty. Badania *in vivo* dowodzą, że najwyższa aktywność antyoksydacyjna we krwi jest obserwowana po 30–50 minutach od wypicia herbaty. Galusan epigallokatechiny jest około 100 razy bardziej skuteczny od witaminy C i 25 razy bardziej efektywny niż witamina E pod względem ochrony komórek i DNA przed uszkodzeniami oksydacyjnymi. Polifenol ten działa przeciwutleniająco dwa razy silniej od resweratrolu występującego w czerwonym winie [2].

Właściwości profilaktyczne i ochronne EGCG są znane w medycynie od lat. Galusan epigallokatechiny zmniejsza uszkodzenia skóry o podłożu zapalnym, spowodowane promieniowaniem UV [3,4]. Podczas gdy komórki odpornościowe indukują procesy zapalne wskutek wzmożonej produkcji reaktywnych form tlenu (RFT), to EGCG działa przeciwzapalnie, gdyż hamuje produkcję wolnych rodników [3,4].

Jak wykazują liczne badania, podawanie EGCG może stać się również atrakcyjnym sposobem na zwiększenie skuteczności leczenia [1,5] oraz reduk-

cję częstotliwości występowania chorób układu krążenia i nowotworów [6]. Polifenole obecne w zielonej herbacie, szczególnie EGCG, mogą uczestniczyć w blokowaniu syntezy związków toksycznych, np. nitrozoamin, powstających wskutek spożywania wędzonych potraw mięsnych, wychwytywaniu wolnych rodników lub ograniczeniu ich aktywacji, inhibicji peroksydacji związków lipidowych, wzmożeniu aktywności enzymów unieszkodliwiających działanie wolnych rodników, jak np. peroksydaza glutationowa i katalaza [1,7].

Jednym z najważniejszych mechanizmów odpowiedzialnych za antyproliferacyjne właściwości flawonoidów jest zatrzymanie cyklu komórkowego, wskutek blokowania replikacji DNA. Galusan epigallokatechiny – podobnie jak epigallokatechina, mirycetyna i kwercetyna – zatrzymuje działanie topoizomerazy II, gdy tworzy ona kompleks enzym-DNA [8]. Może to wówczas prowadzić do powstania aberracji chromosomowej i indukcji apoptozy [9].

Zgodnie z badaniami przeprowadzonymi przez Bandele'a i Osheroffa około ~25 μM/mL ekstraktu zielonej herbaty zawiera ~20–30 μM EGCG, który silnie wpływa aktywność topoizomerazy II oraz przecinanie łańcuchów polinukleotydowych DNA. Po wypiciu około trzech filiżanek zielonej herbaty stężenie EGCG w ludzkim osoczu oraz próbkach śliny osiąga odpowiednio 4 μM i 48 μM [6].

Większa część galusanu epigallokatechiny, zanim zostanie wchłonięta z jelita, ulega przemianom pod wpływem esterazy katecholowej bakterii jelitowych. Metabolity, głównie glukuroniany i siarczany, mają niezmienioną strukturę ugrupowań odpowiedzialnych za aktywność przeciwutleniającą tych związków i wykazują właściwości antyoksydacyjne podobne do właściwości niezmienionych flawonoidów [10].

Etopozyd

Etopozyd, półsyntetyczna pochodna podofilotoksyny, jest stosowany jako środek przeciwmitotyczny. Mechanizm działania etopozydu opiera się na inhibicji topoizomerazy II, przez co indukuje pęknięcia jedno- i dwuniciowe DNA. Etopozyd pobudza również wewnątrzkomórkowe powstawanie wolnych rodników oraz hamuje wbudowywanie tymidyny do DNA. Należy do leków fazowo-specyficznych o najsilniejszym działaniu w fazach S i G2 cyklu komórkowego [11].

Obecnie etopozyd jest jednym z najczęściej stosowanych leków przeciwnowotworowych [12]. Jest lekiem pierwszego rzutu w leczeniu białaczek, raka drobnokomórkowego płuc, raka jądra, ziarnicy złośliwej, chłoniaków nieziarniczych oraz mięsaka Kaposiego [11–14]. Lek ten jest również stosowany w przygotowaniu chorych do przeszczepu szpiku kostnego [13]. W terapii może być stosowany samodzielnie lub w leczeniu skojarzonym z innymi cytostatykami lub radioterapią. Leczenie skojarzone w przypadku etopozydu ma na celu wyeliminowanie komórek, które wykształciły oporność na lek [11,13]. Etopozyd, jak wszystkie leki stosowane w terapii nowotworów, powoduje wiele działań niepożądanych. Najczęściej występują: zapalenie wokół miejsca wlewu, dolegliwości

żołądkowo-jelitowe (utrata apetytu, nudności i wymioty), utrata włosów. U wielu chorych poddanych terapii etopozydem odnotowuje się przejściowy spadek liczby krwinek, co prowadzi do typowych działań ubocznych, tj. zwiększonego ryzyka infekcji z powodu spadku liczby krwinek białych, objawy niedokrwistości (spadek liczby erytrocytów) oraz objawy skazy krwotocznej małopłytkowej [15].

Przeciwutleniacze w chemioterapii

W terapii onkologicznej bardzo poważnym problemem są działania uboczne wywoływane przez leki przeciwnowotworowe. Nadzieją na ich złagodzenie jest terapia skojarzona. Do związków uwzględnianych w tego rodzaju terapii należą antyutleniacze, ponieważ wiele leków stosowanych w chemioterapii powoduje wzrost produkcji reaktywnych form tlenu oraz spadek poziomu przeciwutleniaczy w związku z indukowaniem stresu oksydacyjnego [16-20].

Stres oksydacyjny może być wywołany wieloma czynnikami. W badaniach *in vitro* wykazano, że neutrofile chorych poddanych chemioterapii produkują więcej nadtlenku wodoru i anionów ponadtlenkowych w porównaniu z neutrofilami izolowanymi od osób zdrowych [17]. Intensywna chemioterapia z udziałem cytostatyku, jakim jest etopozyd, poprzedzająca przeszczep szpiku kostnego, powoduje gwałtowny spadek poziomu przeciwutleniaczy w organizmie oraz wzrost ryzyka uszkodzeń struktur komórkowych i DNA przez RFT. Sytuacja taka ma miejsce w szczególności, gdy w komórkach dochodzi do niedoboru witaminy C – podstawowego zmiatacza wolnych rodników [16,21]. Jeżeli uszkodzenia materiału genetycznego nie zostaną naprawione, mogą prowadzić do transformacji nowotworowej [22], w tym rozwoju białaczek lekozależnych [23]. Jednak najczęstszym zdarzeniem jest kierowanie komórek na drogę apoptozy [24].

Podczas leczenia etopozydem dochodzi do silnej mielosupresji. Cytotoksyczne działanie leków blokuje powstawanie, podział i dojrzewanie rozwijających się komórek krwi, czego konsekwencją jest niedobór erytrocytów (anemia) i leukocytów, a w szczególności neutrofili (neutropenia), monocytów (monocytopenia) oraz płytek krwi (trombocytopenia) [25]. Mielosupresja wywołana etopozydem wydaje się być związana nie tylko z jego predyspozycją do hamowania topoizomerazy II, ale również z wysoką aktywnością peroksydaz takich jak mieloperoksydaza w komórkach szpiku kostnego. Aktywność mieloperoksydazy w zróżnicowanych komórkach granulocytów powoduje utlenianie etopozydu i generowanie rodników fenoksylowych [24,26].

W związku z tym usuwanie reaktywnych form tlenu przez przeciwutleniacze mogłoby ograniczyć neutropenię poprzez działanie ochronne na neutrofile, których czas życia zależny jest od RFT. Stosowanie związków o działaniu przeciwutleniającym wymaga jednak dużej ostrożności, ponieważ wytwarzanie RFT w czasie metabolizmu wielu leków przeciwnowotworowych jest jednym z najważniejszych elementów ich cytotoksycznej aktywności. Dlatego stosowa-

nie przeciwutleniaczy jako terapii wspomagającej budzi obawy. Jednak w sytuacji, gdy reaktywne formy tlenu są wytwarzane jako skutek uboczny metabolizmu leków, wprowadzenie terapii antyoksydacyjnej budzi nadzieję jako strategia ochrony komórek prawidłowych [18, 26–28].

Materiały i metody

Celem badań było określenie wpływu flawonoidu występującego w zielonej herbacie: galusanu epigallokatechiny oraz cytostatyku, jakim jest etopozyd, na żywotność komórek, ilość uszkodzeń DNA i proces apoptozy w komórkach białaczkowych K562. W przeprowadzonych badaniach posłużono się linią komórkową K562 dostarczoną przez European Collection of Cell Cultures (ECACC). Komórki pochodziły od 53-letniej kobiety rasy kaukaskiej chorującej na przewlekłą białaczkę szpikową (CML, ang. *chronic myelogenous leukemia*).

Hodowla komórek K-562

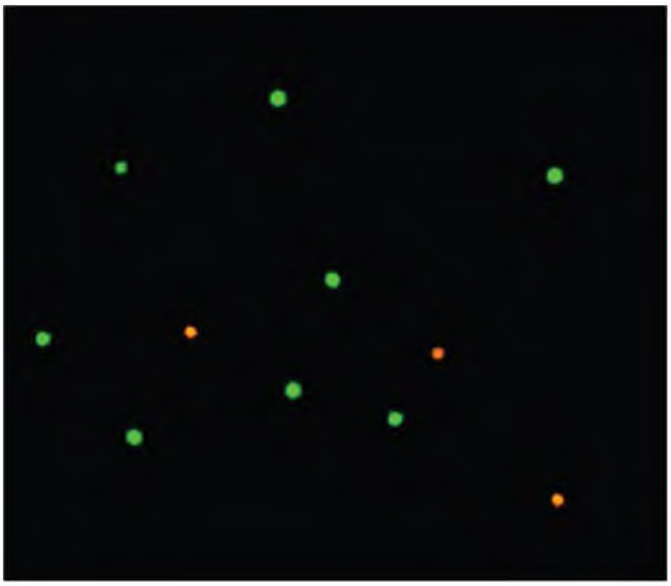
Komórki K-562 hodowano w zawiesinie o gęstości 5 x 10^5/ml w pożywce RPMI 1640 z dodatkiem 10% płodowej surowicy cielęcej (FBS, *fetal bovine serum*) oraz antybiotyków: penicyliny (100 U/ml) i streptomycyny (100 μg/ml). Hodowle prowadzono w temperaturze 37°C, w atmosferze zawierającej 5% CO_2 o wilgotności 95%, zmieniając płyn hodowlany co 48 godzin. Wszystkie eksperymenty wykonywano w fazie logarytmicznego wzrostu komórek.

Ocena żywotności komórek

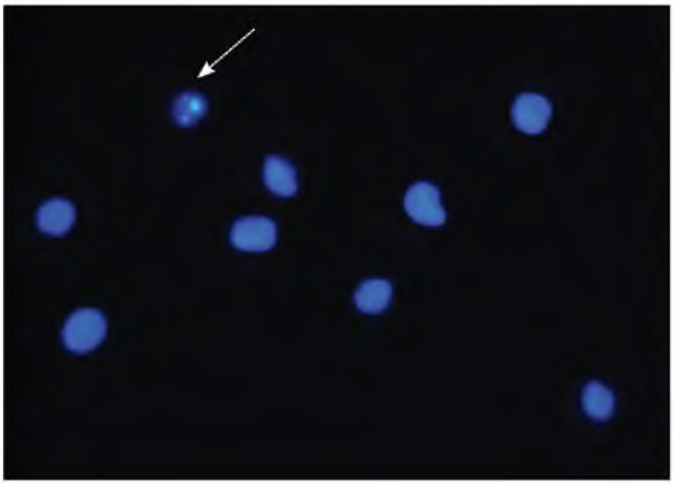
W celu zbadania wpływu EGCG (Merck, Niemcy) i/lub etopozydu (Merck, Niemcy) na żywotność komórek przeprowadzono różnicowe barwienie fluorescencyjne, w którym pod wpływem dwuoctanu fluoresceiny komórki żywe barwią się na kolor zielony, a bromek etydyny wybarwia komórki martwe na pomarańczowo, co zaprezentowano na rycinie 1. Komórki K562 o gęstości 5x10^5/ml inkubowano przez 1, 4, 24 oraz 48 godzin z galusanem epigallokatechiny w stężeniach od 0 do 100 μM i/lub z 0,5 μM etopozydem, dodanym na ostatnią godzinę inkubacji. Następnie komórki odwirowano, zawieszono w 30 μl PBS po czym połączono w proporcji 1:1 z mieszaniną dwuoctanu fluoresceiny o stężeniu 5 mg/ml w acetonie, bromku etydyny o stężeniu 200 μg/ml w PBS i PBS bez Ca^{2+} i Mg^{2+}. Preparaty analizowano w mikroskopii fluorescencyjnej (Olympus IX50, Olympus, Japonia) z użyciem niebieskiego filtra, licząc 500 losowo wybranych komórek w każdym preparacie. Zliczano wyniki z trzech niezależnych eksperymentów.

Badanie uszkodzeń DNA na poziomie pojedynczej komórki – test kometowy

Metoda elektroforezy pojedynczych komórek w żelu agarozowym, czyli test kometowy (ang. *comet assay*) służy do oceny uszkodzeń DNA jądrowego na



Rycina 1. Obraz z mikroskopu fluorescencyjnego (powiększenie x 100) przedstawiający komórki żywe – świecące na zielono oraz komórki martwe – świecące na czerwono



Rycina 2. Obraz z mikroskopu fluorescencyjnego (powiększenie x 400). Strzałka wskazuje komórkę apoptotyczną z widocznymi ciałkami apoptotycznymi

poziomie pojedynczej komórki. Nieuszkodzone DNA jądrowe po zastosowaniu alkalicznej lizy nie jest podatne na migrację w polu elektrycznym. Natomiast jeśli doszło do uszkodzenia DNA, w czasie elektroforezy pęknięte fragmenty migrują, a w preparatach pod mikroskopem fluorescencyjnym widoczny jest charakterystyczny obraz przypominający kometę. Intensywność fluorescencji ogona komety odzwierciedla ilość uszkodzeń DNA w jądrze, która jest wyrażana jako % uszkodzeń DNA w pojedynczej komórce.

W przeprowadzonych doświadczeniach komórki K562 o gęstości 5 x 10^5/ml inkubowano przez 1, 4 oraz 24 godziny z galusanem epigallokatechiny w stężeniach: 0, 10, 50 i 100 μM i/lub 0,5 μM etopozydem. Następnie komórki odwirowano w PBS w warunkach: 4°C, 5 min., 230 x *g* (1200 rpm) i zawieszono w 50 μl PBS bez Ca^{2+} i Mg^{2+}. Do zawiesiny komórek dodawano agarozę o obniżonej temperaturze topnienia (LMPA, ang. *Low Melting Point Agarose*). Na wcześniej przygotowane szkiełka podstawowe pokryte agarozą o normalnej temperaturze topnienia (NMPA, ang. *Normal Melting Point Agarose*) nakładano po 85 μl zawiesiny komórek i przykrywano szkiełkiem nakrywkowym. Po zastygnięciu agarozy i zdjęciu szkiełek nakrywkowych preparaty zanurzano w alkalicznym buforze lizującym (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10% DMSO, 1% Triton X-100, pH=10) i pozostawiano w ciemności, w temperaturze 4°C, na co najmniej 16 godzin. Po zakończeniu lizy preparaty dwukrotnie płukano buforem neutralizującym (0,4 M Tris pH=7.5) oraz układano na 40 minut w aparacie do elektroforezy, zawierającym silnie alkaliczny bufor (300 mM NaOH, 1mM EDTA, pH>13). Po tym czasie prowadzono elektroforezę przez 30 minut przy napięciu 0,74 V/cm i natężeniu 300 mA. Następnie preparaty płukano trzykrotnie buforem neutralizującym (0,4 M Tris, pH=7.5) oraz zanurzano na 5 minut w zimnym metanolu. Bezpośrednio przed analizą szkiełka inkubowano przez 5 minut w wodzie destylowanej oraz barwiono jodkiem propidyny (2,5 μg/ml). Pomiarów dokonano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Olympus IX 50 z wykorzystaniem zielonego filtra oraz kamery CCD. Analiza uszkodzeń DNA została przeprowadzona w programie Comet Assay 2.6 (Theta System GmbH, Niemcy) określającym stopień uszkodzenia komórek. Wszystkie eksperymenty wykonano w trzech, niezależnych powtórzeniach, zaś z każdego preparatu analizowano po 100 komórek. W dalszej analizie posłużono się % DNA zawartym w „ogonie komety".

Oznaczenie komórek apoptotycznych z użyciem barwnika Hoechst 33342 w mikroskopii fluorescencyjnej

Apoptoza, czyli programowana śmierć komórki, jest wysoce zorganizowanym, kontrolowanym genetycznie procesem fizjologicznym prowadzącym do eliminacji komórek. Apoptoza służy utrzymaniu stałej liczby komórek w tkankach i narządach oraz pomaga usuwać zbyteczne lub uszkodzone komórki. Jest to kluczowy proces w eliminacji komórek nowotworowych. Na poziomie morfolo-

gicznym komórki apoptotyczne wyraźnie różnią się od zdrowych: widoczna jest kondensacja chromatyny, fragmentacja DNA na odcinki wielkości około 180 par zasad lub ich wielokrotności oraz formowanie ciałek apoptotycznych – struktur zawierających organelle i fragmenty chromosomów otoczonych błoną komórkową. Za pomocą barwienia fluorescencyjnego możliwe jest odróżnienie komórek prawidłowych od tych, które weszły w apoptozę, ponieważ w ich przypadku zamiast jądra komórkowego w obrazie z mikroskopu fluorescencyjnego widoczne są jasno świecące ciałka apoptotyczne zaprezentowane na rycinie 2.

Komórki w zawiesinie o gęstości 5 x 10^5/ml wysiewano na 24-dołkową płytkę i dodawano galusan epigallokatechiny w stężeniu z zakresu 0–100 μM i/lub etopozyd w stężeniu 0,5 μM. Płytki pozostawiano do inkubacji w cieplarce w 37°C i 5% CO_2 na 1, 24 lub 48 godzin. Następnie komórki dwukrotnie odwirowano w PBS w warunkach: 230 x *g* (1200 rpm), 5 minut, 4°C i dodano 100 μl barwnika (1μg/ml Hoechst 33342 w 3,7% paraformaldehydzie w PBS). Analizę wykonano w mikroskopie fluorescencyjnym, licząc za pomocą licznika hematologicznego procentowy udział komórek apoptotycznych w 500 przypadkowo napotkanych komórkach. Jako apoptotyczne przyjmowano komórki, w których widoczne były ciałka apoptotyczne oraz wykazywały intensywną, niebieską fluorescencję.

Analiza statystyczna

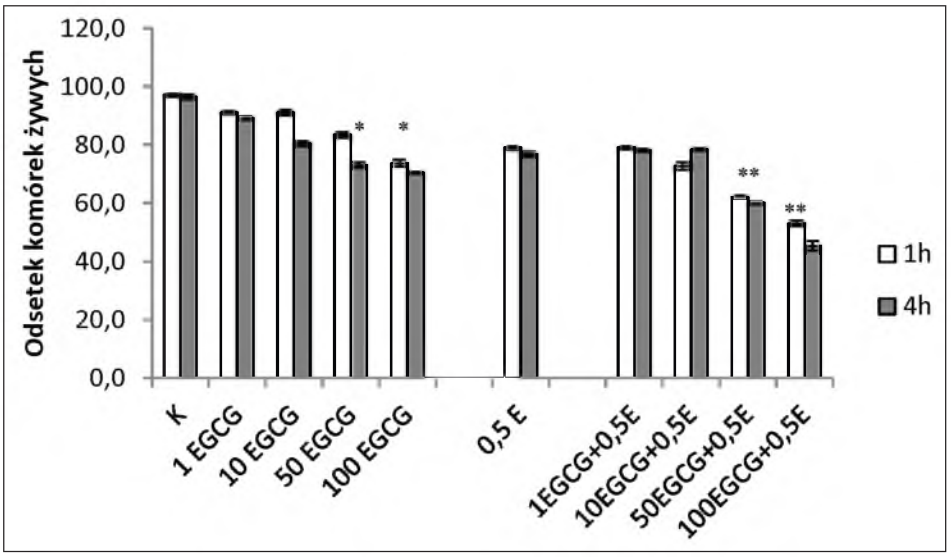
Analizy statystycznej wyników testu kometowego dokonano w programie Statistica 12,0 (StatSoft Polska), używając testu ANOVA popartego analizą post-hoc Tukeya (HSD). Wyniki przedstawiono w postaci średnich grupowych, słupki błędów oznaczają 1,96SE (błędu standardowego). Różnice przy $p < 0,05$ przyjęto za istotne statystycznie. W przypadku oceny istotności wyników pomiaru żywotności oraz apoptozy zastosowano test t-studenta.

Wyniki

Wpływ EGCG i/lub etopozydu na żywotność komórek K562

Wykazano, że wraz ze wzrostem stężenia EGCG zmniejsza się odsetek komórek żywych. Równoczesna inkubacja komórek K562 z etopozydem i EGCG powoduje istotne statystycznie zmniejszenie odsetka komórek żywych, ale tylko dla wyższych stężeń tego polifenolu, tj. 50 i 100 μM EGCG. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic pomiędzy czasem inkubacji wynoszącym 1 lub 4 godziny dla wszystkich badanych stężeń i związków. Wyniki przedstawiono na rycinie 3.

Aby sprawdzić, czy wcześniejsza inkubacja komórek K562 z EGCG uwrażliwia je na działanie etopozydu, komórki traktowano przez 23 lub 47 godzin z EGCG, a następnie na jedną (ostatnią) godzinę dodawano etopozyd w stężeniu 0,5 μM. Wyniki przedstawiono na rycinie 4. Wykazano, że wraz z wydłużeniem czasu inkubacji do 24 i 48 godzin zmniejsza się odsetek komórek żywych,

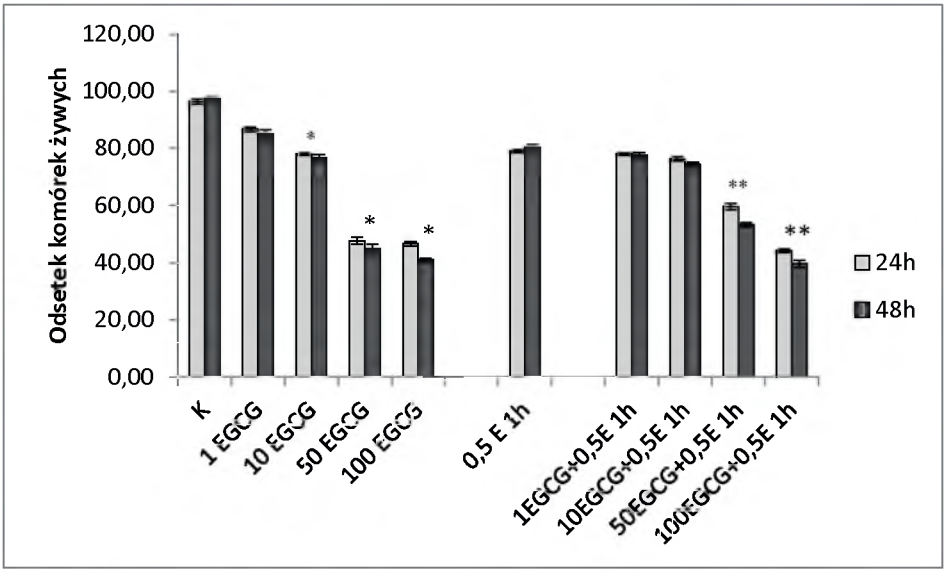


Rycina 3. Wpływ galusanu epigallokatechiny (EGCG) w zakresie stężeń 0–100 μM i/lub 0,5 μM etopozydu (E) na żywotność komórek K562 po 1 i 4 godzinach inkubacji z badanymi związkami. K-kontrola; 1–100 EGCG – 1–100 μM EGCG; 0,5E – 0,5 μM E. * – istotność statystyczna ($p<0,05$) w stosunku do kontroli; ** – istotność statystyczna ($p<0,05$) w stosunku do 0,5 μM etopozydu

traktowanych EGCG w sposób zależny od zastosowanej dawki. Wcześniejsza inkubacja komórek K562 uwrażliwia je na działanie etopozydu. Zaobserwowany wzrost odsetka komórek martwych po 24 i 48 godzinach inkubacji z EGCG i jednogodzinnej równoczesnej inkubacji z 0,5 μM etopozydem wynika raczej z silnego działania galusanu niż etopozydu. Jednocześnie może to świadczyć o tym, że wcześniejsza i długotrwała (do 48 godzin) ekspozycja komórek K562 na działanie niskich dawek EGCG (tj. 1 i 10 μM) nie zmniejsza skuteczności cytostatycznego działania tego leku.

Wpływ EGCG na uszkodzenia DNA w komórkach K562

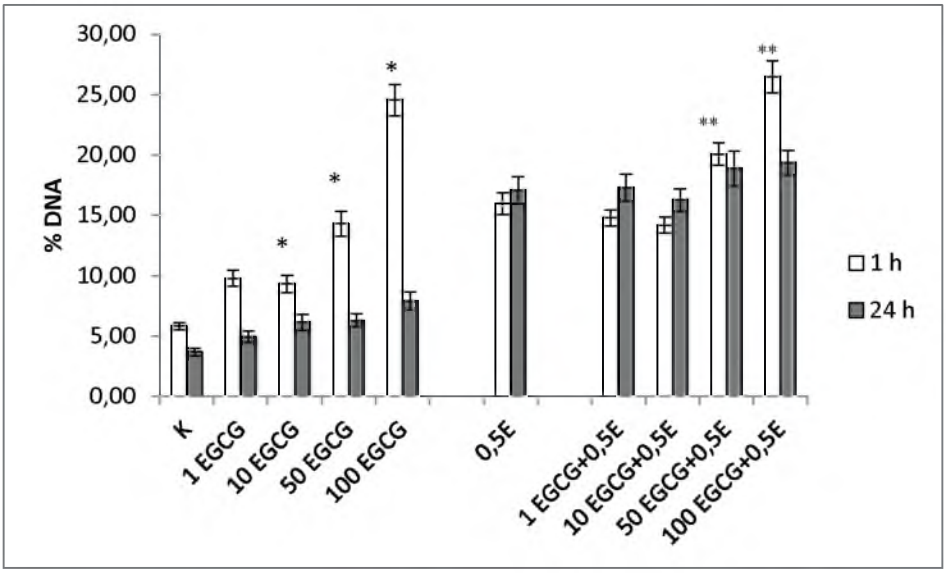
Galusan epigallokatechiny w stężeniach 50 i 100 μM powoduje istotny statystycznie wzrost poziomu uszkodzeń DNA w komórkach linii K562, ale tylko po jednogodzinnej inkubacji z tym polifenolem. Efektu tego nie wykazano wydłużając czas inkubacji z EGCG do 24 godzin. Ponadto zaobserwowano, że wyższy poziom uszkodzeń występuje po jednogodzinnej inkubacji komórek z EGCG niż po 24-godzinnej inkubacji, co może wskazywać, że zainicjowane przez EGCG



Rycina 4. Wpływ galusanu epigallokatechiny (EGCG) w zakresie stężeń 0–100 μM na żywotność komórek K562 po 24 i 48 godzinach inkubacji oraz 23 i 47 godzinach inkubacji z EGCG w zakresie stężeń 0–100 μM i równoczesnej jednogodzinnej inkubacji z 0,5 μM etopozydem. K-kontrola; 1–100 EGCG – 1–100 μM EGCG; 0,5E 1h – 0,5 μM E; 1–100 EGCG + 0,5 E 1h – 1–100 μM EGCG 23 lub 47 h i 0,5 μM E 1h (ostatnia godzina inkubacji). * – istotność statystyczna ($p<0,05$) w stosunku do kontroli; ** – istotność statystyczna ($p<0,05$) w stosunku do 0,5 μM etopozydu.

uszkodzenia są po pewnym czasie (w tym wypadku 24 godziny) naprawiane przez komórki K562. Wyniki przedstawiono na rycinie 5.

W dalszej kolejności sprawdzono, czy równoczesna inkubacja komórek K562 z EGCG w zakresie stężeń 0–100 μM i etopozydem w stężeniu 0,5 μM przez okres jednej godziny wpływa na poziom indukowanych uszkodzeń DNA. Wyniki przedstawiono na rycinie 5. Etopozyd w stężeniu 0,5 μM przez okres jednej godziny powoduje istotny statystycznie wzrost poziomu uszkodzeń DNA. Równoczesna inkubacja komórek K562 z 0,5 μM etopozydem i EGCG w stężeniach 1 i 10 μM nie powoduje istotnych statystycznie zmian w poziomie uszkodzeń DNA. Co ważne, te zakresy stężeń nie zmniejszają też poziomu uszkodzeń DNA wywołanych cytostatykiem. Natomiast jednoczesna inkubacja z 0,5 μM etopozydem oraz z 50 lub 100 μM EGCG powoduje istotny statystycznie wzrost poziomu uszkodzeń DNA w stosunku do działania samego etopozydu.



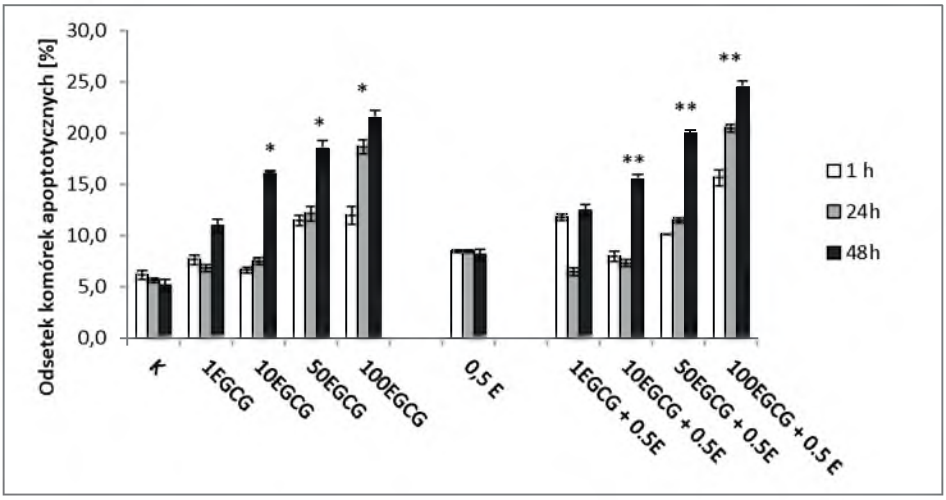
Rycina 5. Wpływ galusanu epigallokatechiny i/lub etopozydu na uszkodzenia DNA w komórkach linii K562 po 1- i 24-godzinnej inkubacji. Komórki K562 inkubowano z EGCG w stężeniu 1–100 μM (1–100 EGCG) przez 1 lub 24 godziny bez lub w obecności 0,5 μM etopozydu dodawanego na jedną (ostatnią) godzinę inkubacji (1–100 EGCG + 0,5 E). Wyniki reprezentują średnie wartości z trzech doświadczeń. Na wykresie oznaczono różnice istotne statystycznie ($p<0,05$) względem próby kontrolnej (K) (*) oraz etopozydu (0,5μM) (0.5E)(**)

Następnie sprawdzono, czy wcześniejsza inkubacja komórek K562 z galusanem epigallokatechiny uwrażliwia je na działanie cytostatyku, jakim jest etopozyd. Wykazano, że ekspozycja komórek K562 na 23-godzinne działanie EGCG nie uwrażliwia tych komórek na późniejsze jednogodzinne działanie etopozydu – nie wykazano istotnych statystycznie zmian w poziomie uszkodzeń DNA. Co ważne, polifenol ten nie zmniejsza/obniża działania cytostatyku, co odzwierciedlało się w takim samym poziomie uszkodzeń DNA po działaniu etopozydu (17%), jak i po działaniu EGCG (we wszystkich badanych zakresach stężeń) i etopozydu (uszkodzenia DNA na poziomie 16–19%).

Apoptoza

Wykazano, że 24-godzinna inkubacja komórek K562 z EGCG w stężeniach 50 i 100 μM powoduje istotny statystycznie wzrost odsetka komórek apoptotycznych. Wydłużenie czasu inkubacji do 48 godzin wzmacnia ten proapoptotyczny efekt działania EGCG poprzez dalszy wzrost liczby komórek z widocznymi ciał-

kami apoptotycznymi. Wcześniejsza, tj. 23- lub 47-godzinna inkubacja komórek białaczkowych z EGCG w wyższych stężeniach (tj. 50 i 100 μM) uwrażliwia je na późniejsze jednogodzinne działanie etopozydu – zaobserwowano istotny wzrost odsetka komórek apoptotycznych. Wyniki przedstawiono na rycinie 6.



Rycina 6. Zależność pomiędzy stężeniem EGCG oraz EGCG i 0,5 μM etopozydem, a odsetkiem komórek apoptotycznych po 1, 24 i 48 godzinach inkubacji. Komórki K562 inkubowano z EGCG w stężeniu 0–100μM (0–100 EGCG) przez 1, 23 lub 47 godzin, a następnie dodawano etopozyd w stężeniu 0,5 μM (0,5E) na jedną godzinę. Eksperyment wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach. Na wykresie oznaczono (*) różnice istotne statystycznie ($p<0,05$) względem próby kontrolnej (K) oraz względem etopozydu (**)

Dyskusja

W leczeniu nowotworów chemioterapia jest ciągle najczęściej stosowaną metodą. W ostatnich latach badacze coraz częściej skupiają się na tzw. terapii wspomaganej z zastosowaniem różnego typu związków, głównie o charakterze antyoksydacyjnym, w tym flawonoidów i innych polifenoli. W przeprowadzonych eksperymentach postanowiono sprawdzić, czy składnik zielonej herbaty – galusan epigallokatechiny – może okazać się skuteczny w terapii skojarzonej z etopozydem w przypadku leczenia przewlekłej białaczki szpikowej. Zastosowane w badaniach stężenia galusanu epigallokatechiny oraz etopozydu obejmowały jedynie zakres zbliżony do stężeń, które osiągane są w organizmie. Stężenie etopozydu osiągane w osoczu w zależności od użytego schematu leczenia waha się

pomiędzy 0,2–150 μM [29]. W przeprowadzonych eksperymentach użyto stężenia leku 0,5 μM, które pozwala osiągnąć dobre efekty terapeutyczne przy jego najmniejszej toksyczności. W przypadku galusanu epigallokatechiny użyto również stężeń (1–100 μM), które możliwe są do osiągnięcia we krwi po wypiciu zielonej herbaty lub zażyciu suplementów wzbogaconych EGCG [6].

Wpływ EGCG na żywotność komórek K562.

Badania przeprowadzone z wykorzystaniem galusanu epigalloketechiny potwierdziły, że związek ten ujemnie wpływa na żywotność komórek przewlekłej białaczki szpikowej. Zastosowanie wysokich stężeń, tj. 50 lub 100 μM EGCG, skutkowało znacznym obniżeniem żywotności komórek K562 bez względu na zastosowany czas inkubacji. Natomiast wydłużenie czasu inkubacji komórek z EGCG do 48 godzin przyczyniło się do istotnego statystycznie zmniejszenia żywotności komórek już przy niższym, tj. 10 μM, stężeniu EGCG. Wykazano również, że EGCG może być skutecznym związkiem, jeśli chodzi o redukcję liczby komórek nowotworowych, jeżeli połączymy jego działanie z etopozydem. Co ważne, nawet niskie dawki tego polifenolu – tj. do 10 μM – nie zmniejszają skuteczności działania cytostatyku, a wyższe dawki (50 i 100 μM) uwrażliwiają komórki K562 na działanie etopozydu. Zaobserwowany wzrost odsetka komórek martwych po 24 i 48 godzinach inkubacji z EGCG i etopozydem wydaje się wynikać z silnego działania samego polifenolu.

Z doświadczeń przeprowadzonych przez inne grupy badawcze wynika również, że EGCG wpływa na zmniejszenie żywotności komórek nowotworowych. Inkubacja komórek MCF-7 (nowotwór piersi) przez 72-godzinny z EGCG w stężeniach 40–100 μM powodowała istotne statystycznie obniżenie żywotności [30]. Galusan epigallokatechiny był również czynnikiem wpływającym na żywotność nowotworowych komórek macierzystych (CSC), wyizolowanych z linii komórkowych PC-3 i LNCaP (nowotwór prostaty). Badania dowiodły, że ludzki nowotwór prostaty zawiera niewielką populację komórek macierzystych wrażliwych na działanie EGCG, ponieważ zastosowanie rosnących dawek tego polifenolu powodowało zmniejszenie żywotności CSC [31].

Badania przeprowadzone na linii K562 sugerują, że EGCG stosowany w wyższych dawkach (50 i 100 μM) może w znaczny sposób przyczyniać się do eliminacji komórek nowotworowych krwi, a niskie dawki tego polifenolu nie zmniejszają skuteczności działania cytostatyku. Podobne wyniki uzyskały inne grupy badawcze, stosując EGCG z połączeniu z doksorubicyną oraz wykazując synergistyczny efekt działania EGCG i doksorubicyny w badaniach *in vitro* i *in vivo* na komórkach nowotworu wątroby i prostaty [32–34].

Uszkodzenia DNA

Galusan epigallokatechiny, którym traktowano komórki linii K562, indukował uszkodzenia DNA w sposób zależny od zastosowanej dawki, ale tylko po jed-

nogodzinnej inkubacji. Efektu tego nie obserwowano po 24 godzinach, co sugeruje, że komórki K562 są w stanie naprawić uszkodzenia indukowane EGCG. Równocześnie wykazano, że wyższe stężenia tego polifenolu (tj 50 i 100 μM) wzmagają efekt 0,5 μM etopozydu, co skutkowało wzrostem poziomu uszkodzeń DNA z 15% do, odpowiednio, 20 i 26%. Natomiast wcześniejsza inkubacja komórek z EGCG nie uwrażliwia ich na późniejsze działanie etopozydu, ale też nie zmniejsza genotoksycznego działania leku.

Metoda kometowa została także wykorzystana w badaniach nad wpływem EGCG na uszkodzenia DNA indukowane H_2O_2 i MNNG (metylonitronitrosoguanidyna, mutagen) w linii komórkowej V-79 (fibroblasty płuc chomika chińskiego). Inkubacja fibroblastów z H_2O_2 i MNNG powodowała uszkodzenia DNA, które rosły wraz ze wzrostem stężeń użytych czynników. W obu przypadkach zastosowanie EGCG (0–100 μM) powodowało zmniejszenie uszkodzeń wywołanych wcześniejszą inkubacją z H_2O_2 i MNNG. Ta sama grupa badawcza przeprowadziła eksperyment, w którym wykazano, że jeżeli komórki V-79 tratowane są najpierw EGCG w stężeniach 0–100 μM, a następnie H_2O_2 (45μg/ml) lub MNNG (50 μM), odsetek uszkodzeń DNA ulega redukcji proporcjonalnie do użytego stężenia EGCG [35].

Indukcja procesu apoptozy w komórkach K562

W przypadku komórek, w których inicjowano proces apoptozy, zastosowanie krótkiego czasu inkubacji pozwoliło na uzyskanie wyników istotnych statystycznie przy stężeniach 50 μM i 100 μM EGCG. Natomiast wydłużenie czasu inkubacji do 48 godzin powodowało, że stężenie czynnika koniecznego do zapoczątkowania mechanizmów apoptozy maleje do 10 μM. Ponadto wcześniejsza ekspozycja komórek K562 na EGCG uwrażliwia je na późniejsze działanie etopozydu, co obserwowano poprzez wzrost odsetka komórek z ciałkami apoptotycznymi. Zatem za inicjację procesu apoptozy w komórkach K562 odpowiadają proapoptotyczne właściwości galusanu epigallokatechiny. Badania przeprowadzone przez Roya i wsp. potwierdzają, że EGCG hamuje wzrost i proliferacje komórek nowotworowych K562 oraz indukuje w nich proces apoptozy [35]. Grupa badawcza Tanga również dowiodła, że EGCG ma właściwości proapototyczne. Swoje badania przeprowadzili na komórkach macierzystych (CSC, ang. *cancer stem cells*) wyizolowanych z nowotworu prostaty. Otrzymane wyniki były potwierdzeniem, że EGCG powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego i inicjację apoptozy poprzez generowanie wolnych rodników tlenowych oraz na drodze aktywacji białek proapoptotycznych: Bax, Bad, Bik, Bid i kaspaz: 3, 9. EGCG blokował także ekspresję antyapoptotycznych białek Bcl-2, Bcl-xL. Grupa wykazała, że efekt proapoptotycznej aktywności EGCG jest wzmacniany przez inny polifenol z grupy flawonoidów – kwercetynę. Komórki macierzyste nowotworu prostaty, stymulowane jednocześnie EGCG i kwercetyną, cechowały się niższą

żywotnością, częściej wchodziły na drogę apoptozy i były bardziej wrażliwe na działanie chemioterapii [31]. Podobnie wyniki uzyskali badacze, którzy w doświadczeniach wykorzystywali linie komórkowe wyizolowane z nowotworów płuc: H1299, H460, A549, CL13 i okrężnicy: HT29. Wszystkie komórki nowotworowe, które inkubowano z EGCG, były wrażliwe na działanie tego polifenolu. Dodatkowo udowodniono, że obecność enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i katalazy (5 U/ml, 30 U/ml) osłabiała aktywność EGCG. Równocześnie, jeżeli komórki były mniej podatne na działanie EGCG, badacze obserwowali, że mniejszą rolę odgrywają SOD i katalaza w obniżaniu aktywności EGCG. Po 24 godzinach inkubacji komórek H1299 wyłącznie z 50 μM EGCG obserwowali zwiększenie odsetka komórek apoptotycznych. Natomiast jeżeli komórki traktowano 25 μM lub 50 μM EGCG przez 24 godziny w obecności SOD i katalazy, to nieznacznie zmniejszała się ilość komórek apoptotycznych. Wyniki badań, które uzyskali, świadczą o tym, że na indukcję apoptozy wpływają RFT produkowane w wyniku oksydacyjnej aktywności EGCG obecnego w pożywce w czasie inkubacji z komórkami [36].

Obecnie sugerowanym sposobem na zwiększenie wydajności działania cząstek używanych w terapii nowotworów jest stosowanie nanotechnologii. Efekt działania galusanu epigallokatechiny umieszczonego w nanocząsteczkach po 24 godzinach inkubacji okazał się ponad 10 razy bardziej skuteczny w porównaniu z samym EGCG. W przypadku komórek PCa stężenie, dla którego został zahamowany wzrost 50% komórek (IC50), dla nano-EGCG wynosiło 3,74 μM, podczas gdy dla samego EGCG – 43,6 μM. Osiągnięto wysoki odsetek komórek wchodzących na drogę apoptozy (81%) po zastosowaniu 5,48 μM nano-EGCG. Natomiast, aby osiągnąć podobny efekt dla samego EGCG, należało zwiększyć jego dawkę do ponad 40 μM [37].

Podsumowując dane literaturowe i powyższe badania, galusan epigallokatechiny wydaje się być obiecującym polifenolem w leczeniu skojarzonym z etopozydem. Wspomaga działanie etopozydu – eliminując komórki białaczkowe, zwiększa uszkodzenia DNA w tych komórkach oraz kieruje je na drogę apoptozy. I co ważne, nawet niskie dawki EGCG nie zmniejszają terapeutycznego działania etopozydu. Nie należy jednak tych jakże obiecujących właściwości galusanu epigallokatechiny przekładać na wszystkie rodzaje nowotworów czy inne leki stosowane podczas chemioterapii. Bowiem jak wykazały badania Golden i wsp. [38], EGCG zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo* hamuje działanie bortezomibu (leku przeciwnowotworowego, który jest inhibitorem 26S proteasomu), stosowanego w leczeniu m.in. szpiczaka mnogiego. Podobne wyniki uzyskała grupa badawcza (Modernelli i wsp.) – EGCG hamował terapeutyczne działanie bortezomibu na komórki raka prostaty [39].

Wnioski

Chemioterapia jest jednym z najczęściej stosowanych sposobów leczenia nowotworów. Niestety efekty uboczne, jakie niesie ze sobą, są nadal poważnym, a zarazem najczęstszym problemem, pomimo kilkudziesięciu lat stosowania tego sposobu leczenia. Obecnie wielu badaczy skupia się na poszukiwaniu rozwiązań, które, niezmniejszając cytostatycznej efektywności leków, zmniejszałyby cytotoksyczność w kierunku zdrowych komórek i pozwoliły na wyeliminowanie problemów związanych ze stanami zapalnymi lub infekcjami, czyli tzw. terapii wspomaganej, która wykorzystuje przeciwutleniacze. Niestety wiedza na temat interakcji pomiędzy antyoksydantami, a lekami przeciwnowotworowymi jest w dalszym ciągu ograniczona. I jak pokazują badania, nie każdy antyoksydant „współdziała" z cytostatykiem, jak na przykład w przypadku galusanu epigallokatechiny i bortezomibu.

W opisanych badaniach wykazano, że galusan epigallokatechiny, podstawowy składnik zielonej herbaty, może się okazać przydatny w terapii białaczek z zastosowaniem konkretnego cytostatyku: etopozydu. Obiecujące efekty osiągnięto dla stężeń 50 i 100 μM EGCG, które to dawki eliminowały komórki przewlekłej białaczki szpikowej, a w połączeniu z cytostatykiem wzmagały jego cytotoksyczne właściwości. Skuteczność współdziałania EGCG i etopozydu na komórki K562 wyrażona jest także jako wzrost odsetka komórek z uszkodzeniami DNA. Co więcej, komórki, które nie zostały wyeliminowane poprzez cytotoksyczne właściwości etopozydu i galusanu epigallokatechiny, mogą zostać skierowane na drogę apoptozy, co również potwierdzają wyniki naszych badań. Obserwowany wzrost liczby komórek apoptotycznych po działaniu EGCG i etopozydu jest w opisywanym przypadku procesem nieodwracalnym, gdyż ciałka apoptotyczne to tzw. „późna apoptoza". Przedstawione tutaj wstępne wyniki badań nad zastosowaniem EGCG w terapii skojarzonej z etopozydem w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej wymagają dalszych wnikliwych badań szczególnie pod kątem reakcji na ten typ terapii komórek prawidłowych. Uprzednio opublikowane wyniki, uzyskane w badaniach nad wpływem terapii kojarzonej kwercetyną i etopozydem, wskazują na możliwość redukcji ryzyka powstawania uszkodzeń DNA indukowanych etopozydem w zdrowych komórkach przez zastosowanie polifenoli [40–42]. Wstępne wyniki aktualnie prowadzonych badań wypadają bardzo obiecująco. Galusan epigallokatechiny w zakresie dawek 1–50 μM obniża poziom uszkodzeń DNA indukowanych etopozydem w limfocytach i neutrofilach prawidłowych [publikacja w przygotowaniu]. Jednakże kluczową wydaje się kwestia sprawdzenia efektu działania tej konkretnej pary cytostatyk–przeciwutleniacz: etopozyd–EGCG. Rosnące zainteresowanie flawonoidami, do których należy również galusan epigallokatechiny budzi zapotrzebowanie na kompleksową i syntetyczną wiedzę o współdziałaniu tych substancji z chemioterapeutykami.

Bibliografia

1. Ostrowska J, Stankiewicz A, Skrzydlewska E. *Antyoksydacyjne właściwości zielonej herbaty*. Brom Chem Toksykol. 2001; 34(2): 131–140.
2. Kwiatkowska E. *Składniki herbat w zapobieganiu chorób układu krążenia*. Post Fitoterapii. 2007; 2: 91–94.
3. Katiyar SK, Matsui MS, Elmets CA, et al. *Polyphenolic antioxidant (-)-epigallocatechin-3-gallate from green tea reduces UVB-induced inflammatory responses and infiltration of leukocytes in human skin*. Photochem Photobiol. 1999; 69(2): 148–153.
4. Agarwal A, Prasad R, Jain A. *Effect of green tea extract (catechins) in reducing oxidative stress seen in patients of pulmonary tuberculosis on DOTS Cat I regimen*. Phytomedicine. 2010; 17(1): 23–27.
5. Khan N, Afaq F, Saleem M, et al. *Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate*. Cancer Res. 2006; 66(5): 2500–2505.
6. Bandele OJ, Osheroff N. *(-)-Epigallocatechin gallate, a major constituent of green tea, poisons human type II topoisomerases*. Chem Res Toxicol. 2008; 21(4): 936–943.
7. Łuczaj W. *Metody oznaczania polifenoli (katechin oraz teaflawin) występujących w herbatach*. Gazeta Farmaceut. 2008; 5: 30–33.
8. Malińska D, Kiersztan A. *Flawonoidy – charakterystyka i znaczenie w terapii*. Post Bioch. 2004; 50: 182–196.
9. Kik K, Szmigiero L. *Deksrazoksan (ICRF-187) – czynnik kardioochronny i modulator działania niektórych leków przeciwnowotworowych*. Post Hig Med Dośw. 2006; 60: 584–590.
10. Ostrowska J, Skrzydlewska E. *Aktywność biologiczna flawonoidów*. Post Fitoterapii. 2005; 3: 71–79.
11. Kostowski W, Herman ZS. *Farmakologia. Podstawy farmakoterapii. Podręcznik dla studentów medycyny i lekarzy*. Wyd. Lek. PZWL 2005; s. 434.
12. Slevin ML. *The clinical pharmacology of etoposide*. Cancer. 1991; 67 (1 Suppl): 319–329.
13. Hande KR. *Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II*. Biochim Biophys Acta. 1998; 1400(1–3): 173–184.
14. Podlewski JK, Chwalibogowska-Podlewska A, Adamowicz R. *Leki współczesnej terapii*. Split Trading, Warszawa 2005; s. 261.
15. Cancer Research UK. www.cancerhelp.org.uk/about-cancer/treatment/cancer--drugs/etoposide [dostęp 6.04.2018].
16. Weijl NI, Cleton FJ, Osanto S. *Free radicals and antioxidants in chemotherapy--induced toxicity*. Cancer Treat Rev. 1997; 23(4): 209–240.
17. Sangeetha P, Das UN, Koratkar R, et al. *Increase in free radical generation and lipid peroxidation following chemotherapy in patients with cancer*. Free Radic Biol Med. 1990; 8(1):15–19.
18. Dürken M, Agbenu J, Finckh B, et al. *Deteriorating free radical-trapping capacity and antioxidant status in plasma during bone marrow transplantation*. Bone Marrow Transplant. 1995; 15(5): 757–762.

19. Lauterburg BH, Nguyen T, Hartmann B, et al. *Depletion of total cysteine, glutathione, and homocysteine in plasma by ıfosfamide/mesna therapy.* Cancer Chemother Pharmacol. 1994; 35(2): 132–136.
20. Clemens MR, Ladner C, Schmidt H, et al. *Decreased essential antioxidants and increased lipid hydroperoxides following high-dose radiochemotherapy.* Free Radic Res Commun. 1989; 7(3–6): 227–232.
21. Weijl NI, Elsendoorn TJ, Lentjes EG, et al. *Supplementation with antioxidant micronutrients and chemotherapy-induced toxicity in cancer patients treated with cisplatin-based chemotherapy: a randomised, double-blind, placebo-controlled study.* Eur J Cancer. 2004; 40(11): 1713–1723.
22. Raptis S, Bapat B. *Genetic instability in human tumors.* EXS. 2006; (96): 303–320.
23. Schneider DT, Hilgenfeld E, Schwabe D, et al. *Acute myelogenous leukemia after treatment for malignant germ cell tumors in children.* J Clin Oncol. 1999; 17(10): 3226–3233.
24. Kagan VE, Kuzmenko AI, Tyurina YY. *Pro-oxidant and antioxidant mechanisms of etoposide in HL-60 cells: role of myeloperoxidase.* Cancer Res. 2001; 61(21): 7777–7784.
25. Garay G, Dupont J, Dragosky M, Nucifora E, et al. *Combination salvage chemotherapy with MIZE (ıfosfamide-mesna, idarubicin and etoposide) for relapsing or refractory lymphoma.* Leuk Lymphoma. 1997; 26(5–6): 595–602.
26. Kagan VE, Yalowich JC, Borisenko GG, et al. *Mechanism-based chemopreventive strategies against etoposide-induced acute myeloid leukemia: free radical/antioxidant approach.* Mol Pharmacol. 1999; 56(3): 494–506.
27. Seifried HE, Anderson DE, Sorkin BC, et al. *Free radicals: the pros and cons of antioxidants. Executive summary report.* J Nutr. 2004; 134(11): 3143–3163.
28. Lamson DW, Brignall MS. *Antioxidants in cancer therapy; their actions and interactions with oncologic therapies.* Altern Med Rev. 1999; 4(5): 304–329.
29. Cierniak A. *Wpływ kwercetyny (3,5,7,3',4' – pentahydroksyflawonu) na uszkodzenia DNA wywołane etopozydem w komórkach prawidłowych krwi i komórkach białaczkowych.* Wydz. Biotech. UJ, Kraków 2007; s. 131.
30. Kushima Y, Iida K, Nagaoka Y, et al. *Inhibitory effect of (-)-epigallocatechin and (-)-epigallocatechin gallate against heregulin beta1-induced migration/invasion of the MCF-7 breast carcinoma cell line.* Biol Pharm Bull. 2009; 32(5): 899–904.
31. Tang SN, Singh C, Nall D, et al. *The dietary bioflavonoid quercetin synergizes with epigallocathechin gallate (EGCG) to inhibit prostate cancer stem cell characteristics, invasion, migration and epithelial-mesenchymal transition.* J Mol Signal. 2010; 5: 14. doi: 10.1186/1750-2187-5-14.
32. Stearns ME, Amatangelo MD, Varma D, et al. *Combination therapy with epigallocatechin-3-gallate and doxorubicin in human prostate tumor modeling studies: Inhibition of metastatic tumor growth in severe combined immunodeficiency mice.* Am J Pathol. 2010; 177: 3169–3179.
33. Chen L, Ye HL, Zhang G, et al. *Autophagy inhibition contributes to the synergistic interaction between EGCG and doxorubicin to kill the hepatoma Hep3B cells.* PloS One. 2014; 9.

34. Liang G, Tang A, Lin X, et al. *Green tea catechins augment the antitumor activity of doxorubicin in an in vivo mouse model for chemoresistant liver cancer*. Int J Oncol. 2010; 37: 111–123.
35. Roy M, Chakrabarty S, Sinha D, et al. *Anticlastogenic, antigenotoxic and apoptotic activity of epigallocatechin gallate: a green tea polyphenol*. Mutat Res. 2003; 523–524: 33–41.
36. Li GX, Chen YK, Hou Z, ET AL. *Pro-oxidative activities and dose-response relationship of (-)-epigallocatechin-3-gallate in the inhibition of lung cancer cell growth: a comparative study in vivo and in vitro*. Carcinogenesis. 2010; 31(5): 902–910.
37. Siddiqui IA, Adhami VM, Ahmad N, et al. *Nanochemoprevention: sustained release of bioactive food components for cancer prevention*. Nutr Cancer. 2010; 62(7): 883–890.
38. Golden EB, Lam PY, Kardosh A, et al. *Green tea polyphenols block the anticancer effects of bortezomib and other boronic acid-based proteasome inhibitors*. Blood. 2009; 113(23): 5927–5937.
39. Modernelli A, Naponelli V, et al. *EGCG antagonizes Bortezomib cytotoxicity in prostate cancer cells by an autophagic mechanism*. Sci Rep. 2015; 5: 15270. doi: 10.1038.
40. Kapiszewska M, Cierniak A, Elas M, et al. *Lıfespan of etoposide-treated human neutrophils is affected by antioxidant ability of quercetin*. Toxicol In Vitro. 2007; 21(6): 1020–1030.
41. Kapiszewska M, Cierniak A, Papiez MA, et al. *Prolonged quercetin administration diminishes the etoposide-induced DNA damage in bone marrow cells of rats*. Drug Chem Toxicol. 2007; 30(1): 67–81.
42. Cierniak A, Papiez M, Kapiszewska M. *Modulatory effect of quercetin on DNA damage, induced by etoposide in bone marrow cells and on changes in the activity of antioxidant enzymes in rats*. Rocz Akad Med Bialymst. 2004; 49 Suppl 1: 167–169.

Can epigallocatechin gallate be an effective polyphenol in combination therapy with etoposide for the treatment of chronic myelogenous leukemia?

Abstract

Introduction: Green tea ingredient – epigallocatechin gallate (EGCG) – is known for its chemopreventive and chemotherapeutic properties. It has strong antioxidant and anti-inflammatory properties, and antiproliferative or pro-apoptotic activity against cancer cells. Etoposide is one of the most commonly used anti-cancer drugs causing many side effects. Materials and methods: This study investigated the role of EGCG in combination therapy with etoposide in the treatment of chronic myeloid leukemia. K562 cells were treated with EGCG and / or etoposide to determine the effect of this polyphenol on cell survival, DNA damage or apoptosis. DNA damages were measured with single cell gel electrophoresis (comet assay) and the apoptosis were analyzed in fluorescence microscope with Hoechst 33342 staining.

Results: Preliminary results suggest that EGCG at 50 and 100 μM sensitizes leukemic cells to the cytotoxic effect of etoposide, increases DNA damage that promotes removal cell and directs them to apoptosis.
Conclusions: The data show that epigallocatechin gallate may prove to be an effective polyphenol in combination therapy with etoposide in the treatment of chronic myeloid leukemia. However, further research is needed to explain the EGCG interaction with chemotherapeutics.

Key words: apoptosis, EGCG, etoposide, chronic myeloid leukemia, DNA damage

Państwo i Społeczeństwo

2018 (XVIII) nr 3

e-ISSN 2451-0858
ISSN 1643-8299

doi.org/10.31749/pismzp2018/20843

Ewelina Wędrowska[1], Marek Libura[2], Maciej Chmielarski[1], Bartłomiej Grad[2], Joanna Golińska[1], Tomasz Senderek[3], Rafał Wojciechowski[4], Jakub Siudut[5], Piotr Kopiński[1]

1. Collegium Medicum Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Wydział Lekarski, Zakład Genoterapii
2. Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja, Wydział Leśny, Zakład Fitopatologii Leśnej, Mykologii i Fizjologii Drzew, Instytut Ochrony Ekosystemów Leśnych
3. Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego, Katedra Fizjologii i Patofizjologii, Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu
4. Klinika Reumatologii i Układowych Chorób Tkanki Łącznej, Szpital Uniwersytecki nr 2 im. dr. Jana Biziela
5. Krakowskie Centrum Badań i Technologii Medycznych, Krakowski Specjalistyczny Szpital im. Jana Pawła II

OBRAZ CYTOIMMUNOLOGICZNY PŁYNU STAWOWEGO W REUMATOIDALNYM ZAPALENIU STAWÓW. WSTĘPNA OCENA WPŁYWU LECZENIA METOTREKSATEM I METYLOPREDNIZOLONEM

Autor korespondencyjny:
Ewelina Wędrowska, Zakład Genoterapii Collegium Medicum UMK
ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz,
e-mail: ewelina.wedrowska@gmail.com

Streszczenie

Wprowadzenie: Pobranie płynu stawowego w reumatoidalnym zapaleniu stawów (RZS) umożliwia wgląd w miejscową aktywność zapalenia. W patogenezie zmian stawowych główną rolę pełnią komórki T, w tym dodatnie z ligandami receptorów śmierci: Ligand Fas (FasL) i TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand). W terapii RZS lekiem pierwszego rzutu jest metotreksat (MTX), w leczeniu uwzględnia się m.in. glikokortyko-

steroidy (metyloprednizolon) i niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ). Mało wiadomo o wpływie leczenia na profil immunologiczny płynu stawowego w RZS.
Cel pracy: Scharakteryzowanie wpływu leczenia metyloprednizolonem i MTX na obraz cytoimmunologiczny płynu stawowego w RZS.
Materiał i metody: Płyn stawowy pobrano od chorych z RZS leczonych metyloprednizolonem (n=11) i MTX (n=6). Grupę kontrolną stanowili chorzy przyjmujący tylko NLPZ (n=19). Zbadano całkowitą liczbę komórek (CLK), odsetek krwinek białych i fenotyp subpopulacji limfocytów płynu stawowego, w tym ekspresję FasL i TRAIL na komórkach Th i Tc.
Wyniki: Stwierdzono spadek CLK płynu u chorych leczonych metyloprednizolonem lub MTX. W grupie MTX wzrosła wartość indeksu CD4/CD8 (mediany: 1,2 vs 0,7, $p<0,05$) w porównaniu z grupą NLPZ. Metyloprednizolon zmniejsza odsetek limfocytów T FasL+ i TRAIL+ (np. mediana CD8+TRAIL+ 12,0% u leczonych metyloprednizolonem, w porównaniu z 19,2% w grupie NLPZ, $p<0,05$; test U-Manna-Whitneya).
Wnioski: W płynie stawowym chorych leczonych metyloprednizolonem wystąpiło obniżenie markerów cytotoksyczności limfocytów w porównaniu z grupą leczoną wyłącznie NLPZ. Równoległe zmiany grupy MTX nie były znamienne. Wysoka wartość indeksu CD4/CD8 w grupie leczonej MTX wynika prawdopodobnie z preferencyjnej eliminacji komórek cytotoksycznych. Badanie cytoimmunologiczne płynu stawowego może mieć znaczenie w ocenie skuteczności leczenia RZS.

Słowa kluczowe: reumatoidalne zapalenie stawów, płyn stawowy, metotreksat, metyloprednizolon

Wprowadzenie

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) jest przewlekłą, układową chorobą tkanki łącznej o podłożu autoimmunologicznym, dotyczącą ok. 1% populacji. Charakteryzuje się nieswoistym, symetrycznym zapaleniem błony maziowej stawów oraz występowaniem licznych zmian pozastawowych. Najbardziej typowymi objawami są narastający ból, sztywność poranna oraz obrzęki małych stawów. Przebieg RZS ma charakter przewlekły, z okresami zaostrzeń i remisji, często agresywny, prowadzący do postępującego niszczenia struktur stawu i tkanek okołostawowych, a w konsekwencji do niepełnosprawności chorego [1–3].

Etiologię RZS poznano tylko częściowo; przyjmuje się, że główną rolę w patogenezie odgrywają mechanizmy autoimmunizacyjne, w tym przede wszystkim aktywowane limfocyty T, makrofagi i komórki dendrytyczne, stanowiące źródło cytokin prozapalnych. Istotne znaczenie przypisuje się też limfocytom B jako bezpośrednio odpowiedzialnym za syntezę m.in. jednego z markerów immunologicznych RZS (czynnika reumatoidalnego) oraz pojawienie się przeciwciał anty-cytrulinowych, wysoce swoistych dla choroby [4–8]. Niewątpliwie ważną rolę w rozwoju choroby odgrywają czynniki genetyczne; ustalono, że ryzyko zachorowania na RZS jest kilkukrotnie wyższe u osób z ekspresją niektórych antygenów układu zgodności tkankowej klasy II (zwłaszcza HLA-DR1B

i –DRB4). Wskazuje się, że zakażenia wirusowe (np. EBV) i bakteryjne (jak *Porphyromonas gingivalis*), mogą w drodze reakcji krzyżowej uruchomić proces autoimmunizacji u predysponowanych genetycznie osób [2,4].

Postępy w zrozumieniu patofizjologii choroby prowadzą do opracowania nowych strategii terapeutycznych, jednak wciąż leczenie RZS ma na celu przede wszystkim osiągniecie remisji klinicznej, tj. uzyskania stanu bez dodatkowych cech aktywności choroby. Stosowane są niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ), glikokortykosteroidy (GKS) oraz leki modyfikujące przebieg choroby (LMPCh): syntetyczne i biologiczne. Właśnie LMPCh pełnią kluczową rolę w farmakoterapii choroby. Ich zastosowanie pozwala na znaczną poprawę kliniczną i powoduje obniżenie stężenia czynnika reumatoidalnego oraz normalizację markerów stanu zapalnego (CRP i OB). Najczęściej stosowanym lekiem z tej grupy jest metotreksat (MTX), uznawany za najskuteczniejszy i wybierany jako lek pierwszego rzutu, zwłaszcza u chorych z agresywnym przebiegiem RZS. MTX jest pośrednim inhibitorem syntezy cytokin prozapalnych i metaloproteinaz. Jego korzystny wpływ wiąże się m.in. z hamowaniem proliferacji limfocytów, syntezy leukotrienów, interleukiny-2 i samego czynnika reumatoidalnego [9,10]. Jednak tylko w pojedynczych badaniach oceniono bezpośredni wpływ MTX na parametry biochemiczne i immunologiczne we krwi, tym mniej więc wiadomo o tych parametrach w płynie stawowym chorych. Drugą grupę powszechnie stosowanych środków w RZS stanowią glikokortykoidy, najczęściej metyloprednizolon. Glikokortykoidy wdrażane są w celu szybkiego wyciszenia reakcji zapalnej, a podawanie ich w skojarzeniu z lekami modyfikującymi przebieg choroby pomaga m.in. zahamować tworzenie ubytków kostnych w przebiegu RZS [11]. Zgodnie z obowiązującym algorytmem leczenia reumatoidalnego zapalenia stawów wg zaleceń EULAR 2016 [12] w przypadku braku skuteczności dotychczasowej terapii – a wcześniej u młodych chorych z agresywną postacią RZS – wdrażane są leki biologiczne. Najczęściej są to przeciwciała monoklonalne, skierowane przeciwko wybranym czynnikom przeciwzapalnym [13,14].

Pomimo stosowania adekwatnego leczenia konwencjonalnego nie udaje się całkowicie powstrzymać postępujących zmian stawowych. Z kolei nieleczone RZS skutkuje poważną niepełnosprawnością narządu ruchu i przedwczesnym zgonem [15]. Należy podkreślić, że narząd ruchu, co oczywiste, nie jest jedynym obszarem patologii RZS, nawet nie jest do końca pewne, czy chronologicznie pierwszym – ale z pewnością najbardziej charakterystycznym. Na nim też skoncentrowano się w niniejszej pracy.

Zbadano w niej poszczególne populacje leukocytów w miejscowym, dotyczącym stawów, odczynie zapalnym RZS. Zmiany zachodzące w tkankach stawu znajdują odzwierciedlenie w składzie płynu stawowego, dokonano zatem próby scharakteryzowania obrazu cytologicznego i immunologicznego płynu stawowego chorych z RZS. Uwzględniono zmianę całkowitej liczby komórek, a także odsetek populacji krwinek białych płynu. W przypadku komórek T zbadano kom-

pozycję ich subpopulacji (CD4+, w uproszczeniu traktowanych jako komórki pomocnicze Th, oraz CD8+, jako komórki cytotoksyczne Tc). Określono odsetek komórek T z ekspresją antygenu wczesnej aktywacji HLA-DR. W pracach nad patogenezą RZS wykazano oporność fibroblastów łuszczki stawowej (fibroblast-like synoviocytes, FLS) na proces apoptozy [16,17]. W związku z tym zwrócono szczególną uwagę na możliwy potencjał cytotoksyczny komórek CD4+ i CD8+ z koekspresją ligandów receptorów śmierci FasL+ i TRAIL+ (TNF-related apoptosis-inducing ligand). Prawdopodobnie są one zdolne do indukcji programowanej śmierci komórek docelowych. Mogą tym samym działać dwojako: niszczyć tkanki stawowe, ale też i hamować zapalenie, poprzez wywołanie apoptozy komórek łuszczki. Pierwsze z tych potencjalnych działań nie jest korzystne, drugie tak. Mając tak określony punkt odniesienia (obraz płynu stawowego u chorych nieleczonych lub tylko leczonych lekami grupy NLPZ), zajęto się w niniejszej pracy dokładną oceną wpływu leczenia metotreksatem i metyloprednizolonem na obraz cytoimmunologiczny płynu chorych z RZS.

Materiał i metody

Grupy chorych

Płyny stawowe pozyskano z Oddziału Urazowo-Ortopedycznego Samodzielnego ZOZ MSW Szpitala w Krakowie (ul. Kronikarza Galla 25) oraz z Kliniki Reumatologii i Układowych Chorób Tkanki Łącznej Szpitala Uniwersyteckiego nr 2 im dr. Jana Biziela w Bydgoszczy. Chorzy zostali poinformowani o celach i procedurach badania i wyrazili świadomą zgodę na swój udział (zgoda Komisji Bioetycznej UMK nr 709/2016) Włączono chorych: 1) leczonych tylko lekami grupy NLPZ – doustnie lub miejscowo, zwykle od wielu miesięcy (lub nieleczonych), w szczególności nieleczonych preparatami GKS ani LMPCh (n=19); 2) leczonych lekami grupy NLPZ i preparatami GKS, zwykle metyloprednizolonem 4–8 mg p.o. (n=11); 3) leczonych lekami grupy NLPZ i MTX (n=6), dawka 15 mg na tydzień. Chorzy przyjmowali leki przez co najmniej miesiąc przed pobraniem płynu stawowego (artropunkcji).

Dane demograficzne badanych chorych, a także podstawowe informacje kliniczne przedstawiono w tabeli 1.

Badanie cytologiczne płynu stawowego

Punktowano staw kolanowy. Uzyskiwano kilka–kilkanaście mililitrów płynu, zwykle zapalnego typu II (rzadko III) [18]. Obliczano całkowitą liczbę komórek w płynie stawowym przy użyciu komory Bürkera (liczbę komórek zliczano w 25 małych kwadratach, mnożono przez rozcieńczenie i wyrażano w dziesiątkach tysięcy; wynik przedstawiono jako liczbę krwinek białych w 1 ml płynu). Żywotność komórek badano z użyciem błękitu trypanu (płyn mieszano z barwnikiem w proporcji 1:1, mieszaninę w ilości 8–10μL nakładano do komory, wy-

nik prezentowano jako odsetek żywych krwinek białych). Szczegóły opisano uprzednio [19].

Tabela 1. Kliniczne i demograficzne dane pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów (RZS)

Liczba pacjentów [n]	36
Wiek [lata] (średnia ± SD)	23–79 (57,86 ± 11,63)
Płeć (K:M)	29:7
Czas trwania RZS [miesiące] (średnia ± SD)	10–160 (130,45 ± 13,42)
Obecność RF [% pacjentów]	80
Leczenie NLPZ [% pacjentów]	100
Leczenie tylko NLPZ [n]	19
Leczenie NLPZ + GKS [n]	11
Leczenie NLPZ + MTX [n]	6
CLK (mediana ± SEM) Leczeni tylko NLPZ	$1899x10^3$ kom/ml ± $49x10^3$
CLK [mediana ± SEM) Leczeni NLPZ + GKS	728 $x10^3$ kom/ml ± $81x10^3$
CLK (mediana ± SEM) Leczeni NLPZ + MTX	905 $x10^3$ kom/ml ± 22 $x10^3$

n – liczba chorych, K – kobiety, M – mężczyźni, SD – odchylenie standardowe (ang. *standard deviation, SD*), RZS – reumatoidalne zapalenie stawów, RF – czynnik reumatoidalny, NLPZ – niesteroidowe leki przeciwzapalne, CLK – całkowita liczba komórek, SEM – standardowy błąd pomiaru (ang. Standard Error of Measurement, SEM), GKS – glikokortykosteroidy

Preparaty cytologiczne uzyskiwano w drodze cytowirowania (80g, 5min., cytowirówka Sigma 4K15, 10740, Osterode am Harz Germany); barwiono równolegle dwiema technikami – hematoksyliną-eozyną (HE) i May-Gruenwald-Giemsą (MGG). Preparaty poddawano analizie cytologicznej, zliczając co najmniej po 200 komórek z preparatu. Obliczano średnie arytmetyczne wartości odsetków: limfocytów, granulocytów (z reguły były to neutrofile, nie odnotowano eozynofilów) i makrofagów (wliczano tu młode monocytoidalne komórki

układu makrofagów, niekiedy opisywane jako „monocyty"). Szczegóły opisano uprzednio [20].

Badanie immunologiczne płynu stawowego

Zastosowano cytometrię przepływową (FACScan Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA) i typowanie fenotypu limfocytów płynu stawowego techniką wielokolorowej immunoflurescencji bezpośredniej. Oznaczano odsetek komórek T (CD3+), NK [CD3-(CD16+lub56+)], B (CD19+), Th (CD4+) oraz Tc (CD8+). Marker HLA-DR+ w koekspresji z CD3+ wskazywał na poziom wczesnej nieswoistej aktywacji komórek T. Badano odsetek komórek Th i Tc dodatnich z markerami FasL i TRAIL, tj. ligandami receptorów śmierci drogi zewnątrzpochodnej apoptozy; limfocyty FasL+ oraz TRAIL+ traktowano jako komórki o czynności cytotoksycznej.

Procedurę typowania opisano uprzednio [20]. W skrócie, komórki płynu stawowego w ilości 50–150 x 10^3 w pojedynczej próbce inkubowano z nasycającymi objętościami odpowiednich przeciwciał monoklonalnych w temperaturze pokojowej w ciemności (30 min), płukano roztworem PBS z azydkiem sodu 0,1%, utrwalano w 250µL PBS z formaldehydem 2% i zbierano w cytometrze przepływowym w ciągu 48 godzin od pobrania. Wszystkie wirowania prowadzono przez 8 min. (300g, temp. pokojowa).

W tabeli 2 zestawiono użyte w pracy mysie przeciwciała monoklonalne, skierowane przeciw antygenom ludzkim; uwzględniono fluorochromy i pasma fluorescencji, w których badano koekspresję odp. markerów. Ludzki antygen CD45 posłużył jako kontrola dodatnia, mysie surowice nieswoiste, zgodne idiotypowo z przeciwciałami swoistymi („roboczymi") i sprzężone z właściwymi barwnikami – jako kontrola ujemna. Pole limfocytów płynu („bramka limfocytowa") definiowano w układzie parametrów CD45/SSC (boczne rozproszenie światła, ang. *side scatter*), a markery podczas analizy bramki ustawiano tak, by nieswoiste dodatnie świecenie komórek we wszystkich badanych w pracy kanałach fluorescencji nie przekraczało 5% limfocytów. Szczegóły przedstawiono uprzednio [20].

Metody statystyczne

Posłużono się programem Statistica 12.0. Podstawowe dane demograficzne i kliniczne chorych (tabela 1) zaprezentowano jako średnie wartości zmiennej ± odchylenie standardowe (standard deviation, SD) i w razie potrzeby zakres wartości zmiennej (minimum-maksimum). Zmienne cytologiczne i immunologiczne, w związku z nieparametrycznym rozkładem zmiennych przedstawiano jako medianę ± przedział wartości między pierwszym i trzecim kwartylem (zakres wartości minimum-maksimum). Wyniki otrzymane w nierównych liczbowo grupach

porównano testem U Manna-Whitneya (nieparametrycznym, z powodu wspomnianego wyżej rozkładu zmiennych). Interpretacji wyników obliczeń dokonano na podstawie wartości prawdopodobieństwa (p), stosując poziom istotności statystycznej $\alpha=0,05$ (różnice dla $p<0.05$ uznano za znamienne statystycznie).

Tabela 2. Zestawienie mysich przeciwciał monoklonalnych/surowic użytych w badaniu przeciw antygenom ludzkim lub stosowanych jako kontrola izotypowa, z uwzględnieniem badania koekspresji w poszczególnych próbkach

Nr Próbki	Pasmo fluorescencji / Kanał cytometru		
	FL1	FL2	FL3
	FITC	PE	PE-Cy5
1	*Kontrola izotypowa*		
	349526 (FL1+FL2)		555750 (FL3)
2	CD3 561806	CD16+CD56+ 340042	CD45 555490
3	CD4 555346	Fas Ligand 564261	CD8 555368
4	CD8 557085	TRAIL 561784	CD4 555348
5	CD3 561806	HLA-DR 555561	CD19 555414

Numery kat. wg firmy Becton-Dickinson Pharmingen™ (wszystkie przeciwciała);
Pasma fluorescencji cytometru: FL1 (światło zielone), FL2 (jasnoczerwone), FL3 (ciemnoczerwone), FITC, izotiocyjanian fluoresceiny (ang. *fluorescein isothiocyanate*), PE, fikoerytryna (ang. *phycoerythrin*), PE-Cy5, fikoerytryna-cyjanina 5 (ang. *Phycoerythrin* – Cyanine-5).

Wyniki

Stwierdzono nieznamiennie statystycznie niższe wartości CLK (tabela 1) i niższy odsetek limfocytów w grupie leczonej MTX w porównaniu z grupą przyjmującą tylko NLPZ. Zarówno dla chorych leczonych metyloprednizolonem, jak i MTX obserwowano niższy odsetek makrofagów/monocytów (tabela 3).

Limfocyty T stanowią główną populację komórek we wszystkich badanych grupach. Wykazano istotne statystycznie, wyższe wartości odsetka limfocytów T i Th oraz niższe – odsetka komórek NK w grupie przyjmującej metyloprednizolon w porównaniu z grupą NLPZ. Jest możliwe, że wzrost odsetka limfocytów T w grupie leczonej metyloprednizolonem wynika ze spadku liczby limfocytów NK.

Tabela 3. Skład populacji krwinek białych płynu stawowego

Populacja	Leczeni NLPZ[1]	Leczeni prednizonem[2]	Leczeni MTX[3]
Limfocyty [%]	26,5±3,3 (2-74)	32,0±3,3 (22-50)	18,0±12,5 (10-72)
Monocyty/Makrofagi [%]	47,0±3,9 (8-92)	36,5±5,8 (4-59)	24,0±8,8 (23-68)
Granulocyty [%]	16,5±3,9 (1-88)	19,5±6,1 (9-65)	22,0±10,9 (5-60)

Wyniki przedstawiono jako mediana ± SEM (zakres); brak różnic znamiennych między grupami.
[1]Leczeni niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi (NLPZ) doustnie bądź miejscowo, bez glikokortykosteroidów i LMChP (w tym leków biologicznych).
[2]Leczeni NLPZ i prednizonem co najmniej od jednego miesiąca przed pobraniem płynu 4-8mg/dzień.
[3]Leczeni NLPZ i metotreksatem (MTX) co najmniej od jednego miesiąca przed pobraniem płynu w dawce 15mg/tydzień.

Zaobserwowano także niższy odsetek limfocytów cytotoksycznych i zwiększony – limfocytów Th w grupie leczonej MTX w odniesieniu do grupy NLPZ (tabela 4). Istotna statystycznie okazała się wyższa wartość stosunku odsetka limfocytów CD4+ do odsetka limfocytów CD8+ (1,2) dla pacjentów przyjmujących MTX w porównaniu z grupą chorych leczonych wyłącznie NLPZ (0,7). W przypadku grupy przyjmującej GKS stwierdzono niezamienną statystycznie podwyższoną wartość indeksu (0,85) w porównaniu z grupą NLPZ (rycina 1).

Na rycinie 2 uwagę zwraca znamienny statystycznie wzrost odsetka komórek T dodatnich z markerem aktywacji HLA-DR u chorych leczonych zarówno metyloprednizolonem (58%), jak i MTX (66,5%), w porównaniu do grupy przyjmującej tylko NLPZ (27%). Należy w przyszłości rozważyć użyteczność markera HLA-DR+ na limfocytach CD3+ w decyzjach terapeutycznych (rozwinięto poniżej, w części „Dyskusja").

Grupa leczona metyloprednizolonem charakteryzuje się znamiennymi statystycznie niższymi wartościami odsetków komórek T, Th i Tc dodatnich z FasL w stosunku do grupy leczonej wyłącznie NLPZ. Grupa leczona MTX przyjęła wartości zbliżone do chorych z grupy NLPZ (rycina 3).

Tabela 4. Odsetek poszczególnych subpopulacji limfocytów w płynie stawowym

Rodzaj komórek	Leczeni NLPZ[1]	Leczeni metyloprednizolonem[2]	Leczeni MTX[3]
Limfocyty T [%]	82,0±1,9 (33-98)	88,0*±3,9 (55-95)	83,5±4,6 (66-98)
Limfocyty Th [%]	35,5±2,0 (6-60)	42,0*±5,2 (21-71)	45,5±4,8 (28-63)
Limfocyty Tc [%]	50,5±2,3 (26-76)	49,5±5,5 (23-80)	38,5±5,7 (30-67)
Limfocyty NK [%]	12,5±1,9 (2-62)	7,0*±3,8 (2-43)	14,5±4,0 (2-24)
Limfocyty B [%]	1,0±0,4 (0-12)	1,0±0,5 (0-4)	1,5±0,7 (1-5)

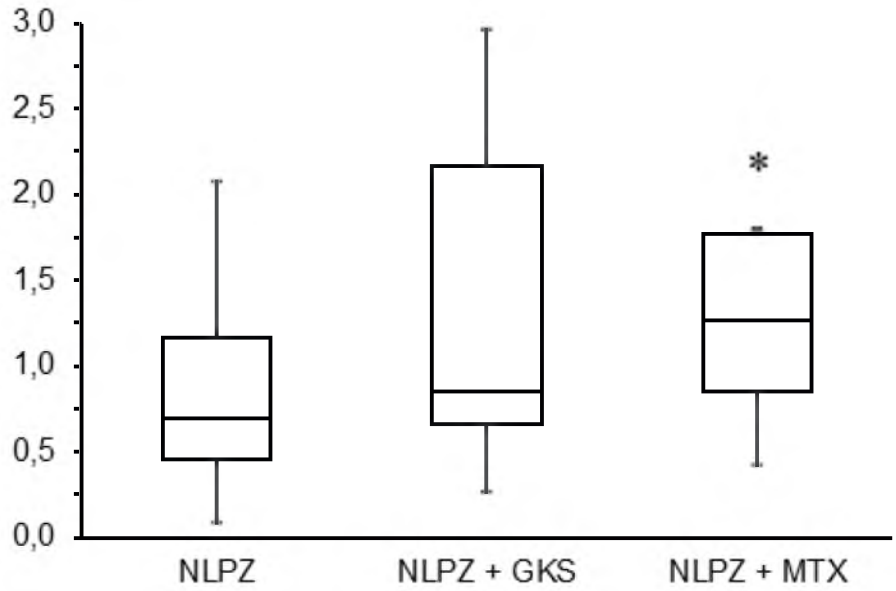
Wyniki przedstawiono jako mediana ± SEM (zakres);

* ($p<0,05$) w porównaniu z chorymi nieleczonymi; test U Manna-Whitneya.

[1]Leczeni niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi (NLPZ) doustnie bądź miejscowo, bez glikokortykosteroidów i LMChP (w tym leków biologicznych).

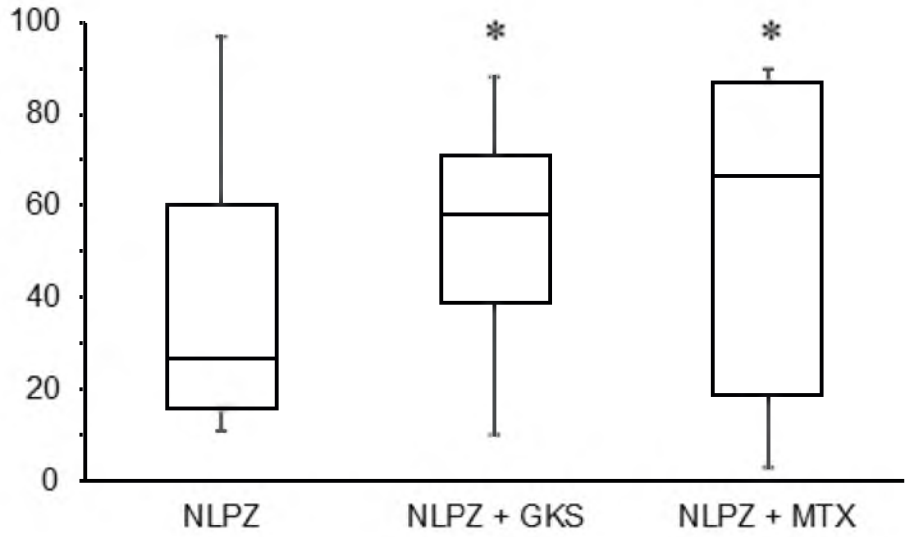
[2]Leczeni metyloprednizolonem przez co najmniej miesiąc przed pobraniem płynu w dawce 4–8mg/dzień.

[3]Leczeni metotreksatem (MTX) otrzymywali lek przez co najmniej miesiąc przed pobraniem płynu w dawce 15mg/tydzień.



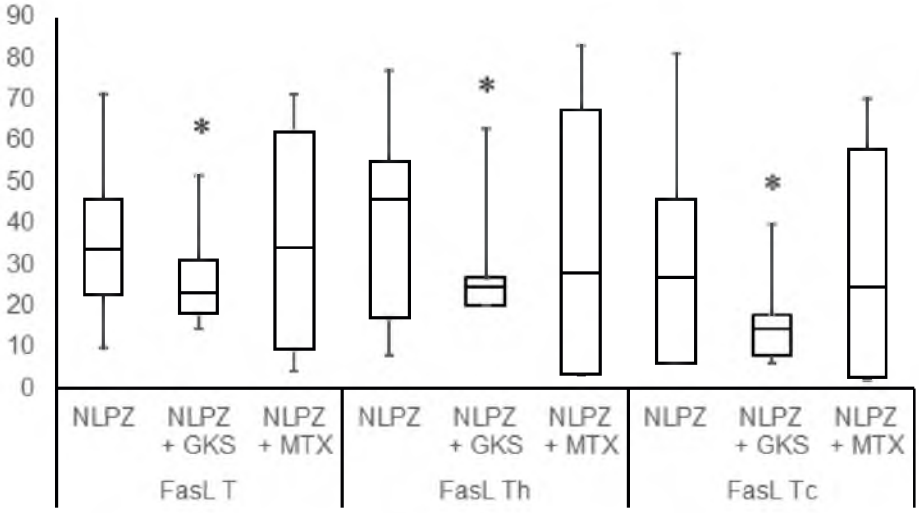
NLPZ – niesteroidowe leki przeciwzapalne, GKS – glikokortykosteroidy, MTX – metotreksat (* $p<0,05$ w porównaniu z grupą leczoną NLPZ; test U Manna-Whitneya)

Rycina 1. Wartość indeksu CD4/CD8 w zależności od zastosowanego leczenia



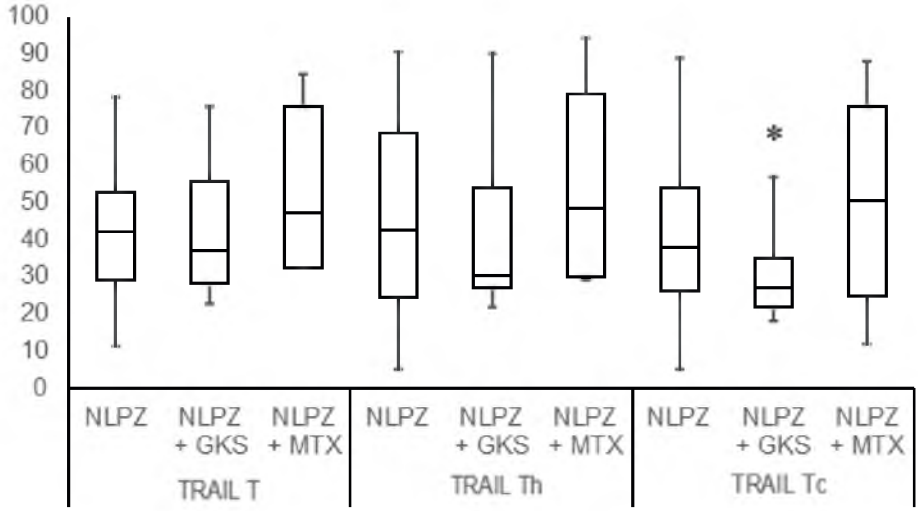
NLPZ – niesteroidowe leki przeciwzapalne, GKS – glikokortykosteroidy, MTX – metotreksat (* p<0,05 w porównaniu z grupą leczoną NLPZ; test U Manna-Whitneya)

Rycina 2. Odsetek limfocytów T (CD3+) dodatnich z markerem HLA-DR w zależności od zastosowanego leczenia



NLPZ – niesteroidowe leki przeciwzapalne, GKS – glikokortykosteroidy, MTX – metotreksat (* p<0,05 w porównaniu z grupą leczoną NLPZ; test U Manna-Whitneya)

Rycina 3. Odsetki limfocytów Th (CD4+) i Tc (CD8+) dodatnich z markerem FasL



NLPZ – niesteroidowe leki przeciwzapalne, GKS – glikokortykosteroidy, MTX – metotreksat (* $p<0,05$ w porównaniu z grupą leczoną NLPZ; test U Manna-Whitneya)

Rycina 4. Odsetki limfocytów Th (CD4+) i Tc (CD8+) dodatnich z markerem TRAIL

Odnotowano istotny statystycznie mniejszy udział procentowy komórek T cytotoksycznych (CD8+TRAIL+) w grupie leczonej metyloprednizolonem (12%) w stosunku do grupy leczonej tylko NLPZ (19,2%), przedstawiony na rycinie 4.

Dyskusja

Analiza płynu stawowego opierała się na badaniu składu krwinek białych, zaangażowanych miejscowo w proces patologiczny w RZS. Istotna część obserwacji dotyczyła limfocytów T, stosunku komórek pomocniczych do cytotoksycznych (indeks CD4/CD8), określenia poziomu aktywacji komórek T oraz odsetka komórek Th i Tc z markerami czynności cytotoksycznej TRAIL i FasL.

Interpretację wyników płynu stawowego w RZS utrudnił brak odpowiedniej próby kontrolnej, co wynikło ze zbyt małej ilości materiału uzyskiwanego podczas artropunkcji osób zdrowych (i jeszcze mniejszej liczby komórek) oraz z oczywistych względów bioetycznych – od osób zdrowych płynu się nie pobiera. W niniejszej pracy, opisującej parametry cytoimmunologiczne chorych leczonych metyloprednizolonem i MTX, grupę kontrolną stanowili więc chorzy z reguły leczeni tylko preparatami NLPZ. Leczenie zostało podjęte zgodnie z aktualnie obowiązującymi zaleceniami [12]. Słabą stroną tak pomyślanego badania jest możliwość zaistnienia sytuacji, w której osoby z grupy kontrolnej nie otrzy-

mały bardziej agresywnego leczenia (GKS ani LMPCh) dlatego, że charakteryzowały się wyjściowo słabszym nasileniem zmian zapalnych. W tym kontekście wyniki pracy należy traktować jako wstępne, a wnioskowanie jest celowo ostrożne i wymaga potwierdzenia w większej liczbie przypadków, zwłaszcza powtarzanych artropunkcji tych samych chorych, co udało się dotąd wykonać jedynie u pojedynczych osób (wyników nie przedstawiano). Podsumowując, porównanie grupy leczonej NLPZ z leczoną metyloprednizolonem i MTX (oraz NLPZ) nie musi jednoznacznie określać faktycznego wpływu danej terapii na parametry cytoimmunologiczne płynu stawowego, na pewno jednak wyniki pracy dają podstawę do przemyśleń i wstępnych wniosków [21].

W wynikach zwraca uwagę duża liczba krwinek białych, w tym granulocytów, limfocytów i makrofagów/monocytów w płynie stawowym. W ocenie zapalnego płynu stawowego szczególna uwaga skupia się na liczebności populacji neutrofilów, które w RZS niszczą tkanki stawowe, produkując w wielkich ilościach wolne rodniki i hydrolazy, w tym proteazy grupy MMP i katepsyny. W RZS wykazano m.in. istotne obniżenie progu aktywacji neutrofilów, wyrażające się między innymi wysoką ekspresją białka receptorowego TREM1 (ang. *triggering receptor expressed in myeloid cells 1*), co prowadzi pośrednio do nasilonego uwalniania interleukiny-8. Wysoka jest ekspresja ligandu dla aktywatora receptora czynnika transkrypcyjnego NFκB, czyli głównego czynnika odpowiedzialnego za generację cytokin prozapalnych i propagację zapalenia [22]. Mediatory neutrofilów przyspieszają proliferację błony maziowej i formowanie łuszczki, powodują śmierć chondrocytów i niszczenie stawu. Chemokiny, TNF-α, Il-1β oraz IL-6 aktywują inne populacje krwinek białych, w tym limfocyty T. Również temu celowi służy zjawisko netozy (ang. *netosis*), tj. programowanej genetycznie śmierci z równoczesną prezentacją antygenów limfocytom [23]. Interesującym sposobem oceny toczącego się stanu zapalnego jest określenie stosunku neutrofilów do limfocytów (ang. *neutrophil-lymphocyte ratio*, NLR) w płynie stawowym. W tym miejscu wypada zaznaczyć, że wg wartości indeksu NLR limfocyty pełnią w tkankach stawu rolę ochronną, neutrofile – szkodliwą [24]. Niestety, w wynikach naszych badań wartość NLR nie zmieniała się istotnie w zależności od leczenia. Warto jednak odnotować, że gdyby liczbę neutrofilów w płynie stawowym przedstawić w wartościach bezwzględnych (*vide* tabela 2), to są one mniejsze w grupach leczonych MTX i metyloprednizolonem niż w grupie leczonej NLPZ (niestety, różnice w odniesieniu do grupy chorych leczonych NLPZ nie były znamienne, dlatego ich szczegółowo nie prezentowano).

Ważną grupą komórek odczynu swoistego w RZS są limfocyty. Z reguły wykazano dominację komórek T, z różnym, w zależności od przypadku, odsetkiem limfocytów NK i praktycznym brakiem komórek B. Wcześniej wykonanymi odczynami cytoimmunologicznymi udało się wykazać powszechną ekspresję CD45R0 na populacji limfocytów płynu stawowego [nieprezentowane dane własne]. Jest to zgodne z wcześniejszymi badaniami nad populacją komórek

T w miejscu przewlekłego odczynu zapalnego, która jest zdominowana przez efektorowe komórki T (w RZS zwłaszcza komórki cytotoksyczne T CD8+ oraz pomocnicze CD4+, Th1 i Th17). Być może obecna jest pewna liczba komórek pamięci immunologicznej T [25,26]. Komórki NK, chociaż wydają się pełnić drugorzędną rolę, to z pomocą IFN-γ, TNF-α, limfotoksyny-β i układu perforyna/granzymy niszczą tkanki stawowe oraz wpływają na proces osteoklastogenezy poprzez ekspresję RANKL, przyczyniając się do resorpcji kości [21]. Udowodniono również zdolność komórek NK do stymulacji limfocytów T i B [27]. Wg naszej najlepszej wiedzy jesteśmy pierwsi, którzy w świetle wyników pracy sugerują wpływ preparatów GKS na redukcję częstości występowania komórek NK w płynie stawowym. Uważamy to za zjawisko korzystne dla chorego. Limfocyty T są celem obu analizowanych tu leków – metyloprednizolonu i metotreksatu. W przypadku GKS udokumentowano ich wpływ na liczbę oraz aktywność limfocytów T w RZS. GKS działają na komórki T, hamując ekspresję cytokin prozapalnych, np. IL-2, IL-6 i IFN-γ, kluczowych w procesie aktywacji limfocytów T. GKS mogą wpływać na syntezę cytokin w momencie transkrypcji, translacji czy potranslacyjnej modyfikacji białek. Ważnym celem molekularnym metyloprednizolonu jest wspomniany czynnik NFκB, a wtórnie – panel prozapalnych cytokin. Już pojedyncza dawka GKS może wywołać limfopenię, i to dla każdej z subpopulacji limfocytów T [28]. GKS zwiększają podatność aktywowanych limfocytów T na proces programowanej śmierci [25]. Gugino i wsp. wykazali wpływ MTX i metylprednizolonu (GKS) na populację limfocytów Th17 oraz komórek Treg krwi obwodowej chorych z RZS. W inkubacji limfocytów z MTX zanotowano spadek odsetka efektorowych limfocytów Th17 chorych z wczesnym RZS, natomiast odsetek komórek Treg podlegał wzrostowi. W zaawansowanej postaci RZS powyższe zmiany były słabiej zaznaczone. Wyniki dla GKS były zbliżone do grupy inkubowanej z MTX [29]. Z kolei Kremer i wsp. ocenili wpływ 36-miesięcznej terapii MTX na stężenia cytokin prozapalnych i odsetki subpopulacji limfocytów T krwi obwodowej chorych z aktywną postacią RZS, wykazując spadek jedynie w przypadku komórek T pamięci o fenotypie CD4+CD29+. Pośrednio przyznano, że wpływ MTX na limfocyty T może zależeć od miejsca ich pobrania [30]. W wynikach naszej pracy skoncentrowano się na fenotypie zewnątrzkomórkowym limfocytów, więc nie podzielono komórek CD4+ na subpopulacje czynnościowe Th1, Th2, Th17 i nTreg. Za to zbadano limfocyty w miejscu ich bezpośredniej czynności efektorowej – w stawie, a nie w krwi obwodowej. Spadek rzeczywistej liczby limfocytów płynu stawowego po podaniu MTX i metyloprednizolonu był prawdopodobnie zamaskowany pozornym wzrostem ich odsetka (równolegle bowiem spadała miejscowo całkowita liczba neutrofilów); niestety, spadek całkowitej liczby limfocytów miał w naszej niezbyt licznej grupie, opracowanej w ramach wstępnych wyników badań, charakter nieznamienny. Jednak wydaje się, że prace innych badaczy koncentrują się – nie do końca zasadnie – na komórkach pomocniczych, podczas gdy w świetle pre-

zentowanych tu wyników ważniejszym celem obu rozważanych leków są komórki cytotoksyczne CD8+. Wyraziło się to znamiennym statystycznie: a) wzrostem względnym odsetka limfocytów CD4+ w grupie leczonej metyloprednizolonem oraz b) wzrostem indeksu CD4/CD8 w grupie leczonej metotreksatem. Są to oryginalne obserwacje pracy. Uważamy je za korzystne dla chorego.

Uzupełniając dane literaturowe, wypada jeszcze nadmienić, że MTX może działać pośrednio, hamując cytokiny odpowiedzialne za aktywację limfocytów T, w tym komórki cytotoksyczne. Dotyczy to między innymi IL-1β, IL-6, IL-8 i IL-17, a więc interleukin kluczowych w patogenezie RZS [30].

Mniej jasne są wyniki (czyli wyraźnie wyższe odsetki) komórek HLA-DR+ wśród limfocytów T płynu stawowego chorych leczonych MTX i metyloprednizolonem, w porównaniu z grupą leczoną NLPZ. Otóż wydaje się, że ekspresja HLA-DR na komórkach T odzwierciedla aktywność procesu chorobowego w RZS i ewentualną skuteczność leczenia [31]. Dane zaczerpnięte z literatury fachowej nie są jednoznaczne [32], wyniki pracy wymagają więc weryfikacji. Na chwilę obecną stawiamy hipotezę, że to właśnie chorzy z aktywnym przebiegiem RZS (i wyjściowo wysokim odsetkiem komórek CD3+HLA-DR+ w płynie stawowym) zostali poddani terapii MTX lub GKS, a wyniki naszych badań odzwierciedlają prawidłowy algorytm działań terapeutycznych; leczenie mogło natomiast nie przełożyć się na spadek (normalizację) ekspresji markera aktywacji limfocytów, tj. HLA-DR. Marker HLA-DR wydaje się w tym ujęciu mieć wyjściowe znaczenie w podejmowaniu decyzji terapeutycznych.

W niniejszym badaniu skupiono się na komórkach o potencjale cytotoksycznym z antygenami TRAIL i FasL, mogącymi indukować apoptozę komórek docelowych, posiadających na powierzchni specyficzne receptory śmierci. Zdolność do indukcji zaprogramowanej śmierci można interpretować dwojako. W przypadku niszczenia komórek struktur stawowych jest to z oczywistych względów proces negatywny. Ale istnieją doniesienia, że komórkami docelowymi limfocytów są aktywowane synowiocyty typu B, budujące łuszczkę stawową [21,33,34]. Czynność cytotoksyczna limfocytów mogłaby więc hamować procesu zapalny w RZS. Stąd mógłby właśnie wynikać korzystny prognostycznie efekt niskiej wartości indeksu NLR (*vide* wyżej). Przy interpretacji wyników należy wziąć pod uwagę trzy okoliczności: 1) Ligandy FasL i TRAIL podlegają ekspresji zarówno na limfocytach cytotoksycznych CD8+, jak i komórkach CD4+; obie populacje na poziomie efektorowym mogą pełnić czynność cytotoksyczną; 2) Limfocyty T TRAIL+ generalnie uczestniczą w zabijaniu innych komórek, podczas gdy limfocyty T FasL+ mogą także indukować własną apoptozę – samobójczą lub bratobójczą [25]; 3) w ich powierzchniowej ekspresji (zwłaszcza FasL) uczestniczy aktywacja NFκB, ważny cel molekularny metyloprednizolonu [35].

Podsumowując, wydaje się że profil zmian wywołanych przez GKS (niska ekspresja FasL na limfocytach płynu stawowego oraz słabiej zaznaczone różnice w zakresie ekspresji TRAIL) odpowiada ograniczaniu łuszczki stawo-

wej przez komórki T, co jest korzystne dla chorego. Mniej jasne wydają się wyniki ekspresji ligandów receptorów śmierci po metotreksacie. Przypuszczalnie poszerzenie prezentowanych tu wyników wstępnych o kolejne przypadki może rzucić więcej światła na to pasjonujące zagadnienie. Należy nadmienić, iż działanie białka TRAIL było dotąd rozważane w przypadku badań dotyczących chorób nowotworowych. Być może warto, w oparciu o przedstawione wyniki, zwrócić uwagę na potencjał tych komórek jako markera aktywności cytotoksycznej płynu stawowego w RZS. Zakładamy, że zebrane informacje ułatwią dobranie odpowiedniego leczenia.

Wnioski

W zapalnie zmienionym płynie stawowym chorych z RZS terapia metyloprednizolonem lub MTX skutkuje obniżeniem liczby komórek płynu. MTX może sprzyjać eliminacji komórek o fenotypie cytotoksycznym, na co wskazuje znamiennie wyższa wartość indeksu CD4/CD8, w porównaniu z chorymi leczonymi tylko NLPZ. Wysoka ekspresja HLA-DR na limfocytach T płynu stawowego chorych leczonych metyloprednizolonem i MTX może odzwierciedlać wstępną wysoką aktywność procesu zapalnego, a nie wpływ zastosowanego leczenia. Metyloprednizolon z reguły obniża ekspresję TRAIL i FasL na limfocytach, szczególnie zaznaczony był spadek wartości odsetka limfocytów CD8+TRAIL+. Można to zinterpretować jako obniżenie potencjału cytotoksycznego krwinek płynu stawowego. Badanie cytoimmunologiczne płynu stawowego może mieć znaczenie w ocenie skuteczności leczenia RZS lub może stanowić pomocniczą informację o konieczności włączenia odpowiedniego leczenia.

Bibliografia

1. Okada Y, Wu D, Trynka G et al. *Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery*. Nature. 2014; 506: 376–381.
2. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ et al. *2010 Rheumatoid arthritis classi cation criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative*. Arthritis Rheum. 2010; 62: 2569–2581.
3. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. *Rheumatoid arthritis*. Lancet. 2010; 376: 1094–1108.
4. Bellucci E, Terenzi R, La Paglia GMC et al. *One year in review 2016: pathogenesis of rheumatoid arthritis*. Clinical and Experimental Rheumatology. 2016; 34: 793–801.
5. Van Venrooij WJ, Van Beers JJ, Pruijn GJ. *Anti-CCP Antibody, a Marker for the Early Detection of Rheumatoid Arthritis*. Ann NY Acad Sci. 2008; 1143: 268–285.
6. Steiner G, Smolen J, *Autoantibodies in rheumatoid arthritis and their clinical significance*. Arthritis Researches. 2002; 4: 1–5.

7. Darrah E, Andrade F. *Rheumatoid arthritis and citrullination*. Current Opinion in Rheumatology. 2018, 30: 72–78.
8. Doorenspleet ME, Klarenbeck PL, de Hair MJ et al. *Rheumatoid 47. arthritis synovial tissue harbours dominant B-cell and plasma-cell clones associated with autoreactivity*. Ann Rheum Dis. 2014; 73: 756–762.
9. Filipowicz-Sosnowska A, Stanisławska-Biernat E, Zubrzycka-Sienkiewicz A. *Reumatoidalne zapalenie stawów*. Reumatologia. 2004; 42 (1): 1–16.
10. Katchamart W, Trudeau J, Phumethum V, Bombardier C. *Methotrexate monotherapy versus methotrexate combination therapy with non-biologic disease modifying anti-rheumatic drugs for rheumatoid arthritis*. Cochrane Database Syst Rev. 2010; 14 (4): 495–502.
11. Tłustochowicz W, Brzosko M, Filipowicz-Sosnowska A et al. *Stanowisko Zespołu Ekspertów Konsultanta Krajowego ds. Reumatologii w sprawie diagnostyki i terapii reumatoidalnego zapalenia stawów*. Reumatologia. 2008; 46: 111–114.
12. Smolen J.S., Landewé R, Bijlsma J et al. *EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update*. Annals of the Rheumatic Diseases. 2017; 76: 960–977.
13. Zimmermann-Górska I. *Zastosowanie leków biologicznych w chorobach reumatycznych*. Przew Lek. 2007; 3: 40–47.
14. Zimmermann-Górska I. *Postępy w diagnostyce i terapii w reumatologii*. Przew Lek. 2008; 1: 124–128.
15. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. *Rheumatoid arthritis*. Lancet. 2010; 376 (9746): 1094–108.
16. Liu H, Pope MR. *The role of apoptosis in rheumatoid arthritis*. Current Opinion in Pharmacology. 2003; 3: 317–322.
17. Darrieutort-Laffite C, Boutet MA, Chatelais M et al. *IL-1β and TNFα promote monocyte viability through the induction of GM- CSF expression by rheumatoid arthritis synovial fibroblasts*. Mediators of Inflammation, 2014; 1–10.
18. Zimmermann-Górska I, Białkowka-Puszczewicz G, Puszczewicz M. *Atlas płynu stawowego*. Wyd. Lekarskie PZWL, 1995.
19. Balicka-Ślusarczyk B, Dyczek A, Marszałek A et al. *Wybrane cytokiny i ich receptory w dolnych drogach oddechowych palaczy papierosów. Czy dym tytoniowy wpływa na stan polaryzacji immunologicznej Th1/Th2 w śródmiąższowych chorobach płuc?*. Przegl. Lek. 2011; 68 (10): 684–688.
20. Kopiński P, Szczeklik J, Lackowska B et al. *Flow cytometric characteristics of alveolar lymphocytes obtained by bronchoalveolar lavage (BAL) in the control group - proposal of normal value range of AL subsets in non- smokers*. Central Eur J Immunol. 2004; 29: 63–72.
21. Guo X, Wang Y, Xu D et al. *Rheumatoid arthritis: pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies. Review article*. Bone Research. 2018; 6: 15.
22. Poubelle PE, Chakravarti A, Fernandes MJ et al. *Differential expression of RANK, RANK-L, and osteoprotegerin by synovial fluid neutrophils from patients with rheumatoid arthritis and by healthy human blood neutrophils*. Arthritis Res Ther. 2007; 9 (2): R25.

23. Cecchi I, Arias de la Rosa I, Menegattia E et al. *Neutrophils: Novel key players in Rheumatoid Arthritis. Current and future therapeutic targets*. Autoimmun Rev. 2018, Sep 11. pii: S1568-9972(18)30216-7.
24. Abd-Elazeem MI, Mohamed RA. *Neutrophil-lymphocyte and platelet-lymphocyte ratios in rheumatoid arthritis patients: Relation to disease activity*. The Egyptian Rheumatologist. 201710.1038/s41413-018-0016-9.
25. Kopiński P. *Badania nad apoptozą limfocytów pęcherzykowych w wybranych śródmiąższowych chorobach płuc* [rozprawa habilitacyjna]. Bydgoszcz 2012.
26. Mellado M, Martinez-Muñoz L, Cascio G et al. *T Cell Migration in Rheumatoid Arthritis*. Front Immunol. 2015; 6: 384.
27. Ahern DJ., Brennan FM. *The role of Natural Killer cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: Major contributors or essential homeostatic modulators?*. Immunology Letters. 2011; 136: 115–112.
28. Townsend HB, Saag KG. *Glucocorticoid use in rheumatoid arthritis: Benefits, mechanisms, and risks*. Clinical and Experimental Rheumatology. 2004; 22 (35): 77–82.
29. Guggino G, Giardina A, Ferrante A et al. *The in vitro addition of methotrexate and/or methylprednisolone determines peripheral reduction in Th17 and expansion of conventional Treg and of IL-10 producing Th17 lymphocytes in patients with early rheumatoid arthritis*. Rheumatology International. 2015; 35 (1): 171–175.
30. Kremer JM, Lawrence DA, Hamilton R et al. *Long-term study of the impact of methotrexate on serum cytokines and lymphocyte subsets in patients with active rheumatoid arthritis: correlation with pharmacokinetic measures*. RMD Open. 2016; 2:e000287.
31. Libura M. *Wpływ podanego dostawowo autologicznego osocza bogatopłytkowego (platelet-rich plasma, PRP) na miejscowy obraz cytoimmunologiczny w reumatoidalnym zapaleniu stawów. Ocena hamowania potencjału cytotoksycznego limfocytów płynu stawowego* [rozprawa doktorska]. Bydgoszcz 2018 (w przygotowaniu).
32. Dulic S, Vásárhelyi Z, Sava F et al. *T-Cell Subsets in Rheumatoid Arthritis Patients on Long-Term Anti-TNF or IL-6 Receptor Blocker Therapy*. Mediators of Inflammation. 2017; 2017:6894374.
33. Malemud CJ. *Matrix Metalloproteinases and Synovial Joint Pathology*. Prog Mol Biol Transl Sci. 2017; 148: 305–325.
34. Bartok B, Firestein GS. *Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis*. Immunological Reviews. 2010; 233 (1): 233–255.
35. Allen LV Jr, Yanchick VA, Maness DD. *Dissolution rates of corticosteroids utilizing sugar glass dispersions*. J Pharm Sci. 1977; 66 (4): 494–497.

Cytoimmune image of synovial fluid in rheumatoid arthritis. Evaluation of the impact of selected treatment methods

Abstract

Introduction: Synovial fluid aspiration of patients with rheumatoid arthritis (RA) provides important information on the activity of the local inflammation. Synovial T lymphocytes, including cells positive with ligands of death receptors, i.e. Fas ligand (FasL) and TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), both of which play an important role in RA pathogenesis. The first-line treatment of RA is methotrexate (MTX), but glucocorticoids (as prednisone) and non-steroid anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are also used. The impact of treatment on the immune profile of synovial fluid in RA has not yet been cleared.

Objective: Characteristics of the influence of prednisone and MTX treatment on the cytoimmunological pattern of synovial fluid in RA patients.

Material and methods: Synovial fluid was harvested from RA patients treated with prednisone (n=11) and MTX (n=6). The control group consisted of patients receiving NSAIDs only (n = 19).

The total cell number (TCN), the percentage of leukocyte populations and the phenotype of lymphocytes, including FasL and TRAIL expression on Th and Tc cells, was analyzed.

Results: In the prednisone and MTX-treated groups, a decline in TCN was found. The increased value of the CD4/CD8 index in the MTX group was statistically significant, as compared to the NSAIDs-treated group (median: 1.2 vs 0.7, $p<0.05$). In prednisone-treated patients, a statistically significant decrease in the percentage of lymphocytes T FasL+ and TRAIL+ was observed (i.e. median of CD8+TRAIL+ cells was 12.0% vs 19.2% in the NSAIDs-treated group, $p<0.05$, U-Mann-Whitney test).

Conclusions: In the synovial fluid of patients treated with prednisone, there was a decrease in the lymphocyte cytotoxicity markers compared to the group treated only with NSAIDs. Parallel changes in the MTX group were non-significant. MTX seems to increase the value of the CD4/CD8 index, which can be interpreted as a result of CD8+ cytotoxic cell elimination. Cytological and immunological analysis of synovial fluid may be useful to assess the efficacy of local treatment.

Key words: rheumatoid arthritis, synovial fluid, methotrexate, prednisone

Państwo i Społeczeństwo

2018 (XVIII) nr 3

e-ISSN 2451-0858
ISSN 1643-8299

doi.org/10.31749/pismzp2018/20847

Magdalena Słapińska[1], Tomasz Senderek[2], Filip Gołkowski[1]

1. Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego,
Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu, Katedra Endokrynologii i Chorób Wewnętrznych
2. Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego,
Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu, Katedra Fizjologii i Patofizjologii

ZMIENNOŚĆ WYNIKU POMIARU CIŚNIENIA TĘTNICZEGO KRWI W ZALEŻNOŚCI OD PROCEDURY JEGO WYKONANIA U PACJENTA Z KONTROLOWANYM IDIOPATYCZNYM NADCIŚNIENIEM TĘTNICZYM

Autor do korespondencyjny:
Tomasz Senderek, Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego, Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu, ul. G. Herlinga Grudzińskiego 1, 30-705 Kraków
e-mail: tsenderek@afm.edu.pl

Streszczenie

Wprowadzenie: Nadciśnienie tętnicze (NT) – powszechna choroba populacji wymagająca stałego, skutecznego leczenia, aby zapobiegać powikłaniom, wśród nich zawałowi serca, udarowi mózgu i niewydolności serca. Dobór leku i jego dawki zależy od wyników pomiaru ciśnienia tętniczego krwi (CTK), wykonywanego przez samych chorych, ale także przez lekarza (pomiar gabinetowy) i innych pracowników służby zdrowia (pomiary ambulatoryjne). Szczególne znaczenie, ze względu na istotność podejmowania prawidłowych decyzji terapeutycznych, ma standaryzacja pomiaru gabinetowego.

Celem pracy było określenie zmienności trzech kolejno wykonanych u chorego wyników pomiaru CTK w zależności od płci, wieku, indeksu masy ciała (*body mass index*, BMI), palenia tytoniu, współobecności wybranych chorób przewlekłych (cukrzycy, DM), przewlekłej obturacyjnej choroby płuc (POChP) i astmy oskrzelowej oraz stosowanego leczenia hipotensyjnego.

Materiał i metody: U 130 chorych z pierwotnym NT wykonano w gabinecie kardiologicznym trzykrotny pomiar CTK: 1. w pozycji siedzącej natychmiast po wejściu do gabinetu;

2. po 10 minutach w pozycji siedzącej; 3. po 15 minutach w pozycji leżącej. W oparciu o wywiad lekarski i dokumentację chorych zebrano dane dotyczące: BMI, chorób współistniejących, aktualnie przyjmowanych leków i palenia tytoniu.
Wyniki: Wykazano istotną statystycznie zmienność wyniku pomiaru CTK w zależności od pozycji i czasu wykonania pomiaru, niezależnie od płci, wieku, BMI i stosowanego leczenia hipotensyjnego. Nie stwierdzono zmienności wyników pomiaru ze współistniejąca cukrzycą, astmą oskrzelową ani POChP. Najwyższe wartości CTK stwierdzono w czasie pierwszego pomiaru, niższe w dwóch kolejnych.
Wnioski: Pozycja ciała i czas, jaki upłynął od początku wizyty, wpływają na wynik pomiaru CTK, poza grupami chorych, w których powikłania choroby lub stosowane leczenie mogą niwelować różnicę (cukrzyca, astma oskrzelowa, POChP). Uzyskane wyniki potwierdzają konieczność ostrożnej oceny wyniku pomiaru gabinetowego CTK.

Słowa kluczowe: leczenie przeciwnadciśnieniowe, nadciśnienie pierwotne, pomiar ciśnienia tętniczego

Wprowadzenie

Nadciśnienie tętnicze (NT) jest jednym z głównych czynników ryzyka chorób układu krążenia i ośrodkowego układu nerwowego (OUN), jak zawał serca, udar mózgu oraz niewydolność serca. Wśród krajów europejskich Polska odznacza się wysoką umieralnością z powodu chorób układu sercowo-naczyniowego mimo nowoczesnego podejścia terapeutycznego w ich leczeniu. W badaniu NATPOL z r. 2011 rozpoznano NT u 32% Polaków; jest jednak możliwe, że chorych jest nawet o ok. trzy miliony więcej [1,2,3].

NT przez długi czas rozwija się bezobjawowo, lecz z upływem lat doprowadza do poważnych powikłań. Chorobę nadciśnieniową wykrywa się najczęściej podczas kontrolnego pomiaru ciśnienia tętniczego krwi (CTK). Ze względy na dużą zmienność wartości CTK, zależną od takich czynników jak stan emocjonalny, wysiłek fizyczny czy spożycie posiłku, istotne jest ścisłe przestrzeganie standardów pomiaru zgodnie z wytycznymi Europejskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego / Europejskiego Towarzystwa Kardiologiczne ESH/ESC (European Society of Hypertension / European Society of Cardiology), opublikowanymi w 2013 r. [4]. W leczeniu NT kwestią kluczową dla wybrania właściwego leczenia są wyniki samokontrolnych pomiarów CTK w warunkach domowych w zestawieniu z badaniem CTK w gabinecie [3].

Wartość CTK zależy od rzutu serca (*cardiac output*, CO) oraz oporu przepływu krwi w układzie naczyniowym. Ciśnienie tętnicze podlega złożonej regulacji ze strony układu hormonalnego, układu nerwowego i czynności nerek. W aktywnej regulacji ciśnienia tętniczego krwi wyróżniamy zwłaszcza układ renina–angiotensyna–aldosteron (działający długoterminowo) i układ współczulno-nadnerczowy (o działaniu natychmiastowym); ponadto modyfikujące działanie odgrywają: neuropeptyd Y, peptydy natriuretyczne oraz substancje presyjne

i hipotensyjne wytwarzane w komórkach śródbłonka naczyń. Najszybciej działającym mechanizmem monitorowania i regulacji CTK są receptory zlokalizowane w mięśniu sercowym i w płucach (mechanoreceptory sercowo-płucne), w tętnicach (mechanoreceptory i ich odmiana znana – baroreceptory) oraz mięśniach szkieletowych (ergoreceptory). Ponadto znaczenie mają chemoreceptory kłębków aortalnych i szyjnych, zlokalizowane wzdłuż łuku aorty i w rozgałęzieniu tętnic szyjnych wspólnych [4,5,6,7].

Wartość ciśnienia tętniczego krwi określa się przy pomocy ciśnieniomierza, stosując metody pomiaru: manualną, osłuchową lub oscylometryczną. Metoda osłuchowa polega na detekcji tonów Korotkowa za pomocą stetoskopu [8].

Zaleca się, aby rozmiar mankietu był indywidualnie dobrany do grubości ramienia chorego. Należy poinformować chorego o przebiegu badania. Konieczny jest kilkuminutowy odpoczynek bezpośrednio przed wykonaniem pomiaru. Zaleca się wykonanie co najmniej dwóch pomiarów; w przypadku znacznej różnicy wartości CTK należy rozważyć uśrednienie uzyskanych wyników [3,4,9].

Nadciśnienie tętnicze rozpoznaje się, jeśli średnia wartość CTK, uzyskana podczas co najmniej dwóch różnych wizyt lekarskich, jest większa lub równa 140/90 mmHg. Wartości prawidłowe zmodyfikowano dla chorych w podeszłym wieku lub z chorobami współistniejącymi, jak cukrzyca, przewlekła choroba nerek, stan po zawale serca lub udarze mózgu [4,10].

Dopuszczalne jest rozpoznanie choroby nadciśnieniowej, jeżeli wartość CTK pojedynczego pomiaru przekracza 180/110mm Hg i wykluczono czynniki, które mogą tę wartość podwyższyć. Wyróżnia się trzy stopnie NT (tab. 1) [11,12].

Tabela 1. Klasyfikacja nadciśnienia tętniczego w pomiarach gabinetowych

Klasyfikacja	Ciśnienie skurczowe [mm Hg]		Ciśnienie rozkurczowe [mm Hg]
Optymalne	<120	i	<80
Prawidłowe	120–129	i/lub	80–84
Wysokie prawidłowe	130–139	i/lub	85–89
Nadciśnienie tętnicze 1 stopnia	140–159	i/lub	90–99
Nadciśnienie tętnicze 2 stopnia	160–179	i/lub	100–109
Nadciśnienie tętnicze 3 stopnia	≥180	i/lub	≥110

Podstawowym problemem technicznym jest błędnie dobrany mankiet lub nieprawidłowe jego założenie. Skutkuje to fałszywą oceną wartości CTK i niewłaściwą interpretacją wyniku [13].

Ważnym elementem diagnostyki NT są pomiary wykonywane samokontrolnie w warunkach domowych chorego, co po instruktażu badającego pozwala

uzyskać relatywnie dobrze odzwierciedlające stopień kontroli choroby i w konsekwencji optymalizować leczenie [3,8].

Kolejną metodą w diagnostyce nadciśnienia tętniczego jest Holter ciśnieniowy, w którym monitorowanie CTK odbywa się co 15–30 min. w ciągu dnia i 30–60 min. w ciągu nocy [12,13].

Celem terapii NT jest obniżenie CTK do wartości uznanych za docelowe lub najbardziej do nich zbliżonych i w konsekwencji maksymalne zmniejszenie ryzyka powikłań sercowo-naczyniowych. Leczenie NT polega na farmakoterapii i zmianie stylu życia [3,15]. Istotną rolę w terapii NT odgrywa leczenie niefarmakologiczne [12,16].

Leczenie farmakologiczne opiera się na pięciu głównych grupach leków: diuretyków tiazydowych/tiazydopodobnych, beta-adrenolityków (beta-blokerów), antagonistów wapnia (blokerów kanału wapniowego), inhibitorów konwertazy angiotensyny (hamujych enzym konwertazę angiotensyny I, ACE-I) oraz sartanów (blokerów receptora angiotensyny). Leki te należą do farmakoterapii I rzutu, która wykazuje korzystny wpływ na śmiertelność sercowo-naczyniową. Najczęściej leczenie hipotensyjne rozpoczyna się od monoterapii, w razie potrzeby wprowadza się terapię skojarzoną dwulekową. Właściwy dobór leków zależy m.in. od wieku, płci, stopnia NT i chorób współistniejących.

W przypadku istnienia wskazań indywidualnych lub NT opornego na dotychczasowe leczenie, stosuje się inne leki hipotensyjne, jak diuretyki pętlowe, antagoniści aldosteronu, alfa-adrenolityki, centralne i obwodowe sympatykolityki. U części chorych przyjmuje to postać terapii skojarzonej wielolekowej [3].

Cele badania

1. Potwierdzenie, że procedura (pozycja chorego, czas wykonania) pomiaru CTK w warunkach porady gabinetowej wpływa na jego wynik.
2. Ocena zależności zmienności wyników pomiaru CTK od płci, wieku, BMI i palenia tytoniu.
3. Określenie, czy wybrane choroby przewlekłe (cukrzyca, POChP, astma oskrzelowa, przebyty zawał serca i udar mózgu) wpływają na zmienność pomiaru CTK.
4. Ocena zależności zmienności wyniku pomiaru CTK od stosowanego leczenia hipotensyjnego.

Materiał i metody

Badanie wykonano w NZOZ w Wieliczce w okresie od września 2016 r. do maja 2017 r. po uzyskaniu pozytywnej opinii Komisji Bioetycznej Krakowskiej Akademii im. A. Frycza Modrzewskiego (nr zgody 19/2016).

Do badania włączono 130 chorych, wszyscy podpisali świadomą zgodę na udział w badaniu. Kryteriami włączenia było posiadanie dzienniczka ciśnieniowego z odnotowanymi, co najmniej dwoma pomiarami CTK dziennie, prowadzonymi przez ostatnie dwa tygodnie przed wizytą. Kryteriami wyłączenia były odnotowane wartości ciśnienia tętniczego krwi przekraczające 180/100 mmHg (niedostateczna kontrola farmakologiczna wartości CTK) w ostatnich czternastu dniach w dzienniczku ciśnieniowym, obecność przewlekłych zespołów bólowych, udokumentowanych chorób psychicznych lub ciężki stan ogólny zdrowia chorego (wg subiektywnej oceny lekarza prowadzącego).

W gabinecie trzykrotnie mierzono CTK u każdej osoby na obu ramionach za pomocą ciśnieniomierza sprężynowego Viso Spencer. Pomiary dokonano w odstępach czasowych:

1. pierwszy pomiar natychmiast po wejściu do gabinetu w pozycji siedzącej,
2. drugi pomiar 10 minut później również w pozycji siedzącej,
3. trzeci w 15 minut od pierwszego pomiaru w pozycji leżącej.

Dodatkowo mierzono tętno i saturację hemoglobiny przy pomocy pulsoksymetru (Beurer PO40). Zebrano wywiad i sprawdzono w dokumentacji lekarskiej informacje dotyczące: BMI, chorób współistniejących, farmakoterapii i palenia tytoniu. Efekt „białego fartucha" oceniono, porównując wartości pomiarów CTK „gabinetowych" ze średnimi wartościami ciśnienia pochodzącymi z dzienniczka samokontroli pacjentów.

Wszystkie zebrane informacje gromadzono w sposób uniemożliwiający identyfikację chorych. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej w programie IBM SPSS Statistics 23.0. Rozkład wyników oszacowano na podstawie wartości skośności i kurtozy, które dla uzyskanych parametrów nie przekroczyły przedziału <-1, 1>. Potwierdza to zgodność rozkładu wyników badanych parametrów z rozkładem normalnym oraz pozwoliło na zastosowanie w dalszych obliczeniach testu *t* dla prób zależnych w celu porównania różnicy CTK na prawym i lewym ramieniu oraz procedury parametrycznej, tzn. analizy wariancji *ANOVA* z powtarzanym pomiarem, gdzie czynnikiem był czas pomiaru (pomiar 1 vs pomiar 2 vs pomiar 3). Analizę wykonano dla grupy badanej ogółem, a następnie z podziałem kolejno na płeć (kobieta vs mężczyzna), wiek (<50 lat vs 50–65 lat vs >65 lat), obecność chorób współistniejących tj. cukrzycy, astmy, POCHP, przebytego zawału serca, przebytego udaru mózgu (tak vs nie), BMI (niedowaga vs waga prawidłowa vs nadwaga vs otyłość), insulinoterapię (tak vs nie), farmakoterapię (monoterapia vs terapia dwulekowa vs terapia wielolekowa), palenie tytoniu (tak vs nie). Zmienną zależną była wartość CTK skurczowego i rozkurczowego, uśredniona z prawego i lewego ramienia. Porównania parami *post hoc* wykonano z zastosowaniem poprawki dla porównań wielokrotnych Bonferroniego. Istotność statystyczną wyników przyjęto na poziomie $p<0,05$.

Wyniki

Badana grupa składała się z 130 osób: 60,8% kobiet i 39,2% mężczyzn, w wieku 25–87 lat (*M* = 58,88; *SD* = 13,86). Charakterystykę grupy przedstawiono w tabelach 2 i 3. Wszyscy chorzy stosowali leczenie farmakologiczne NT (tab. 4).

Tabela 2. Dane demograficzne grupy badanej

		N	%
Płeć	Kobiety	79	60,8%
	Mężczyźni	51	39,2%
Wiek	Poniżej 50 lat	35	26,9%
	50–65 lat	49	37,7%
	Powyżej 65 lat	46	35,4%
Palenie	Tak	46	35,4%
	Nie	84	64,6%
BMI	< 18,5 (niedowaga)	0	0,0%
	18,5–24,9 (waga prawidłowa)	22	16,9%
	25–29,9 (nadwaga)	63	48,5%
	30–34,9 (otyłość I stopnia)	35	26,9%
	35–39,9 (otyłość II stopnia)	7	5,4%
	> 40 (otyłość III stopnia)	3	2,3%

Tabela 3. Częstość występowania wybranych chorób przewlekłych w badanej grupie

Choroby współistniejące		N	%
Cukrzyca typu I	Tak	7	5,4%
	Nie	123	94,6%
Cukrzyca typu II	Tak	13	10,0%
	Nie	117	90,0%
Astma oskrzelowa	Tak	6	4,6%
	Nie	124	95,4%
POChP	Tak	12	9,2%
	Nie	118	90,8%
Inne choroby współistniejące	Tak	43	33,1%
	Nie	87	66,9%
Udar mózgu	Tak	8	6,2%
	Nie	122	93,8%
Zawał serca	Tak	7	5,4%
	Nie	123	94,6%

Tabela 4. Leki stosowane w terapii badanych osób

			N	%
Rodzaj terapii lekowej		Monoterapia	13	10,0%
		Terapia dwulekowa	56	43,1%
		Terapia wielolekowa	61	46,9%
Grupy leków	Beta blokery	Tak	90	69,2%
		Nie	40	30,8%
	Inhibitory ACE-I	Tak	94	72,3%
		Nie	36	27,7%
	Diuretyki	Tak	60	46,2%
		Nie	70	53,8%
	Antagoniści kanałów wapniowych	Tak	44	33,8%
		Nie	86	66,2%
	Sartany	Tak	30	23,1%
		Nie	100	76,9%
Inne leki		Tak	72	55,4%
		Nie	58	44,6%
Insulina		Tak	13	10,0%
		Nie	117	90,0%

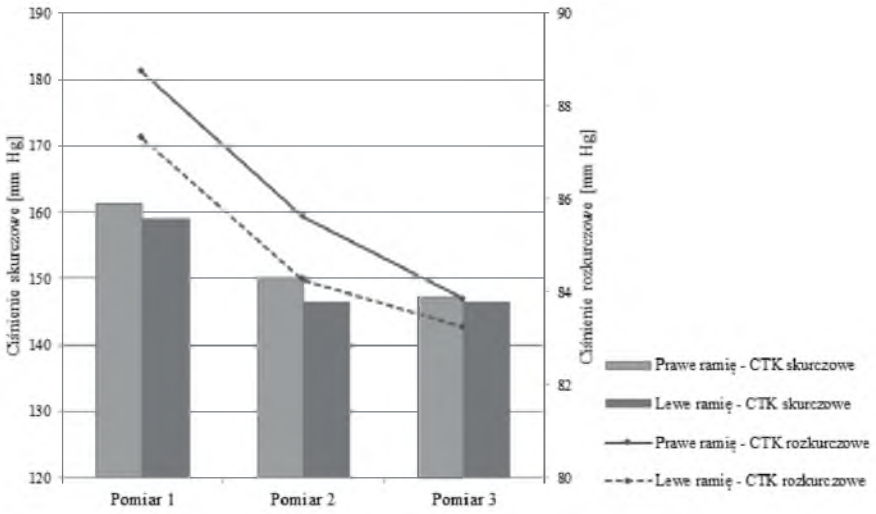
Wszystkie poniższe wyniki przedstawiono w milimetrach słupa rtęci.

W analizie pomiarów CTK, uzyskanych wg danych dzienniczków ciśnieniowych, badane osoby uzyskały wynik wysoki prawidłowy w przypadku ciśnienia tętniczego skurczowego (M = 130,31) i wynik optymalny w przypadku ciśnienia tętniczego rozkurczowego (M = 76,81).

W trzykrotnym pomiarze gabinetowym CTK w opisanych wyżej odstępach czasowych w przypadku ciśnienia tętniczego skurczowego prawego ramienia uzyskano w pomiarze pierwszym wynik klasyfikujący nadciśnienie tętnicze do II stopnia (M = 161,35), w pomiarze drugim i trzecim – do I stopnia (pomiar drugi: M = 150,08; pomiar trzeci: M = 147,31). W przypadku ciśnienia tętniczego skurczowego lewego ramienia w każdym z trzech pomiarów uzyskano wynik klasyfikujący NT do stopnia I (pomiar oierwszy: M = 158,92; pomiar drugi: M = 146,42; pomiar trzeci: M = 146,42) (ryc. 1). W przypadku średniego ciśnienia tętniczego skurczowego prawego i lewego ramienia w pomiarze pierwszym uzyskano wynik klasyfikujący NT do II stopnia (M = 160,40), w pomiarze drugim i trzecim – do I stopnia (pomiar drugi: M = 149,33; pomiar trzeci: M = 146,94) (tab. 5).

Tabela 5. Porównanie ciśnienia tętniczego skurczowego i rozkurczowego prawego i lewego przedramienia

	Pomiar	Prawa kończyna górna		Lewa kończyna górna		Porównanie średnich	Statystyki testu *t*		
		M	*SD*	*M*	*SD*		*t*	*Df*	*p*
CTK skurczowe [mm Hg]	1	161,35	12,57	158,92	12,62	P>L	4,27	129	<0,001
	2	150,08	13,06	146,42	21,17	P>L	2,37	129	<0,02
	3	147,31	12,25	146,42	12,03	P>L	3,21	129	<0,001
CTK rozkurczowe [mm Hg]	1	88,73	7,63	87,31	7,90	P>L	3,68	129	<0,001
	2	85,62	7,29	84,27	7,26	P>L	4,68	129	<0,001
	3	83,85	6,63	83,23	6,61	P>L	3,01	129	<0,001



Rycina 1. Porównanie skurczowego i rozkurczowego CTK prawego i lewego ramienia

Wyniki tętna i saturacji Hb były prawidłowe we wszystkich trzech punktach czasowych.

Podsumowując, zaobserwowano istotny statystycznie wpływ czasu pomiaru i pozycji ciała na wartość CTK. Porównania *post hoc* wykazały różnice między pomiarem pierwszym a drugim, pomiarem drugim a trzecim oraz pomiarem pierwszym a trzecim (wszystkie znamienne statystycznie). W sumie, im później wykonano pomiar, tym wartość ciśnienia tętniczego skurczowego i rozkurczowego była niższa (ryc. 2).

Analogiczne zależności obserwowano, gdy osobno analizowano kobiety i mężczyzn. W obu tych grupach, porównania *post hoc* wykazały istotne różnice pomiędzy pomiarem CTK pierwszym a drugim, pomiarem drugim a trzecim oraz pomiarem pierwszym a trzecim (później wykonany pomiar przekładał się na znamiennie niższą wartość ciśnienia tętniczego skurczowego i rozkurczowego (ryc. 3).

Stwierdzono istotny statystycznie efekt czasu pomiaru i pozycji ciała na wartość CTK skurczowego i rozkurczowego we wszystkich trzech grupach wiekowych (ryc. 4).

Wykazano istotny statystycznie efekt czasu pomiaru i pozycji ciała na wartość CTK wyłącznie u chorych bez cukrzycy, astmy ani POChP. W podgrupie osób bez tych chorób towarzyszących porównania *post hoc* wykazały istotne statystycznie różnice między pomiarami. Natomiast w grupie osób, która dodatkowo chorowała na cukrzycę, astmę lub POChP, nie wykazano istotnego statystycznie wpływu czasu pomiaru i pozycji ciała na wartości CTK skurczowego i rozkurczowego (ryc. 5–8).

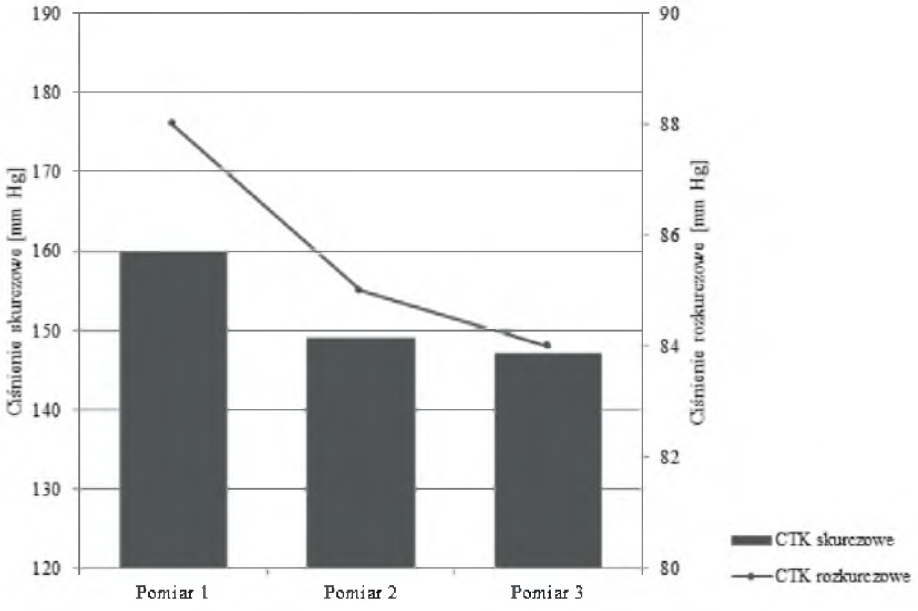
Zaobserwowano istotny statystycznie wpływ czasu pomiaru i pozycji ciała na wartość CTK, niezależnie od wartości BMI (ryc. 9).

Zaobserwowano istotny statystycznie efekt wpływ czasu pomiaru i pozycji ciała na wartość CTK, niezależnie od liczby przyjmowanych leków hipotensyjnych (ryc. 10).

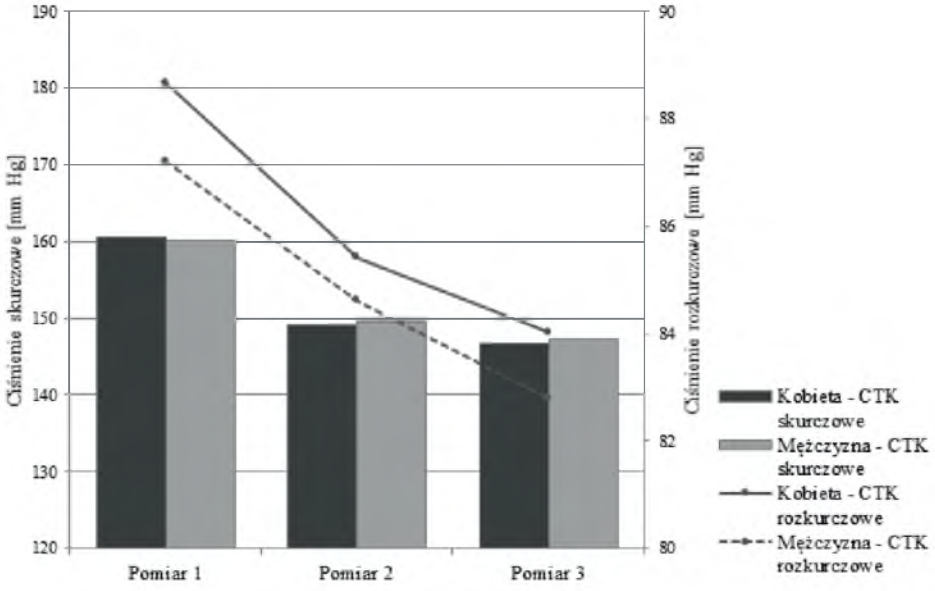
Zaobserwowano istotny statystycznie wpływ czasu pomiaru i pozycji ciała na wartość CTK, zarówno u chorych palących papierosy, jak i niepalących. Osoby niepalące w pierwszym pomiarze miały nieznacznie wyższe wartości skurczowego CTK od osób palących (ryc. 11).

U chorych z przebytym zawałem serca lub udarem mózgu nie stwierdzono istotnego statystycznie wpływu czasu pomiaru na wartość ciśnienia tętniczego skurczowego i rozkurczowego. Bez względu na sposób pomiaru chorzy po przebytym zawale lub udarze uzyskały podobne wartości CTK skurczowego i rozkurczowego (ryc. 12–13). Te dwie grupy chorych nie były liczne; uzyskane tu wyniki wymagają potwierdzenia w większej liczbie pacjentów.

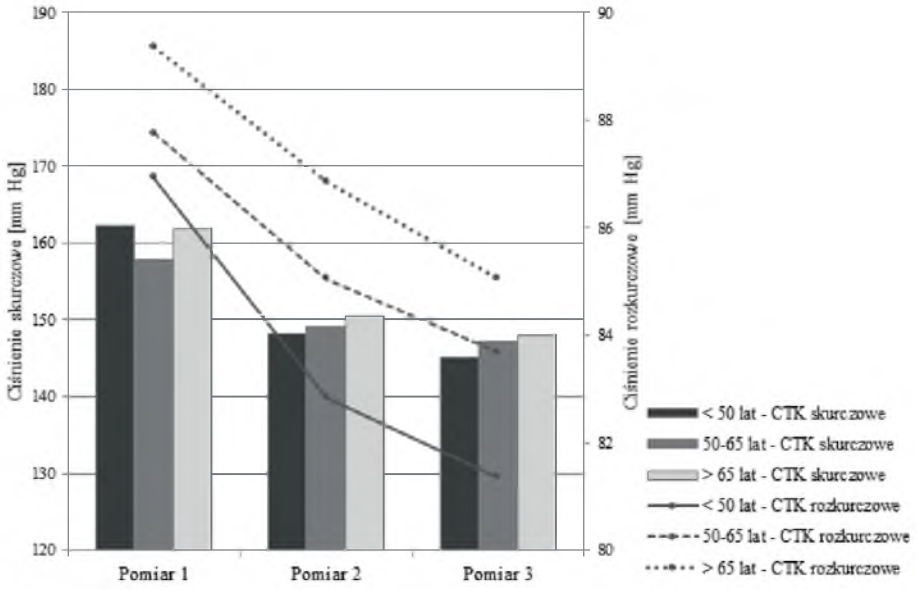
U 78,4% chorych (102 osoby, w tym 64 kobiety i 38 mężczyzn) średnia wartość pomiarów CTK nr 2 i 3 w gabinecie „gabinetowych" była wyższa od średnich wartości ciśnienia tętniczego pochodzących z dzienniczka samokontroli pacjentów (w obserwacji dwutygodniowej). Dla całej grupy uczestniczących w badaniu chorych zależność ta była znamienna statystycznie ($p<0,05$); ze względu na rozmiary niniejszej pracy nie prezentowano szczegółowych danych.



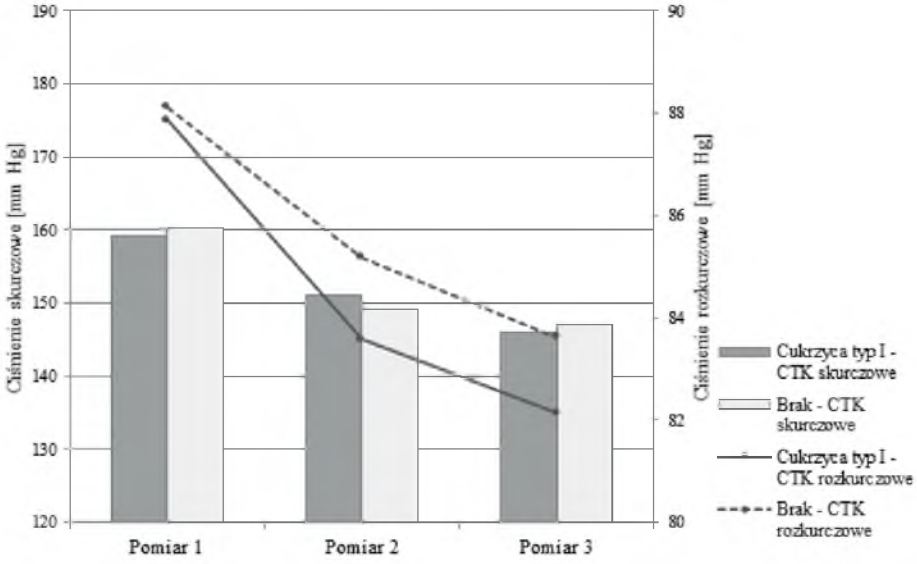
Rycina 2. Wpływ czasu pomiaru i pozycji ciała na ciśnienie tętnicze skurczowe i rozkurczowe



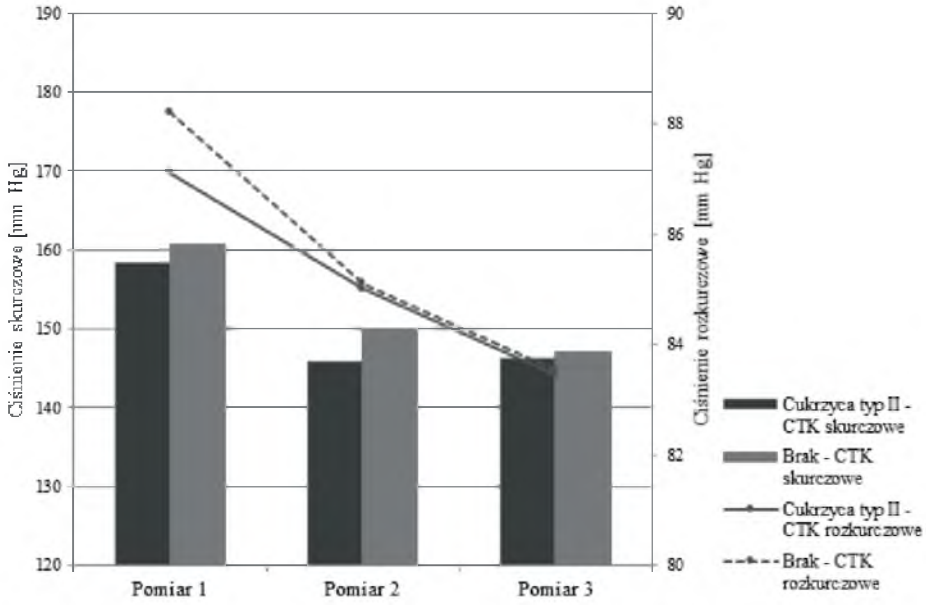
Rycina 3. Wpływ czasu pomiaru i pozycji ciała na ciśnienie tętnicze skurczowe i rozkurczowe w zależności od płci



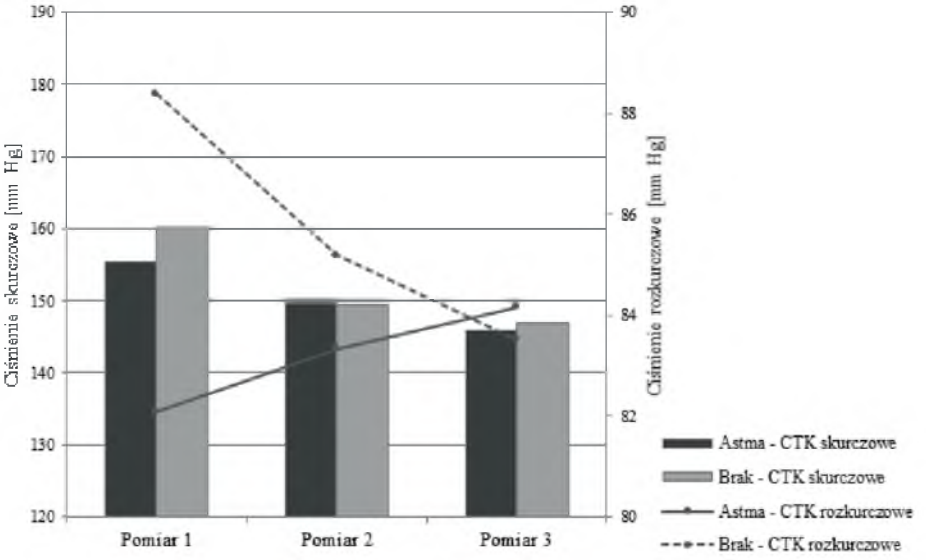
Rycina 4. Wpływ czasu pomiaru i pozycji ciała na ciśnienie tętnicze skurczowe i rozkurczowe w zależności od wieku



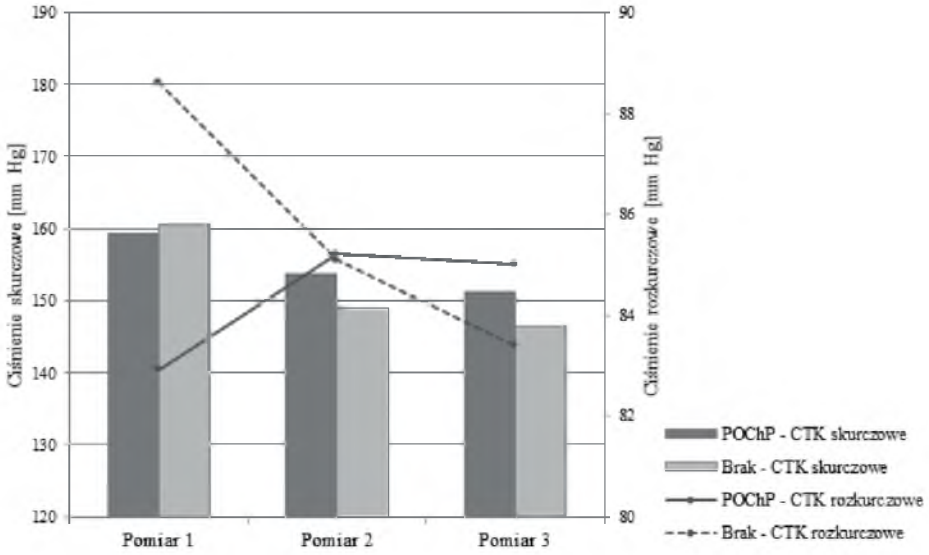
Rycina 5. Wpływ czasu pomiaru i pozycji ciała na ciśnienie tętnicze skurczowe i rozkurczowe w zależności od współwystępowania cukrzycy typu I



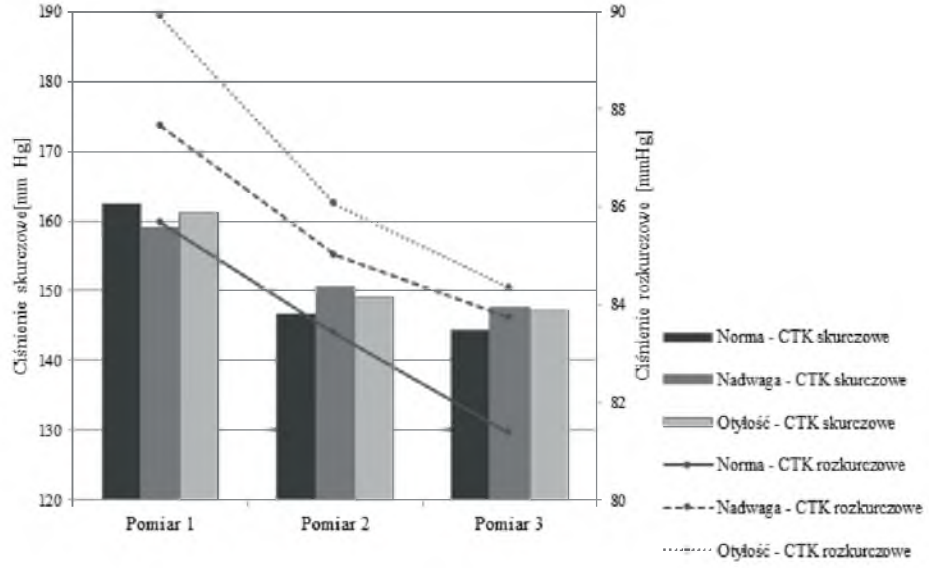
Rycina 6. Wpływ czasu pomiaru i pozycji ciała na ciśnienie tętnicze skurczowe i rozkurczowe w zależności od współwystępowania cukrzycy typy II



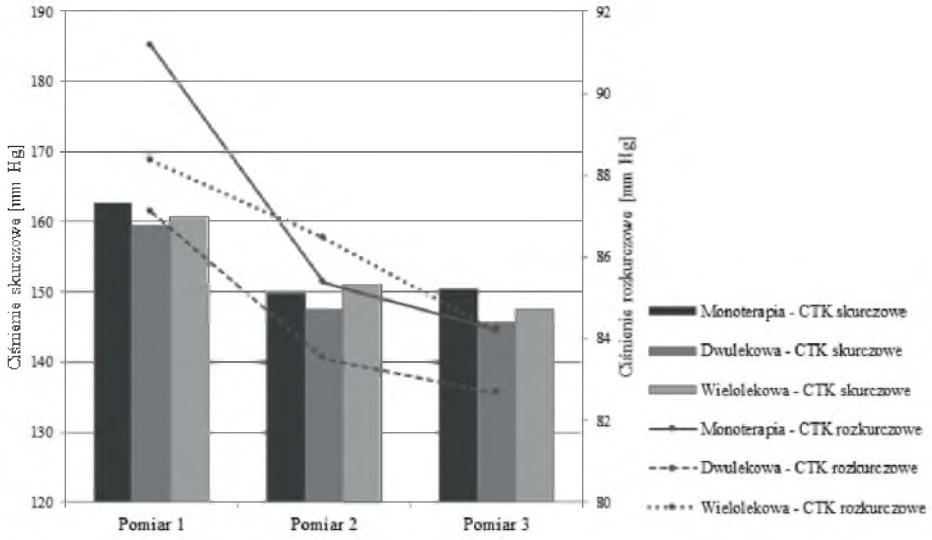
Rycina 7. Wpływ czasu pomiaru i pozycji ciała na ciśnienie tętnicze skurczowe i rozkurczowe w zależności od współwystępowania astmy oskrzelowej



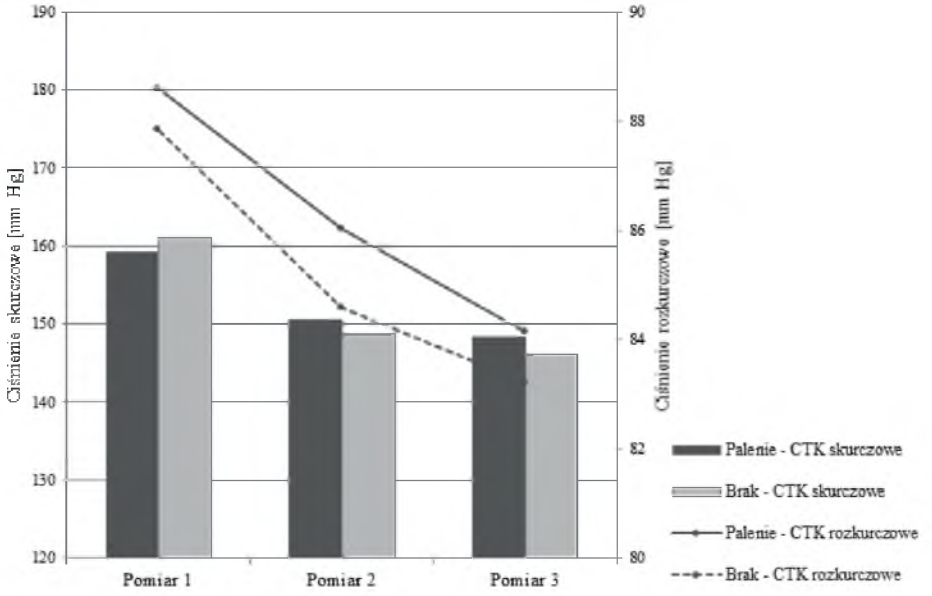
Rycina 8. Wpływ czasu pomiaru i pozycji ciała na ciśnienie tętnicze skurczowe i rozkurczowe w zależności od współwystępowania POChP



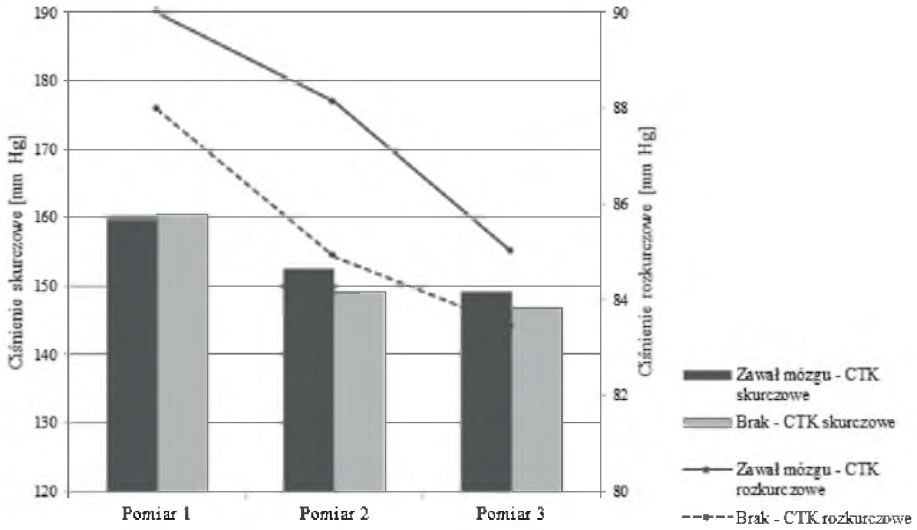
Rycina 9. Wpływ czasu pomiaru na ciśnienie tętnicze skurczowe i rozkurczowe w zależności od wartości BMI



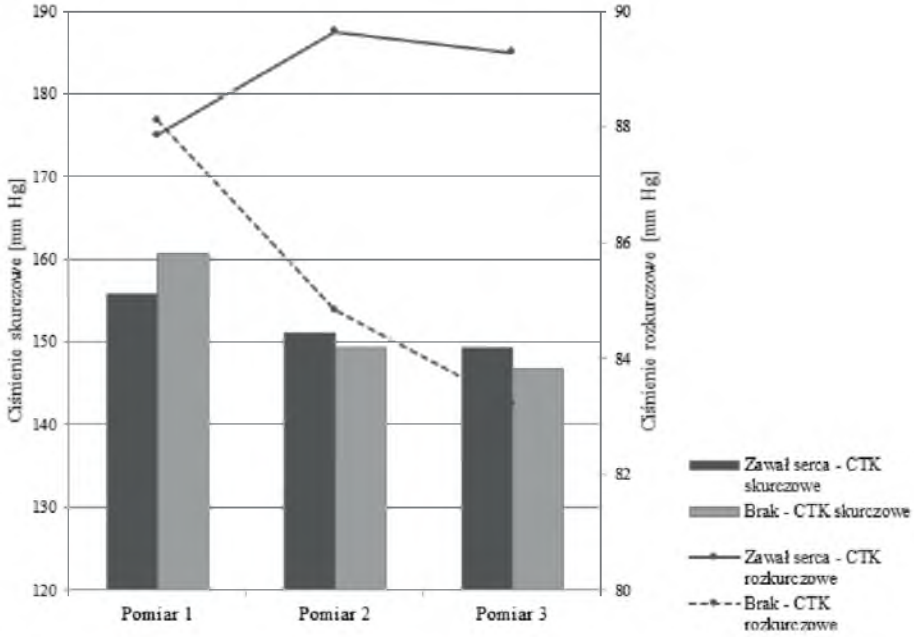
Rycina 10. Wpływ czasu pomiaru i pozycji ciała na ciśnienie tętnicze skurczowe i rozkurczowe w zależności od stosowanej terapii farmakologicznej



Rycina 11. Wpływ czasu pomiaru i pozycji ciała na ciśnienie tętnicze skurczowe i rozkurczowe w zależności od palenia tytoniu



Rycina 12. Wpływ czasu pomiaru i pozycji ciała na ciśnienie tętnicze skurczowe i rozkurczowe w zależności od przebytego udaru mózgu



Rycina13. Wpływ czasu pomiaru i pozycji ciała na ciśnienie tętnicze skurczowe i rozkurczowe w zależności od przebytego zawału serca

Dyskusja

Choroba nadciśnieniowa jest rozpowszechnionym czynnikiem ryzyka innych chorób, w tym powikłań sercowo-naczyniowych. NT przez długi czas może rozwijać się bezobjawowo, dlatego też często bywa rozpoznawana przypadkowo, podczas kontrolnego pomiaru CTK. Ze względy na fakt zmiennej wartości ciśnienia tętniczego krwi, która zależna jest od licznych czynników zewnętrznych, istotne jest ścisłe przestrzeganie standardów pomiaru.

W przeprowadzonym badaniu wykazano, że w pomiarze CTK w warunkach domowych chorzy uzyskiwali przeważnie wyniki prawidłowe – średnia pomiaru, jak wspomniano – wynosiła 130,31/76,81 mm Hg. Natomiast podczas pomiaru gabinetowego badane osoby uzyskały znamiennie wyższe wartości ciśnienia tętniczego krwi. Według wytycznych Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego dotyczących zasad postępowania w NT (2015) pomiary CTK w warunkach domowych zmniejszają ryzyko błędu związanego z wystąpieniem efektu białego fartucha czy też izolowanego nadciśnienia gabinetowego (ang. *isolated office hypertension*) oraz nadciśnienia zamaskowanego (ang. *isolated abmbulatory hypertension*). Wysiłek fizyczny i stres związany z wizytą lekarską, starszy wiek, płeć żeńska i niepalenie tytoniu mogą przyczyniać się do wzrostu ciśnienia tętniczego krwi w gabinecie. W wytycznych autorzy stwierdzają, że problem dotyczy ok. 55% chorych. Zdarza się rzadziej, gdy pomiar dokonywany jest przez pielęgniarkę, a nie lekarza. Wciąż trwa dyskusja, czy tę grupę chorych traktować jak osoby z prawdziwą normotonią. Wytyczne stwierdzają, że u wymienionych chorych CTK należy kontrolować co sześć miesięcy i poszukiwać u nich ewentualnych powikłań narządowych zwłaszcza przerostu lewej komory i współistniejącej cukrzycy [4].

Przeprowadzona w niniejszej pracy analiza wariancji *ANOVA* z powtarzanym pomiarem potwierdza, że procedura wykonania pomiaru CTK ma wpływ na wartość wyniku. W traktowanej całościowo grupie 130 chorych z NT wykazano, że badani uzyskali najwyższe wartości ciśnienia w pozycji siedzącej zaraz po wejściu do gabinetu (pomiar nr 1), natomiast najniższe – w pomiarze nr 3 w pozycji leżącej po 15 minutach od pomiaru nr 1.

W badaniu nie wykazano istotnego wpływu płci, wieku, palenia papierosów ani BMI na zmienność CTK w zależności od procedury wykonania pomiaru. Tak więc niezależnie od wieku, płci, statusu osoby niepalącej/palacza tytoniu i klasyfikacji masy ciała, najwyższe wartości CTK skurczowego i rozkurczowego stwierdzono w pomiarze pierwszym w pozycji siedzącej, natomiast najniższe w pomiarze trzecim w pozycji leżącej. Również niezależnie od prowadzonej u danego chorego typu farmakoterapii hipotensyjnej (monoterapia, terapia dwulekowa, terapia wielolekowa) zmienność wyniku CTK była typowa, czyli wartość ciśnienia spadała od pomiaru nr 1 do pomiaru nr 3; zależność była znamienna statystycznie.

Okazuje się jednak, że ta charakterystyczna zależność wyników CTK od procedury pomiaru przestaje mieć znaczenie w niektórych częstych chorobach towarzyszących nadciśnieniu. W niniejszej pracy wykazano po pierwsze, iż w przypadku osób chorych z cukrzycą nie wystąpiły różnice w zakresie wartości ciśnienia tętniczego skurczowego i rozkurczowego w zależności od procedury wykonania pomiaru. Pacjenci z cukrzycą mieli słabiej kontrolowane CTK i zażywali więcej leków hipotensyjnych. Było to zgodne z wynikami Shelley i wsp., w myśl których współistnienie cukrzycy, niezależnie od jej typu, pogarsza kontrolę NT i wymaga zastosowania większej liczby leków [19]. Potwierdzono tym samym pośrednio tezę Niedziałka i wsp., że współistnienie NT i cukrzycy wiąże się z około dwukrotnie wyższym ryzykiem niewyrównanego NT w porównaniu do osób niechorujących na cukrzycę i z koniecznością wdrożenia wielolekowej terapii hipotensyjnej dla osiągnięcia docelowych wartości CTK [17]. Z drugiej strony badania przeprowadzone przez Mete i wsp. u chorych z cukrzycą wykazały istotny wpływ niewłaściwej kontroli CTK na czas powstawania blaszek miażdżycowych w tętnicach szyjnych, ale nie na stopień kontroli glikemii [18].

W niniejszej pracy potwierdzono istotny wpływ insulinoterapii na wartość wyniku CTK, co przejawiło się nieoczekiwanie brakiem różnic wyniku ciśnienia tętniczego skurczowego i rozkurczowego w zależności od procedury wykonania pomiaru. Ponieważ jednak insulinę stosowano w oczywisty sposób tylko u podgrupy chorych z cukrzycą, więc obecności – lub nie – insulinoterapii u danego chorego prawdopodobnie nie można potraktować jak zmiennej niezależnej.

Także analiza grup chorych z astmą oskrzelową i POChP wykazała brak różnic w zakresie wartości CTK skurczowego i rozkurczowego w zależności od procedury wykonania pomiaru (pozycji ciała i czasu wykonania badania) (ryc. 12–15). Brak znamiennego wpływu pozycji ciała i czasu pomiaru na wynik CTK w astmie oskrzelowej i POChP jest kolejnym cennym i oryginalnym wynikiem niniejszej pracy. Według najlepszej naszej wiedzy w piśmiennictwie przedmiotu brak wyjaśnienia lub choćby odnotowania tej zależności. Jako możliwą przyczynę wskazujemy skłonność do hipoksji i wtórnej nadmiernej aktywacji układu sympatycznego. Chorzy ci zwykle leczeni są ponadto sympatykomimetykami. W sumie przypuszczalnie wysoka wyjściowo aktywacja adrenergiczna nakłada się na stres związany z pomiarem CTK gabinetowymi i zaciera różnice między kolejnymi trzema pomiarami. Problem wydaje się istotny, gdyż np. według badania epidemiologicznego grupy z pierwotnym NT, publikowanym w *Medical Outcomes Study*, astma i POChP należą do najistotniejszych współistniejących z nadciśnieniem chorób układu oddechowego [20]. W takich przypadkach wskazane jest użycie selektywnych beta-1 adrenolityków bez wewnętrznej aktywności sympatykomimetycznej w celu zmniejszenia ryzyka zaostrzenia chorób dróg oddechowych w przebiegu leczenia NT [21]. Z tymi danymi korespondują pośrednio wyniki niniejszego badania, wg których współwystępowanie astmy lub POChP skutkuje znamiennym pogorszeniem kontroli NT. Wydaje się, że lekarze

prowadzący niepotrzebnie ograniczają stosowanie terapii beta-adrenolitycznej w tej grupie chorych.

Typowej zmienności wyniku pomiaru CTK nie stwierdzono również w nielicznej grupie chorych z przebytym zawałem serca lub udarem mózgu. Interpretacja tej obserwacji jest utrudniona ze względu na małą liczebność tych podgrup, złożone zaburzenia regulacyjne u chorych po incydencie sercowo-naczyniowym oraz brak w dostępnym nam piśmiennictwie istotnych publikacji dotyczących tego zagadnienia.

Wnioski

1. Wykazano istotną zmienność wyniku pomiaru CTK w zależności od pozycji chorego oraz czasu wykonania pomiaru bez względu na płeć, wiek i BMI badanych oraz zastosowane leczenie hipotensyjne.
2. Najwyższe wartości CTK stwierdzono w czasie pierwszego pomiaru wykonanego w pozycji siedzącej zaraz po wejściu do gabinetu; niższe w czasie drugiego pomiaru w pozycji siedzącej po upływie 10 minut; najniższe po upływie 15 minut w pozycji leżącej. Różnice między poszczególnymi pomiarami były znamienne statystycznie.
3. Nie stwierdzono występowania zmienności wyników pomiaru CTK u chorych z cukrzycą I ani II typu, astmą oskrzelową lub POChP, co może wynikać z powikłań naczyniowych i nerwowych choroby (cukrzyca) lub stosowanego leczenia (POChP, astma oskrzelowa).
4. Pomiar CTK w warunkach lekarskiej porady gabinetowej nie powinien być wykonywany zaraz po wejściu chorego do gabinetu, a wynik należy interpretować ostrożnie.

Bibliografia

1. Suligowska K i wsp. *Niedostateczna wiedza Polaków na temat kryteriów nadciśnienia tętniczego i jego powikłań – wyniki badania NATPOL 2011*. Nadciśnienie Tętnicze. 2014; 18 (1): 9–18.
2. Wojciechowska M, Izbeska E. *Profilaktyka nadciśnienia tętniczego*. Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu. 2014; 20 (4): 370–373.
3. Tykarski A, Narkiewicz K, Gaciong Z i wsp. *Zasady postępowania w nadciśnieniu tętniczym. Wytyczne Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego*. Nadciśnienie Tętnicze w Praktyce. 2015; 1: 1–33.
4. Mancia G i wsp. *Wytyczne ESH/ESC dotyczące postępowania w nadciśnieniu tętniczym w 2013 roku. Grupa Robocza Europejskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego (ESH) i Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego (ESC) do spraw postępowania w nadciśnieniu tętniczym. Kardiologia Polska*. 2013; 71, supl. III: 27–118.

5. Rajzer M. *Podatność tętnic w nadciśnieniu tętniczym. Od patofizjologii do znaczenia klinicznego*. Arterial Hypertension. 2002; 6 (2): 61–73.
6. Zamojski M. *Role of autonomic nervous system in the pathomechanism of hypertension*. Arterial Hypertens. 2016; 20: 21–25.
7. Weakley S. *Arterial baroreceptors in the management of systemic hypertension*. Medical Science Monitor. 2010; 16: 1–8.
8. O'Brien E, Waeber B, Parati G i wsp. *Blood pressure measuring devices: recommendations of the European Society of Hypertension*. BMJ. 2001; 322: 531–536.
9. Wojciechowska M. *Profilaktyka nadciśnienia tętniczego*. Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu. 2014; 20: 370–373.
10. Prejbisz A, Januszewicz A. *Postępowanie w nadciśnieniu tętniczym w świetle wytycznych amerykańskich 2017*. Med. Prakt. 2018; 2: 30–38.
11. Whelton PK, Carey RM. *The 2017 clinical practice guideline for high blood pressure*. JAMA. 2017; 318: 2073–2074.
12. Viera A. *Ambulatory blood pressure phenotypes and risk for hypertension*. Current Hypertension Reports. 2014; 16 (10): 1–6.
13. Grabańska K. *Miejsce leczenia niefarmakologicznego w prewencji i terapii nadciśnienia tętniczego*. Forum Zaburzeń Metabolicznych. 2010; 1 (2): 115–122.
14. Stępień-Wałek A. *Ciśnienie tętnicze w pomiarach gabinetowych a całodobowe monitorowanie ciśnienia tętniczego u pacjentów leczonych hipotensyjnie*. Arterial Hypertension. 2013; 1: 184–190.
15. Strepikowska A. *Udar mózgu – czynniki ryzyka i profilaktyka*. Postępy Farmakoterapii. 2009; 65 (1): 46–50.
16. Tykarski A. *Inhibitory konwertazy angiotensyny – zmniejszenie śmiertelności u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym*. Nadciśnienie Tętnicze. 2012; 16 (4): 210–215.
17. Niedziałek J. *Porównanie leczenie nadciśnienia tętniczego u pacjentów ze współistniejącą cukrzycą typu 2 i bez cukrzycy*. Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu. 2012; 18 (1): 45–48.
18. Mete M. *Relationship of glycemia control to lipid and blood pressure lowring and atherosclerosis*. Journal of Diabetes and its Complications. 2011; 25 (6): 362–367.
19. Shelley D. *Predictors of blood pressure control among hypertensives in community health centers*. American Journal of Hypertension. 2011; 24 (12): 1318–1326.
20. Grabicki M. *Leczenie nadciśnienia tętniczego u pacjentów z przewlekłymi chorobami układu oddechowego*. Forum Medycyny Rodzinnej. 2007; 1 (2): 95–108.
21. Rutten FH, Zuithoff NP, Halk F i wsp. *Beta-Blockers may reduce mortality and risk of exacerbations in patients with chronic obstructive pulmonary disease*. Arch Intern Med. 2010; 170: 880–887.

Variability of the blood pressure results depending on its measurement procedure in patients with controlled idiopathic hypertension

Abstract

Introduction: Hypertension is a common condition requiring systematic effective treatment to prevent severe complications such as heart attack, stroke, heart failure. The pharmacotherapy and drug doses depend on the results of blood pressure (BP) measurements performed by patients themselves, as well as by physicians and other health professionals. In order to reach the correct therapeutic decisions, the cabinet BP measurement needs to be standardized.

The aim of the study was to determine the variability of three subsequent BP measurements in the same patient depending on sex, age, body mass index (BMI), smoking, antihypertensive treatment and concomitant selected chronic diseases, i.e. diabetes mellitus (DM), chronic obstructive pulmonary disease (COPD), bronchial asthma (BA).

Material and methods: In 130 patients with primary hypertension in the office, three BP measurements were performed: 1. in a sitting position immediately after entering the office; 2. after 10 minutes in a sitting position; 3. after 15 minutes in a lying position. BMI, comorbidities, current medication and smoking status were collected on the basis of medical records.

Results: A statistically significant variability in BP measurement results was found. It depended on the position and time of the measurement; this finding was regardless of sex, age, BMI and type of antihypertensive treatment. There were no variations in measurement results in patients with DM, COPD or BA. The highest BP values were found at the first measurement, the lower at 2nd and 3rd one.

Conclusions: Body position and time from the visit onset to the BP measurement affect it's result, except the groups of patients (DM, COPD, BA) in which the pharmacotherapy side effects can eliminate the difference. The study results confirm the need for careful assessment of the results of cabinet BP measurements.

Key words: antihypertensive treatment, blood pressure measurement, primary hypertension

PRACE POGLĄDOWE

Państwo i Społeczeństwo

2018 (XVIII) nr 3

e-ISSN 2451-0858
ISSN 1643-8299

doi.org/10.31749/pismzp2018/20846

Anna M. Roszkowska

Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego,
Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu, Katedra Okulistyki

AKTUALNOŚCI W DIAGNOSTYCE I LECZENIU STOŻKA ROGÓWKI

Autor korespondencyjny:
Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego, Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu, Katedra Okulistyki,
ul. G. Herlinga Grudzińskiego 1, 30-705 Kraków
e-mail: aroszkowska@afm.edu.pl

Streszczenie
Stożek rogówki jest chorobą degeneracyjną, polegającą na postępującym ścieńczeniu i uwypukleniu rogówki. Choroba ta, w postaciach zaawansowanych, prowadzi do znacznych zaburzeń ostrości wzroku – jedynym rozwiązaniem staje się wówczas przeszczep rogówki. Nowoczesna diagnostyka stożka bazuje na analizie powierzchni rogówki przy użyciu topo-tomografii komputerowej, która pozwala na ocenę wczesnych zmian chorobowych z możliwością wdrożenia odpowiedniego leczenia w stadiach początkowych. Taką procedurą jest wprowadzone w ostatnich latach sieciowanie włókien kolagenowych. Zabieg ten, dzięki reakcji fotochemicznej wywołanej oddziaływaniem UVA i ryboflawiny, prowadzi do tworzenia nowych wiązań pomiędzy łańcuchami kolagenu, z następującym usztywnieniem miąższu rogówki i zahamowaniem rozwoju stożka. Wczesna diagnoza, możliwa dzięki obrazowaniu rogówki przy użyciu nowoczesnych systemów topo-tomograficznych w połączeniu z efektywnym zabiegiem powstrzymującym rozwój stożka, stanowią istotne osiągniecie ostatnich lat.

Słowa kluczowe: stożek rogówki, rogówka, topografia rogówki, pachymetria, sieciowanie włókien kolagenowych

Wprowadzenie

Stożek rogówki jest chorobą degeneracyjną, charakteryzującą się postępującym ścieńczeniem i uwypukleniem rogówki powodującym obniżenie ostrości wzroku na skutek astygmatyzmu nieregularnego [1]. Schorzenie to do niedawna uważane było za niezapalne, jednak badania ostatnich lat wykazały jego związek z aktywnością cytokin i enzymów prozapalnych w rogówce i na powierzchni oka [2,3]. W zaawansowanych postaciach choroby dochodzi do znaczącego obniżenia ostrości wzroku – wówczas jedynym rozwiązaniem terapeutycznym jest przeszczep rogówki.

Epidemiologia i etiopatogeneza stożka

Opisana w literaturze częstotliwość występowania stożka rogówki waha się pomiędzy 54,5 a 265 przypadków na 100 000 osób, a roczna zapadalność to 2–23 przypadków na 100 000 [2–4]. Stożek rogówki występuje z jednakową częstotliwością u kobiet i mężczyzn; postępuje do ok. 40 roku życia i jest zazwyczaj obustronny z różnym stopniem zaawansowania.

Etiologia jest do dnia dzisiejszego nieznana. Uważa się, iż na powstanie stożka mogą wpływać drobne urazy, częste pocieranie oka i alergie, czyli wszystkie stany, w których dochodzi do uwalniania prozapalnych cytokin nabłonkowych przyczyniających się do apoptozy keratocytów rogówki, co leży u podłoża zmian zaobserwowanych w stożku. Zmniejszeniu liczby keratocytów wraz z obniżeniem ilości blaszek kolagenowych towarzyszy degradacja fibroblastów miąższu rogówki. Ścieńczenie miąższu, typowe dla tej choroby, spowodowane jest wzrostem aktywności proteaz z jednoczesnym zmniejszeniem aktywności ich inhibitorów, co powoduje obniżenie stabilności biomechanicznej rogówki i jej postępujące uwypuklenie [2,5].

Szczególne znaczenie w etiopatogenezie stożka przypisywane jest predyspozycjom genetycznym, za czym przemawia występowanie rodzinne, wysoka zgodność u bliźniąt jednojajowych i współwystępowanie w niektórych chorobach genetycznych takich jak zespół Marfana, Ehlersa-Danlosa czy Downa [1–4].

Opublikowane w ostatnich latach badania naukowe potwierdzają rolę czynników genetycznych w patogenezie stożka [6–9]; wydaje się, że ich współdziałanie z czynnikami środowiskowymi ma istotne znaczenie w rozwoju choroby.

Objawy

Objawy subiektywne stożka rogówki to postępujące pogorszenie ostrości wzroku, spowodowane astygmatyzmem i krótkowzrocznością, częste podrażnienia,

zespół suchego oka oraz, nierzadko, nadwrażliwość na światło. Typowymi zaburzeniami widzenia zgłaszanymi przez chorych są objawy typu „halo" wokół źródła światła, rozmycie konturów, widzenie podwójne.

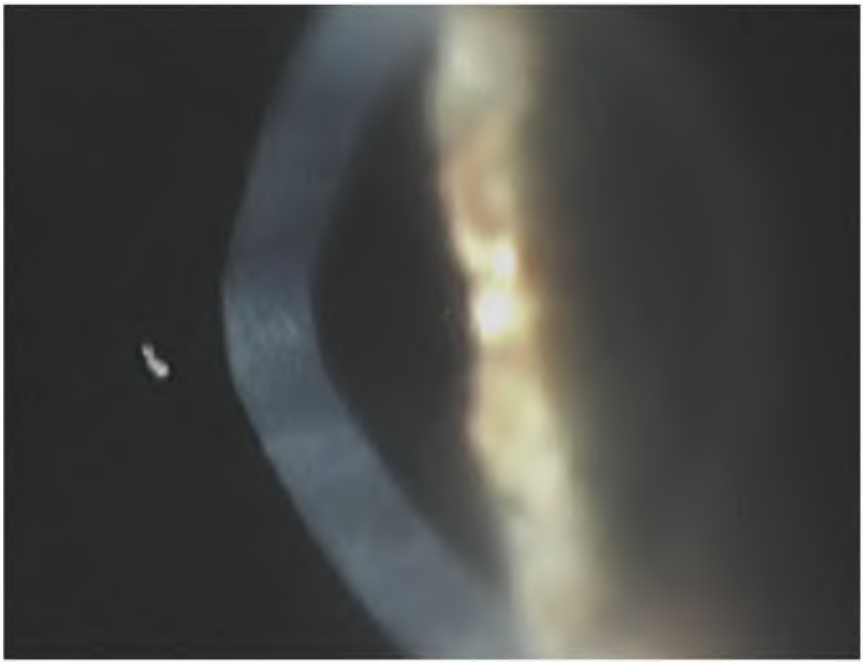
Objawy kliniczne stożka są dosyć charakterystyczne. W stopniach zaawansowanych może pojawić się tzw. objaw Munsona, polegający na deformacji brzegu powieki dolnej przy spojrzeniu w dół [1–4].

Diagnostyka

W badaniu przy użyciu lampy szczelinowej obserwuje się typowe dla tego schorzenia ścieńczenie miąższu rogówki w jej części centralnej i paracentralnej odpowiadającej szczytowi stożka (rycina 1).

Pozostałe zmiany rogówki to:

- pierścień Fleischera koloru brunatnego, spowodowany odkładaniem hemosyderyny pod nabłonkiem u podstawy stożka;
- pęknięcia błony Bowmana, a w ich efekcie – blizny podnabłonkowe
- linie Vogta, czyli pionowe linie na szczycie stożka w miąższu rogówki spowodowane rozstępami w istocie właściwej;
- obrzęk rogówki i zaznaczone blizny w stożkach wysoce zaawansowanych [1–3].



Rycina 1. Stożek rogówki w stanie zaawansowanym

Wszystkie ryciny pochodzą ze zbiorów autora.

Podstawowym badaniem diagnostycznym w stożku pozostaje komputerowa topografia rogówki, która pozwala na pomiar całkowitej krzywizny jej przedniej powierzchni. Do czasu pojawienia się tej techniki obrazowania informacji o krzywiźnie rogówki dostarczał keratometr, dokonujący pomiaru jedynie w jej części centralnej. Jest więc oczywiste, że takie pomiary w przypadkach wczesnego stożka nie pozwalały na postawienie diagnozy, która była możliwa dopiero w stadiach zaawansowanych.

Jak już wspomniano, współczesne topografy mierzą przednią krzywiznę rogówki w każdym jej punkcie, wykorzystując zmodernizowany dysk Placido, mający postać tarczy z koncentrycznymi pierścieniami – na przemian białymi i czarnymi. Obraz pierścieni po odbiciu od powierzchni rogówki jest analizowany komputerowo przy pomocy odpowiednich algorytmów. Otrzymane dane przetwarzane są na promienie krzywizny i przedstawiane za pomocą barwnych map, w których kolory tzw. ciepłe (od pomarańczowego po czerwony) odpowiadają wzrostowi krzywizny, a kolory zimne (jak ciemnozielony, niebieski, granatowy) charakteryzują obszary o niskiej krzywiźnie. Kolory zielony i żółty zarezerwowane są dla wartości normalnych, najczęściej występujących w populacji (rycina 2, 3). Topografia komputerowa pozwala zatem na ocenę krzywizny rogówki oraz informuje o jej kształcie i właściwościach refrakcyjnych [10,11].

Wszystkie topografy są dotowane programami do screeningu stożka poprzez analizę krzywizny rogówki i symetrii otrzymanego obrazu. Aktualnie są to systemy bardzo precyzyjne, które podają wskaźniki prawdopodobieństwa występowania stożka w badanym oku, a w przypadku obecności schorzenia informują o stopniu jego zaawansowania [11,12].

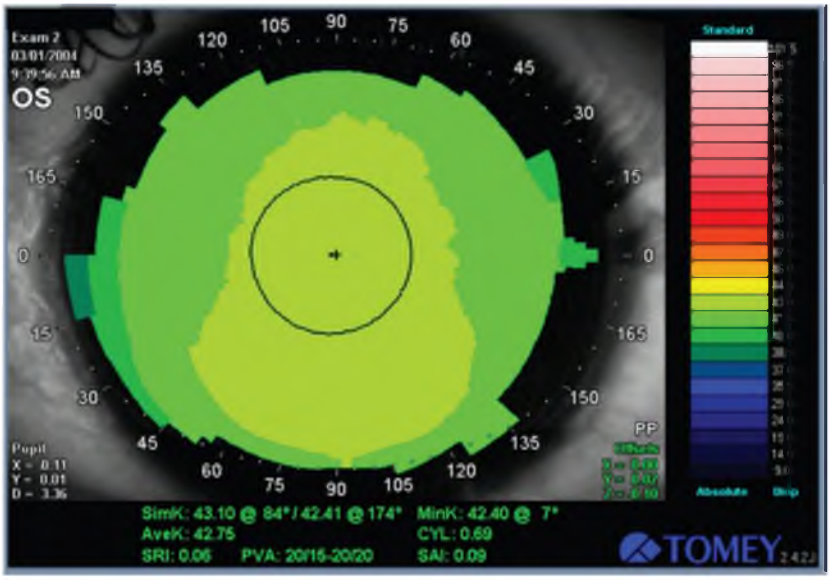
Diagnoza stożka w jego stadiach początkowych, tj. przedklinicznych, była zawsze problematyczna i pomimo istotnych postępów naukowych i technologicznych do dziś istnieją przypadki, w których trudno jest jednoznacznie potwierdzić istnienie schorzenia.

Najnowsze osiągnięcia w dziedzinie diagnostyki instrumentalnej rogówki to topo-tomografy, które podają informacje nie tylko z przedniej, ale również z tylnej powierzchni rogówki, co pozwala na wykrycie wczesnych zmian typowych dla stożka. Instrumenty te działają na zasadzie pomiaru wysokości w stosunku do punktów odniesienia – np. szczelinowa skaningowa tomografia (Orbscan®, Bausch & Lomb, USA) – lub na zasadzie kamery Scheimpfluga, tworzącej trójwymiarowy model matematyczny przedniego odcinka oka (Pentacam® Oculus, Niemcy; Sirius® CSO, Włochy; Gallilei® Ziemer, Szwajcaria). Możliwość pomiaru przedniej i tylnej powierzchni rogówki pozwala na obserwacje minimalnych zmian w jej grubości i krzywiźnie, które są charakterystyczne dla wczesnych stadiów stożka [13–15] (rycina 4).

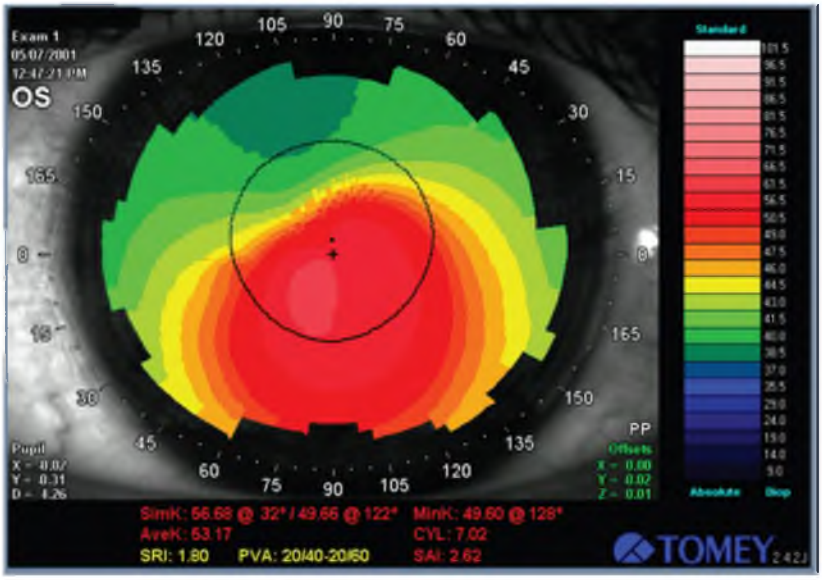
Pomiar grubości rogówki stanowi, obok topografii, istotne badanie diagnostyczne w stożku, ponieważ ścieńczenie miąższu towarzyszące wzrostowi krzywizny jest jednym z głównych objawów choroby. Pomiar ten może być wykonywany przy użyciu pachymetrów ultrasonograficznych, jednak informacje

dotyczące grubości rogówki w każdym jej punkcie, otrzymywane przy użyciu tomografów, są bardziej dokładne, powtarzalne i niezależne od operatora.

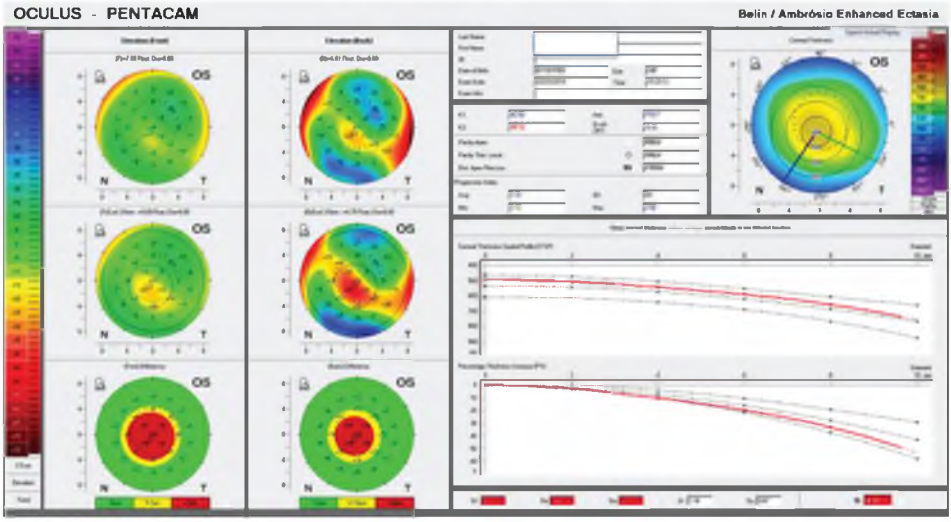
Można zatem uznać, że możliwość jednoczesnego pomiaru krzywizny i grubości rogówki w każdym jej punkcie stanowi bez wątpienia istotne osiągnięcie we współczesnej diagnostyce schorzeń rogówki.



Rycina 2. Topografia rogówki o normalnym profilu



Rycina 3. Topografia rogówki w przypadku stożka rogówki



Rycina 4. Przykład analizy wczesnego stożka rogówki przy pomocy programu Belin-Ambrosio Display (BAD), którym dysponuje tomograf Pentacam®. U dołu po lewej przedstawiony jest wynik kompleksowej analizy przedniej i tylnej powierzchni rogówki, gdzie istotne zmiany centralnej krzywizny rogówki sugerujące obecność stożka oznaczone są kolorem czerwonym

Klasyfikacja

Stożek rogówki można sklasyfikować pod względem szybkości rozwoju, jego krzywizny i morfologii. Co do stopnia ewolucji rozróżnia się tzw. *forme fruste*, czyli stożek nierozwijający się, stożek o rozwoju powolnym, pojawiający się u dorosłych, oraz formy o szybkiej progresji manifestujące się w okresie pokwitania.

Klasyfikacja oparta na wartości krzywizny centralnej stożka (K), która determinuje jej moc łamiącą w danym punkcie, rozróżnia stożek nieznaczny o wartości K<45 dioptrii, umiarkowany (K: 45–52 dioptrii), zaawansowany (K>52 dioptrii) i bardzo zaawansowany (K>62 dioptrii). Klasyfikacja morfologiczna rozróżnia stożek okrągły, owalny i ogólny [2].

Istnieje wiele propozycji podziału stożka pod względem zaawansowania, jednak najbardziej rozpowszechniona jest 4-stopniowa klasyfikacja Amslera-Krumeicha, biorąca pod uwagę średnią krzywizny z mapy topograficznej, refrakcję, grubość oraz przejrzystość rogówki [15].

Leczenie

Leczenie stożka rogówki można podzielić na zachowawcze i chirurgiczne. Pierwsze polega na optycznej korekcji wady wzroku przy pomocy okularów czy odpowiednio dobranych szkieł kontaktowych. W niektórych przypadkach, po odpowiedniej kwalifikacji, istnieje możliwość wykonania laserowej korekcji wady wzroku, jednak takie podejście terapeutyczne nie jest szczególnie rozpowszechnione [16,17].Leczenie chirurgiczne polega przede wszystkim na przeszczepie rogówki, który może być warstwowy lub drążący – w zależności od stopnia zaawansowania stożka i przejrzystości miąższu. Innym zabiegiem mającym na celu poprawę widzenia jest wszczepienie pierścieni śródrogówkowych, które, regulując krzywiznę centralnej części rogówki, poprawiają ostrość wzroku.

W ostatnim dziesięcioleciu nastąpił istotny postęp w leczeniu stożka rogówki. Związane jest to z zastosowaniem zabiegu sieciowania włókien kolagenowych, który powoduje utwardzenie i zwiększenie stabilności rogówki. Sieciowanie włókien kolagenowych rogówki (*Corneal Cross-linking*) zostało wprowadzone do kliniki przez Theo Seilera i Eberharda Spoerla, badaczy z Uniwersytetu w Dreźnie, w 1998 roku. Zabieg ten, dzięki reakcji fotochemicznej wywołanej działaniem promieniowania UVA o długości fali 370 nm i ryboflawiny (witaminy B2) na włókna kolagenowe, doprowadza do powstania nowych wiązań pomiędzy łańcuchami kolagenu, które modyfikują jego strukturę i powodują zwiększenie sztywności tkanki. Wybór ryboflawiny nie jest przypadkowy, gdyż ta okazała się idealnym fotouczulaczem, absorbującym UVA o długości fali 370 nm i wywołującym pożądaną reakcję fotochemiczną, doprowadzającą do powstawania nowych wiązań kolagenowych, co klinicznie objawia się właśnie wzrostem sztywności tkanki rogówki. Usztywnienie miąższu rogówki powstrzymuje proces jej uwypuklania związany z zaburzeniem struktury i nadmierną elastycznością [18–20].

Istnieją różne techniki sieciowania, różniące się sposobem nasączania miąższu rogówki ryboflawiną i czasem naświetlania. Istotne jest optymalne nasączenie i naświetlanie promieniowaniem UVA o mocy 3 mW/cm^2 przez 30 min. lub 10 mW/cm^2 przez 9 min.; taka dawka jest niezbędna do osiągnięcia efektu sieciowania, prowadzącego do zwiększenia stabilności biomechanicznej rogówki i zahamowania procesu chorobowego, jednocześnie zabieg taki pozostaje bezpieczny dla struktur oka (rycina 5).

Rozpowszechnienie zabiegu sieciowania włókien kolagenowych i efektywność tej techniki w zahamowaniu procesu chorobowego doprowadziły w ostatnich latach do istotnego obniżenia ilości przeszczepów rogówki z powodu stożka [21–24].

Należy podkreślić istotne znaczenie wczesnego wykrycia stożka, gdyż pozwala ono na zastosowanie zabiegu sieciowania i zahamowanie rozwoju choroby w stadiach początkowych, w których ostrość wzroku jest zachowana lub tylko

nieznacznie obniżona. Sieciowanie jest zabiegiem o stosunkowo niskiej częstotliwości powikłań, które obserwuje się głównie w technice przewidującej usunięcie nabłonka. Najczęściej występującym powikłaniem jest zaburzenie przejrzystości rogówki, które występuje w 8,6% przypadków, lecz dotyczy głównie stożków bardziej zaawansowanych. Rzadziej obserwuje się przejściowy obrzęk rogówki lub zakażenia związane z ubytkiem nabłonka i stosowaniem opatrunkowych szkieł kontaktowych [25].

Rycina 5. Zabieg sieciowania włókien kolagenowych

Podsumowanie

Postępy w diagnostyce stożka rogówki związane są z charakteryzującym ostatnie lata znacznym rozwojem nowoczesnych technologii: zaczynając od keratometru, mierzącego jedynie centralną krzywiznę rogówki, poprzez wideokeratoskopy, aż do nowoczesnych systemów topo-tomograficznych, które wykonują pomiar krzywizny i grubości rogówki w każdym jej punkcie.

Postępy w leczeniu stożka wynikają bez wątpienia z rozpowszechnienia sieciowania włókien kolagenowych, które okazało się zabiegiem efektywnym, pozwalającym na zahamowanie procesu chorobowego. Rezultatem tego jest znaczny spadek ilości przeszczepów rogówki w krajach, w których procedura ta zaczęła być stosowana rutynowo.

Podsumowując, można stwierdzić, że stożek rogówki jest chorobą występującą częściej niż zwykło się uważać, może mieć przebieg powolny lub przeciwnie: szybki i agresywny, zwłaszcza gdy pojawi się w okresie dojrzewania. Jeżeli nie zostanie zdiagnozowany we wczesnych stadiach, prowadzi do poważnych zaburzeń ostrości wzroku. Istotnym osiągnięciem ostatnich lat jest możliwość wczesnej diagnozy przy użyciu nowoczesnych tomo-topografów oraz nowa technika terapeutyczna zwana sieciowaniem, w której – dzięki reakcji fotochemicznej wywołanej działaniem promieniowania UVA o długości fali 370 nm i ryboflawiny na włókna kolagenowe – dochodzi do powstawania nowych wiązań pomiędzy łańcuchami kolagenu, które, modyfikując jego strukturę, powodują zwiększenie sztywności tkanki. Pozwala to na zatrzymanie choroby w jej wczesnych stadiach, w których jeszcze nie doszło do zaburzenia ostrości wzroku.

Bibliografia

1. Rabinowitz YS. *Keratoconus*. Surv Ophthalmol. 1998; 42: 297–319.
2. Mas-Tur V, MacGregor C, Jayaswal R, O'Brart DPS, Maycock NJR. *A Review of Keratoconus: Diagnosis, Pathophysiology and Genetics*. Survey of Ophthalmology 2017, doi: 10.1016/j.survophthal.2017.06.009.
3. Davidson AE, Hayes S, Hardcastle AJ, Tuft SJ. *The Pathogenesis of Keratoconus*. Eye. 2014; 28: 189–195.
4. Duncan JK, Belin MW, Borgstrom M. *Assesing Progression of Keratoconus: Novel Tomographic Determinants*. Eye and Vision. 2016; 3 (6): 1–9.
5. Meek KM, Tuft SJ, Huang Y et al. *Changes in Collagen Orientation and Distribution in Keratoconus Corneas*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005; 46: 1948–1956.
6. Nowak DM, Gajecka M. *The Genetics of Keratoconus*. Middle East Afr J Ophthalmology. 2011; 18: 2–6.
7. Karolak JA, Gajecka M. *Genomic Strategies to Understand Causes of Keratoconus*. Mol Genet Genomics. 2017; 292: 251–269.
8. Nowak MD, Gajecka M. *Nonrandom Distribution of MiRNAs Gene and Single Nucleotide Variants in Keratoconus Loci*. Plos One. 2015, July 15.
9. Bykhovskaya Y, Margines B, Rabinowitz YS. *Geetics in Keratoconus: Where We Are?*. Eye Vis. 2016; 27: 3–16.
10. Smolek MK, Klyce SD. *Current Keratoconus Detection Methods Compared with a Neural Network Approach*. Invest Ophthalmo Vis Sci. 1997; 38 (11): 2290–2299.
11. Rabinowitz YS, Rasheed K. *KISA% Index: A Quantitative Videokeratography Algorithm Embodying Minimal Topographic Criteria For Diagnosing Keratoconus*. J Cataract Refract Surg. 1999; 25 (10): 1327–1335.

12. Rabinowitz YS. *Videokeratographic Indices to Aid in Screening For Keratoconus*. J Refract Surg. 1995; 11: 371–379.
13. Belin MW, Khachikian SS. *An Introduction to Understanding Elevation-Based Topography: How Elevation Data Are Displayed – A Review*. Clinical and Experiment Ophthalmol. 2009; 37: 14–29.
14. Belin MW, Ambrosio R. *Scheimpflug Imaging For Keratoconus and Ectatic Disease*. Indian J Ophthalmol. 2013; 61 (8): 401–406.
15. Kamiya K, Ishii R, Shimizu K, Igarashi A. *Evaluation of Corneal Elevation, Pachymetry and Keratometry in Keratoconic Eyes with Respect to the Stage of Amsler–Krumeich Classification*. Br J Ophthalmol. 2014; 98 (4): 459–463.
16. Sakla H, Altroudi W, Munoz G, Sakla Y. *Simultaneous Topography-Guided Photorefractive Keratectomy and Accelerated Corneal Collagen Cross-Linking for Keratoconus*. Cornea. 2016; 35 (7): 941–945.
17. Camellin M, Guidotti JM, Arba Mosquera S. *Corneal-Wavefront Guided Transepithelial Photorefractive Keratectomy After Corneal Collagen Cross Linking in Keratoconus*. J Optom. 2017; 10 (1): 52–62.
18. Spoerl E, Huhle M, Seiler T. *Induction of Cross-Links in Corneal Tissue*. Exp Eye Res. 1998; 66: 97–103.
19. Spoerl E, Mrochen M, Sliney D et al. *Safety of UVA Riboflavin Cross-Linking of the Cornea*. Cornea. 2007; 26: 385–389.
20. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. *Riboflavin/Ultraviolet-A-Induced Collagen Cross-Linking For the Treatment of Kertatoconus*. Am J Ophthalmol. 2003; 135: 620–627.
21. Hashemi H, Seyedian MA, Miraftab M, Fotouhi A, Asgari S. *Corneal Collagen Cross-Linking with Riboflavin and Ultraviolet A Irradiation for Keratoconus: Long-Term Results*. Ophthalmology. 2013; 120: 1515–1520.
22. McCall AS, Kraft S, Edelhauser HF et al. *Mechanisms of Corneal Tissue Cross--Linking in Response to Treatment with Topical Riboflavin and Long-Wavelength Ultraviolet Radiation (UVA)*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010; 51: 129–138.
23. Vinciguerra P, Albé E, Frueh BE, Trazza S, Epstein D. *Two-Year Corneal Cross--Linking Results in Patients Younger Than 18 Years with Documented Progressive Keratoconus*. Am J Ophthalmol. 2012; 154: 520–526.
24. Mastropasqua L. *Collagen Cross-Linking: When and How? A Review of the State of the Art. Of the Technique and New Perspectives*. Eye and Vision 2015; 2: 19.
25. Mohammadpour M, Masoumi A, Mirghorbani M, Shahraki K, Hashemi H. *Updates on Corneal Collagen Cross Linking: Indications, Techniques and Clinical Outcomes*. Journal of Current Ophthalmology 2017; 29: 235–247.

Up to date on diagnosis and treatment of keratoconus

Abstract

Keratoconus is a degenerative disease with progressive thinning and steepening of the cornea. In the advanced stages with severe reduction of visual acuity, a corneal transplantation is required. Modern diagnostic procedures are based on corneal topography and tomography that permit early diagnosis and therapy. Corneal Cross-linking is the modern

therapeutic procedure that allows arrest of disease progression with maintenance of good visual acuity if performed in early stages. This therapeutic procedure is based on the photochemical reaction induced by riboflavin and UVA radiation that creates new bonds between collagen fibers that results in stromal stiffening that arrest keratoconus progression. It could be stated that significant achievements in keratoconus management are related to the possibility of early detection due to the modern tomographic systems and possibility of effective treatment with corneal cross linking procedure that arrests progression of ectasia.

Key words: keratoconus, cornea, corneal topography, pachymetry, cross-linking

Państwo i Społeczeństwo

2018 (XVIII) nr 3

e-ISSN 2451-0858
ISSN 1643-8299

doi.org/10.31749/pismzp2018/20849

Justyna Chronowska[2], Andrzej Madej[1], Sylwia Leks[2], Renata Chrobot[2]

1. Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego, Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu, Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Farmakologii Klinicznej
2. Szpital Zakonu Bonifratrów w Katowicach, Oddział Chorób Wewnętrznych z Pododdziałami: Diagnostyki Kardiologicznej i Diabetologii

BEZPIECZEŃSTWO PRZYJMOWANIA NIESTERYDOWYCH LEKÓW PRZECIWZAPALNYCH, CZ. I

Autor korespondencyjny:
Justyna Chronowska, Szpital Zakonu Bonifratrów w Katowicach,
Oddział Chorób Wewnętrznych z Pododdziałami: Diagnostyki Kardiologicznej i Diabetologii,
ul. Ks. Leopolda Markiefki 87, 40-211 Katowice
e-mail: justynachronowska@interia.pl

Streszczenie

Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) pomimo licznych działań niepożądanych w dalszym ciągu pozostają najczęściej stosowaną grupą leków, które można nabyć bez recepty. Mechanizm ich działania polega na hamowaniu aktywności cyklooksygenaz (COX 1; COX 2), enzymów uczestniczących w jednym ze szlaków przemian kwasu arachidonowego, którego końcowymi produktami są prostaglandyny (PGE2 oraz PGI2--prostacykliny) oraz tromboksany. Zahamowanie aktywności cyklooksygenazy (COX) nieuchronnie prowadzi po wystąpienia działań niepożądanych. Do najczęściej występujących skutków ubocznych związanych ze stosowaniem niesteroidowych leków przeciwzapalnych należą objawy ze strony przewodu pokarmowego. Rzadziej z nadmiernym stosowaniem NLPZ wiąże się oddziaływanie nefrotoksyczne, hepatotoksyczne, negatywny wpływ na działanie układu oddechowego oraz stosunkowo niedawno potwierdzone działanie kardiotoksyczne. Należy więc wszelkimi możliwymi sposobami dążyć do zmniejszenia dostępności niesteroidowych leków przeciwzapalnych oraz monitorować stosowanie tych leków głównie u osób szczególnie narażonych na wystąpienie skutków

ubocznych (ludzi starszych, z niewydolnością krążenia, nadciśnieniem tętniczym, chorobami nerek i przewodu pokarmowego).

Słowa kluczowe: niesteroidowe leki przeciwzapalne, aspiryna, cyklooksygenza

Wprowadzenie

Samoleczenie w tradycji polskiej jest niezwykle rozpowszechnione. W prawie każdym mieszkaniu jest miejsce na apteczkę zawierającą różne leki: od antybiotyków, poprzez suplementy diety, po leki przeciwbólowe. Istnieje silne społeczne przekonanie, że środek farmaceutyczny nabyty bez recepty lekarskiej jest bezpieczny i może być stosowany bez jakiejkolwiek kontroli. Prawie 1/5 Polaków spożywa więcej niż 52 tabletki przeciwbólowe rocznie [1]. W 2011 r. w Polsce kupiono łącznie dwa miliardy leków zawierających środki przeciwbólowe, w tym 1 mld 437 mln bez recepty [1]. Aż 58% Polaków zażywa leki przeciwbólowe minimum raz w miesiącu, 18% minimum raz w tygodniu a 2% codziennie [1].

Dane ze struktury sprzedaży dowodzą, że zakup aż 1,3 mld tabletek przeciwbólowych odbywa się bez pomocy eksperta. Prawie połowa Polaków sięga po leki przeciwbólowe już przy pierwszych objawach bólu lub profilaktycznie, gdy spodziewa się, że ból ten nadejdzie. Niestety, bezrefleksyjne stosowanie leków dotyczy także dzieci. W badaniu *Zdrowie i zachowania zdrowotne mieszkańców Polski w świetle Europejskiego Ankietowanego Badania Zdrowia (EHIS) 2014* dowiedziono, że w ciągu dwóch tygodni poprzedzających badanie leki stosowano u prawie 58% dzieci [2].

Najczęściej stosowaną grupą leków przeciwbólowych, pomimo licznych działań niepożądanych, w dalszym ciągu pozostają niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ). Do najczęściej występujących skutków ubocznych należą m.in. nudności i wymioty (50–60% przypadków), owrzodzenia przewodu pokarmowego, a także stosunkowo niedawno potwierdzone działanie kardiotoksyczne [3]. Interesujący pozostaje fakt, że u ponad 80% pacjentów, u których wystąpiły poważne działania niepożądane, nie zaistniały istotne objawy sygnalizujące.

Mechanizm działania NLPZ

Mechanizm działania NLPZ, odkryty na początku lat 70. XX w., polega na hamowaniu aktywności cyklooksygenaz (COX 1, COX 2), enzymów uczestniczących w jednym ze szlaków przemian kwasu arachidonowego, którego końcowymi produktami są prostaglandyny (PGE2, PGI2-prostacykliny) oraz tromboksany (Tx) [4]. Cykliczne nadtlenki PG, jak i same PG mają być nie tylko mediatorami procesów zapalnych, lecz także uczestnikami w procesie przekaźnictwa bodźców bólowych [4]. Wiadomo jednak, że oprócz szlaku cyklooksygenaz istnieje także

drugi szlak przemian kwasu arachidonowego, tj. szlak lipooksygenazy, którego końcowym produktem są leukotrieny (LTB4, LTC4, LTD4, LTE4), również odgrywające istotną rolę w procesach zapalnych, a także w nocycepcji [3,4].

W 1992 r. DanielSimmonds wykazał, że istnieją co najmniej dwie izoformy cyklooksygenazy: cyklooksygenaza konstytutywna (COX 1) i indukowana (COX 2). COX-1 występuje w warunkach fizjologicznych (płytki krwi, śluzówka żołądka, nerki, endotelium). Oddziaływuje więc cytoprotekcyjnie na przewód pokarmowy, wpływa korzystnie na przepływ krwi w nerkach, reguluje funkcję płytek krwi [4]. Forma indukowana (COX-2) powstaje natomiast w następstwie działania endotoksyn czy cytokin prozapalnych. Niestety, COX-2 pełni także istotne funkcje konstytutywne – odgrywa ważną rolę w regulacji przepływu nerkowego i gospodarki sodowej organizmu [4]. Odpowiada więc za powstawanie prostaglandyn indukujących wzrost przepuszczalności naczyń, obrzęk i ból [4]. Jej obecność wykryto także w komórkach płytki miażdżycowej oraz komórkach nowotworowych pochodzenia nabłonkowego [4].

Na początku XX. w. odkryto białko, które nazwano COX-3, będące odmianą COX-1 i występujące m.in. w strukturach OUN [5].

Większość NLPZ hamuje obie izoformy COX; za działania niepożądane związane ze stosowaniem NLPZ odpowiedzialne jest przede wszystkim zahamowanie COX-1, natomiast efekt przeciwzapalny jest rezultatem zahamowania COX-2 [3,4]. W ostatnich latach pojawiły się także publikacje, z których wynika, że mechanizm przeciwzapalnego działania NLPZ związany jest prawdopodobnie także z zahamowaniem ekspresji indukowanej izoformy syntazy tlenku azotu, enzymu ściśle związanego z rozwojem stanu zapalnego w uszkodzonych tkankach [5].

Obecnie NLPZ dzielimy na trzy grupy:

- NLPZ I generacji:
  - hamujące preferencyjnie głównie COX-1, np. kwas acetylosalicylowy, indometacyna;
  - hamujące głównie COX-2 i w pewnym stopniu COX-1, np. diklofenak;
- NLPZ II generacji hamujące głównie COX-2, np. meloksykam, nimesulid, sulindak;
- NLPZ III generacji wybiórczo hamujące COX-2 tzw. koksyby, np. celekoksyb [3,4,5].

Oddziaływanie na przewód pokarmowy

Zahamowanie aktywności cyklooksygenazy (COX) nieuchronnie prowadzi po wystąpienia działań niepożądanych. Na czoło wszystkich skutków ubocznych związanych ze stosowaniem NLPZ, w tym popularnego kwasu acetylosalicylowego [ASA], wysuwa się zarówno miejscowy, jak i ogólnoustrojowy niekorzystny wpływ na przewód pokarmowy, zależny w dużej mierze od hamowa-

nia syntezy prostaglandyn [4,5]. Prostaglandyny odpowiadają za zwiększenie przepływu krwi w błonie śluzowej, pobudzanie wytwarzania oraz wydzielania śluzu i wodorowęglanów; sprzyjają też proliferacji i regeneracji nabłonka [4], wykazując tym samym działanie cytoprotekcyjnie dla błony śluzowej żołądka i dwunastnicy. Objawy niepożądane ze strony przewodu pokarmowego można podzielić na kilka grup. Do częstych, ale stosunkowo łagodnych należą objawy dyspeptyczne, takie jak nudności, uczucie dyskomfortu w nadbrzuszu, biegunki. Jednak najbardziej niebezpiecznymi, mogącymi prowadzić nawet do zgonu, są ciężkie uszkodzenia górnej części przewodu pokarmowego pod postacią krwawień, owrzodzeń czy perforacji [4,5]. Dzięki zastosowaniu endoskopii kapsułkowej coraz większą uwagę zwraca się również na uszkodzenia jelita cieńkiego, najczęściej pod postacią nadżerek i owrzodzeń [7]. Grupą chorych szczególnie narażonych na ryzyko krwawienia z przewodu pokarmowego są pacjenci powyżej 60–75 roku życia, z chorobą reumatyczną, przyjmujący dodatkowo preparaty kwasu acetylosalicylowego, leki sterydowe, przeciwdepresyjne i przeciwzakrzepowe oraz z epizodem krwawienia z przewodu pokarmowego w wywiadzie [4,7]. Również duże dawki NLPZ lub przyjmowanie kilku NPLZ jednoczasowo zwiększa ryzyko wystąpienia krwawień [5]. Na podstawie analizy badań endoskopowych wiadomo, że już po 1–2 tygodniach stosowania NLPZ u 60–100% chorych stwierdza się przekrwienie, wybroczyny, nadżerki, a nawet wrzody żołądka lub dwunastnicy [8]. Udowodniono także, iż długotrwałe leczenie preparatami ASA zwiększa ryzyko krwawienia z przewodu pokarmowego niezależnie od dawki i rodzaju preparatu [9].

Ryzyko wystąpienia wspomnianych uszkodzeń jest największe w początkowym okresie przyjmowania NLPZ, u chorych stosujących je przewlekle zmiany w obrębie błony śluzowej żołądka i dwunastnicy opisywane są w 5–30% przypadków [8]. Według Jaya Goldsteina największe ryzyko ciężkich uszkodzeń przewodu pokarmowego występuje w trakcie stosowania Ketoprofenu (23,7%), Piroksykamu (13,7%) i Naproksenu (9,1%), najmniejsze zaś przy Nimesulidzie (2,6%) i Ibuprofenie (2,0%) [10]. W świetle opublikowanych badań można przyjąć, że stosowanie wybiórczych inhibitorów COX-2 niesie ze sobą mniejsze ryzyko choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy czy krwawienia z przewodu pokarmowego w porównaniu do inhibitorów COX-1 [7]. Wytyczne American College of Rheumatology zalecają, aby u chorych z objawowym lub powikłanym owrzodzeniem górnego odcinka przewodu pokarmowego, ale bez krwawienia z tegoż odcinka w ostatnim roku, u których lekarz zadecydował o włączeniu NLPZ przyjmowanych doustnie, wybierać wybiórcze inhibitory COX-2 lub niewybiórcze w połączeniu z inhibitorem pompy protonowej (IPP) [11]. Pantoprazol, należący do grupy IPP, w dawce 20 mg, zgodnie ze swoim wskazaniem rejestracyjnym, zapobiega powstawaniu owrzodzeń żołądka i dwunastnicy, zmniejsza ryzyko zabiegu chirurgicznego oraz śmiertelności, wywołanymi przez przyjmowanie NLPZ u osób z grupy zwiększonego ryzyka, wymagających dłu-

gotrwałego stosowania tych leków, tj. pacjenci >65. r.ż., z dodatnim wywiadem w kierunku choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy lub epizodem krwawienia z przewodu pokarmowego [7,11]. W przypadku wystąpienia choroby wrzodowej czy krwawienia z górnego odcinka przewodu pokarmowego jako pierwsze zalecane jest leczenie endoskopowe [7].

Oddziaływanie nefrotoksyczne

Prostaglandyny wywierają także wpływ na nerki i są odpowiedzialne za ich prawidłowe funkcjonowanie [4]. PG obecne w kłębuszkach nerkowych, ramieniu wstępującym pętli Henlego, plamce gęstej, kanalikach zbiorczych oraz naczyniach nerkowych odpowiadają za prawidłowe przesączanie kłębuszkowe oraz wydzielanie sodu i chloru, regulują także wydzielanie reniny oraz przepływy w łożysku nerkowym, wpływając na rozszerzanie tętniczek doprowadzających oraz antagonizowanie działania kurczącego angiotensyny II [4]. NLPZ, hamując produkcję PG, powodują zmniejszenie wydzielania sodu o 30–50%, prowadząc tym samym do retencji wody z następczymi obrzękami i skłonnością do nadciśnienia [4,12]. Przeprowadzone randomizowane badanie CRESCENT, oceniające wpływ niesterydowych leków przeciwzapalnych na wartości ciśnienia tętniczego u chorych z nadciśnieniem tętniczym, zapaleniem kości i stawów oraz cukrzycą typu 2, wykazało, że już po sześciu tygodniach stosowania NLPZ pojawił się u pacjentów istotny wzrost wartości ciśnienia tętniczego [13]. Największy wzrost wartości ciśnienia wystąpił w grupie chorych przyjmujących Rofekoksyb (31,1%), nieco mniejszy (19,3%) w grupie przyjmującej Naproksen, najmniejszy natomiast w grupie przyjmującej Celekoksyb (16,2%) [13]. Kolejne badanie porównujące wpływ rofekoksybu i celekoksybu na wartości ciśnienia tętniczego ujawniło, iż w grupie chorych przyjmujących rofekoksyb obserwowano znacznie większy wzrost wartości skurczowego ciśnienia tętniczego (> 20 mmHg) w porównaniu do grupy pacjentów przyjmujących celekoksyb [14]. Rofekoksyb odpowiadał za największy wzrost wartości skurczowego ciśnienia tętniczego u chorych przyjmujących leki hipotensyjne z grupy inhibitorów enzymów konwertazy i beta-adrenolityków, podczas gdy u pacjentów leczonych antagonistami kanału wapniowego lub lekami diuretycznymi stosowanymi w monoterapii nie obserwowano znacznego wzrostu wartości ciśnienia tętniczego zarówno w grupie przyjmującej rofekoksyb, jak i celekoksyb [14]. Przeprowadzone badania dowiodły, iż w przypadku inhibitorów COX-2 nie istnieje efekt klasy; należące do tej samej grupy rofekoksyb i celekoksyb w różnym stopniu wpływały na wartości ciśnienia tętniczego u stosujących je chorych [6].

Po opublikowaniu wniosków płynących z przeprowadzonego badania VIGOR, z uwagi na wzrost ryzyka zgonów i zdarzeń sercowo-naczyniowych oraz szereg innych działań niepożądanych, rofekoksyb został wycofany z rynku [15].

NLPZ mogą także prowadzić zarówno do ostrego, jak i przewlekłego uszkodzenia nerek [17]. Najczęściej spotykana ostra niewydolność nerek z towarzyszącą martwicą brodawek nerkowych czy ostrym śródmiąższowym zapaleniem nerek przebiega z hiperkalemią i kwasicą metaboliczną [17]. Również tutaj nie bez znaczenia pozostaje fakt równoczesnego stosowania leków hipotensyjnych. Wykazano, że jednoczesne przyjmowanie NLPZ i leków hipotensyjnych z grupy inhibitorów konwertazy angiotensyny, beta-adrenolityków czy diuretyków zwiększa ryzyko ostrej niewydolności nerek [17]. Zjawisko to jest jednak najczęściej odwracalne po odstawieniu NLPZ i zapewnieniu równowagi wodno-elektrolitowej. Znacznie rzadziej opisywane są przypadki przewlekłego uszkodzenia nerek, będącego następstwem przyjmowania NLPZ. Najczęściej występuje ono u chorych przyjmujących NLPZ przez długi czas, w bardzo dużych dawkach [17].

Skutki uboczne wpływu NPLZ na funkcjonowanie nerek są szczególnie widoczne u chorych z już upośledzoną czynnością nerek, nadciśnieniem i niewydolnością krążenia.

Zgodnie ze wskazaniami American College of Rheumatology nie powinno się stosować doustnie NLPZ u chorych z przewlekłą chorobą nerek w stadium IV i V (eGFR < 30 ml/min), natomiast decyzję o doustnym zastosowaniu NLPZ u pacjentów w stadium III niewydolności nerek (eGFR 30–59 ml/min) powinno się opierać na indywidualnej ocenie korzyści i ryzyka [11]

Oddziaływanie hepatotoksyczne

Uszkodzenie wątroby w stosunku do opisywanych powyżej skutków ubocznych przyjmowania NLPZ nie wiąże się z podstawowym mechanizmem działania tych leków [4]. Niemniej jednak, przypuszczalnie ze względu na przemiany metaboliczne, którym te leki podlegają, występuje dość często [4,17]. Szacowana częstość występowania uszkodzeń wątroby indukowanych przez NLPZ mieści się w zakresie 1–9 przypadków na 100 000 osób [17]. Do najczęściej opisywanych objawów, będących skutkiem uszkodzenia tego narządu, należą nudności (73%), żółtaczka (67%) czy oddawanie ciemnego moczu (67%) [17]. Znacznie wcześniej przed pojawieniem się tych symptomów można obserwować poważny wzrost wartości enzymów wątrobowych (transaminazy alaninowej i asparaginowej, bilirubiny, fosfatazy alkalicznej) [17]. Przeprowadzone badania wskazują, że najczęściej za uszkodzenie wątroby odpowiedzialne są: sulindak, diklofenak oraz nimesulid [4,16,17]. Biorąc pod uwagę mnogość dostępnych alternatywnych NLPZ, wydaje się rozsądnym unikanie stosowania tych konkretnych leków lub uznania ich za leki drugiego lub trzeciego rzutu [17].

Idealnym lekiem o działaniu przeciwbólowym wydaje się być zatem paracetamol, działający przeciwbólowo i przeciwgorączkowo, nie wywierający jed-

nak efektu przeciwzapalnego. Idealnym, gdyby nie znaczne zwiększenie ryzyka uszkodzenia wątroby [4,17]. Do czynników zwiększających ryzyko uszkodzenia wątroby podczas stosowania paracetamolu należy zaliczyć niedożywienie lub anoreksję, jednoczasowe spożywanie alkoholu czy genetycznie uwarunkowany polimorfizm CYP2E1 [16,17]. Należy podkreślić fakt, iż paracetamol jest powszechnie dostępnym lekiem bez recepty, co wiąże się z dużym ryzykiem nadużycia. Jest to jeden z najczęściej stosowanych środków farmakologicznych w celach samobójczych: 10 g paracetamolu przyjętych jednorazowo może sprawić, że próba samobójcza okaże się skuteczna, jeśli pomoc nie przyjdzie na czas [4,16].

Oddziaływanie na układ oddechowy

Działania niepożądane ze strony układu oddechowego jako efekt przyjmowania NLPZ występują stosunkowo rzadko [4]. Najczęściej manifestują się jako skurcz oskrzeli, będący elementem reakcji nadwrażliwości, do której dochodzi w wyniku zablokowania szlaku COX-1, co powoduje wzrost aktywności szlaku lipooksygenazowego i zwiększoną produkcję leukotrienów, jednego ze związków endogennych najsilniej kurczącego oskrzela [18].

Lekiem w głównej mierze odpowiedzialnym za tego rodzaju skutki uboczne jest popularna aspiryna, mogąca wywołać nawet tzw. astmę aspirynopochodną [20]. Zarówno aspiryna, jak i inne NLPZ mogą zaostrzyć przebieg przewlekłego zapalenia zatok i nosa, a także wywołać eozynofilowe zapalenie górnych i dolnych dróg oddechowych, objawiające się dusznością, gorączką i kaszlem [18,19,20].

Podsumowanie

Działania niepożądane po niesterydowych lekach przeciwzapalnych są najczęstszymi wśród wszystkich grup terapeutycznych [4]. Szkodliwe działania dotyczące przewodu pokarmowego są dość znane, niemniej często pacjenci zgłaszający objawy nie wiążą ich wystąpienia z zażywanym lekiem. Wśród dominujących powikłań na pierwszym miejscu należy wymienić nudności i wymioty (50–60% populacji) oraz owrzodzenia przewodu pokarmowego (15–30% pacjentów zażywających regularnie NLPZ) [6]. Znacznie rzadziej z lekami przeciwbólowymi wiążą się inne częste powikłania, takie jak: wzrost ciśnienia tętniczego, obrzęki obwodowe, uszkodzenie nerek i wątroby czy skurcz oskrzeli. Co więcej, wprowadzenie do leczenia i intensywne reklamowanie form leków o przedłużonym działaniu dodatkowo zwiększa częstotliwość powikłań. Odwołując się w ramach podsumowania do Paracelsusa, twierdzącego, że „wszystko jest trucizną, decyduje tylko dawka", należałoby – poprzez kampanie społeczne i regulacje usta-

wowe – przede wszystkim zmniejszyć dostępność niesterydowych leków przeciwzapalnych oraz monitorować stosowanie tych leków u wybranych pacjentów (osoby starsze, z niewydolnością krążenia, nadciśnieniem tętniczym, chorobami nerek i przewodu pokarmowego).

Bibliografia

1. Ochrona zdrowia w gospodarstwach domowych w 2013; GUS, Departament Badań Społecznych i Warunków Życia. Warszawa 2014, http://stat.gov.pl/files/gfx/portalinformacyjny/pl/defaultaktualnosci/5513/2/4/1/ochrona_zdrowia_w_gospodarstwach_domowych_w_2013_r.v2.pdf [dostęp: 6.04.2018].
2. Zdrowie i zachowanie zdrowotne mieszkańców Polski w świetle Europejskiego Ankietowego Badania Zdrowia (EHIS) 2014 r. GUS, notatka informacyjna. Warszawa 2015, http://stat.gov.pl/files/gfx/portalinformacyjny/pl/defaultaktualnosci/5513/10/1/1/zdrowie_i_zachowania_zdrowotne_mieszkancow_polski_w_swietle_badania_ehis_2014.pdf [dostęp: 6.04.2018].
3. Harirforoosh S, Asghar W, Jamali F. *Adverse Effects of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs: An Update of Gastrointestinal, Cardiovascular and Renal Complications*. J Pharm Pharm Sci. 2013; 16 (5): 821–847.
4. Kostowski W, Herman ZS. *Farmakologia – podstawy farmakoterapii*; Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2010; t. 1, 323–329.
5. Woroń J, Wordliczek J, Dobrogowski J. *Porównanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ)*. Medycyna po Dyplomie. 2011 (20); 6 (183): 55–63.
6. Domiati S, El-Mallah A, Ghoneim A, Bekhit A, El Razik HA.*Evaluation of Anti-inflammatory, Analgesic Activities, and Side Effects of Some Pyrazole Derivatives*. Inflammopharmacology. 2016; 24 (4): 163–172.
7. *A Case Report of Combined Treatment with Rituximab and Eltrombopag in Refractory Immune Thrombocytopenia*. Zhonghua Nei Ke Za Zhi. 2017; 56 (1): 81–85.
8. Kim i wsp. BMJ Open Diabetes Res Care. 2015; 3 (1).
9. Derry S, Loke YK. *Risk of Gastrointestinal Haemorrhage with Long Term Use*
10. *of Aspirin: Meta-Analysis*. British Medical Journal. 2000; 321: 1183–1187.
11. Goldstein JL. *Challenges in Managing NSAID-Associated Gastrointestinal Tract Injury.*Digestion. 2004; 69(suppl 1):25–33
12. Hochberg MC, Altman RD, April KT et al. *American College of Rheumatology 2012 recommendations for the use of nonpharmacologic and pharmacologic therapies in osteoarthritis of the hand, hip and knee*. Arthritis Care Res. 2012; 64 (4): 465–474.
13. Harirforoosh S, Asghar W, Jamali F. *Adverse Effects of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs: An Update of Gastrointestinal, Cardiovascular and Renal Complications*. J Pharm Pharm Sci. 2013; 16 (5): 821–847.
14. Sowers JR, White WB, Pitt B et al. *Celecoxib Rofecoxib Efficacy and Safety in Comorbidities Evaluation Trial (CRESCENT) Investigators*. Arch Intern Med. 2005; 165 (2): 161–168.
15. Whelton A, White WB, Bello AE et al. *SUCCESS-VII Investigators*. Am J Cardiol. 2002; 90 (9): 959–963.

16. Curfman G et al. *Expression of Concern.* N Engl J Med. 2005; 353: 2813–2814.
17. Palviainen MJ, Junnikkala S, Raekallio M et al. *Activation of Complement System in Kidney after Ketoprofen-induced Kidney Injury in Sheep.* Acta Vet Scand. 2015; 57: 15.
18. Schmeltzer PA, Kosinski AS, Kleiner DE et al. *Drug-Induced Liver Injury Network (DILIN).* Liver Int. 2016; 36 (4): 603–609.
19. Sakalar EG, Muluk NB, Kar M et al . *Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease and Current Treatment Modalities.* Eur Arch Otorhinolaryngol. 2017; 274 (3): 1291–1300.
20. Saff RR, Banerji A. *Management of Patients with Nonaspirin-Exacerbated Respiratory Disease Aspirin Hypersensitivity Reactions.* Allergy Asthma Proc. 2015; 36 (1): 34–39.
21. Mullol J, Picado C. *Rhinosinusitis and Nasal Polyps in Aspirin-Exacerbated Respiratory* . Immunol Allergy Clin North Am. 2013 May; 33 (2): 163–76.

Safety of taking non-steroidal anti-inflammatory drugs, part I

Abstract

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), despite numerous adverse effects, still remain the most commonly used group of medicines that can be obtained without a prescription. The mechanism of their action consists in inhibiting the activity of cyclooxygenases (COX 1; COX 2); these are enzymes that participate in one of the routes of transformation of arachidonic acid, whose end products are prostaglandins (PGE2 and PGI2-prostacyclins) and thromboxanes. Inhibition of cyclooxygenase (COX) activity inevitably leads to adverse reactions. The most common side effects associated with the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs include gastrointestinal symptoms. More rarely associated with the excessive use of NSAIDs are nephrotoxic, hepatotoxic, and negative effects on the respiratory system and the relatively recently confirmed cardiotoxicity. Therefore, all possible ways should be tried to reduce the availability of non-steroidal anti-inflammatory drugs and to monitor their use, mainly in people who are particularly exposed to side effects (the elderly, people with heart failure, hypertension, kidney and gastrointestinal diseases).

Key words: non-steroidal anti-inflammatory drugs, aspirin, cyclooxygenase

Państwo i Społeczeństwo

2018 (XVIII) nr 3

e-ISSN 2451-0858
ISSN 1643-8299

doi.org/10.31749/pismzp2018/20848

Małgorzata Kalemba-Drożdż

Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego,
Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu, Zakład Biochemii

WITAMINA C W LECZENIU NOWOTWORÓW I PROFILAKTYCE CHORÓB NIEZAKAŹNYCH

Autor korespondencyjny:
Małgorzata Kalemba-Drożdż, Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego,
Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu, Zakład Biochemii,
ul. G. Herlinga-Grudzińskiego 1, 30-705 Kraków
email: mkalemba-drozdz@afm.edu.pl

Streszczenie

Od ponad czterdziestu lat witamina C wzbudza nadzieję na skuteczną, tanią i bezpieczną terapię przeciwnowotworową. Wyniki badań *in vitro* i w modelach zwierzęcych z zastosowaniem bardzo wysokich dawek (tzw. mega-dawek) witaminy C w leczeniu nowotworów są obiecujące, jednak wnioski płynące z badań klinicznych pozostają niejednoznaczne. Nie udowodniono skuteczności bardzo wysokich dawek witaminy C podawanych dożylnie w leczeniu nowotworów, ale przypuszczalnie, jako uzupełnienie terapii konwencjonalnej, może ona poprawić jakość życia chorych, gdyż łagodzi niepożądane objawy uboczne, spowodowane np. chemioterapią. Występują jednak pewne przeciwwskazania w stosowaniu witaminy C, a ponadto istnieją typy nowotworów, w których nie należy jej podawać, ze względu na ryzyko pogorszenia stanu klinicznego chorego.

W niniejszej pracy omówiono także najnowsze opracowania kwestionujące zasadność stosowania witaminy C w prewencji chorób niezakaźnych takich jak schorzenia układu krążenia i choroby neurodegeneracyjne, jak również w przeziębieniach.

Słowa kluczowe: kwas askorbinowy, mega dawki witaminy C, nowotwory, choroby cywilizacyjne

Wprowadzenie
Witamina C – informacje ogólne

2,3-didehydro-L-treo-heksono-1,4-lakton, czyli kwas askorbowy (popularnie: kwas askorbinowy, $C_6H_8O_6$) to dobrze rozpuszczalny w wodzie organiczny związek chemiczny z grupy nienasyconych alkoholi polihydroksylowych o masie molowej 176,12 g/mol i temperaturze topnienia 190°C. Związek ten w organizmach żywych pełni funkcje antyoksydacyjne oraz służy jako kofaktor dla kilku enzymów [1].

Ze względu na strukturę cząsteczki, tj. w związku z występowaniem dwóch atomów węgla stanowiących centra chiralności, teoretycznie jest możliwe występowanie czterech izomerów kwasu askorbinowego: kwas L-askorbinowy, kwas D-askorbinowy, kwas L-izoaskorbinowy i kwas D-izoaskorbinowy, jednak tylko kwas L-askorbinowy pełni funkcje w organizmach żywych. Pod względem aktywności optycznej witamina C skręca płaszczyznę światła spolaryzowanego w prawo, czyli jest to kwas L(+)-askorbinowy.

Źródła i wchłanianie kwasu askorbinowego

Rośliny jako substratu do syntezy kwasu askorbinowego używają mannozy i galaktozy. Dla większości zwierząt kwas askrobinowy jest substancją endogenną, która syntetyzowana jest z glukozy. Szacowana produkcja witaminy C u kozy ważącej 60 kg wynosi ok. 13 g dziennie [54]. Natomiast u świnek morskich, kapibar, większości nietoperzy, szarańczy i ssaków naczelnych, w tym człowieka, występuje defekt genu kodującego oksydazę L-gulonolaktonu, ostatniego enzymu ze szlaku syntezy kwasu askorbinowego, który powoduje, że nie jesteśmy zdolni do syntezy tego związku. Stąd wynika konieczność dostarczania kwasu askorbinowego z pożywieniem. Głównym dietetycznym źródłem witaminy C są świeże warzywa i owoce [tabela 1], natomiast pokarmy pochodzenia zwierzęcego są w tę witaminę ubogie [41,42]. Kwas askorbinowy jest wrażliwy na światło, powietrze i wysoką temperaturę [46,53].

Zalecane dzienne spożycie witaminy C przez dorosłe osoby nie powinno być niższe niż 90 mg [43,46]. Zapotrzebowanie na tę witaminę rośnie podczas laktacji, u palaczy, przy ciężkim wysiłku fizycznym, u osób starszych oraz chorych na nadciśnienie i cukrzycę – w tych przypadkach zalecane dzienne spożycie powinno przekraczać 120 mg. Obecnie sugeruje się, że są to dawki wystarczające dla zapobiegania szkorbutowi, jednak daleko zaniżone w stosunku do optymalnego funkcjonowania organizmu. Jednakże spożycie ponad 3 g witaminy C dziennie uznawane jest za problematyczne ze względu na występowanie niepożądanych objawów ubocznych: nudności, dyskomfortu jelitowego, biegunek, bólów głowy, kłopotów ze snem, zaczerwienienia skóry, działania prooksydacyjnego [44]. Nadmiar witaminy C może spowodować nadmierne wchłanianie

Tabela 1. Średnia zawartość witaminy C w wybranych warzywach i owocach. Wartości mogą się różnić w zależności od odmiany rośliny, warunków klimatycznych, w których rosła, rodzaju gleby, stopnia dojrzałości owocu, warunków przechowywania oraz sposobu obróbki [41,42]

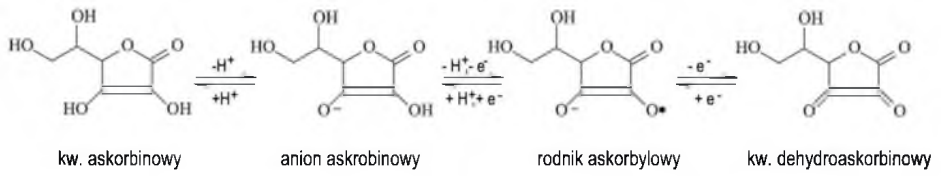
Produkt	Zawartość witaminy C [mg/100 g]
Acerola (Malpigia granatolistna)	160–02500
Owoce dzikiej róży surowe	1460–2500
Rokitnik	200–700
Dżem z dzikiej róży	300–450
Zielona papryka	260
Igły sosny	200
Owoce głogu	190
Czarna porzeczka	180
Tymianek	160
Kiwi	90–160
Czerwona papryka	140
Skórka z pomarańczy	136
Natka pietruszki	130
Jarmuż	120
Chrzan	114
Kalafior surowy	88
Koperek	85
Brukselka	85
Liczi	70
Rzeżucha	69
Truskawki	63
Pomelo	60
Papaja	60
Zielony groszek	60
Poziomki	60
Szczypiorek	60
Brokuły surowe	54
Szpinak	54
Cytryny	53
Pomarańcze bez skórki	53
Kiszona kapusta	12
Ziemniaki gotowane	7
Kiszone ogórki	4

żelaza, a także upośledzenie wchłaniania witaminy B12 oraz miedzi [53]. Dawkę śmiertelną LD50 dla witaminy C na podstawie badań na szczurach szacuje się na 11,9 g/kg masy ciała, co dla osoby o wadze 70 kg wynosi ponad 800 g, lecz nigdy nie stwierdzono przypadku zgonu po spożyciu witaminy C. Przy bezpośrednim kontakcie kwas askorbinowy może powodować swędzenie skóry, łzawienie oczu i podrażnienie układu oddechowego [1].

Witamina C jest absorbowana z pożywienia w jelitach w 70–95%, w zależności od dawki, przy czym wysokie stężenie cukrów zmniejsza jej wchłanianie [2], zaś wydalana jest wraz z moczem w formie utlenionej. Stężenie w osoczu ulega fluktuacjom pod wpływem różnych czynników i posiłków, osiągając poziom ok. 1,5 mg/dl. Wyższe wartości przekraczają próg nerkowy i witamina C jest wydalana do moczu. Kwas askorbinowy gromadzi się w limfocytach, mózgu, śledzionie, płucach, węzłach chłonnych, wątrobie, tarczycy, trzustce i innych narządach. Najwyższy stopień koncentracji, około stukrotnie przewyższający jego stężenie w osoczu, osiągany jest w nadnerczach, przysadce mózgowej, grasicy, ciałku żółtym i siatkówce. Witamina C dostarczana jest do komórek głównie na drodze transportu aktywnego poprzez kotransportery sodowo-askorbinowe (SVCTs – *Solute Carrier Family*), które przenoszą formę zredukowaną, oraz transportery glukozowe (GLUTs – *glucose transporters*), przenoszące formę utlenioną (kwas dehudroaskorbinowy), która wewnątrz komórek jest szybko konwertowana do formy zredukowanej, czyli kwasu askorbinowego [3].

Funkcje witaminy C

W organizmie witamina C pełni przede wszystkim rolę przeciwutleniacza i zmiatacza wolnych rodników. Po oddaniu dwóch elektronów kwas askorbinowy przechodzi w formę utlenioną: kwas dehydroaskorbinowy (rycina 1) ((5R)-5-[(1S)-1,2-dihydroksyetylo]furan-2,3,4(5H)-trion), natomiast po jednoelektrodowym utlenieniu witamina C ulega przekształceniu w formę rodnikową: kwas semihydroksyaskorbinowy, czyli rodnik askorbylowy.



Rycina 1. Reakcje witaminy C. Kwas askorbinowy (forma zredukowana witaminy C), forma jonowa, rodnik askorbylowy i kwas dehydroaskorbinowy (forma utleniona) [56]

Kwas dehydroaksorbinowy jest związkiem nietoksycznym, stosunkowo stabilnym, jednak może on reagować z wolnymi jonami metali (żelaza, miedzi, kobaltu, niklu, manganu, chromu), redukując je i zwiększając przez to ryzyko generowania wolnych rodników w wyniku reakcji Fentona (aby wyeliminować ryzyko tych reakcji, wszystkie jony metali w organizmie transportowane i magazynowane są w postaci związanej przez białka). Jednocześnie witamina C, poprzez redukcję jonów żelaza Fe3+ do Fe2+, ułatwia ich wchłanianie w układzie pokarmowym [46]. Kwas dehydroaskorbinowy może ulegać nieodwracalnej hydrolizie do kwasu 2,3-diokso-L-gulonowego, który może ulegać dalszemu utlenianiu do kwasu szczawiowego i L –treonowego [56].

Kwas askorbinowy jako reduktor dostarcza elektrony do reakcji zachodzących spontanicznie, jak i katalizowanych enzymatycznie. Tworzy układy oksydacyjno-redukcyjne z glutationem, witaminą E oraz flawonoidami. Forma utleniona witaminy C może zostać zredukowana przez glutation lub NADPH-zależne enzymy (np. tioredoksynę). Za charakter kwasowy cząsteczki odpowiadają grupy hydroksylowe w pozycji 2 oraz 3.

Witamina C jako koenzym odpowiada za utrzymanie aktywności katalitycznej enzymów poprzez redukcję jonów metali znajdujących się w centrach aktywnych tych enzymów. Witamina C uczestniczy w syntezie kolagenu jako kofaktor hydroksylazy prolinowej i hydroksylazy lizynowej, odpowiedzialnych pośrednio za tworzenie wiązań poprzecznych między włóknami tropokolagenu. Stąd niedobory witaminy C skutkują zaburzeniami syntezy kolagenu i objawiają się upośledzeniem czynności tkanki łącznej, w tym ścian naczyń krwionośnych, spontanicznymi krwawieniami i rozwojem szkorbutu, zaburzone są też funkcje nabłonków.

Kwas L-askorbinowy bierze udział w syntezie karnityny jako kofaktor hydroksylazy ε-N-trimetylo-L-lizyny i hydroksylazy betainy γ-masłowej, dlatego też niedobory dietetyczne mogą skutkować obniżeniem efektywności utlenienia kwasów tłuszczowych. Witamina C wpływa również na gospodarkę hormonalną. Służąc za kofaktor beta-hydroksylazy dopaminowej, bierze udział w syntezie adrenaliny. Ma także swój udział w metabolizmie tyrozyny, gdyż dostarcza elektrony niezbędne do działania dioksygenazy p-hydroksyfenylopirogronianiu, odpowiedzialnej za syntezę kwasu homogentyzynowego (alkaptonu). Kwas askorbinowy bierze udział w stabilizacji hormonów peptydowych jako kofaktor monooksygenazy alfa-amidującej peptydyloglyciny, która odpowiada za dekarboksylację C-terminalnej glicyny danego peptydu. Witamina C reguluje również działanie układu odpornościowego poprzez wpływ na aktywność fagocytów i limfocytów oraz na produkcję cytokin [4,46,53]. Witamina C wpływa na ekspresję licznych genów, gdyż degraduje czynnik aktywowany hipoksją (HIF-1, ang. *hypoxia inducible factor*), tj. czynnik transkrypcyjny wzbudzany przez hipoksję wewnątrzkomórkową; HIF-1 aktywuje ekspresję genów dostosowujących procesy metaboliczne komórki do zmniejszonego stężenia tlenu [63]. Wskazuje

się również, że kwas askorbinowy wpływa na procesy demetylacji DNA i histonów prawdopodobnie jako kofaktor enzymów uczestniczących w procesie TET (ang. *ten–eleven translocation*) poprzez redukcję jonów żelaza obecnych w ich centrach katalitycznych [63]. Tym samym uczestniczyłby w epigenetycznej regulacji ekspresji genomu.

Zastosowanie witaminy C

Wpływ świeżych owoców na zapobieganie szkorbutowi był już znany za czasów Vasco da Gamy podczas jego wyprawy w 1497 r. Historia badań nad witaminą C sięga połowy XVIII w., kiedy to w 1747 r. szkocki lekarz James Lind potwierdził w wyniku badań klinicznych, że sok z cytryny i limonki zapobiega występowaniu szkorbutu u marynarzy. Po wprowadzeniu nowych zaleceń dietetycznych dla Brytyjskiej Królewskiej Marynarki Wojennej, jej marynarzy pogardliwie przezywano *limeys* – „limeciarzami". Jednak dzięki tej dyrektywie marynarze Royal Navy nie byli nękani objawami szkorbutu: krwawieniem z dziąseł, wypadaniem zębów, bólami mięśniowymi i trudno gojącymi się ranami [5].

W 1907 r. dwaj norwescy lekarze, Axel Holst i Theodor Frølich, odkryli czynnik przeciwszkorbutowy podczas modelowych badań nad niedoborami dietetycznymi u świnek morskich, jednych z nielicznych zwierząt podatnych na szkorbut. Sugeruje się, że równolegle hipotezę czynnika przeciwszkorbutowego wysunął w 1912 r. Kazimierz Funk i nazwał go witaminą C. Węgier Albert Szent-Györgyi w 1932 r. wyizolował związek nazwany ówcześnie kwasem heksuronowym – najpierw z tkanek zwierzęcych, potem z papryki. Natomiast Walter Haworth, brytyjski chemik, opisał strukturę i izomerię optyczną tego związku, a w 1934 r. dokonał chemicznej syntezy kwasu askorbinowego [5].

Standardowo zalecana suplementacja witaminą C to dawka od 100 do 1000 mg/dzień w postaci tabletek powlekanych [6,49]. Przy zaawansowanych postaciach szkorbutu polecana jest forma liposomalna, charakteryzująca się zwiększoną wchłanialnością [48]. Przy stanach zapalnych pochwy zaleca się suplementację dopochwową w dawce 250 mg/dzień [49]. W terapii nowotworowej stosowane są wlewy dożylne od 10 g do 1,5 g/kg masy ciała [9] dziennie; w literaturze anglojęzycznej dawki powyżej 3 g dziennie określane są często jako mega-dawki.

Witamina C może wchodzić w interakcje z innymi środkami farmaceutycznymi. Między innymi inhibitory pompy protonowej, stosowane przy nadkwasocie żołądka, upośledzają jej wchłanianie, a aspiryna zwiększa wydalanie. Kwas askorbinowy przyspiesza eliminację trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych i przeciwpsychotycznych oraz zmniejsza działanie antybiotyków z grupy aminoglikozydów (streptomycyna, neomycyna, gentamycyna) [6]. Stwierdzono również występowanie dodatniej korelacji pomiędzy poziomem wi-

taminy C i żeńskich hormonów płciowych u kobiet w wieku rozrodczym [37,39]. Zaobserwowano także, iż kwas askorbinowy powoduje zwiększenie produkcji estradiolu *in vitro* [40] oraz wzrost stężenia estrogenów po doustnej suplementacji u kobiet stosujących hormonalną terapię zastępczą [38].

Wysokie dawki witaminy C w leczeniu nowotworów

Od lat 70. XX w. sugerowane jest lecznicze działanie witaminy C przeciwko chorobom nowotworowym [7,8], jednakże ówczesne prace obarczone były licznymi błędami, również na etapie samego projektu badania, a przez to ich wyniki są mało wiarygodne. Jednak zapoczątkowały one zainteresowanie wysokimi dawkami witaminy C i stanowiły punkt wyjścia do podjęcia szeregu prac badawczych i prób klinicznych. Praktyka dożylnych wlewów wysokich dawek witaminy C została podchwycona również przez zwolenników medycyny alternatywnej i głównie z nimi jest kojarzona [9].

Liczne badania *in vitro* wykazały, że farmakologiczne dawki kwasu askorbinowego (0,1–100 mM) zmniejszają proliferację komórek różnych linii nowotworowych. Między innymi podatne na działanie witaminy C okazały się komórki nowotworowe gruczołu krokowego, trzustki, wątroby, okrężnicy i neuroblastomy [10–13, 58–59].

Również wyniki eksperymentów na modelach zwierzęcych wzbudziły nadzieje dotyczące skuteczności witaminy C w leczeniu nowotworów, ponieważ po podaniu kwasu askorbinowego w licznych badaniach zaobserwowano zahamowanie wzrostu niektórych nowotworów [10, 14, 15, 64–68].

Chociaż nie ma wiarygodnych doniesień o zadowalającej skuteczności leczenia witaminą C nowotworów u ludzi, jednak wiele badań niektórych typów raka jajnika i trzustki potwierdziło poprawę efektów leczenia konwencjonalnego [16]. Stwierdzono także, po wlewach z witaminy C, poprawę jakości życia u chorych leczonych paliatywnie: polepszenie funkcji fizycznych, umysłowych i stanu emocjonalnego, zniesienie objawów zmęczenia, utraty apetytu, nudności, wymiotów, a nawet dolegliwości bólowych [17,18]. Niestety, do tej pory nie określono jednoznacznie zalecanego dawkowania witaminy C w takich przypadkach, a farmakokinetyka kwasu askorbinowego wskazuje, że po wlewie dożylnym większa jej część jest usuwana z organizmu w ciągu dwóch godzin [69]. W licznych badaniach wykazano, że witamina C nie wywiera negatywnego wpływu na efektywność działania standardowej terapii; badania takie dotyczyły raka trzustki, skóry, jajnika i nowotworów hematologicznych [20,67,70–71,73]. Jednakże wyniki niektórych innych badań klinicznych nie wykazały jakiegokolwiek efektu witaminy C na skuteczność leczenia [72,74,75]. Najnowsze analizy wskazują, że brak jest wystarczających dowodów potwierdzających skuteczność dożylnych wlewów wysokich dawek witaminy C w zwiększeniu działania przeciwnowotworowego chemioterapii i zmniejszeniu jej toksyczności [19].

Ponadto stwierdzono, że wlewów z witaminą C nie można stosować rutynowo w terapii nowotworów, ponieważ w niektórych przypadkach mogą przyspieszać rozwój choroby [52]. Po wlewach dożylnych mega-dawek witaminy C zaobserwowano pogorszenie stanu chorych z ostrą białaczką szpikową, rakiem jelita grubego i czerniakiem [20–22]. Być może przyczyną takiego stanu rzeczy jest odmienna rola reaktywnych form tlenu i przeciwutleniaczy na różnych stadiach rozwoju komórek nowotworowych. W stadium preinicjacyjnym reaktywne formy tlenu indukują uszkodzenia oksydacyjne DNA i zwiększają ryzyko mutacji w proto-onkogenach i genach supresorowych (np. *RAS, TP53*), jednak na etapie progresji komórki nowotworowe modulują swój metabolizm, intensywnie produkując reduktory, w związku z tym dostarczanie im dodatkowej porcji przeciwutleniaczy może ułatwiać ich rozwój [57].

Ustalono też wstępne przeciwwskazania do stosowania wlewów z witaminą C. Mianowicie u osób z niedoborem dehydrogenazy glukozo-6-fosforanu (G6PD) tego typu działanie może spowodować wystąpienie anemii hemolitycznej [23]. Przedawkowanie witaminy C może doprowadzić do hiperoksalurii, a także do rozwoju kamicy nerkowej [23]. W skrajnych przypadkach może dojść do wytrącania się kryształów szczawianów w tkankach obwodowych [55]. Wysokie dawki witaminy C są niewskazane również przy dysfunkcjach nerek [24]; a także mogą być niebezpieczne w przypadku hemochromatoz [23].

Witamina C w prewencji chorób niezakaźnych

Intensywnie prowadzone w ostatnich latach meta-analizy wskazują, że brak jest przekonujących dowodów, aby suplementacja witaminą C zmniejszała ryzyko występowania chorób układu krążenia takich jak zawał serca, choroba wieńcowa czy udar [25].

W przypadku chorób neurodegeneracyjnych stwierdzono, że suplementacja witaminą C nie przynosi żadnych rezultatów lub uzyskiwane wyniki są rozbieżne [26].

Jeżeli chodzi o najpopularniejsze zastosowanie witaminy C, tzn. jako środka zmniejszającego podatność na przeziębienia, jej rola wciąż nie została wyjaśniona. Nie potwierdzono jednoznacznie, aby suplementacja kwasem askorbinowym samodzielnie lub z dodatkiem rutyny wpływała na zmniejszenie zachorowalności na przeziębienie w badanych populacjach. Podawanie witaminy C nie skraca również znacząco czasu trwania przeziębienia u dorosłych – zaledwie o 8%, natomiast u dzieci o około 15% [27]. Wyjątkiem, potwierdzającym bezsprzecznie skuteczność suplementacji witaminą C, były wyniki uzyskane dla grupy żołnierzy poddanych ciężkiemu i długotrwałemu wysiłkowi fizycznemu na silnym mrozie. Podanie 2 g kwasu askorbinowego dziennie pomogło zredukować ryzyko przeziębienia o połowę. Zatem wnioskować można, iż podatność na przeziębienie związana z niewystarczającym poziomem witaminy C może się

ujawnić w bardzo określonych, raczej ekstremalnych warunkach [27]. Jednakże, uwzględniając niski koszt i nietoksyczność standardowych dawek witaminy C, warto utrzymać zalecenia jej podawania przy przeziębieniu, nawet jeżeli dla większości populacji zysk zdrowotny jest niewielki.

Dieta, nie tabletki

Niezależnie od rozterek, jakie towarzyszą suplementacji witaminami, nie ulega wątpliwości, że dieta bogata w warzywa i owoce wyraźnie zmniejsza ryzyko zachorowania na nowotwory [28,29,60–62]. Podobnie okazuje się, że pożywienie naturalnie bogate w witaminę C redukuje ryzyko chorób układu krążenia [30,51], a także innych chorób niezakaźnych, takich jak cukrzyca, osteoporoza, reumatoidalne zapalenie stawów, astma oskrzelowa [31,32]. Podobnie potwierdzono, że dieta oparta na warzywach i owocach, składnikach zasobnych między innymi w witaminę C, redukuje ryzyko Alzheimera i innych chorób neurodegeneracyjnych [33-36].

Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) wyznaczyła poziom minimalnego spożycia sumarycznego różnych warzyw i owoców na 400 g dziennie [28], co, analizując zawartość kwasu askorbinowego w tych produktach, powinno zapewnić przyjęcie dawki przynajmniej 200 mg witaminy C (tabela 1). Niestety, standardowa dieta w krajach rozwiniętych nie zawiera odpowiedniej ilości warzyw i owoców, co skutkuje niedoborami dietetycznymi, również witaminy C, a także zwiększonym ryzykiem chorób cywilizacyjnych [50,51]. Brak jednak medycznego uzasadnienia, by niedobory te niwelować przy pomocy suplementów, a nie poprzez zmianę sposobu odżywiania [45,52].

Podsumowanie

Witamina C nie wykazuje działania leczniczego w terapii nowotworów, lecz może działać wspomagająco przy zastosowaniu konwencjonalnego leczenia określonych typów nowotworów. Zarazem podanie witaminy C w niektórych rodzajach chorób nowotworowych może wywołać efekt odwrotny i przyspieszyć rozwój choroby. Konieczne jest także przeprowadzenie dokładnego wywiadu w celu określenia możliwych przeciwwskazań. Nie potwierdzono również prewencyjnego działania suplementów witaminy C w zapobieganiu innych chorób niezakaźnych. Natomiast dieta bogata w warzywa i owoce, jako źródła naturalnego kwasu askorbinowego i innych składników aktywnych jak: witaminy, mikroelementy, flawonoidy czy izoprenoidy ma udokumentowane działanie prewencyjne w chorobach niezakaźnych, łącznie z nowotworami. Warzywa i owoce, jako dietetyczne źródła witamin i związków aktywnych, mają przewagę nad suplementami, ponieważ są złożonymi i zrównoważonymi układami oksydacyj-

no-redukcyjnymi o szerokim spektrum działania. Liczne związki roślinne działają poprzez różnorodne mechanizmy i ze zróżnicowaną siłą na poszczególne tkanki i narządy, czym wykazują kompleksowy i synergistyczny efekt ochronny, którego nie zapewni żaden pojedynczy wyizolowany związek. Dlatego też kluczowym elementem profilaktyki chorób cywilizacyjnych powinna być edukacja żywieniowa społeczeństwa i podkreślanie znaczenia naturalnych źródeł składników odżywczych, a nie suplementów.

Bibliografia

1. *Ascorbic Acid* [headword]. PubChem. Open Chemistry Database; https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54670067 [dostęp 10.06.2017].
2. Wilson JX. *Regulation of Vitamin C Transport*. Annu. Rev. Nutr. 2005; 25: 105–25.
3. Corti A, Casini AF, Pompella A. *Cellular Pathways for Transport and Efflux of Ascorbate and Dehydroascorbate*. Arch Biochem Biophys. 2010; 500(2): 107–115.
4. Preedy VR, Watson RR, Sherma Z. *Dietary Components and Immune Function (Nutrition and Health)*. Totowa, NJ 2010: 36, 52.
5. Carpenter KJ. *History of Scurvy and Vitamin C*. Cambridge 1988.
6. Jarosz M. *Interakcje leków z żywnością i alkoholem*. Borgis 2004.
7. Cameron E, Campbell A. *The Orthomolecular Treatment of Cancer. II. Clinical Trial of High-Dose Ascorbic Acid Supplements in Advanced Human Cancer*. Chem Biol Interact. 1974; 9 (4): 285–315.
8. Cameron E, Pauling L. *Supplemental Ascorbate in the Supportive Treatment of Cancer: Prolongation of Survival Times in Terminal Human Cancer*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1976; 73 (10): 3685–3689.
9. Padayatty SJ, Sun AY, Chen Q et al. *Vitamin C: Intravenous Use by Complementary and Alternative Medicine Practitioners and Adverse Effects*. PLoS One. 2010; 5 (7): e11414.
10. Chen P, Stone J, Sullivan G et al. *Anti-Cancer Effect of Pharmacologic Ascorbate and Its Interaction with Supplementary Parenteral Glutathione in Preclinical Cancer Models*. Free Radic Biol Med. 2011; 51 (3): 681–687.
11. Chen P, Yu J, Chalmers B et al. *Pharmacological Ascorbate Induces Cytotoxicity in Prostate Cancer Cells Through ATP Depletion and Induction of Autophagy*. Anticancer Drugs. 2012; 23 (4): 437–444.
12. Espey MG, Chen P, Chalmers B et al. *Pharmacologic Ascorbate Synergizes with Gemcitabine in Preclinical Models of Pancreatic Cancer*. Free Radic Biol Med. 2011; 50 (11): 1610–1619.
13. Pathi SS, Lei P, Sreevalsan S et al. *Pharmacologic Doses of Ascorbic Acid Repress Specificity Protein (Sp) Transcription Factors and Sp-Regulated Genes in Colon Cancer Cells*. Nutr Cancer. 2011; 63 (7): 1133–1142.
14. Verrax J, Calderon PB. *Pharmacologic Concentrations of Ascorbate Are Achieved By Parenteral Administration and Exhibit Antitumoral Effects*. Free Radic Biol Med. 2009; 47 (1): 32–40.

15. Chen Q, Espey MG, Sun AY et al. *Pharmacologic Doses of Ascorbate Act As a Prooxidant and Decrease Growth of Aggressive Tumor Xenografts in Mice*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105 (32): 11105–11109.
16. Cieslak JA, Cullen JJ. *Treatment of Pancreatic Cancer with Pharmacological Ascorbate*. Curr Pharm Biotechnol. 2015; 16 (9): 759–770.
17. Vollbracht C, Schneider B, Leendert V et al. *Intravenous Vitamin C Administration Improves Quality of Life in Breast Cancer Patients During Chemo-/Radiotherapy and Aftercare: Results of a Retrospective, Multicentre, Epidemiological Cohort Study in Germany*. In Vivo. 2011; 25 (6): 983–990.
18. Yeom CH, Jung GC, Song KJ. *Changes of Terminal Cancer Patients' Health--Related Quality of Life after High Dose Vitamin C Administration*. J Korean Med Sci. 2007; 22 (1): 7–11.
19. Jacobs C, Hutton B, Ng T et al. *Is There a Role for Oral or Intravenous Ascorbate (Vitamin C) in Treating Patients with Aancer? A Systematic Review*. Oncologist. 2015; 20 (2): 210–223.
20. Welch JS, Klco JM, Gao F et al. *Combination Decitabine, Arsenic Trioxide, and Ascorbic Acid for the Treatment of Myelodysplastic Syndrome and Acute Myeloid Leukemia: A Phase I Study*. Am J Hematol. 2011; 86 (9): 796–800.
21. Subbarayan PR, Lima M, Ardalan B. *Arsenic Trioxide / Ascorbic Acid Therapy in Patients with Refractory Metastatic Colorectal Carcinoma: A Clinical Experience*. Acta Oncol. 2007; 46 (4): 557–561.
22. Bael TE, Peterson BL, Gollob JA. *Phase II Trial of Arsenic Trioxide and Ascorbic Acid with Temozolomide in Patients with Metastatic Melanoma with or without Central Nervous System Metastases*. Melanoma Res. 2008; 18 (2): 147–151.
23. Padayatty SJ, Sun H, Wang Y et al. *Vitamin C Pharmacokinetics: Implications for Oral and Intravenous Use*. Ann Intern Med. 2004; 140 (7): 533–537.
24. Hoffer LJ, Levine M, Assouline S et al. *Phase I Clinical Trial of I.V Ascorbic Acid in Advanced Malignancy*. Ann Oncol. 2008; 19 (11): 1969–1974.
25. Ye Y, Li J, Yuan Z. *Effect of Antioxidant Vitamin Supplementation on Cardiovascular Outcomes: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials*. PLoS ONE. 2013; 8 (2), https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0056803 [dostęp: 20.04.2018].
26. Harrison FE. *A Critical Review of Vitamin C for the Prevention of Age-Related Cognitive Decline and Alzheimer's Disease*. J. Alzheimers Dis. 2013; 29 (4): 711–726.
27. Hemilä H. *Vitamin C and Infections*. Nutrients. 2017; 9 (4): 339.
28. WHO. *Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation*. World Healthy Organisation Technical Report Series. 2004; 916.
29. Kapiszewska M. *A Vegetable to Meat Consumption Ratio as a Relevant Factor Determining Cancer Preventive Diet. The Mediterranean Versus Other European Countries*. Forum Nutr. 2006; 59: 130–153.
30. Chen GC, Lu DB, Pang Z et al. *Vitamin C Intake, Circulating Vitamin C and Risk of Stroke: A Meta-Analysis of Prospective Studies*. J Am Heart Assoc. 2013; 2 (6): 1–11.
31. Boeing H, Bechthold A, Bub A et al. *Critical Review: Vegetables and Fruit in the Prevention of Chronic Diseases*. Eur J Nutr. 2012; 51 (6): 637–663.

32. Vanamala J. *Food Systems Approach to Cancer Prevention*. Crit Rev Food Sci Nutr. 2017; 57 (12): 2573–2588
33. Crichton GE, Bryan J, Murphy KJ. *Dietary Antioxidants, Cognitive Function and Dementia. A Systematic Review*. Plant Foods Hum Nutr. 2013; 68 (3): 279–292.
34. Harrison FE. *Dietary Intakes of Vitamin E, Vitamin C, and β-carotene and Risk of Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis*. J. Alzheimers Dis. 2012; 31 (2): 253–258.
35. Morris MC, Tangney CC, Wang Y et al. *MIND diet associated with Reduced Incidence of Alzheimer's Disease*. Alzheimers Dement. 2015;11 (9): 1007–1014.
36. Lamport DJ, Saunders C, Butler LT et al. *Fruits, Vegetables, 100% Juices, and Cognitive Function*. Nutr Rev. 2014; 72 (12): 774–789.
37. Michos C, Kiortsis DN, Evangelou A et al. *Antioxidant Protection During the Menstrual Cycle: The Effects of Estradiol on Ascorbic-Dehydroascorbic Acid Plasma Levels and Total Antioxidant Plasma Status in Eumenorrhoic Women During the Menstrual Cycle*. Acta Obstet Gynecol Scand. 2006; 85 (8): 960–965.
38. Vihtamäki T, Parantainen J, Koivisto AM et al. *Oral Ascorbic Acid Increases Plasma Oestradiol During Postmenopausal Hormone Replacement Therapy*. Maturitas. 2002; 42 (2): 129–135.
39. Mumford SL, Browne RW, Schliep KC et al. *Serum Antioxidants Are Associated with Serum Reproductive Hormones and Ovulation among Healthy Women*. J Nutr. 2016; 146 (1): 98–106.
40. Wang Y, Tang C, Wu M et al. *Dehydroascorbic Acid Taken Up by Glucose Transporters Stimulates Estradiol Production Through Inhibition of JNK/c-Jun/AP1 Signaling in JAR Cells*. Mol Hum Reprod. 2014; 20 (8): 799–809.
41. United States Department of Agriculture Food Composition Databases [baza danych składników odżywczych Departamentu Rolnictwa Stanów Zjednoczonych]; https://ndb.nal.usda.gov/ndb [dostęp 10.04.2018].
42. Kunachowicz H, Nadolna I, Przygoda B et al. *Tabele składu i wartości odżywczej żywności. Food Composition Tables*. Warszawa 2017.
43. Jarosz M et. al. (red.). *Normy żywienia dla populacji polskiej – nowelizacja*. Instytut Żywności i Żywienia. Warszawa 2012: 106–107.
44. WHO. *Toxicological Evaluation of Some Food Additives Including Anticaking Agents, Antimicrobials, Antioxidants, Emulsifiers and Thickening Agents*. WHO Food Additives Series. 1974; 5 (257–353): 1–520.
45. Martínez ME, Jacobs ET, Baron JA et al. *Dietary Supplements and Cancer Prevention: Balancing Potential Benefits Against Proven Harms*. J Natl Cancer Inst. 2012; 104 (10): 732–739.
46. Gawędzki J, *Żywienie człowieka. Podstawy nauki o żywieniu*. Warszawa 2010: 271–276.
47. Chatterjee IB, Majumder AK, Nandi BK et al. *Synthesis and Some Major Functions of Vitamin C in Animals*. Annals of the New York Academy of Sciences, Second Conference on Vitamin C. 1975; 258: 24–47.
48. Davis JL, Paris HL, Beals JW et al. *Liposomal-Ancapsulated Ascorbic Acid: Influence on Vitamin C Bioavailability and Capacity to Protect Against Ischemia--Reperfusion Injury*. Nutr Metab Insights. 2016; 9: 25–30.
49. Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne. *Farmakopea Polska IX*. Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych. Warszawa 2011: 4574.

50. Hagel AF, Albrecht H, Hagel W et al. *Plasma Concentrations of Ascorbic Acid in a Cross Section of the German Population*. J Int Med Res. 2018; 46 (1): 168–174.
51. Miller V, Mente A, Dehghan M et al. *Fruit, Vegetable, and Legume Intake, and Cardiovascular Disease and Deaths in 18 Countries (PURE): A Prospective Cohort Study*. Lancet. 2017; 390 (10107): 2037–2049.
52. Bjelakovic G, Nikolova D, Simonetti RG et al. *Antioxidant Supplements for Preventing Gastrointestinal Cancers*. Cochrane Database Syst Rev. 2008; 2, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18677777 [dostęp 20.04.2018].
53. Moszczyński P, Pyć R. *Biochemia witamin. Witaminy lipofilne i kwas askorbinowy*. Cz. II. Warszawa 2001.
54. Stone I. *Homo Sapiens Ascorbicus, a Biochemically Corrected Robust Human Mutant*. Medical Hypotheses. 1979; 5 (6): 711–721.
55. Nankivell BJ, Murali KM. *Renal Failure from Vitamin C after Transplantation*. N Engl J Med 2008; 358: e4.
56. Janda K, Kasprzak M, Wolska J. *Witamina C – budowa, właściwości, funkcje i występowanie*. Pom J Life Sci 2015, 61 (4): 419–425
57. Assi M. *The Differential Role of Reactive Oxygen Species in Early and Late Stages of Cancer*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2017; 313 (6): 646–653.
58. Miller PG, Ebert BL. *Leukaemia: Vitamin C Regulates Stem Cells and Cancer*. Nature. 2017; 549 (7673): 462–464.
59. Agathocleous M, Meacham CE, Burgess RJ et al. *Ascorbate Regulates Haematopoietic Stem Cell Function and Leukaemogenesis*. Nature. 2017; 549 (7673): 476–481.
60. Lock K, Pomerleau J, Causer L et al. *The Global Burden of Disease Attributable to Low Consumption of Fruit and Vegetables: Implications for the Global Strategy on Diet*. Bull World Health Organ. 2005; 83(2): 100–108.
61. Riboli E, Norat T. *Epidemiologic Evidence of the Protective Effect of Fruit and Vegetables on Cancer Risk*. Am J Clin Nutr. 2003; 78 (3 Suppl.): 559s–569.
62. Liu J, Wang J, Leng Y et al. *Intake of Fruit and Vegetables and rRisk of Esophageal Squamous Cell Carcinoma: A Meta-Analysisof Observational Studies*. Int J Cancer. 2013; 133 (2): 473–485.
63. Guz J, Oliński R. *The Role of Vitamin C in Epigenetic Regulation*. Postepy Hig Med Dosw (Online). 2017; 71 (1): 747–760, [dostęp 20.04.2018].
64. Takemura Y, Satoh M, Satoh K et al. *High Dose of Ascorbic Acid Induces Cell Death in Mesothelioma Cells*. Biochem Biophys Res Commun. 2010; 394 (2): 249–253.
65. Du J, Martin SM, Levine M et al. *Mechanisms of Ascorbate-Induced Cytotoxicity in Pancreatic Cancer*. Clin Cancer Res. 2010; 16 (2): 509–520.
66. Pollard HB, Eidelman O, Pollard M et al. *Pharmacological Ascorbic Acid Suppresses Syngeneic Tumor Growth and Metastases in Hormone-Refractory Prostate Cancer*. In Vivo. 2010; 24 (3): 249–255.
67. Ma Y, Chapman J, Levine M et al. *High-Dose Parenteral Ascorbate Enhanced Chemosensitivity of Ovarian Cancer and Reduced Toxicity of Chemotherapy*. Sci Transl Med. 2014; 6 (222): 222ra18.
68. Gao P, Zhang H, Dinavahi R et al. *HIF-Dependent Antitumorigenic Effect of Antioxidants in Vivo*. Cancer Cell. 2007; 12 (3): 230–238.

69. Nielsen TK, Højgaard M, Andersen JT et al. *Elimination of Ascorbic Acid After High-Dose Infusion in Prostate Cancer Patients: A Pharmacokinetic Evaluation*. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2015; 116 (4): 343–348.
70. Abou-Jawde RM, Reed J, Kelly M et al. *Efficacy and Safety Results with the Combination Therapy of Arsenic Trioxide, Dexamethasone, and Ascorbic Acid in Multiple Myeloma Patients: A Phase 2 Trial*. Med Oncol. 2006; 23 (2): 263–272.
71. Berenson JR, Matous J, Swift RA et al. *A Phase I/II Study of Arsenic Trioxide / Bortezomib / Ascorbic Acid Combination Therapy for the Treatment of Relapsed or Refractory Multiple Myeloma*. Clin Cancer Res. 2007; 13 (6): 1762–1768.
72. Monti DA, Mitchell E, Bazzan AJ et al. *Phase I Evaluation of Intravenous Ascorbic Acid in Combination with Gemcitabine and Erlotinib in Patients with Metastatic Pancreatic Cancer*. PLoS One. 2012; 7 (1): e29794.
73. Qazilbash MH, Saliba RM, Nieto Y et al. *Arsenic Trioxide with Ascorbic Acid and High-Dose Melphalan: Results of a Phase II Randomized Trial*. Biol Blood Marrow Transplant. 2008; 14 (12): 1401–1407.
74. Welsh JL, Wagner BA, Van't Erve TJ et al. *Pharmacological Ascorbate with Gemcitabine for the Control of Metastatic and Node-Positive Pancreatic Cancer (PACMAN): Results from a Phase I Clinical Trial*. Cancer Chemother Pharmacol. 2013; 71 (3): 765–775.
75. Freitas Bde J, Lloret GR, Visacri MB et al. *High 15-F2t-Isoprostane Levels in Patients with a Previous History of Nonmelanoma Skin Cancer: The Effects of Supplementary Antioxidant Therapy*. Biomed Res Int. 2015; 2015: 963569.

Vitamin C for the treatment of cancer and the prevention of non-infectious diseases

Abstract

For more than 40 years, vitamin C has offered the hope of cancer treatment that is effective, cheap, and gentle for patients. In vitro studies and research using animal models of high doses of vitamin C for the treatment of cancer have promising results, but the conclusions of clinical trials are unclear.

Mega-doses of vitamin C administrated intravenously do not produce positive results in the treatment of cancers; however, in combination with conventional therapies they can improve the quality of patients' lives by reducing the undesirable side effects of chemotherapy.

Yet, there are some contraindications and types of cancer for which ascorbic acid should not be given due to the risk of clinical deterioration.

The article also discusses the latest findings that question the validity of vitamin C in the prevention of non-infectious diseases such as cardiovascular and neurodegenerative diseases and the common cold.

Key words: ascorbate, vitamin C mega-doses, cancer, civilization diseases

Państwo i Społeczeństwo

2018 (XVIII) nr 3

e-ISSN 2451-0858
ISSN 1643-8299

doi.org/10.31749/pismzp2018/20851

Janusz Ligęza

Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego w Krakowie,
Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu, Zakład Biochemii

W POSZUKIWANIU FONTANNY MŁODOŚCI – PODŁOŻE GENETYCZNE DŁUGOWIECZNOŚCI ORAZ PROCESÓW STARZENIA

Autor korespondencyjny:
Janusz Ligęza, Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego
ul. G. Herlinga Grudzińskiego 1, 30-705 Kraków
e-mail: jligeza@afm.edu.pl

Streszczenie

W ciągu ostatnich sześciu dekad poprawa warunków życia oraz rozwój medycyny wydłużyły przewidywany w dniu urodzenia czas życia ludzkiego o prawie 25 lat. Dłuższy czasu życia nie idzie jednak w parze z utrzymaniem dobrego stanu zdrowia w wieku podeszłym. Starzenie jest nieuniknionym procesem dotykającym każdego człowieka. Z medycznego punktu widzenia opóźnienie procesu starzenia może przynieść wymierne korzyści. Szczególnie istotne wydaje się utrzymanie dobrego stanu zdrowia w wieku podeszłym. Ze względu na ogrom opublikowanych ostatnio informacji dotyczących tematu pracy, skupiono się w niej na podłożu genetycznym opisywanych zjawisk – starzenia i jego opóźnionego przebiegu.

Zarówno badania nad długowiecznymi gatunkami zwierząt, jak i doświadczenia prowadzone w typowych modelach zwierzęcych wskazują, że istotną rolę w starzeniu i długowieczności odgrywają geny odpowiedzialne za naprawę DNA, stabilność genomu, odpowiedź organizmu na stres, a także kodujące białka uczestniczące w regulacji metabolizmu komórki. Obserwacje te znajdują częściowo potwierdzenie w analizie genomu ludzi żyjących 100 lat i dłużej, z drugiej zaś strony w badaniach zespołów przedwczesnego starzenia, czyli progerii.

Słowa kluczowe: starzenie, długowieczność, podłoże genetyczne

Wprowadzenie

Poprawa warunków życia oraz rozwój medycyny wydłużyły przewidywany czas życia ludzi z 46,8 lat w połowie XX w. do ponad 70 lat obecnie. Szacuje się, że liczba osób w wieku powyżej 60 lat wzrośnie na świecie z 901 milionów w roku 2015 do około 1,4 miliarda w 2030 roku i ponad 2 miliardów w roku 2050. W badaniach populacyjnych wiek jest najsilniejszym wskaźnikiem stanu zdrowia człowieka [1]. Uznawany jest również za główny czynnik ryzyka chorób przewlekłych, w tym układu sercowo-naczyniowego [2], chorób neurodegeneracyjnych [3,4] i nowotworów [5].

Postęp cywilizacyjny znacznie poprawił stan zdrowia ludzi, zwłaszcza w krajach rozwiniętych. Przyczyniła się do tego poprawa warunków życia, dostęp do czystej wody i pożywienia, profilaktyka chorób zakaźnych, a także postęp w ich leczeniu. Wzrost średniej długości życia wynika też ze znacznego zmniejszenia śmiertelności u noworodków i małych dzieci.

Postęp w poprawie stanu zdrowia osób w wieku podeszłym nie nadąża niestety za wzrostem długości życia człowieka, stąd znaczne zainteresowania procesami starzenia w ostatnich latach. Wciąż poszukuje się czynników odpowiedzialnych za długowieczność i za utrzymanie dobrego stanu zdrowia do późnej starości. Przekłada się to na bardzo liczne publikacje – z tego względu w niniejszym artykule ograniczono się tylko do wybranych aspektów procesu starzenia, koncentrując się na mechanizmach genetycznych.

Starzenie

Starzenia nie można rozpatrywać jako choroby. Jest to proces, w wyniku którego organizm traci integralność procesów fizjologicznych. Skutkiem starzenia jest upośledzenie podstawowych czynności organizmu, funkcji reproduktywnych (spadek płodności) oraz wzrost ryzyka chorób i śmierci. W roku 2013 Lopez-Otin i wsp. opublikowali pracę, w której podjęli się usystematyzowania wiedzy na temat procesu starzenia. Wyróżnili oni dziewięć zjawisk molekularnych/komórkowych charakteryzujących starzenie bądź stanowiących jego podłoże, są to: niestabilność genomowa, skracanie telomerów, zmiany epigenetyczne, zaburzenia struktury białek, zmiana w szlakach sygnalizacyjnych regulujących metabolizm, dysfunkcja mitochondriów, starzenie komórkowe, wyczerpanie puli komórek macierzystych oraz zaburzenia komunikacji międzykomórkowej [6].

Starzenie dotyczy wszystkich organizmów wielokomórkowych, choć zdarzają się pewne wyjątki. Badania Caleba Fincha nad karmazynami (rybami z rodziny *Sebastidae*) i żółwiami olbrzymimi pokazały, że starzenie może przebiegać u zwierząt z różną szybkością w zależności od gatunku [7]. Ponadto przyjmuje się, że w wyniku starzenia spada płodność, a rośnie śmiertelność, istnieją jednak intrygujące gatunki, u których trend zmian śmiertelności i płodności z wiekiem

wymyka się tej regule lub wręcz jej przeczy. I tak w przypadku żółwia pustynnego (*Gopherus agassizii*) śmiertelność spada wraz z wiekiem, płodność natomiast wykazuje trend wzrostowy [8]. Caleb Finch nazwał to zjawisko zaniedbywalnym starzeniem (ang. *negligible senescence*).

Rekordzistą w królestwie zwierząt pod względem długości życia jest słodkowodna stułbia. Według części badaczy, jeśli nie dopuścić do rozmnażania płciowego, jamochłon ten może żyć wiecznie [9]. Organizm stułbi ma bardzo prostą budowę. Właściwie można go rozpatrywać jako skupisko trzech typów komórek macierzystych wykazujących tylko częściowe zróżnicowanie [10]. Sugeruje się, że właśnie dzięki dużej zawartości komórek macierzystych, ciągłym podziałom komórkowym oraz wysoce sprawnym mechanizmom selekcji komórek uszkodzonych, stułbia może unikać procesu starzenia [11].

Zaniedbywalne starzenie, objawiające się spadkiem śmiertelności oraz wzrostem płodności, dość często obserwuje się w królestwie roślin, jednak wiadomości te wykraczają poza ramy tematyczne niniejszej pracy [8].

Zwierzęta długowieczne

Trudno przenieść obserwacje poczynione na jamochłonach, rybach czy gadach na organizm człowieka. Istnieją na nasze szczęście bliższe filogenetycznie nam organizmy, wykazujące wyjaśnione wyżej zjawisko zaniedbywalnego starzenia. Przykładem jest golec piaskowy (*Heterocephalus glaber*), gryzoń zbliżony wielkością do myszy, zamieszkujący tereny pustynne Etiopii, Kenii i Somalii. Golec piaskowy jest najdłużej żyjącym znanym człowiekowi gryzoniem. W niewoli dożywa około 30 lat, co przekracza ponad 5-krotnie maksymalny wiek przewidywany na podstawie rozmiarów ciała tego zwierzęcia. Ponadto golce utrzymują dobry stan zdrowia przez około 85% długości życia i nie wykazują wzrostu śmiertelności wraz z wiekiem.

Długowieczność golca może wynikać z przystosowania do trudnych warunków środowiskowych, zwierzę to wykazuje między innymi zdolność do hibernacji, z czasowym spowolnieniem tempa metabolizmu i obniżeniem temperatury ciała (do około 32 ^{o}C) [12].

Interesujący jest również fakt, że na ponad tysiąc udokumentowanych sekcji zwłok golców pustynnych tylko w dwóch przypadkach zaobserwowano zmiany nowotworowe [13]. Badania *in vitro* wykazały, że fibroblasty golców, mimo transdukcji wektorami retrowirusowymi, kodującymi antygen T wirusa SV40 i protoonkogen Ras, nie ulegały transformacji nowotworowej. Wszczepione myszom o upośledzonej odporności, nie formowały nowotworów, przeciwnie niż identycznie modyfikowane fibroblasty mysie [14].

Niezwykle niską zapadalność na nowotwory wśród tych zwierząt można przypisać między innymi mutacji w genie HAS2, którego produkt białkowy bierze udział w produkcji wielkocząsteczkowego kwasu hialuronowego (ang. High

Molecular Weight Hyaluronic Acid, HMW-HA) [15]. Zwiększona zawartość kwasu hialuronowego w tkankach chroni komórki przed działaniem wolnych rodników, a także moduluje sygnalizację komórkową. U golców zaobserwowano również wczesny mechanizm zahamowania kontaktowego (ang. *early contact inhibition*, ECI) zależny od białek supresorów cyklu (i onkogenezy), p53 i Rb. Wypada wspomnieć, że upośledzenie zahamowania kontaktowego promuje karcynogenezę. W odróżnieniu od innych ssaków, zahamowanie kontaktowe u golców opiera się na działaniu dwóch inhibitorów cyklu komórkowego $p27^{KIP1}$ i $p16^{INK4a}$ (zależnych odpowiednio od p53 i Rb), podczas gdy u większości gatunków działa tylko p27 [16]. Stanowi to rodzaj podwójnego zabezpieczenia przed niekontrolowaną proliferacją komórek. Ponadto, u golca piaskowego transkrypt locus genowego INK4a/b kodował białko p15/p16, znacznie silniej hamujące cykl komórkowy niż pojedynczo działające białka $p15^{INK4b}$ czy $p16^{INK4a}$ [17].

Jednym z molekularnych mechanizmów leżących u podstaw długowieczności golców może być również zwiększona w porównaniu do myszy aktywność czynnika transkrypcyjnego NRF2. Białko to inicjuje ekspresję setek genów zaangażowanych w mechanizmy antyoksydacyjne [18]. Zmiana ekspresji NRF2 może być wynikiem przystosowania do życia pod ziemią, w warunkach obniżonej prężności tlenu (10–15%). Jak wiadomo, hipoksja stymuluje produkcję wolnych rodników.

Charakterystyczną cechą starzenia na poziomie komórkowym jest akumulacja uszkodzonych i nieprawidłowo sfałdowanych białek. W przypadku golców piaskowych nie obserwuje się gromadzenia z wiekiem utlenionych ani uszkodzonych cząsteczek białka, jak ma to miejsce u większości zwierząt. Wykazano również wyższą w porównaniu do myszy aktywność proteasomu oraz intensywniej zachodzący proces autofagii, a zatem nieprawidłowe cząsteczki białek nie ulegają akumulacji [19]. Ponadto białka golca piaskowego wykazują większą stabilność, charakteryzują się większą opornością na denaturujące działanie mocznika i dłużej zachowują swoją funkcjonalność, niż ma to miejsce u myszy [20].

W prawidłowych warunkach każdy podział komórki powoduje skracanie telomerów. Gdy długość telomerów osiągnie krytyczny poziom, komórka wchodzi ulega starzeniu replikacyjnemu (ang. *replicative senescence*) i przestaje się dzielić lub ginie w mechanizmie apoptozy. Porównanie genomu golca z myszą i człowiekiem wykazało zwiększoną liczbę kopii genu CEBPG, kodującego białko regulujące naprawę DNA, oraz genu TINF2 chroniącego integralność telomerów [21]. Liang i wsp. sugerują również wyższą aktywność telomerazy u golca piaskowego, aczkolwiek jej działanie wydaje się podlegać silniejszej regulacji w porównaniu do innych ssaków [14].

Innym zasługującym na szczególną uwagę zwierzęciem jest mały nietoperz *Myotis* (polska nazwa rodzajowa – nocek). Jeśli weźmiemy pod uwagę masę ciała nocków (3–30 g), to czas życia tych nietoperzy jest wręcz rekordowy, dla nocka Brandta (*M. brandti)* wynosi 47 lat, dla nocka dużego (*M. myotis)* – 37 lat,

nocka myszouchego (*M. lucifugus*) – 34 lata, zaś dla nocka wschodniego (*M. blythii)* – 33 lata [22,23].

Badania molekularne wykazały u nocka myszouchego mniejszą produkcję wolnych rodników w przeliczeniu na ilość zużytego tlenu w porównaniu do innych małych ssaków [24]. Zaobserwowano również wyższą aktywność enzymów antyoksydacyjnych (katalazy, dysmutazy ponadtlenkowej oraz peroksydazy glutationowej) i enzymów zaangażowanych w naprawę DNA. Stwierdzono także niższy poziom niestabilności mikrosatelitarnej u długożyjącego gatunku nietoperza *Desmodus rotundus* w porównaniu z krótkożyjącym gatunkiem *Myotis velifer* [25]. Salmon i wsp. sugerują, że długowieczność niektórych gatunków nietoperzy może mieć podłoże w niezwykle efektywnych mechanizmach utrzymujących homeostazę białkową. Badacze wykazali wyższą stabilność frakcji białkowych izolowanych z dwóch gatunków nietoperzy *Tadarida brasiliensis* oraz *Myotis velifer* w porównaniu z białkami pochodzącymi od myszy. Białka nietoperzy, w porównaniu ze swymi mysimi odpowiednikami, były mniej wrażliwe na działanie mocznika; zaobserwowano również niższy poziom białek utlenionych oraz ubikwitynowanych [26].

Dotychczas dysponujemy ograniczoną ilością danych pochodzących z badań nad zwierzętami długowiecznymi. Obserwacje poczynione u długożyjących ssaków są jednak niezwykle ważne w badaniach nad procesami starzenia, ponieważ dotychczasowa wiedza w tym temacie opiera się wyłącznie na badaniach nad krótko żyjącymi zwierzętami laboratoryjnymi.

Zwierzęta laboratoryjne

Doświadczenia na organizmach modelowych: drożdżach, nicieniach, muszkach owocowych i myszach wykazały, że starzenie i długowieczność przynajmniej częściowo kontrolowane są przez mechanizmy genetyczne. Badania mutacji w genomie nicienia *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) pozwoliły zidentyfikować dwa geny daf-2 i age-1, których zmniejszona aktywność wydłuża czas życia tych zwierząt. Oba geny kodują białka zaangażowane w przekaz sygnału przez konserwatywną ewolucyjnie ścieżkę sygnalizacyjną insulina/insulinopodobny czynnik wzrostu [27–30]. Wyniki powyższych analiz znalazły potwierdzenie również u ssaków. W przypadku długożyjących karłowatych myszy Snell ($Pit1^{dw}/Pit1^{dw}$) i Ames ($Prop1^{df}/Prop1^{df}$), które charakteryzują się niskim poziomem hormonu wzrostu, wynikającym z mutacji genów Pit-1 i Prop-1, obserwuje się również niski poziom insulinopodobnego czynnika wzrostu I (ang. Insulin-like Growth Factor, IGF-I) oraz insuliny we krwi. Nie są to jedyne zmiany w układzie hormonalnym. U obu mysich mutantów wykazano również niedobór tyreotropiny oraz prolaktyny. Postuluje się jednak, że to właśnie niski poziom hormonu wzrostu oraz osłabienie sygnalizacji z udziałem szlaku insulina/insulinopodobny czynnik wzrostu odpowiedzialne są za wydłużenia czasu życia myszy Snell i Ames

w porównaniu do myszy typu dzikiego [31–33]. Długo żyjące myszy udało się również uzyskać w wyniku delecji genów wpływających na dostępność wolnego IGF-I [34] lub genów kodujących białka szlaków sygnałowych, aktywowanych poprzez receptory insuliny/insulinopodobnych czynników wzrostowych [35,36].

Wśród mechanizmów uczestniczących w procesie starzenia wymienia się akumulację uszkodzeń struktur komórkowych spowodowaną działaniem wolnych rodników. W przypadku myszy Ames wykazano obniżone stężenie reaktywnych form tlenu oraz podwyższoną aktywność enzymów antyoksydacyjnych (katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej) w nerkach, sercu i podwzgórzu [37–39]. Fibroblasty pobrane od myszy Ames oraz innych myszy z mutacjami osi somatotropowej wykazują *in vitro* wyższą oporność na czynniki cytotoksyczne, głodzenie i czynniki indukujące uszkodzenia oksydacyjne niż fibroblasty pobrane od myszy kontrolnych [40]. Rolę osi somatotropowej w odpowiedzi na stres komórkowy potwierdziło doświadczenie, w którym wykazano, że podawanie hormonu wzrostu przywraca wrażliwość fibroblastów myszy Ames na czynniki stresowe [41]. U myszy Ames i Snell zaobserwowano również wyższą aktywność transkrypcyjną genów regulowanych przez czynnik transkrypcyjny Nrf2 [42,43]. Zwiększona odporność na stres oksydacyjny przekłada się na niższy poziom uszkodzeń lipidów, białek i kwasów nukleinowych u myszy Ames [44], jak i prawdopodobnie na wolniejsze tempo akumulacji mutacji genetycznych [45]. Ponadto wykazano zmiany w ekspresji wielu typów mikroRNA oraz genów kodujących enzymy uczestniczące w metabolizmie puryn [46], a także białka szoku cieplnego (HSP) [47].

Ludzie

Naukowcy napotykają tu na wiele problemów i ograniczeń. Po pierwsze sama długość życia i stosunkowo późne osiąganie dojrzałości płciowej skutkuje małą ilością danych umożliwiających śledzenie zmian genetycznych w kolejnych pokoleniach i korelowanie ich z długością życia. Po drugie ze względów etycznych pewnych eksperymentów nie można wykonywać u ludzi.

Analiza rodzin osób dożywających sędziwego wieku przyniosła potwierdzenie wpływu podłoża genetycznego na długowieczność i utrzymanie dobrego stanu zdrowia w podeszłym wieku. Porównanie krzywych przeżycia osób z rodzin długowiecznych z krzywymi przeżycia dla pozostałych osobników zamieszkujących dany obszar wykazało wyraźną różnicę czasu życia rodzeństwa osób długowiecznych w porównaniu z ogółem populacji, na korzyść tych pierwszych [48,49]. Wykazano również, że rodzeństwo stulatków ma niższe ryzyko wystąpienia chorób związanych z wiekiem, takich jak choroby sercowo-naczyniowe, cukrzyca czy rak, w porównaniu z odpowiednią grupą kontrolną dobraną spośród badanej populacji [50]. Ponadto potomstwo osób długowiecznych jest zdrowsze od osób w tym samym wieku, pochodzących z tej samej populacji [51]. Wskazuje to także na związek między dobrym stanem zdrowia a długowiecznością.

Badania bliźniąt jednojajowych i dwujajowych wykazały, że 25% zmienności w długości życia człowieka może mieć podłoże genetyczne. Ponadto procent wyjaśnianej czynnikami genetycznymi zmienności może być wyższy u osób starszych i u mężczyzn [52–54]. Pozostała część zróżnicowania fenotypowego ma podłoże epigenetyczne i środowiskowe. Cechy ilościowe warunkowane są jednak wielogenowo, stąd duże trudności w identyfikacji wariantów genów, które w istotny sposób mogłyby wpływać na czas życia człowieka. Jednak przeprowadzone w ostatnich latach metaanalizy, uwzględniające kohorty pochodzące z różnych grup etnicznych, wskazały na dwa geny, których polimorfizmy, każdy samodzielnie, mogą wpływać na długowieczność. Pierwszy z polimorfizmów, rs429358, występuje w genie APOE kodującym apolipoproteinę E. Obecność allelu ε4 istotnie zmniejsza szansę dożycia wieku ponad 100 lat (OR = 0,43; 95% CI = 0,36–0,50) [55]. Drugi polimorfizm, rs1799752 (Ins/Del), dotyczy genu ACE, kodującego enzym konwertujący angiotensynę I. Wykazano, że delecja w obydwu allelach genu ACE pozytywnie wpływa na prawdopodobieństwo osiągnięcia sędziwego wieku (OR: 1,25; 95% CI: 1,02–1,54) [56].

Innym podejściem do identyfikacji genów odpowiedzialnych za starzenie jest analiza genomu osób chorych na progerie – zespoły przedwczesnego starzenia. Prawdopodobnie jednym z najlepszych przykładów jest zespół Wernera, ponieważ u osób dotkniętych tą chorobą obserwuje się wiele objawów przedwczesnego starzenia już w drugiej i trzeciej dekadzie życia. Typowe zmiany patologiczne to atrofia skóry z zanikiem podskórnej tkanki tłuszczowej, siwienie włosów i łysienie, obustronna zaćma, hipogonadyzm oraz wiele chorób związanych z wiekiem, m.in. cukrzyca typu drugiego, osteoporoza i miażdżyca [57]. Zespół Wernera jest rzadką autosomalną, recesywną chorobą wynikającą z mutacji w locus WRN, kodującym białko zaliczane do rodziny helikaz RecQ [58,59]. Podobne podłoże genetyczne, autosomalną, recesywną mutację w genie kodującym helikazę RECQL3 (BLM), ma zespół Blooma, a także zespół Rothmunda-Thompsona, w którym u ponad dwóch trzecich chorych obserwuje się mutację genu RECLQ4, również kodującym helikazę.

Kolejnym dobrze opisanym przykładem progerii jest syndrom Hutchinsona-Gilforda. Charakteryzuje się on wybitnie przyspieszonym starzeniem. Noworodki dotknięte chorobą nie wykazują widocznych zmian chorobowych. W ciągu kilku lat pojawiają się jednak typowe objawy: opóźnienie rozwoju, miażdżyca i zmiany twardzinowe skóry. Podłożem genetycznym jest mutacja w genie LMNA kodującym laminę A, jedno z białek otoczki jądrowej. W jej wyniku powstaje skrócone o około 50 aminokwasów białko określane jako progeryna [60]. Akumulacja zmutowanej odmiany białka prowadzi do zaburzenia struktury otoczki jądrowej oraz zaniku peryferyjnej heterochromatyny. Poza zmianami morfologicznymi jądra wykazano zaburzenia procesu naprawy DNA oraz kontroli cyklu komórkowego, skutkujące niestabilnością genomu. Ponadto wykazano, że lamina A u ssaków wiąże się z telomerami oraz odgrywa rolę w utrzymaniu ich

długości, struktury i funkcji [61]. Interesujący jest fakt, że progeryna gromadzi się również wraz z wiekiem u osób zdrowych – w fibroblastach i komórkach śródbłonka naczyń wieńcowych [62,63]. Chorzy cierpiący na syndrom Hutchinsona-Gilforda umierają najczęściej w wieku około 12 lat, a przyczyną zgonu jest zwykle zawał serca, udar mózgu lub zastoinowa niewydolność serca.

Istnieje wiele innych zespołów o podłożu genetycznym, które charakteryzują się przyspieszonym starzeniem, takich jak zespół MDPL (ang. *mandibular hypoplasia, deafness, progeroid features, lipodystrophy*), zespół Ruijs–Aalfs czy też Aicardi–Goutieres. U osób chorych na ataksję-telangiektazję, anemię Fanconiego czy zespół Cockayne'a również można zaobserwować pewne aspekty przyspieszonego starzenia. Jednak zespoły Hutchinsona-Gilforda oraz Wernera wydają się najlepszymi przykładami modelowymi progerii, ze względu na mnogość typowych cech charakteryzujących przyspieszone starzenie.

Podsumowując, analiza podłoża znanych zespołów przebiegających z przedwczesnym starzeniem wskazuje na bezpośredni udział uszkodzeń DNA. Stanowi również dowód na znaczenie akumulacji uszkodzeń materiału genetycznego i starzenia komórkowego w rozwoju fenotypu starczego i pojawieniu się szeregu chorób związanych z wiekiem.

Podsumowanie

Temat starzenia i długowieczności jest pasjonujący, ale niestety zbyt obszerny, aby dało się go szczegółowo omówić w zwięzłym opracowaniu poglądowym. Dlatego w niniejszej pracy skupiono się na czynnikach genetycznych, a dla uproszczenia pominięto praktycznie wpływ środowiska. Postuluje się, że czynniki genetyczne współdziałają z czynnikami środowiskowymi, jednak charakter i siła tych oddziaływań są jeszcze trudniejsze do określenia; sam wpływ środowiska na długowieczność jest tematem na odrębny artykuł. Spośród czynników genetycznych wpływających na starzenie najważniejszą rolę odgrywają mutację w genach odpowiedzialnych za reakcję organizmu na warunki stresowe (w tym reaktywne formy tlenu), naprawę DNA, stabilność genomu oraz geny zaangażowane w przekaz sygnału przez konserwatywne ewolucyjnie ścieżki sygnalizacyjne regulujące metabolizm, przy czym najprawdopodobniej intensywny (przyspieszony) metabolizm komórkowy jest skrajnie niekorzystny z punktu widzenia długowieczności.

Bibliografia

1. ONU. *World population ageing. 2015*, http://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/ageing/WPA2015_Report.pdf [dostęp: 24.03.2018].
2. Dhingra R, Vasan RS. *Age As a Cardiovascular Risk Factor*. Med. Clin. North Am. 2012; 96: 87–91.

3. Reeve A, Simcox E, Turnbull D. *Ageing and Parkinson's disease: Why is advancing age the biggest risk factor?*. Ageing Res. Rev. 2014; 14: 19–30.
4. Sosa-Ortiz AL, Acosta-Castillo I, Prince MJ. *Epidemiology of Dementias and Alzheimer's Disease*. Arch. Med. Res. 2012; 43: 600–608.
5. Smetana K, Lacina L, Szabo P, Dvořánková B, Brož P, Šedo A. *Ageing as an important risk factor for cancer*. Anticancer Res. 2016; 36: 5009–5017.
6. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. *The hallmarks of aging*. Cell. 2013; 153.
7. Finch CE. *Update on slow aging and negligible senescence. A mini-review*. Gerontology. 2009; 55: 307–313.
8. Jones OR, Scheuerlein A, Salguero-Gómez R, Camarda CG, Schaible R, Casper BB, Dahlgren JP, Ehrlén J, García MB, Menges ES, Quintana-Ascencio PF, Caswell H, Baudisch A, Vaupel JW. *Diversity of ageing across the tree of life*. Nature. 2014; 505: 169–73.
9. Martínez DE. *Mortality patterns suggest lack of senescence in hydra*. Exp. Gerontol. 1998; 33: 217–225.
10. Bosch TCG, Anton-Erxleben F, Hemmrich G, Khalturin K. *The hydra polyp: Nothing but an active stem cell community*. Dev. Growth Differ. 2010; 52: 15–25.
11. Dańko MJ, Kozłowski J, Schaible R. *Unraveling the non-senescence phenomenon in Hydra*. J. Theor. Biol. 2015; 382: 137–149.
12. Lagunas-Rangel FA, Chávez-Valencia V. *Learning of nature: The curious case of the naked mole rat*. Mech. Ageing Dev. 2017; 164: 76–81.
13. Delaney MA, Ward JM, Walsh TF, Chinnadurai SK, Kerns K, Kinsel MJ, Treuting PM. *Initial Case Reports of Cancer in Naked Mole-rats (Heterocephalus glaber)*. Vet. Pathol. 2016; 53: 691–696.
14. Liang S, Mele J, Wu Y, Buffenstein R, Hornsby PJ. *Resistance to experimental tumorigenesis in cells of a long-lived mammal, the naked mole-rat (Heterocephalus glaber)*. Aging Cell. 2010; 9: 626–635.
15. Tian X, Azpurua J, Hine C, Vaidya A, Myakishev-Rempel M, Ablaeva J, Mao Z, Nevo E, Gorbunova V, Seluanov A. *High-molecular-mass hyaluronan mediates the cancer resistance of the naked mole rat*. Nature. 2013; 499: 1–6.
16. Seluanov A, Hine C, Azpurua J, Feigenson M, Bozzella M, Mao Z, Catania KC, Gorbunova V. *Hypersensitivity to contact inhibition provides a clue to cancer resistance of naked mole-rat*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2009; 106: 19352–19357.
17. Tian X, Azpurua J, Ke Z, Augereau A, Zhang ZD, Vijg J, Gladyshev VN, Gorbunova V, Seluanov A. *INK4 locus of the tumor-resistant rodent, the naked mole rat, expresses a functional p15/p16 hybrid isoform*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2015; 112: 1053–1058.
18. Lewis KN, Wason E, Edrey YH, Kristan DM, Nevo E, Buffenstein R. *Regulation of Nrf2 signaling and longevity in naturally long-lived rodents*. Proc. Natl. Acad. Sci. 2015; 112: 3722–3727.
19. Zhao S, Lin L, Kan G, Xu C, Tang Q, Yu C, Sun W, Cai L, Xu C, Cui S. *High autophagy in the naked mole rat may play a significant role in maintaining good health*. Cell. Physiol. Biochem. 2014; 33: 321–332.
20. Perez VI, Buffenstein R, Masamsetti V, Leonard S, Salmon AB, Mele J, Andziak B, Yang T, Edrey Y, Friguet B, Ward W, Richardson A, Chaudhuri A. *Protein sta-*

bility and resistance to oxidative stress are determinants of longevity in the longest-living rodent, the naked mole-rat. Proc Natl Acad Sci U. S. A. 2009; 106: 3059–3064.

21. Macrae SL, Zhang Q, Lemetre C, Seim I, Calder RB, Hoeijmakers J, Suh Y, Gladyshev VN, Seluanov A, Gorbunova V, Vijg J, Zhang ZD. *Comparative analysis of genome maintenance genes in naked mole rat, mouse, and human*. Aging Cell. 2015; 14: 288–291.
22. Podlutsky AJ, Khritankov AM, Ovodov ND, Austad SN: *A new field record for bat longevity.* J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. 2005; 60: 1366–1368.
23. Tacutu R, Craig T, Budovsky A, Wuttke D, Lehmann G, Taranukha D, Costa J, Fraifeld VE, de Magalhães JP. *Human Ageing Genomic Resources: Integrated databases and tools for the biology and genetics of ageing*. Nucleic Acids Res. 2013; 41.
24. Brunet-Rossinni AK. *Reduced free-radical production and extreme longevity in the little brown bat (Myotis lucifugus) versus two non-flying mammals*. Mech. Ageing Dev. 2004; 125: 11–20.
25. Conde-Pérezprina JC, Luna-Lopez A, Gonzalez-Puertos VY, Zenteno-Savín T, León-Galván MA, Königsberg M. *DNA MMR systems, microsatellite instability and antioxidant activity variations in two species of wild bats: Myotis velifer and Desmodus rotundus, as possible factors associated with longevity*. Age (Omaha). 2012; 34: 1473–1492.
26. Salmon AB, Leonard S, Masamsetti V, Pierce A, Podlutsky AJ, Podlutskaya N, Richardson A, Austad SN, Chaudhuri AR. *The long lifespan of two bat species is correlated with resistance to protein oxidation and enhanced protein homeostasis*. FASEB J. 2009; 23: 2317–2326.
27. Johnson TE, Wood WB. *Genetic analysis of life-span in Caenorhabditis elegans*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1982; 79: 6603–6607.
28. Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y, Ruvkun G. *daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in Caenorhabditis elegans*. Science. 1997; 277: 942–946.
29. Larsen PL, Albert PS, Riddle DL. *Genes that regulate both development and longevity in Caenorhabditis elegans*. Genetics. 1995; 139: 1567–1583.
30. Morris JZ, Tissenbaum HA, Ruvkun G: *A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in Caenorhabditis elegans.* Nature. 1996; 382: 536–539.
31. Brown-Borg HM, Borg KE, Meliska CJ, Bartke A. *Dwarf mice and the ageing process.* Nature. 1996; 384: 33.
32. Sornson MW, Wu W, Dasen JS, Flynn SE, Norman DJ, O'Connell SM, Gukovsky I, Carrière C, Ryan AK, Miller AP, Zuo L, Gleiberman AS, Andersen B, Beamer WG, Rosenfeld MG. *Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism*. Nature. 1996; 384: 327–333.
33. Flurkey K, Papaconstantinou J, Harrison DE. *The Snell dwarf mutation Pit1dw can increase life span in mice*. Mechanisms of Ageing and Development. 2002; 123: 121–130.
34. Conover CA, Bale LK. *Loss of pregnancy-associated plasma protein A extends lifespan in mice*. Aging Cell. 2007; 6: 727–729.

35. Taguchi A, Wartschow LM, White MF. *Brain IRS2 signaling coordinates life span and nutrient homeostasis*. Science. 2007; 317: 369–372.
36. Selman C, Tullet JMA, Wieser D, Irvine E, Lingard SJ, Choudhury AI, Claret M, Al-Qassab H, Carmignac D, Ramadani F, Woods A, Robinson IC, Schuster E, Batterham RL, Kozma SC, Thomas G, Carling D, Okkenhaug K, Thornton JM, Partridge L, Gems D, Withers DJ. *Ribosomal Protein S6 Kinase 1 Signaling Regulates Mammalian Life Span*. Science. 2009; 326: 140–144.
37. Brown-Borg HM, Bode AM, Bartke A. *Antioxidative mechanisms and plasma growth hormone levels: potential relationship in the aging process*. Endocrine. 1999; 11: 41–48.
38. Brown-Borg HM, Rakoczy SG. *Catalase expression in delayed and premature aging mouse models*. Exp. Gerontol. 2000; 35: 199–212.
39. Brown-Borg HM, Rakoczy SG, Romanick M, Kennedy MA. *Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-1 on hepatocyte antioxidative enzymes*. Exp. Biol. Med. (Maywood). 2002; 227: 94–104.
40. Salmon AB, Murakami S, Bartke A, Kopchick J, Yasumura K, Miller RA. *Fibroblast cell lines from young adult mice of long-lived mutant strains are resistant to multiple forms of stress*. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2005; 289: E23–E29.
41. Panici JA, Wang F, Bonkowski MS, Spong A, Bartke A, Pawlikowska L, Kwok PY, Masternak MM. *Is altered expression of hepatic insulin-related genes in growth hormone receptor knockout mice due to GH resistance or a difference in biological life spans?*. Journals Gerontol. - Ser. A Biol. Sci. Med. Sci. 2009; 64: 1126–1133.
42. Leiser SF, Miller RA. *Nrf2 signaling, a mechanism for cellular stress resistance in long-lived mice*. Mol. Cell. Biol. 2010; 30: 871–884.
43. Sun LY, Bokov AF, Richardson A, Miller RA: *Hepatic response to oxidative injury in long-lived Ames dwarf mice*. FASEB J. 2011; 25: 398–408.
44. Brown-Borg H, Johnson WT, Rakoczy S, Romanick M: *Mitochondrial oxidant generation and oxidative damage in Ames dwarf and GH transgenic mice*. J. Am. Aging Assoc. 2001; 24: 85–96.
45. Garcia AM, Busuttil RA, Calder RB, Dollé ME, Diaz V, McMahan CA, Bartke A, Nelson J, Reddick R, Vijg J. *Effect of Ames dwarfism and caloric restriction on spontaneous DNA mutation frequency in different mouse tissues*. Mech. Ageing Dev. 2008; 129: 528–533.
46. Bates DJ, Li N, Liang R, Sarojini H, An J, Masternak MM, Bartke A, Wang E. *MicroRNA regulation in Ames dwarf mouse liver may contribute to delayed aging*. Aging Cell. 2010; 9: 1–18.
47. Banks WA, Morley JE, Farr SA, Price TO, Ercal N, Vidaurre I, Schally AV: *Effects of a growth hormone-releasing hormone antagonist on telomerase activity, oxidative stress, longevity, and aging in mice*. Proc. Natl. Acad. Sci. 2010; 107: 22272–22277.
48. Perls TT, Wilmoth J, Levenson R, Drinkwater M, Cohen M, Bogan H, Joyce E, Brewster S, Kunkel L, Puca A. *Life-long sustained mortality advantage of siblings of centenarians*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2002; 99: 8442–8447.
49. Schoenmaker M, de Craen AJM, de Meijer PH, Beekman M, Blauw GJ, Slagboom PE, Westendorp RG. *Evidence of genetic enrichment for exceptional survival*

using a family approach: the Leiden Longevity Study. Eur. J. Hum. Genet. 2006; 14: 79–84.

50. Terry DF, Wilcox M, McCormick MA, Lawler E, Perls TT. *Cardiovascular advantages among the offspring of centenarians*. J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. 2003; 58: M425–M431.
51. Bucci L, Ostan R, Cevenini E, Pini E, Scurti M, Vitale G, Mari D, Caruso C, Sansoni P, Fanelli F, Pasquali R, Gueresi P, Franceschi C, Monti D. *Centenarians' offspring as a model of healthy aging: a reappraisal of the data on Italian subjects and a comprehensive overview*. Aging (Albany, NY). 2016; 8: 1–11.
52. Hjelmborg JB, Iachine I, Skytthe A, Vaupel JW, McGue M, Koskenvuo M, Kaprio J, Pedersen NL, Christensen K. *Genetic influence on human lifespan and longevity*. Hum. Genet. 2006; 119: 312–321.
53. Skytthe A, Pedersen NL, Kaprio J, Stazi MA, Hjelmborg JV, Iachine I, Vaupel JW. Christensen K. *Longevity studies in GenomEUtwin*. Twin Res. 2003; 6: 448–454.
54. Herskind AM, McGue M, Holm NV, Sørensen TI, Harvald B, Vaupel JW. *The heritability of human longevity: A population-based study of 2872 Danish twin pairs born 1870–1900*. Hum. Genet. 1996; 97: 319–323.
55. Garatachea N, Marín PJ, Santos-Lozano A, Sanchis-Gomar F, Emanuele E, Lucia A. *The ApoE gene is related with exceptional longevity: a systematic review and meta-analysis*. Rejuvenation Res. 2015; 18: 3–13.
56. Garatachea N, Marín PJ, Lucia A. *The ACE DD genotype and D-allele are associated with exceptional longevity: A meta-analysis*. Ageing Res. Rev. 2013; 12: 1079–1087.
57. Oshima J, Hisama FM. *Search and insights into novel genetic alterations leading to classical and atypical Werner Syndrome*. Gerontology. 2014; 60: 239–246.
58. Gray MD, Shen JC, Kamath-Loeb AS, Blank A, Sopher BL, Martin GM, Oshima J, Loeb LA. *The Werner syndrome protein is a DNA helicase*. Nat. Genet. 1997; 17: 100–103.
59. Friedrich K, Lee L, Leistritz DF, Nürnberg G, Saha B, Hisama FM, Eyman DK, Lessel D, Nürnberg P, Li C, Garcia-F-Villalta MJ, Kets CM, Schmidtke J, Cruz VT, Van den Akker PC, Boak J, Peter D, Compoginis G, Cefle K, Ozturk S, López N, Wessel T, Poot M, Ippel PF, Groff-Kellermann B, Hoehn H, Martin GM, Kubisch C, Oshima J. *WRN mutations in Werner syndrome patients: Genomic rearrangements, unusual intronic mutations and ethnic-specific alterations*. Hum. Genet. 2010; 128: 103–111.
60. Eriksson M, Brown WT, Gordon LB, Glynn MW, Singer J, Scott L, Erdos MR, Robbins CM, Moses TY, Berglund P, Dutra A, Pak E, Durkin S, Csoka AB, Boehnke M, Glover TW, Collins FS. *Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome*. Nature. 2003; 423: 293–298.
61. Andrés V, González JM. *Role of A-type lamins in signaling, transcription, and chromatin organization*. J. Cell Biol. 2009; 187: 945–957.
62. McClintock D, Ratner D, Lokuge M, Owens DM, Gordon LB, Collins FS, Djabali K. *The mutant form of Lamin A that causes Hutchinson-Gilford progeria is a biomarker of cellular aging in human skin*. PLoS One. 2007; 2.
63. Olive M, Harten I, Mitchell R, Beers JK, Djabali K, Cao K, Erdos MR, Blair C, Funke B, Smoot L, Gerhard-Herman M, Machan JT, Kutys R, Virmani R, Collins

FS, Wight TN, Nabel EG, Gordon LB. *Cardiovascular pathology in Hutchinson--Gilford progeria: Correlation with the vascular pathology of aging*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2010; 30: 2301–2309.

In search of a fountain of youth – the genetic basis of longevity and aging processes

Abstract

Over the past six decades the development of medicine and improvements in living conditions have extended the life expectancy by almost 25 years; however, longer life does not go hand in hand with prolonged health span. Aging is an unavoidable process affecting everyone and from a medical point of view, delaying the aging process can bring noticeable benefits. It is especially important to maintain good health in the elderly. Due to the vast number of articles published on the topic, this publication focuses on the genetic background of aging and its delayed course.

Both studies on long-lived animal species and typical animal models have shown an important role of genes that code for proteins in response to stress, DNA repair, genomic stability, and nutrient-sensing signalling pathways in aging and longevity. These observations are partially confirmed by the genetic analysis of people living 100 years and more, as well as people suffering from human premature aging-like syndromes.

Key words: ageing, longevity, genetic background

Państwo i Społeczeństwo

2018 (XVIII) nr 3

e-ISSN 2451-0858
ISSN 1643-8299

doi.org/10.31749/pismzp2018/20850

Tomasz Gawlikowski[1], Anna Bilska-Kos[2], Leszek Satora[3]

1. Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego,
Katedra Endokrynologii i Chorób Wewnętrznych
2. Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Biochemii i Fizjologii Roślin,
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin
3. Uniwersytet Rzeszowski, Pozawydziałowy Instytut Biotechnologii,
Katedra Fizjologii i Rozrodu Zwierząt

ZATRUCIA GRZYBAMI JADALNYMI

Autor korespondencyjny:
Tomasz Gawlikowski, Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego,
Katedra Endokrynologii i Chorób Wewnętrznych,
ul. G. Herlinga-Grudzińskiego 1, 30-705 Kraków
e-mail: togawlik@gmail.com

Streszczenie

Od wieków zbieranie i spożywanie grzybów mieści się w tradycji kulinarnej krajów Europy, Azji i obu Ameryk. Dziko rosnące gatunki były i są chętnie zbierane i spożywane także w Polsce. W ostatnich latach porzucono pogląd, iż grzyby to bezwartościowy pokarm. Przybywa jednocześnie coraz więcej doniesień wskazujących na ich pozytywny wpływ na organizm człowieka. Jednak dane epidemiologiczne ostatnich lat pokazują, że grzyby jadalne są odpowiedzialne aż za 25–87% wszystkich zatruć grzybami. Biorąc to pod uwagę, należy zastanowić się, jak skutecznie zapobiegać tym zatruciom. W pracy przedstawiono czynniki, które usposabiają do zatruć gatunkami jadalnymi. Dodatkowo uwzględniono gatunki, które jedynie w pewnych sytuacjach (warunkowo) ujawniają swój szkodliwy wpływ na organizm konsumenta.

Słowa kluczowe: grzyby, zatrucie, grzyby trujące, zatrucia grzybami jadalnymi

Wprowadzenie

Grzyby od wieków stanowiły element diety człowieka. W obecnej dobie, pomimo dostępności grzybów hodowlanych, zamiłowanie do zbierania ich w lesie, samodzielnego przygotowywania i konserwowania, nie zmniejszyło się. Trudno także porównać bogactwo grzybów oferowane przez naturę do zaledwie kilku gatunków hodowlanych obecnych na półkach sklepowych.

Należy także podkreślić, że na przestrzeni ostatnich lat postrzeganie grzybów uległo zmianie. Z pokarmu uważanego za niebezpieczny i przeznaczony dla osób niezamożnych, grzyby zaczęły być doceniane z racji swoich walorów smakowych, odżywczych, a także zdrowotnych. Wartość odżywcza grzybów jadalnych związana jest z zawartym w nich białkiem, błonnikiem, witaminami (B1, B2, B12, C, D, E) i składnikami mineralnymi oraz wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi, które przyczyniają się do redukcji poziomu cholesterolu, a co za tym idzie – do prewencji schorzeń układu sercowo-naczyniowego [1,2]. Są pokarmem niskokalorycznym:1 kg suchej masy grzybów jadalnych zawiera przeciętnie 200–250 g białka [2]. Polisacharydy, spośród których β-glukany stanowią około połowy masy budulca ścian komórkowych grzybów, wykazują działanie immunomodulujące, przeciwnowotworowe, neuroprotekcyjne, hipolipemizujące i antyoksydacyjne. Ostatni z wymienionych efektów zależny jest również od związków fenolowych, które wykazują dodatkowo właściwości przeciwalergiczne, przeciwmiażdżycowe, przeciwzakrzepowe, przeciwzapalne, przeciwbakteryjne i naczyniorozszerzające [2]. Twardziak jadalny, *Lentinus edodes* (Berk.), wykazuje działanie przeciwbakteryjne [3]. Z innych korzystnych efektów warto choćby wspomnieć o działaniu hepatoprotekcyjnym grzybów, a także o ich dobroczynnym wpływie u chorych na cukrzycę [4,5]. Pomijając więc względy kulturowe i ekonomiczne (tzw. pokarm biedoty), spożywanie grzybów niesie ze sobą pozytywne skutki zdrowotne.

Wydaje się więc, że w najbliższych latach spożywanie grzybów będzie rekomendowane, stając się przy tym elementem prawidłowej i zdrowej diety. Niestety, w tym przypadku dużym problemem może okazać się kwestia bezpieczeństwa konsumentów [6].

Warto podkreślić, że w skali globalnej zatrucia grzybami stanowią 0,3% wszystkich zatruć [7].

Grzyby trujące

Powszechnie znanym jest fakt, iż spośród grzybów wielkoowocnikowych, w skali globalnej, ok.100 gatunków to grzyby trujące [8]. W przypadku niektórych zidentyfikowano swoiste dla nich toksyny, a także szczegółowo opisano kliniczny przebieg zatruć. Przykładami tego typu grzybów są następujące gatunki:

- Muchomor zielonawy, *Amanita phalloides* (Vaill. ex Fr.) Link 1833, popularnie zwany sromotnikowym. Zawiera on cyklopeptydy (amanityny i falloidyny), które warunkują przebieg zatrucia. Amanityna hamuje aktywność polimerazy RNA typu II, upośledzając wydatnie syntezę białka w hepatocytach. Piorunująca niewydolność wątroby skutkuje względnie dużą śmiertelnością. Należy nadmienić, iż *A. phalloides* i jemu pokrewne (*A. virosa* [Fr.] Bertill. 1866 – muchomor jadowity, *A. verna* [Bull.] Lam. 1783 – muchomor wiosenny) nie są jedynymi grzybami zawierającymi amanityny. Związki te spotyka się również w innych gatunkach, takich jak np. hełmówka rokietowa (*Galerina hypnorum* [Schrank] Kuhner 1935) czy czubajeczka brązowoczerwonawa (*Lepiota brunneoincarnata* Chodat & C. Martin 1889). Ten ostatni gatunek zawiera najwięcej amanityny w przeliczeniu na suchą masę grzyba.
- Piestrzenica kasztanowata (*Gyromitra esculenta* [Pers.] Fr. 1849). Grzyb jest odnajdywany wiosną i powszechnie mylony ze smardzem (*Morchella spp.*). Zawiera gyromitrynę, której składnikiem jest monometylhydrazyna (MMH). Związek ten jest odpowiedzialny za hamowanie pirydoksynozależnych szlaków w syntezie GABA i prowadzi do zaburzenia czynności ośrodkowego układu nerwowego. Ponadto w obrazie klinicznym zatrucia mieszczą się uszkodzenia wielonarządowe (w tym przewodu pokarmowego, wątroby i nerek).
- Zasłonak rudy (*Cortinarius orellanus* Fr. 1838), który zawiera orelaninę. Toksyna ta powoduje uszkodzenie nerek. Zatrucie po raz pierwszy opisał Stanisław Grzymała [9]. Nefrotoksycznym grzybem jest również, występujący w Ameryce Północnej, *Amanita smithiana* (Bas. 1969).
- Gatunki zawierające kwas ibotenowy i muscimol (*A. muscaria* [L.] Lam. 1783 – muchomor czerwony, *A. pantherina* [DC.] Krombh. 1846 – muchomor plamisty) lub psylocybinę (*Psilocybe semilanceata* [Fr.] P. Kumm. 1871 – łysiczka lancetowata, *Panaeolus sphinctrinus* [Fr.] Quel. 1872 – kołpaczek dzwonkowaty, *Stropharia aeruginosa* [Curtis] Quel. 1872 – pierścieniak grynszpanowy) są zazwyczaj spożywane w celach rekreacyjnych, by indukować ostrą psychozę (działanie psychotoniczne) bądź doznania związane ze zmienioną percepcją zmysłów (działanie psycholeptyczne – trzy ostatnie z wymienionych powyżej gatunków).
- Lejkówka odbielona (*Clitocybe dealbata* [Sowerby] Gillet 1874) jest przykładem gatunku odpowiedzialnego za nadmierną stymulację wegetatywnego układu nerwowego. Czynnikiem sprawczym jest muskaryna.

Wieruszka zatokowata (*Entoloma sinuatum* [Bull: Fr.] Kumm.), gąska tygrysowata (*Tricholoma pardalotum* Herink et Kotl), borowik szatański (*Boletus satanas* Lenz), maślanka wiązkowa (*Hypholoma fasciculare* [Huds. Fr.]) to przykłady grzybów wykazujących działanie drażniące na przewód pokarmowy.

Toksyny za to odpowiedzialne nie zostały zidentyfikowane. Wydaje się, że gatunki te mogą zawierać białka czy cukry, które nie są wchłaniane z przewodu pokarmowego, mogą za to być przyczyną reakcji alergicznych.

Grzyby jadalne

Obecnie na świecie istnieje około 25 gatunków grzybów uznanych za wartościowe do spożycia, z których jedynie kilka jest hodowanych – najczęściej jest to *Agaricus bisporus*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus spp.* (w tym spotykany i w naszych sklepach boczniak ostrygowaty) oraz *Flammulina velutipes*. Oczywiście gatunków jadalnych jest więcej, ale, póki co, nie znalazły jeszcze powszechnego uznania. Polscy autorzy wskazują, iż liczba jadalnych grzybów w naszym kraju przekracza 160 gatunków [10]. Polski ustawodawca dopuszcza do obrotu oraz produkcji przetworów grzybowych, środków spożywczych zawierających grzyby oraz uprawnień klasyfikatora grzybów i grzyboznawcy tylko 44 gatunki [11].

Badacze z Górnego Śląska przeprowadzili w latach 2003–2007 diagnostykę 349 przypadków zatruć grzybami. Najczęstszą przyczyną zatruć w analizowanym okresie okazały się gatunki jadalne. Pośród zidentyfikowanych gatunków dominowały grzyby z rodzaju borowikowatych (*Boletaceae spp.*): 172/349 oraz czubajka kania – *Macrolepiota procera* (Scop.), 64/349 [12].

Podobną analizę w latach 2002–2009 przeprowadzili badacze w regionie Małopolski, identyfikując gatunki grzybów, których spożycie było powodem 457 przypadków zatruć. Analiza sporologiczna materiału zebranego wśród osób zatrutych pozwoliła sformułować twierdzenie, że za dolegliwości, jakie występują po spożyciu grzybów, odpowiedzialne są częściej gatunki jadalne niż trujące – 400 przypadków powikłań po spożyciu grzybów jadalnych *versus* 57 przypadków zatruć grzybami trującymi [13]. Pośród grzybów jadalnych gatunkami będącymi najczęstszymi przyczynami zatruć były:

- opieńka miodowa – *Armillariella mellea* (Vahl.: Fr.) Kumm,
- czubajka kania – *M. procera* (Scop.),
- maślak żółty – *Suillus luteus* (L.) Gray 1821,
- pieprznik jadalny – *Cantharellus cibarius* (L.) Fr
- pieczarka polna – *Agaricus campestris* (L.: Fr).

Informacje na temat potencjalnej toksyczności gatunków jadalnych odnaleźć można również w doniesieniach z innych krajów europejskich: m.in. autorzy szwajcarscy, którzy analizowali 5683 przypadki ekspozycji na grzyby, stwierdzili, że objawy zatrucia mogą wystąpić nie tylko po spożyciu gatunków trujących, ale również jadalnych [14]. Także badacze włoscy, którzy analizowali przypadki zatruć grzybami odnotowane w północnych Włoszech na przestrzeni 21 lat, uznali gatunki jadalne za przyczynę dolegliwości u ¼ zatrutych. Borowik szlachetny, *Boletus edulis* (Bull. 1782), był najczęstszą przyczyną dolegliwości [15].

Dolegliwości, jakie wywoływały gatunki jadalne, z wyłączeniem sytuacji szczególnych, opisanych poniżej, sprowadzały się zazwyczaj do przypadłości żołądkowo-jelitowych, które ustępowały w przeciągu 1–2 dni [16, 17].

Nie oznaczało to oczywiście, że tego typu objawy kliniczne zawsze miały charakter łagodny. Istotnym było również, kogo zatrucie dotyczyło. Jednostki bardziej wrażliwe na odwodnienie (dzieci, osoby starsze) i zaburzenia jonowe związane z utratą bogato elektrolitowych płynów bądź cierpiące na dodatkowe schorzenia, odczuwały większy dyskomfort niż osoby młode, uprzednio zdrowe.

Dla lepszego zobrazowania przebiegu takich zatruć omówione zostaną dwa przykłady. Pierwszy z nich dotyczy małżeństwa, które spożyło potrawę grzybową przygotowaną z pieprznika jadalnego. Grzyby były zbierane w lesie, niedaleko miejsca zamieszkania poszkodowanych. Prawidłową identyfikację gatunku potwierdziło przeprowadzone później badanie mykologiczne zarodników pozyskanych z wymiocin. Grzyby nie były przygotowywane bezpośrednio po zbiorze, który odbył się w godzinach wczesnoporannych, ale wieczorem: zostały starannie umyte, doprawione i usmażone. Bezpośrednio po przygotowaniu potrawy oboje małżonkowie zjedli z chlebem po jednej porcji, która odpowiadała około 150g świeżych grzybów. Niespełna godzinę po spożyciu potrawy u kobiety wystąpiło pobolewanie brzucha i nudności. U męża podobne dolegliwości wystąpiły kwadrans później. Przed upływem 2 godzin od spożycia potrawy chora zwymiotowała, co przyniosło jej ulgę, ale nie ustąpienie dyskomfortu w obrębie jamy brzusznej. Mężczyzna nie wymiotował, a nudności i pobolewanie brzucha utrzymywały się. Złagodzenie dolegliwości pozwoliło małżonkom na przespanie nocy. Rano nie jedli śniadania, a jedynie wypili gorzką herbatę, gdyż w dalszym ciągu odczuwali niewielki dyskomfort, który sam ustąpił w godzinach wczesnopopołudniowych.

Nie zawsze przebieg tego rodzaju zatruć jest tak łagodny. Przykładem tego może być 72-letnia kobieta, u której po godzinie od spożycia potrawy przygotowanej z pieczarek wystąpił ból brzucha, uczucie przelewania, a następnie biegunka. Ponieważ dolegliwości nie ustępowały, chora, za namową córki, zgłosiła się do szpitala. Czas, jaki upłynął od spożycia potrawy do zgłoszenia się do szpitala, oszacowano na 7 godzin. Przeprowadzone badania laboratoryjne, w tym oznaczenie amanityny, nie wskazywały na spożycie grzybów trujących. Przeprowadzona analiza mykologiczna dostarczonych, a nie spożytych jeszcze owocników, pozwoliła na identyfikację gatunku, którym okazała się pieczarka polna. Po dożylnej suplementacji płynów chora poczuła się lepiej i opuściła szpital. Powróciła do niego w godzinach wczesnoporannych po nieprzespanej nocy, a to za przyczyną utrzymującej się biegunki i osłabienia. Z uwagi na cechy odwodnienia i tendencję do hipotensji chorą przyjęto do szpitala. Suplementacja płynów i elektrolitów była konieczna przez kolejną dobę. Dolegliwości stały się łagodniejsze i w trzeciej dobie ustąpiły. Przeprowadzona diagnostyka nie ujawniła innej przyczyny stwierdzanych dolegliwości.

Obraz kliniczny zatrucia grzybami jadalnymi u dzieci zasadniczo nie różni się od przebiegu tego rodzaju zatruć u dorosłych. Zachowana jest tendencja do samoograniczania się dolegliwości, aczkolwiek dziecko zatrute wymaga większej atencji ze strony leczących, ze względu na skłonność do odwodnienia i dyselektrolitemii. Warto przypomnieć, że grzyby nie są obligatoryjnym elementem diety dziecięcej. Mimo to co roku dochodzi w naszym kraju do zatruć grzybami jadalnymi w tej grupie wiekowej. Zazwyczaj nie są to zatrucia śmiertelne i poniekąd z tego powodu bywają bagatelizowane.

Pamiętać należy, że w zatruciach grzybami zawierającymi amanityny po okresie latencji, tzn. braku jakichkolwiek dolegliwości, pierwszymi objawami zatrucia są dolegliwości żołądkowo-jelitowe. Cechą kliniczną, która wstępnie pozwala na różnicowanie tych dwóch sytuacji, jest czas trwania okresu latencji. W wypadku spożycia grzybów jadalnych dolegliwości pojawiają się relatywnie szybko, nawet w pierwszej godzinie od spożycia posiłku – czas pojawienia się objawów klinicznych nie przekracza zazwyczaj czterech godzin. Dłuższe okresy latencji spotyka się w zatruciach grzybami trującymi z grupy *A. phalloides* czy *C. orellanus*. Poza określeniem cech morfologicznych danego gatunku (szczególnie rodzaju hymenoforu – gatunki zwierające amanityny mają hymenofor blaszkowy), określeniem czasu, jaki upłynął od spożycia grzyba do wystąpienia dolegliwości, w rozpoznaniu zatrucia grzybami pomocna jest również standardowo przeprowadzana w takich przypadkach diagnostyka laboratoryjna. Obejmuje ona ocenę zaburzeń wodno-elektrolitowych (poziomy potasu, sodu, magnezu i wapnia), morfologii krwi, uszkodzenia narządów miąższowych (wątroby i nerek) oraz mięśni, poziomu glikemii czy równowagi kwasowo-zasadowej. Burzliwe zaburzenia żołądkowo-jelitowe mogą wystąpić zarówno w zatruciach gatunkami jadalnymi, jak i trującymi. Sam fakt wystąpienia dolegliwości ze strony przewodu pokarmowego (nudności, wymiotów czy biegunki) jest istotną cechą kliniczną, która przemawia za zatruciem, ale nie pozwala na odróżnienie zatruć potencjalnie śmiertelnych od zatruć lekkich, w tym tych wywołanych przez gatunki jadalne. Diagnostyka laboratoryjna jest pomocna w rozpoznaniu, a także monitorowaniu postępu uszkodzeń narządowych w zatruciach grzybami. Charakterystyczny wzrost aktywności enzymów indykatorowych, transaminazy alaninowej (AlaT) i asparaginianowej (AspAT), odzwierciedla uszkodzenie wątroby wywołane przez gatunki zawierające amanityny, zaś wydłużenie czasu protrombinowego (czy też wzrost wartości INR) ma znaczenie rokownicze. Obecnie duże znaczenie przypisuje się oznaczeniu w moczu chorego amanityn. Ich obecność pozwala na pewne i względnie szybkie (oznaczone między 6 a 36 godziną od spożycia grzybów) potwierdzenie spożycia gatunku zawierającego cyklopeptydy i jest milowym krokiem w diagnostyce tych zagrażających życiu zatruć. Możliwość detekcji swoistej toksyny innych gatunków trujących nie weszło jeszcze do praktyki klinicznej. W wypadku ekspozycji na gatunki jadalne wyniki powyższych badań nie wykazują odchyleń od normy i to mimo stwierdzonych do-

legliwości żołądkowo-jelitowych (bóle brzucha, wymioty, biegunka). Ponieważ gatunki jadalne nie zwierają swoistych toksyn o określonym szkodliwym działaniu narządowym, standardowa diagnostyka pozwala na uchwycenie możliwych nieprawidłowości w poziomach elektrolitów, równowagi kwasowo-zasadowej i wzrostu hematokrytu (wtórnie do odwodnienia). Oznaczenie amanityn w tych przypadkach może mieć znaczenie diagnostyczne, gdyż pozwala na wykluczenie, na względnie wczesnym etapie, zatrucia grzybami z grupy *A. phalloides*.

Postępowanie terapeutyczne w zatruciach grzybami jadalnymi jest objawowe i polega na uzupełnianiu niedoborów wodno-elektrolitowych. Jeżeli nasilenie dolegliwości nie jest duże, płyny i elektrolity mogą być przyjmowane doustnie. Nie zaleca się stosowania środków zapierających i to nawet gdy biegunka jest uporczywa. Istotne są również zalecenia dietetyczne polegające na powstrzymaniu się od przyjmowania posiłków do czasu ustąpienia bądź złagodzenia dolegliwości, a następnie stosowania (przez 1–2 dni) diety lekkostrawnej.

Otwartym pozostaje pytanie o czynnik sprawczy tych zatruć. Odpowiedź nie jest prosta, zważywszy na względnie skromną liczbę doniesień dotyczących zatruć gatunkami jadalnymi. Prawdą jest, iż grzyby traktowane są jako pokarm ciężkostrawny, a tym samym nieprzeznaczony dla każdego. Może to wynikać z czynników zależnych od konsumenta, jak i związanych z samymi grzybami. Pierwszą sytuacją jest opisany już powyżej, brak tolerancji trehalozy [18]. Gatunek więc dla wielu jadalny i niepowodujący dolegliwości pozostaje nietolerowany przez osoby z brakiem lub niską aktywnością trehalazy, enzymu niezbędnego do trawienia tego dwucukru. Być może nietolerancja grzybów ma związek ze składnikami ścian komórkowych grzybów (np. chityną), które nie są trawione, bądź dużej ilości śluzu [16]. Zagadnienie wydaje się bardziej złożone, gdyż bywa, że osoby, które spożywają grzyby i dobrze je tolerują, niespodziewanie ulegają zatruciu. Mało tego, nawyków żywieniowych nie zmieniają, do spożywania grzybów powracają (mimo przebytego zatrucia) i ponownie dobrze je tolerują. W tych sytuacjach musi więc istnieć jakiś czynnik czy grupa czynników, które warunkują okresowo właściwości toksyczne gatunków jadalnych. Naszym zdaniem za część zatruć gatunkami jadalnymi odpowiedzialne są związki chemiczne, które powstają w owocnikach po zbiorze i, najogólniej ujmując, są wynikiem ich rozkładu. Stąd bardzo ważne jest odpowiednie przygotowanie i przechowywanie grzybów, jak również dbałość o warunki postępowania z nimi w trakcie zbioru.

Grzyby jadalne, ale nie zawsze („warunkowo jadalne")

Ten roboczy termin pozwoliliśmy sobie użyć w odniesieniu do gatunków grzybów, których spożycie nie zawsze prowadzi do intoksykacji. Mogą to być zatrucia warunkowane przez cechy osobnicze samego konsumenta, co np. dotyczy

osób, które nie tolerują trehalozy. Spożycie potrawy z grzybów przez te osoby wywołuje dolegliwości żołądkowo-jelitowe, analogiczne do tych występujących u osób z nietolerancją laktozy [18].

Innym przykładem może być zespół antabusowy, występujący u pacjentów, którzy łączą spożycie czernidłaka pospolitego (*Coprinus atramantarius* [Bull.] Fr. 1838) z etanolem. Zawarta w czernidłaku kopryna hamuje aktywność dehydrogenazy aldehydowej (AlDH), odpowiedzialnej za drugi etap oksydatywnej przemiany alkoholu etylowego, tj. utlenieniu jego metabolitu, aldehydu octowego, do kwasu octowego. Niewydolność tego układu u osoby, która spożyła etanol, prowadzi do wystąpienia zatrucia acetaldehydem. Efekty takie mogą wystąpić do 72 godzin po spożyciu czernidłaka.

Poza wymienionymi przykładami należy wspomnieć również o zatruciu wywoływanym przez krowiaka podwiniętego (*Paxillus involutus* [Batsch] Fr. 1838). Jest to gatunek spożywany bez konsekwencji, choć może być również przyczyną dolegliwości żołądkowo-jelitowych. Ciekawszym jednak wydaje się fakt, iż u niektórych konsumentów może on wywołać hemolizę – związaną z immunizacją, której efektem jest produkcja autoprzeciwciał, skierowanych przeciw antygenom krwinek czerwonych [19].

Pośród gatunków dziko rosnących, a powszechnie przez ludzi spożywanych, są grzyby, które mogą doprowadzić do uszkodzenia mięśni (rabdomiolizy). Potencjał miotoksyczny przypisuje się następującym gatunkom: *B. edulis* (Bull. 1782), *Cantharellus cibarius* (L., Fr.), *Leccinium versipelle* (Fr. & Hok, Snell 1944,) *Albatrellus ovinus* (Schaeff., Kotl. & Pouzar 1957) oraz gatunkom z rodzaju gołąbków (*Russula spp.*). W warunkach eksperymentalnych gatunki te powodowały uszkodzenia mięśni u myszy. Ilości grzybów, na które zwierzęta w tych badaniach eksponowano, były znaczne [20]. Odnosząc wielkość takiego – potencjalnie miotoksycznego – narażenia do ludzi, osoba zagrożona musiałaby spożywać 4 kg świeżego borowika szlachetnego (*B. edulis*) przez pięć kolejnych dni.

W kontekście miotoksycznego działania grzybów warta wspomnienia jest gąska zielonka – *Tricholoma equestre* (L., Fr., Kumm.), gdyż może być ona przyczyną rabdomiolizy. Należy podkreślić, że jest to gatunek powszechnie występujący w Europie i regularnie spożywany, w wielu krajach uznawany więc za jadalny. Do zatruć tym gatunkiem dochodzi sporadycznie, ale w doniesieniach dokumentujących miotoksyczne właściwości *T. equestre* wspomina się również o przypadkach śmiertelnych [21]. Wydaje się, że ryzyko rabdomiolizy wiąże się z regularnym, dzień po dniu, spożywaniem tego gatunku w znacznych ilościach: szacowana sumaryczna ilość gąski zielonki, która jest zdolna do uszkodzenia mięśni, odpowiada spożyciu około 1 kg, odnosząc to do masy świeżych grzybów. Do tej pory, poza czynnikami predysponującymi do rabdomiolizy, nie udało się zidentyfikować czynnika odpowiedzialnego za miotoksyczność *T. equestre*.

Najlepiej udokumentowane śmiertelne przypadki zatruć *T. equestre* przedstawił w 2001 roku Regis Bedry. W latach 1992–2000 w Bordeaux (Francja)

hospitalizowano 7 kobiet i 5 mężczyzn, identyfikując *T. equestre* jako przyczynę rabdomiolizy. Dolegliwości pojawiały się między pierwszym a trzecim dniem od spożycia ostatniego posiłku zawierającego *T. equestre*. Osłabieniu siły mięśniowej towarzyszyła tkliwość mięśni przy ich obmacywaniu, poty, nudności, rumień twarzy i ciemne zabarwienie moczu. Osłabienie narastało przez kolejne 3–4 dni, potem następowała stopniowa poprawa stanu somatycznego, ale u trojga z chorych rozwinęła się hypertermia (do 42°C) oraz cechy zapalenia mięśnia sercowego. Mimo intensywnego leczenia chorzy ci zmarli [21]. W Polsce do tej pory odnotowano jeden przypadek śmiertelny zatrucia *T. equestre* [22].

Ponieważ grzyby wymienione w tym rozdziale swą toksyczność ujawniają w określonych sytuacjach, uprawnionym wydaje się określenie ich mianem „grzybów warunkowo jadalnych".

Jak uniknąć zatrucia grzybami?

W przypadku grzybów trujących odpowiedź wydaje się jedna – nie spożywać tych gatunków. Choć odpowiedź wydaje się prosta, codzienność jest inna – ludzie spożywają grzyby trujące, gdyż nie potrafią ich prawidłowo zidentyfikować. Analizując dane kliniczne i mając wiedzę o spożytym gatunku, zidentyfikowanym na podstawie analizy sporologicznej, atlasów i cech morfologicznych, ustalaliśmy, że 2/3 zatrutych osób deklarowało spożycie innego gatunku niż ten, który został zidentyfikowany w toku procesu diagnostycznego. Wydaje się, że umiejętność prawidłowego oznaczenia gatunku grzyba, czyniona nierzadko w oparciu o wiedzę przekazywaną z pokolenia na pokolenie, jest daleko niewystarczająca. Dodać do tego należy również fakt, że niektórzy zbierają młode owocniki, z niewykształconymi w pełni cechami morfologicznymi, typowymi dla form dojrzałych. Dla miłośników grzybów dziko rosnących sam fakt niesięgania po grzyby z hymenoforem blaszkowym pozwala na uniknięcie wielu niezwykle groźnych zatruć. Alternatywą jest oczywiście spożywanie grzybów hodowlanych, ale liczba dostępnych gatunków, choć asortyment sukcesywnie rośnie, nie może konkurować z bogactwem, jakie oferuje las.

Z uwagi na fakt, iż spożycie gatunków jadalnych także może być przyczyną dolegliwości, najistotniejszą wydaje się edukacja. Miłośnicy grzybów dziko rosnących, poza umiejętnościami prawidłowego rozpoznawania gatunków, muszą mieć świadomość, iż grzyby jadalne mogą być także przyczyną zatruć.

Edukacja

Elementarna wiedza na temat gatunków grzybów i ich zbioru powinna być znana każdemu, a więc skierowana do wszystkich grup wiekowych. W sytuacji, gdy nie ma pewności co do gatunku, grzyb taki nie powinien być spożywany. Osoby,

które nie czują się zbyt pewnie w rozpoznawaniu gatunku grzybów na podstawie cech morfologicznych, celem prewencji zatruć potencjalnie śmiertelnych powinny odrzucać ze zbioru grzyby z hymenoforem blaszkowym.

W dalszym ciągu niektórzy miłośnicy grzybów przywiązują zbyt dużą wagę do smaku grzyba, utrzymując, że owocniki, które są piekące, należą do gatunków trujących. Nie można odróżnić gatunku jadalnego od trującego, kierując się jedynie smakiem grzybów. Liczba czterdziestu przypadków zatruć *A. phalloides* w naszym materiale dobitnie potwierdza tę tezę [13].

Nie należy również pokładać nadziei w różnych technikach czy sposobach przyrządzania potrawy grzybowej, które miałyby warunkować niszczenie toksyn. Wśród tych działań niektórzy konsumenci bronią takich procedur jak smażenie, długie duszenie czy gotowanie; niestety, nie jest to skuteczna droga eliminacji toksyn.

W przypadku spożywania grzybów jadalnych należy dodatkowo unikać:

- niewłaściwego postępowania przy zbiorze, które prowadzi do mechanicznego uszkodzenia owocników;zbierania grzybów do plastikowych toreb;przechowywania już zebranych grzybów w nieprzewiewnych torbach i naczyniach;zbierania starych i uszkodzonych owocników, w tym grzybów robaczywych;wielogodzinnego transportowania czy przechowywania grzybów przed właściwym przygotowaniem (suszeniem, marynowaniem, itp.);
- zbyt długiego (ponad dwie doby) przechowywania potraw przygotowanych z grzybów, których się nie zamraża;
- wielokrotnego odgrzewania przygotowanych już potraw grzybowych.

Stosowanie się do przedstawionych wskazówek minimalizuje ryzyko wystąpienia niekorzystnych zmian zachodzących w owocnikach grzybów po zbiorze, a przed ich przygotowaniem do spożycia czy przetworzenia.

Pamiętajmy:

- grzyby nie powinny stanowić głównego elementu spożywanego posiłku, a raczej dodatek i urozmaicenie diety;
- w kontekście miotoksycznego działania niektórych gatunków winno się unikać spożywania (zwłaszcza obfitych) posiłków grzybowych dzień po dniu;
- należy pamiętać o możliwości hamującego wpływu niektórych gatunków na utlenianie etanolu, a co za tym idzie – generowania reakcji disulfiramopodobnej; przy braku stosownej wiedzy lepiej więc nie łączyć spożywania grzybów z alkoholem.

Uwagi końcowe

Niepokój powinny zawsze budzić sytuacje, gdy dolegliwości po spożyciu grzybów czy potrawy grzybowej pojawiają się po kilku godzinach od czasu ich spożycia (> 4h). Również występowanie objawów zatrucia u wszystkich czy też większości spożywających daną potrawę winno zwrócić naszą uwagę na grzyby jako przyczynę dolegliwości. Nie należy bagatelizować biegunki, nudności czy wymiotów, zwłaszcza gdy stają się uporczywe i nie ustępują. Warto zachowywać niewykorzystane do przygotowania potrawy owocniki i resztki potrawy oraz zabezpieczyć próbkę wymiocin, gdyż może to ułatwić, w razie potrzeby, identyfikację spożytego gatunku. Informacje te wydają się oczywiste, ale praktyka lekarska pokazuje, że większość chorych w wypadku zatruć potencjalnie śmiertelnych (mowa tu głównie o zatruciach grzybami z grupy *A. phalloides*) jest przyjmowana do Ośrodków Ostrych Zatruć w drugiej dobie. Wśród osób przyjmowanych do szpitala były i takie, u których stwierdzono już cechy odwodnienia i hipotensję. W Polsce wszystkie Ośrodki Ostrych Zatruć służą całodobową telefoniczną informacją toksykologiczną. W Małopolsce pomoc w tym zakresie oferuje Oddział Toksykologii i Chorób Wewnętrznych Szpitala Specjalistycznego im. Ludwika Rydygiera w Krakowie – całodobowy numer telefoniczny informacji toksykologicznej to (12) 646 85 50. Podobne usługi świadczone są i w innych województwach, a aktualne numery telefonów dostępne są w Internecie.

Podsumowanie

Grzyby jadalne mogą być przyczyną zatruć. Dochodzi do nich głównie z powodu niewłaściwego przechowywania i/lub przygotowania grzybów. W obrazie zatrucia dominują dolegliwości żołądkowo-jelitowe, które ustępują w przeciągu 1–2 dni. Z uwagi, iż w zatruciach zagrażających życiu (wywołanych np. przez gatunki zawierające amanityny) początkowo w obrazie klinicznym dominują objawy żołądkowo-jelitowe, należy ze szczególną uwagą uściślić, jakie grzyby zostały spożyte (a przynajmniej ustalić rodzaj hymenoforu ich kapeluszy) i po jakim czasie od spożycia grzybów wystąpiły dolegliwości. W razie wątpliwości, poza standardową diagnostyką laboratoryjną, konieczne są dodatkowe badania specjalistyczne (analiza mykologiczna czy oznaczenie amanityn w moczu chorego).

Bibliografia

1. Guillamon E, Garcıa-Lafuente A, Lozano M et al. *Edible Mushrooms: Role in the Prevention of Cardiovascular Diseases.* Fitoterapia. 2010; 7: 715–723.
2. Valverde ME, Hernández-Pérez T, Paredes-López O. *Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life*. Int J Microbiol. 2015; 2015: 376387.

3. Alves M, Ferreira IFR, Dias J et al. *A Review on Antimicrobial Activity of Mushroom (Basidiomycetes) Extracts and Isolated Compounds*. Planta Medica. 2012; 16: 1707–1718.
4. Kim SE, Hwang BS, Song JG et al. *New Bioactive Compounds from Korean Native Mushrooms. Mycobiology*. 2013; 41: 171–176.
5. Soares AA, de Sá-Nakanishi AB, Bracht A et al. *Hepatoprotective Effects of Mushrooms*. Molecules. 2013; 18: 7609–7630.
6. Schmutz M, Carron PN, Yersin B et al. *Mushroom Poisoning: A Retrospective Study Concerning 11-Years of Admissions in a Swiss Emergency Department*. Intern Emerg Med. 2018; 13: 59–67.
7. Mowry JB, Spyker DA, Cantilena LR et al. *2012 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS): 30th Annual Report*. Clin Toxicol (Phila). 2013; 51: 949–1229.
8. Kintziger KW, Mulay P, Watkins S et al. *Wild Mushroom Exposures in Florida, 2003–2007*. Public Health Rep. 2011; 126: 844–852.
9. Grzymala S. *Clinical Picture of Poisoning with Cortinarius Orellanus*. Fr. Przegl Epidemiol. 1965; 19: 269–271.
10. Gumińska B, Wojewoda W. *Grzyby i ich oznaczanie*. Warszawa 1985.
11. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 17 maja 2011 r. w sprawie grzybów dopuszczonych do obrotu lub produkcji przetworów grzybowych, środków spożywczych zawierających grzyby oraz uprawnień klasyfikatora grzybów i grzyboznawcy (Dz. U. z 2011 r. Nr 115, poz. 672).
12. Kapala M, Nowacka A, Kicka M et al. *Mushroom (Fungı) Poisoning Investigated at the Regional Centre of Acute Poisoning, Institute of Occupational Medicine and Environmental Health, Sosnowiec, Poland*. Probl Forensic Sci. 2008; LXXV: 282–293.
13. Gawlikowski T, Romek M, Satora L. *Edible Mushroom-Related Poisoning: A Study on Circumstances of Mushroom Collection, Transport, and Storage*. Hum Exp Toxicol. 2015; 34: 718–724.
14. Schenk-Jaeger KM, Rauber-Lüthy C, Bodmer M et al. *Mushroom Poisoning: A Study on Circumstances of Exposure and Patterns of Toxicity*. Eur. J. Inter. Med. 2012; 23, 85–91.
15. Cervellin G, Comelli I, Rastelli G et al. *Epidemiology and Clinics of Mushroom Poisoning in Northern Italy: A 21-year Retrospective Analysis*. Hum Exp Toxicol. 2018; 37: 697–703.
16. Prager MH, Goos RD. *A Case of Mushroom Poisoning from Suillus Luteus*. Mycopathol. 1984; 3: 175–176.
17. Satora L. *Non-Specific Mushroom Poisoning*. Vet Hum Toxicol. 2004; 46: 224.
18. Arola H, Koivula T, Karvonen AL et al. *Low Trehalase Activity Is Associated with Abdominal Symptoms Caused by Edible Mushrooms*. Scand J Gastroenterol. 1999; 34: 898–903.
19. Winkelmann M, Stangel W, Schedel I et al. *Severe Hemolysis Caused by Antibodies Against the Mushroom Paxillus Involutus and Its Therapy by Plasma Exchange*. Klin Wochenschr. 1986; 64: 935–938.
20. Nieminen P, Mustonen AM, Kirsi M. *Increased Plasma Creatine Kinase Activities Triggered by Edible Wild Mushrooms*. Food Chem Toxicol. 2005; 43: 133–138.

21. Bedry R, Baudrimont I, Deffieux G et al. *Wild-Mushroom Intoxication as a Cause of Rhabdomyolysis*. N Engl J Med. 2001; 345: 798–802.
22. Anand JS, Chwaluk P, Sut M. *Acute Poisoning with Tricholoma Equestre*. Przegl. Lek. 2009; 66: 339–340.

Edible Mushroom Poisonings

Abstract
Collecting and consuming mushrooms has been a culinary tradition in Europe, Asia and both Americas for centuries. As such, wild mushrooms are eagerly collected and consumed in Poland. The idea that mushrooms are worthless food has been revised. Recently, there has been more discussion about their positive influence on humans. Recent epidemiological data indicate that probably edible species are responsible for 25–87% of mushroom poisonings. In view of these facts, we need to consider how to prevent these poisonings effectively. The paper presents the factors that contribute to poisoning by edible species. Moreover, species that only conditionally have a harmful effect on consumers are included.

Key words: mushrooms, poisoning, toxic mushrooms, edible mushroom poisonings

OPIS PRZYPADKU

Państwo i Społeczeństwo

2018 (XVIII) nr 3

e-ISSN 2451-0858
ISSN 1643-8299

doi.org/10.31749/pismzp2018/20852

Olga Milczarek[1], Stanisław Kwiatkowski[1], Marcin Majka[2], Patrycja Swadźba[3], Jakub Swadźba[4]

1. Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Klinika Neurochirurgii Dziecięcej, Instytut Pediatrii
2. Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Zakład Transplantologii
3. RegenMed Spółka z ograniczoną odpowiedzialnością Sp. k.
4. Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego, Katedra Medycyny Laboratoryjnej

ZASTOSOWANIE WIELOKROTNYCH PODAŃ MEZENCHYMALNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH POCHODZĄCYCH Z GALARETY WHARTONA W LECZENIU NIEPEŁNEGO USZKODZENIA RDZENIA KRĘGOWEGO – OPIS PRZYPADKU

Autor korespondencyjny:
Jakub Swadźba, Kraków, ul. Życzkowskiego 16
e-mail: swadzba@diag.pl

Streszczenie

Wprowadzenie: Przerwanie ciągłości rdzenia kręgowego pozostaje chorobą nieuleczalną, prowadzącą do utraty czynności neurologicznych i mechanicznych poniżej poziomu uszkodzenia. Wciąż brakuje skutecznego sposobu leczenia tego typu urazów. Terapie komórkowe są rozwijającym się intensywnie nowym sposobem leczenia, który może prowadzić do regeneracji uszkodzonego rdzenia kręgowego. Celem niniejszej pracy jest ocena bezpieczeństwa i potencjalnej skuteczności podania macierzystych komórek mezenchymalnych z galarety Whartona (*Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells* – WJMSC) u pacjenta z niekompletnym przerwaniem ciągłości rdzenia kręgowego.

Materiał i metody: Pacjent z niecałkowitym przerwaniem ciągłości rdzenia kręgowego na poziomie Th11–12, oceniony w skali ASIA (*American Spinal Injury Association Im-*

pairment Scale), został zakwalifikowany do eksperymentalnej terapii z wykorzystaniem komórek WJMSC. U pacjenta przeprowadzono terapię polegającą na pięciokrotnym podaniu komórek WJMSC, co trzy miesiące kolejna dawka.
Wyniki: W trakcie terapii nie odnotowano skutków ubocznych bezpośrednio związanych z leczeniem eksperymentalnym. Po każdym podaniu WJMSC zaobserwowano stałą poprawę neurologiczną, a co za tym idzie – poprawę jakości życia. Wynik skali ASIA pacjenta zmienił się z A/B na C/D. Poziom czucia obniżył się istotnie, z Th12 do L3–4. Pacjent odzyskał umiejętność poruszania nogami w podporze, wykorzystując czynną ruchomość mięśni czworogłowych obustronnie z przewagą kończyny dolnej lewej. EMG, ENG i SEP (*Somatosensory Evoked Potentials* – SEP) obiektywnie potwierdziły poprawę.
Wnioski: Wyniki leczenia WJMSC wskazują na obiektywną poprawę, uzyskaną u pacjenta z przewlekłym, niekompletnym uszkodzeniem rdzenia kręgowego.

Słowa kluczowe: mezenchymalne komórki macierzyste (MSC), galareta Whartona, niepełne uszkodzenie rdzenia kręgowego, medycyna regeneracyjna

Wprowadzenie

Pomimo postępu w dziedzinie leczenia urazów rdzenia kręgowego oraz wzrastającej znajomości mechanizmów biologicznych odpowiedzialnych za jego uszkodzenie i późniejszą regenerację [1], skuteczne leczenie tego typu uszkodzeń pozostaje nadal nierozwiązanym wyzwaniem nowoczesnej medycyny. Pacjenci po urazie kręgosłupa często stają się całkowicie niesamodzielni i zależni od osób trzecich. Zjawisko to generuje bardzo wysokie koszty ekonomiczne i społeczne.

Rozwój medycyny regeneracyjnej jest nadzieją dla chorych z uszkodzeniami rdzenia kręgowego. Jednym z rozwiązań terapeutycznych, proponowanych przez medycynę regeneracyjną, jest zastosowanie leczenia komórkami macierzystymi. Komórki te mają unikalne możliwości tworzenia złożonych tkanek i narządów oraz utrzymywania ich funkcji przez całe życie osobnicze [2]. Komórki macierzyste mogą być uzyskiwane z wielu źródeł, w tym z tkanek dojrzałych, płodowych i okołoporodowych [3]. W ostatnim czasie wiele badań klinicznych przeprowadza się z wykorzystaniem mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC) [4].

MSC zostały po raz pierwszy odkryte przez Alexandra Fridensteina jako komórki przylegające, przypominające fibroblasty [5]. Ich najważniejszymi właściwościami są: zdolność różnicowania się w odmienne komórki efektorowe, zdolność do immunomodulacji oraz do wydzielania czynników wzrostu i cytokin [6]. Co istotne, MSC wydzielają szereg cytokin i czynników wzrostu stymulujących procesy związane z neurogenezą [7].

Badania przeprowadzone na modelach zwierzęcych wykazały, że – dzięki oddziaływaniom plejotropowym z neuronami i komórkami immunologicznymi – MSC są w stanie wywołać regenerację uszkodzonej tkanki nerwowej [8]. Pilotażowe badania kliniczne z wykorzystaniem MSC wykazały również ich pozy-

tywny potencjał i bezpieczeństwo u pacjentów z zaburzeniami neurologicznymi [9,10] i innymi [11,12].

MSC uzyskiwane ze szpiku kostnego i tkanki tłuszczowej są stosowane w układach autologicznych i allogenicznych, natomiast MSC uzyskiwane z tkanek pochodzących z pępowiny są stosowane jako komórki allogeniczne. Podawanie tych komórek u osób niespokrewnionych wynika z faktu, że MSC nie są rozpoznawane przez układ odpornościowy i nie aktywują go [6,13].

Dotychczasowe badania wykazały, że komórki te mają potencjał immunomodulacyjny i wytwarzają wiele czynników, w tym stymulujących neurogenezę [14,15]. Badania nad wykorzystaniem tych komórek w modelach zwierzęcych, jak również w badaniach klinicznych, wykazały ich całkowite bezpieczeństwo i brak działań niepożądanych związanych z ich podawaniem [16]. Wykorzystanie tych komórek w leczeniu chorób układu krążenia miało natomiast pozytywny wpływ na stan kliniczny pacjentów w badaniach I i II fazy [17,18].

Opublikowane do tej pory badania z wykorzystaniem terapii komórkowych u chorych po urazie rdzenia kręgowego obejmują wykorzystanie komórek szpiku kostnego (*Bone Marrow* – BM), MSC, komórek śluzówki węchowej i komórek Schwanna [19–24]. Ocena bezpieczeństwa wykazała jedynie pojedyncze przypadki nieistotnych zdarzeń niepożądanych [21,25,26]. We wspomnianych badaniach odnotowano natomiast różny zakres poprawy neurologicznej. Bardziej znaczącą poprawę zaobserwowano zwykle u pacjentów cierpiących na ostre (od 1 do 6 miesięcy) uszkodzenie rdzenia kręgowego niż u pacjentów z urazem o charakterze przewlekłym (powyżej 6 miesięcy) [25,27].

W poniższej pracy przedstawiono przypadek pacjenta z niekompletnym uszkodzeniem rdzenia kręgowego, leczonego komórkami MSC, pozyskanymi z galarety Whartona.

Opis przypadku

27-letni mężczyzna z niecałkowitym przerwaniem ciągłości rdzenia kręgowego przeszedł eksperymentalną próbę leczenia komórkami macierzystymi galarety Whartona (WJMSC). Badanie zostało przeprowadzone w Szpitalu Jednego Dnia spółki Regenmed i uzyskało aprobatę Komisji Bioetycznej (zgoda wydana 3.07.2015 r.). Pacjent wyraził pisemną świadomą zgodę na przeprowadzone leczenie. Mężczyzna w czasie pracy uległ upadkowi z dachu, co spowodowało złamanie kręgosłupa na poziomie Th11–Th12. Standardowa jednoroczna terapia, obejmująca stabilizację zniszczonego poziomu rdzenia, leczenie przeciwzapalne i neurorehabilitacyjne, przyniosły tylko nieznaczną poprawę neurologiczną. Przed terapią eksperymentalną z wykorzystaniem komórek macierzystych, tj. 12 miesięcy po urazie rdzenia kręgowego (*Spinal Cord Injury* – SCI), mężczyzna prezentował głęboki niedowład (1 w skali Lovetta), z poziomem czucia na wysokości Th12. Pacjent w wyniku prowadzonej terapii usprawniającej uzyskał

zdolność kontrolowania tułowia. Jednym z głównych problemów zdrowotnych pozostawał wciąż brak zdolności do kontrolowania funkcji zwieraczy i utrata funkcji seksualnych.

W badaniu MRI (*Magnetic Resonance Imaging*), wykonanym przed leczeniem, uwidoczniono klinowate obniżenie wysokości trzonu Th12 do przodu i strony lewej oraz niewielkie obniżenie wysokości trzonu Th11 od strony prawej. Stan po laminektomii Th11-L1 i stabilizacji transpedikularnej Th10-L2, obniżenie wysokości krążków Th11–Th12. Na poziomie Th11–Th12 ognisko mielomalacji o wym. 17x24xAP8 mm. Do wysokości Th11 rdzeń kręgowy prawidłowy, poniżej wydaje się być ścieńczały (ryc. 1a).

Sznury pępowinowe, z których izoluje się komórki WJMSC, pozyskiwane są w trakcie porodu od niespokrewnionego dawcy po uzyskaniu zgody pacjentek, a następnie transportowane do laboratorium Polskiego Banku Komórek Macierzystych S.A. (PBKM), akredytowanego przez Ministerstwo Zdrowia oraz rekomendowanego przez Krajowe Centrum Bankowania Tkanek i Komórek (KCBTiK).

Komórki do aplikacji zostały przygotowane wg procedur zatwierdzonych przez Główny Inspektorat Farmaceutyczny (GIF). Hodowla, krioprezerwacja i przygotowanie mezenchymalnych komórek macierzystych do wykorzystania w RegenMed przeprowadzone było zgodnie z zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej (*Good Laboratory Practice* – GLP) oraz dobrej praktyki wytwarzania (*Good Manufacturing Practice* – GMP), w pomieszczeniach ze statusem klasy czystości mikrobiologicznej B, z wydzielonymi strefami o klasie czystości A. W ten sposób uzyskano produkt leczniczy terapii zaawansowanej wyjątków (wyłączeń) szpitalnych PLTZ (*Advanced Therapy Medical Product Hospital Exemption* – ATMP-HE).

WJMSC podawano dokanałowo do płynu mózgowo-rdzeniowego (PMR) drogą nakłucia lędźwiowego. Leczenie zaplanowano na pięć podań komórek WJMSC w ilości $3x10^7$, w odstępach 3-miesięcznych. Po każdym etapie leczenia WJMSC pacjent poddawany był intensywnej neurorehabilitacji.

Wstępną ocenę pacjenta i dalsze badania neurologiczne przeprowadzono w oparciu o skalę ASIA i system klasyfikacji Frankla. Za pomocą rozkładu dermatomów oceniono również niedobory w zakresie czucia powierzchniowego. Do oceny nasilenia spastyczności pourazowej wykorzystano wagę Ashwortha. Do oceny siły mięśni użyto skali Lovetta (0–5 punktów). Ocena funkcji zwieracza opierała się na deklaracji pacjenta. Po zakończeniu całego leczenia do oceny wykorzystano dodatkowe, obiektywne testy celowe. Elektromiografia (EMG) i elektroneurografia (ENG) zostały wykorzystane do badania przewodzenia w nerwach obwodowych. Do oceny przewodzenia rdzeniowego z kory motorycznej do mięśni efektorowych wykorzystano motoryczne potencjały wywołane (*Motor Evoked Potencials* – MEP). Do oceny zmian w obrazie rdzenia kręgowego wykorzystano metodę magnetycznego rezonansu jądrowego.

Rycina 1a. Ocena MRI struktury rdzenia kręgowego; obraz T1

Oceniono także bezpieczeństwo leczenia oraz zebrano informacje na temat ewentualnych powikłań i działań niepożądanych, które obejmowały: infekcję, gorączkę, bóle, bóle głowy, podwyższony poziom białka reaktywnego C, zwiększoną leukocytozę, reakcję alergiczną – wstrząs, powikłania okołooperacyjne, a także rozwój nowotworów, pogorszenie stanu neurologicznego, pojawienie się bólu neuropatycznego, wtórne zakażenia, infekcje dróg moczowych.

Mężczyzna otrzymał – zgodnie z protokołem – pięć podań WJMSC o łącznej ilości $15x10^7$. Co ok. trzy miesiące podawano $3x10^7$ komórek WJMSC do płynu mózgowo-rdzeniowego poprzez nakłucie lędźwiowe, które wykonywano w warunkach szpitalnych w znieczuleniu miejscowym. Każdorazowo zabieg związany był z jednodniową hospitalizacją.

Wyniki

W okresie 1,5 roku obserwacji nie wystąpiły żadne zdarzenia niepożądane związane z przeprowadzaną terapią eksperymentalną. Po każdej implantacji komórek WJMSC obserwowano jedynie niewielki wzrost podstawowej temperatury ciała, nie wyższy jednak niż 38°C, ale oprócz tego nie odnotowano klinicznie nawet epizodów bólu głowy. W ciągu 1,5 roku od zakończenia leczenia nie zaobserwowano również żadnych późnych powikłań.

W ciągu 2 lat obserwacji pacjent wykazywał stałą poprawą neurologiczną. Pierwsza poprawa nastąpiła po podaniu inicjalnej dawki preparatu WJMSC, a polegała na obniżeniu poziomu czucia z TH12 do poziomu L1 i przywróceniu funkcji motorycznych z poziomu Th12. Po obu stronach nieznacznie wzrosła siła mięśniowa w zakresie lewego uda (1 do 1+) oraz pojawiła się niewielka czynność w zakresie mięśni lewego podudzia. Mężczyzna zyskał możliwość poruszania kończynami dolnymi, zwłaszcza lewą – w pozycji siedzącej, pod kontrolą bioder. Pierwsza implantacja WJMSC zaowocowała również częściowym przywrócenia kontroli nad pęcherzem moczowym (tab. 1 i 2).

Dalsza poprawa, po drugim podaniu WJMSC, objęła obniżenie poziomu czucia do poziomu L2. Pacjent rozwinął umiejętność stania w pionizatorze i przy wysokim balkoniku. Dodatkowo zwiększyła się siła mięśniowa, zwłaszcza w zakresie obu ud i w mięśniu brzuchatym łydki po stronie lewej (1+ do 2). Pacjent zaczął przemieszczać się na krótkich dystansach, posługując się wysokimi ortezami i przy pełnym wsparciu drugiej osoby. Mężczyzna zaczął kontrolować funkcję zwieracza pęcherza moczowego i zaprzestał używania cewnika Foleya. W wyniku drugiej implantacji punktacja ASIA zmieniła się z A na B.

Trzecia implantacja WJMSC przyniosła dalszą poprawę stanu neurologicznego mężczyzny, szczególnie w sferze percepcji. Poziom czucia powierzchniowego obniżył się o kolejny segment do wysokości L1–L2. Czucie głębokie i czucie trzewne ulegało stopniowej poprawie. Odnotowano dalszy wzrost siły mięśni bioder i podudzi (siła wzrosła z 2 do 3), a mężczyzna zyskał umiejętność przemieszczania się w asekuracji osoby drugiej lub w ortezie biodrowej na krótkich dystansach. Głęboki niedowład zmienił się w niedowład kończyn dolnych: 2 stopnia w skali Lovetta w kończynie dolnej lewej i 1/2 stopnia w skali Lovetta w kończynie dolnej prawej. Wynik skali ASIA zmienił się na poziom C.

Czwarte podanie WJMSC przyniosło dalszą poprawę czucia powierzchniowego, które obniżyło się do poziomu L2/3. Całkowicie przywrócono kontrolę nad zwieraczem pęcherza moczowego, a także stwierdzono obecność czucia okolicy urogenitalnej i analnej. Dodatkowo zaobserwowano dalszą poprawę siły mięśniowej obu nóg, zwłaszcza w zakresie siły mięśni czworogłowych ud obustronnie (z 3 do 3+) oraz siły mięśni podudzi obustronnie, z przewagą strony lewej. Mężczyzna przemieszczał się samodzielnie na krótkich odległościach (3–4 m) w wysokich ortezach lub z wysokim balkonikiem.

Tabela 1. Zmiana ASIA, Frankel, poziomu czucia, poprawy funkcjonalności i przewodności po implantacji WJMSC. Ocenę wykonano trzy miesiące po każdej implantacji

OCENA	PRZED LECZENIEM	WJMSC I	WJMSC II	WJMSC III	WJMSC IV	WJMSC V
Skala ASIA	A	A/B	B	B	B/C	B/C
Skala Frankla	A	A	A/B	B	B	B
POZIOM CZUCIA	Th12	L1	L2	L2/L3	L3	L3/L4
CZUCIE POWIERZCHNIOWE	Brak czucia powierzchniowego od poziomu Th12	Czucie powierzchniowe z poziomu L1	Czucie głębokie, czucie trzewne, czucie od poziomu L2	Czucie głębokie, czucie trzewne, czucie od poziomu L2	Czucie powierzchniowo od poziomu L3	Czucie powierzchniowo od poziomu L3/L4
POPRAWA SPRAWNOŚCI	Głęboki obustronny niedowład – LKD – 1 wg Lovetta,	Powrót napięcia mięśni w zakresie uda i podudzia lewego – 1 wg Lovetta obustronnie	Zdolność pionizacji w pionizatorze, stały poziom niedowładu	Zmniejszenie niedowładu LKD 2 wg. Lovetta, w PKD – ½ wg Lovetta	Stały poziom niedowładu	Bez zmian
FUNKCJA ZWIERACZY	Całkowite porażenie	Czucie wypełniania pęcherza	Częściowa kontrola zwieracza, pacjent kontroluje oddawanie moczu bez cewnika Foleya	Częściowa kontrola funkcji zwieracza – oddawanie moczu „na żądanie”	Całkowita kontrola funkcji zwieracza, powrót czucia okolicy urogenitalnej	Całkowita kontrola oddawania moczu, objawy wegetatywne zwiastujące oddawanie stolca

Tabela 2. Zmiany siły mięśni po implantacji WJMSC. Ocenę przeprowadzono trzy miesiące po każdej implantacji

	PRZED LECZENIEM		WJMSC I		WJMSC II		WJMSC III		WJMSC IV		WJMSC V	
	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L
BIODRO												
Zginacze	0	1	0	1+	0	2	1	3	1	3	1	3
Prostowniki	0	0	0	1	0	1+	1	2	1	3	1	3
Przywodziciele	0	0	0	0	0	1	0	1+	1	2	1	2
KOLANO												
Zginacz	0	0	0	1+	0	2	0	3	1	3	1	3
Prostownik	0	0	0	1	0	1+	0	2	1	3	1	3

Piąta dawka komórek WJMSC pozwoliła zaobserwować dalszą poprawę stanu neurologicznego pod postacią obniżenia poziomu czucia do wysokości L3/4. Nie stwierdzono żadnych zmian w zakresie poprawy siły mięśni kończyn dolnych. Intensywna neurorehabilitacja, szczególnie pływanie i hydroterapia, wspomagały proces nauki chodzenia z wykorzystaniem ortez i wysokiego balkonika. Mężczyzna mógł przejść do 10 m wykorzystując ortezy kolanowe lub wysoki balkonik oraz 2 m samodzielnie. Pacjent odzyskał funkcję zwieraczy, mogąc po leczeniu w pełni kontrolować oddawanie moczu. Nie zaobserwowano zmian w zakresie napięcia mięśni w stosunku do czwartego podania preparatu WJMSC, które w skali Ashwortha oceniono na 1+.

Po 1,5-rocznej terapii MRI nie wykazywał istotnych zmian w zakresie sygnału (ryc. 1b). Badania elektrofizjologiczne, przeprowadzone po pięciu podaniach komórek WJMSC, wykazały nieznaczną poprawę neurofizjologiczną. Ocena SEP wykazała przywrócenie właściwego przewodzenia do poziomu L3. W ocenie wykazano obecność prawidłowego potencjału jednostek ruchowych w zakresie mięśnia brzuchatego łydki i piszczelowego przedniego po stronie lewej, prawidłową aktywność w zakresie mięśnia czworogłowego uda i przywodziciela obustronnie, prawidłową aktywność mięśnia prostego brzucha. W kończynach dolnych zaobserwowano również przywrócenie prawidłowego przewodzenia w zakresie nerwów obwodowych w obu kończynach dolnych.

Przewodzenie korowe do mięśni efektorowych w kończynach dolnych nie uległo zmianie i było prawidłowe.

Rycina 1b. Ocena MRI struktury rdzenia kręgowego; obraz T2

Wnioski

W ciągu ostatnich dwóch dekad powstało szereg doniesień o bezpieczeństwie i potencjalnej skuteczności terapii komórkowej z wykorzystaniem komórek pochodzących z różnych tkanek dorosłych pacjentów z SCI, w tym z komórek BM, MSC, komórek śluzówki węchowej i komórek Schwanna lub ich kombinacji [19–24]. Bardziej znaczącą poprawę zaobserwowano w przypadku pacjentów w fazie ostrej, u których wykonano podania wielokrotne lub zastosowano strategię łączenia różnych typów komórek [25,27].

Niniejsze badanie obejmowało pięć implantacji WJMSC. W ich efekcie uzyskano znaczną, ciągłą poprawę neurologiczną i jakości życia, potwierdzoną obiektywnymi ocenami MRI, SEP, MEP, EMG i ENG. Odzyskanie kontroli nad pęcherzem moczowym, a także czucia okolic analnych oraz ich kontrola wskazują na sekwencyjną regenerację przewodności orto- i antydromowej pęcherza moczowego. Najpierw obserwowano antydromową, a następnie, trzy miesiące później, regenerację ortodromową.

W literaturze znaczną poprawę (z ASIA A do D) wykazano, stosując kombinowane wielokrotne implantacje komórek CD34+ z krwi pępowinowej oraz komórek WJMSC [28]. Opisane w niniejszej pracy wyniki są zgodne z poprzednimi doniesieniami.

Co ciekawe, opublikowane doniesienia wykazały najlepsze postępy w leczeniu pacjentów z uszkodzeniem rdzenia kręgowego, u których wykonano intensywną rehabilitację/neurorehabilitację w połączeniu z terapią komórkową. Ponadto większość sprawozdań wykorzystuje strategię implantacji mnogiej [21,23,25,29,30,31]. Dostępne dane wydają się więc wskazywać na przydatność metody wielokrotnego wszczepiania WJMSC w połączeniu z intensywną rehabilitacją/neurorehabilitacją w celu maksymalizacji skuteczności terapii komórkowej u pacjentów z urazami rdzenia kręgowego.

Oprócz leczenia operacyjnego rehabilitacja ruchowa jest głównym sposobem terapii pacjentów po niepełnym uszkodzeniu rdzenia kręgowego [32]. Celem neurorehabilitacji jest przywrócenie utraconych w czasie urazu funkcji poniżej miejsca uszkodzenia. Zabiegi rehabilitacyjne powinny się rozpocząć jak najwcześniej, aby wykorzystać plastyczność centralnego układu nerwowego. Proces rehabilitacji jest jednak zwykle bardzo długi, trudny i nie zawsze przynosi oczekiwane wyniki. Dlatego zastosowanie komórek macierzystych, które mają za zadanie aktywację procesów neuroregeneracyjnych równolegle z neurorehabilitacją ruchową, okazuje się bardziej efektywne niż stosowanie samej rehabilitacji. Jednocześnie należy zaznaczyć, iż zastosowanie samej terapii komórkami macierzystymi, bez następującej po niej terapii usprawniającej, nie pozwoli uzyskać wymiernych efektów klinicznych terapii eksperymentalnej.

Zdajemy sobie sprawę, że to studium przypadku wymaga potwierdzenia na większej grupie pacjentów, ale uważamy, że warto je wziąć pod uwagę przy projektowaniu różnych protokołów leczenia terapią komórkową dla pacjentów z SCI. Przedstawiamy bezpieczeństwo i wykonalność wielu podań WJMSC u pacjenta z niekompletnym uszkodzeniem rdzenia kręgowego. Wyniki badań wskazują na możliwość uzyskania znacznej poprawy neurologicznej i jakości życia u tychże pacjentów.

Autorzy deklarują brak konfliktu interesów. Praca zrealizowana z funduszy własnych.

Bibliografia

1. Vismara I, Papa S, Rossi F et al. *Current Options for Cell Therapy in Spinal Cord Injury*. Trends Mol. Med. 2017; 23: 831–849.
2. Ferraro F, Celso C Lo, Scadden D. *Adult Stem Cels and Their Niches*. Adv Exp Med Biol. 2010; 695: 155–168.
3. Vats A, Tolley NS, Polak JM et al. *Stem Cells: Sources and Applications*. Clin Otolaryngol Allied Sci. 2002; 27 (4): 227–232.
4. Sherman LS, Shaker M, Mariotti V et al. *Mesenchymal Stromal/Stem Cells In Drug Therapy: New Perspective*. Cytotherapy. 2016; 19 (1): 19–27.
5. Friedenstein AJ, Chailkhjan RK, Lalykina KS. *The Development of Fibroblast Colonies in Monolayer Cultures of Guinea-Pig Bone Marrow and Spleen Cells*. Cell Tissue Kinet. 1970; 3 (4): 393–403.
6. Dominici M, Blanc K Le, Mueller I et al. *Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement*. Cytotherapy. 2006; 8 (4): 315–317.
7. Volkman R, Offen D. Concise Review: *Mesenchymal Stem Cells in Neurodegenerative Diseases*. Stem Cells. 2017; 35 (8): 1867–1880.
8. Watanabe S, Uchida K, Nakajima H et al. *Early Transplantation of Mesenchymal Stem Cells after Spinal Cord Injury Relieves Pain Hypersensitivity through Suppression of Pain-Related Signaling Cascades and Reduced Inflammatory Cell Recruitment*. Stem Cells. 2015; 33 (6): 1902–1914.
9. Connick P, Kolappan M, Crawley C et al. *Autologous Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Secondary Progressive Multiple Sclerosis : An Open-Label Phase 2a Proof-of-Concept Study*. Lancet Neurol. 2012; 11 (2): 150–156.
10. Oh K-W, Moon C, Kim HY et al. *Phase I Trial of Repeated Intrathecal Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells in Amyotrophic Lateral Sclerosis*. Stem Cells Transl Med. 2015; 4 (6): 590–597.
11. Ringdén O, Uzunel M, Rasmusson I et al. *Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Therapy-Resistant Graft-Versus-Host Disease*. Transplantation. 2006; 81 (10): 1390–1397.
12. Liang J, Zhang H, Hua B et al. *Allogenic Mesenchymal Stem Cells Transplantation in Refractory Systemic Lupus Erythematosus: A Pilot Clinical Study*. Ann Rheum Dis. 2010; 69 (8): 1423–1429.
13. Donega V, Nijboer CH, Tilborg G van et al. *Intranasally Administered Mesenchymal Stem Cells Promote a Regenerative Niche for Repair of Neonatal Ischemic Brain Injury*. Exp Neurol. 2014; 261: 53–64.
14. Kim D-W, Staples M, Shinozuka K et al. *Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells: Phenotypic Characterization and Optimizing Their Therapeutic Potential for Clinical Applications*. Int J Mol Sci. 2013; 14 (6): 11692–11712.
15. Ribeiro CA, Fraga JS, Graos M et al. *The Secretome of Stem Cells Isolated from the Adipose Tissue and Wharton's Jelly Acts Differently on Central Nervous System-Derived Cell Populations*. Stem Cell Res Ther. 2012; 3 (3): 18.
16. Can A, Celikkan FT, Cinar O. *Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cell Transplantations: A Systemic Analysis of Clinical Trials*. Cytotherapy. 2017; 19: 1351–1382.

17. Musialek P, Mazurek A, Jarocha D et al. *Myocardial Regeneration Strategy Using Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells as an Off-the-Shelf „Unlimited" Therapeutic Agent: Results from the Acute Myocardial Infarction First-in-Man Study.* Postepy Kardiol. Interwencyjnej. 2015; 11 (2): 100–107.
18. Gao LR, Chen Y, Zhang NK et al. *Intracoronary Infusion of Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells in Acute Myocardial Infarction: Double-Blind, Randomized Controlled Trial.* BMC Med. 2015; 13 (1): 162.
19. Park HC, Shim YS, Ha Y et al. *Treatment of Complete Spinal Cord Injury Patients by Autologous Bone Marrow Cell Transplantation and Administration of Granulocyte-macrophage Colony Stimulating Factor*. Tissue Eng. 2005; 11 (5/6): 913–925.
20. Kumar AA, Kumar SR, Narayanan R et al. *Autologous Bone Marrow Derived Mononuclear Cell Therapy for Spinal Cord Injury: A Phase I/II Clinical Safety and Primary Efficacy Data.* Exp Clin Transplant. 2009; 7 (4): 241–248.
21. Karamouzian S, Nematollahi-Mahani SN, Nakhaee N, Eskandary H. *Clinical Safety and Primary Efficacy of Bone Marrow Mesenchymal Cell Transplantation in Subacute Spinal Cord Injured Patients.* Clin Neurol Neurosurg. 2012; 114 (7): 935–939.
22. Lima C, Escada P, Pratas-Vital J et al. *Olfactory Mucosal Autografts and Rehabilitation for Chronic Traumatic Spinal Cord Injury.* Neurorehabil Neural Repair. 2010; 24 (1): 10–22.
23. Rao Y, Zhu W, Liu H et al. *Clinical Application of Olfactory Ensheathing Cells in the Treatment of Spinal Cord Injury*. J Int Med Res. 2013; 41 (2): 473–481.
24. Zhou X, Ning G, Feng S et al. *Transplantation of Autologous Activated Schwann Cells in the Treatment of Spinal Cord Injury : Six Cases, More than Five Years of Follow-Up.* Cell Transplant. 2012; 21 (2): 39–48.
25. Geffner LF, Santacruz P, Izurieta M et al. *Administration of Autologous Bone Marrow Stem Cells into Spinal Cord Injury Patients Via Multiple Routes Is Safe and Improves Their Quality of Life: Comprehensive Case Studies.* Cell Transplant. 2008; 17 (12): 1277–1293.
26. Yoon SH, Shim YS, Park YH et al. *Complete Spinal Cord Injury Treatment Using Autologous Bone Marrow Cell Transplantation and Bone Marrow Stimulation with Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor: Phase I/II Clinical Trial.* Stem cells (Dayton, Ohio). 2007; 25 (8): 2066–2073.
27. Syková E, Homola A, Mazanec R et al. *Autologous Bone Marrow Transplantation in Patients with Subacute and Chronic Spinal Cord Injury.* Cell Transplant. 2006; 15 (8–9): 675–687.
28. Ichim TE, Solano F, Lara F et al. *Feasibility of Combination Allogeneic Stem Cell Therapy for Spinal Cord Injury: A Case Report.* Int Arch Med. 2010; 3: 30.
29. Moviglia G a, Fernandez Viña R, Brizuela J et al. *Combined Protocol of Cell Therapy for Chronic Spinal Cord Injury. Report on the Electrical and Functional Recovery of Two Patients.* Cytotherapy. 2006; 8 (3): 202–209.
30. Tabakow P, Jarmundowicz W, Czapiga B et al. *Transplantation of Autologous Olfactory Ensheathing Cells in Complete Human Spinal Cord Injury.* Cell Transplant. 2013; 22 (9): 1591–612.

31. Jarocha D, Milczarek O, Wędrychowicz A, Kwiatkowski S, Majka M. *Continuous Improvement After Multiple Mesenchymal Stem Cell Transplantations in Patient With Complete Spinal Cord Injury*. Cell Transplantation. 2015; 24 (4): 1–12.
32 Van Hedel HJ, Dietz V. *Rehabilitation of Locomotion After Spinal Cord Injury*. Restor Neurol Neurosci. 2010; 28 (1): 123–134.

Multiple applications of mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly in the treatment of incomplete spinal cord injury – case report

Abstract

Introduction: Interruption of the spinal cord's continuity remains an incurable disease, leading to loss of neurological and mechanical functions below the level of damage. Until now, there are no effective ways to treat patients with this type of injury. Cellular therapies are an intensively developing new method of treatment that can lead to the regeneration of a damaged spinal cord. The aim of this study was to assess the safety and potential efficacy of Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells (WJMSC) in a patient with an incomplete disruption of the spinal cord's continuity.

Material and methods: A patient with incomplete discontinuation of the spinal cord at Th11–12 level was qualified for experimental therapy using WJMSCs. The patient was rated according to American Spinal Injury Association Impairment Scale (ASIA). The patient underwent a five-time administration of WJMSCs every 3 months.

Results: During the therapy there were no side effects directly related to the experimental treatment. After each administration of WJMSC, permanent neurological improvement was observed, followed by improvement in quality of life. The patient's ASIA score changed from A/B to C/D. The level of sensation decreased significantly from Th12 to L3–4. The patient regained the ability to move his legs in the support, using the active mobility of the quadriceps muscles on both sides with the advantage of the left lower limb. EMG, ENG and SEP objectively confirmed the improvement.

Conclusions: The results of WJMSCs treatment indicate an objective improvement in the patient with chronic incomplete spinal cord injury.

Key words: mesenchymal stem cells (MSC), Wharton's jelly, incomplete spinal cord injury, regenerative medicine

SPRAWOZDANIA

Państwo i Społeczeństwo

2018 (XVIII) nr 3

e-ISSN 2451-0858
ISSN 1643-8299

Małgorzata Kalemba-Drożdż

dr, Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego,
Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu

XVIII KONFERENCJA NAUKOWA „PAŃSTWO. GOSPODARKA. SPOŁECZEŃSTWO". SPRAWOZDANIE

W dniach 11–12 czerwca 2018 r. w kampusie Krakowskiej Akademii im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego przy ul. Gustawa Herlinga-Grudzińskiego 1 w Krakowie odbyła się XVIII Konferencja Naukowa „Państwo. Gospodarka. Społeczeństwo". W konferencji wzięło udział ponad dwustu czynnych uczestników, a także pracownicy i studenci KAAFM.

Uczestników konferencji przywitał Jego Magnificencja Rektor KAAFM prof. dr hab. Jerzy Malec. Następnie uczestnicy obradowali w sekcjach tematycznych organizowanych przez poszczególne wydziały Akademii.

Wydział Prawa, Administracji i Stosunków Międzynarodowych obradował w kolejnych sesjach: „Wyzwania współpracy i rywalizacji państw jako przesłanki kształtowania się nowego układu sił międzynarodowych w wymiarze globalnym i regionalnym w drugiej dekadzie XXI w.", „Propozycje reformy wymiaru sprawiedliwości" oraz „Prawo wobec nowych technologii". Wydział Psychologii i Nauk Humanistycznych dyskutował z kolei na inne tematy: „Teoretyczne i praktyczne problemy psychologii. Ujęcia antropologiczne", „Wychowanie do i przez sztukę we współczesnych procesach dydaktycznych i wychowawczych" oraz, w anglojęzycznej sesji, „Art in foreign language education". Wydział Zarządzania i Komunikacji Społecznej podjął refleksję nad zrównoważonym rozwojem organizacji, zaś Wydział Nauk o Bezpieczeństwie obradował na temat „Edukacja dla bezpieczeństwa – doświadczenia, stan obecny i perspektywy"; Wydział Architektury i Sztuk Pięknych podjął dialogi architektoniczne.

Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu podjął oryginalny temat spoza głównego nurtu: „Postępowanie w chorobach rzadkich". Pierwszą sesję rozpoczął i poprowadził Dziekan Wydziału Lekarskiego i Nauk o Zdrowiu prof. dr hab. med. Filip Gołkowski, który przedstawił ogólną charakterystykę chorób rzadkich, a następnie opisał współczesną diagnostykę i leczenie akromegalii. Dr Anna Sadakierska-Chudy zaprezentowała referat nt. rzadkich chorób genetycznych, obejmujący szereg zagadnień – od diagnostyki do leczenia. Następnie prof. dr hab. med. Anna Maria Roszkowska omówiła zwyrodnienia rogówki, ich diagnostykę i leczenie. Kolejnym prelegentem był prof. dr hab. med. Zbigniew Zuber, opisujący obraz kliniczny, diagnostykę i leczenie mukopolisacharydoz. Pani Lidia Stopyra, lek. med., omówiła zagadnienia dotyczące toksoplazmozy wrodzonej: diagnostykę i leczenie w świetle aktualnych wytycznych.

Moderatorem kolejnej sesji była dr n. med. Anna Sadakierska-Chudy. W tym bloku dr Anna Mokrzycka przedstawiła szczególne zasady dotyczące chorób rzadkich, a także praw pacjenta w Unii Europejskiej. Jako druga dr n. med. mgr piel. Irena Milaniak omówiła rolę pielęgniarki w opiece nad pacjentem z chorobą rzadką na przykładzie schorzeń kardiologicznych. Mgr Kamila Makulec przedstawiła studium przypadku zindywidualizowanej fizjoterapii w zespole Arnolda Chiarego, natomiast kolejny referat przygotowała dr n. med. mgr piel. Agnieszka Skorupska-Król (współautorzy: mgr piel. Sylwia Góral, mgr Maria Król) na temat: *Model opieki nad chorym z rozpoznaniem hemofilii typu A, zakwalifikowanym do procedury alloplastyki stawu biodrowego*. Prof. dr hab. med. Dorota Lemańska oraz lic. Barbara Wojciechowska omówiły wiedzę personelu medycznego na temat chorób rzadkich i leków sierocych, z kolei dr Agata Grzywacz-Kisielewska przygotowała referat pt. *Potencjał leczniczy grzybów wielkoowocnikowych w wybranych nowotworach rzadkich*.

Ostatnia, anglojęzyczna sesja Wydziału Lekarskiego i Nauk o Zdrowiu była okazją do wysłuchania inspirujących referatów przygotowanych przez gości z Srinakharinwirot University w Bangkoku (Tajlandia). Dr Amarin Narkwichean, MD omówił diagnostykę i postępowanie w przebiegu talasemii (*Thalassemia screening; pre- and post-conceptional perspectives*), prof. Manaphol Kulpraneet, MD dał przegląd tropikalnych chorób płuc (*An overview of tropical lung disease*), a dr Pichaya Petborom, M.D. przestawiła opis przypadku rzadkiej choroby płuc (*Tropical lung disease – a rare case study*). Całość sesji zakończył referat wygłoszony przez prowadzącego sesję prof. dr hab. Piotra Kopińskiego (współautorzy: prof. dr hab. med. Joanna Chorostowska-Wynimko, prof. dr med. Tomasz Senderek, dr Janusz Ligęza, dr Michał Ząbczyk, mgr Ewelina Wędrowska, mgr inż. Joanna Golińska): *Expression of tumor necrosis factor-related inducer of apoptosis in broncholavleoalar lavage (BAL) of patients with rare interstitial lung diseases*.

Pełny program konferencji dostępny jest na stronie Krakowskiej Akademii im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego: https://www.ka.edu.pl/aktualnosci/konferencje-naukowe/art,30,panstwo-gospodarka-spoleczenstwo-11-12-czerwca-2018-r-.html.

Państwo i Społeczeństwo

2018 (XVIII) nr 3

e-ISSN 2451-0858
ISSN 1643-8299

Agata Grzywacz-Kisielewska

dr, Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego,
Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu

IV MIĘDZYNARODOWY KONGRES POLSKIEGO TOWARZYSTWA UROGINEKOLOGICZNEGO. SPRAWOZDANIE

W dniach 20 i 21 kwietnia 2018 r. w kampusie Krakowskiej Akademii im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego przy ul. Gustawa Herlinga-Grudzińskiego 1 w Krakowie odbył się IV Międzynarodowy Kongres Polskiego Towarzystwa Uroginekologicznego.

Kongres miał charakter interdyscyplinarny, gromadząc specjalistów z różnych dziedzin – lekarze, położni, fizjoterapeuci, a także psychoterapeuci spotkali się, żeby porozmawiać o aktualnych trendach w uroginekologii. Jednym z głównych tematów poruszanych podczas kongresu była sprawność mięśni dna miednicy, temat istotny dla codziennego funkcjonowania znacznej części populacji zarówno kobiet, jak i mężczyzn. Do istotnych celów kongresu – poza wymianą doświadczeń – należało także propagowanie wiedzy w tym niezwykle ważnym, a często trudnym i wstydliwym dla pacjentów obszarze zdrowia. Zwrócono również uwagę, jak istotna jest prewencja chorób uroginekologicznych, i wielokrotnie podkreślono, że powinna ona odgrywać coraz to większą rolę w pracy uroginekologa.

W kongresie wzięło udział około 500 uczestników: gości, prelegentów, a także pracowników i studentów Akademii.

Jeszcze 19 kwietnia w Klinice Ginekologii i Uroginekologii Szpitala św. Rafała w Krakowie odbyły się warsztaty przedkongresowe „Laparoskopowa naprawa dna miednicy", które poprowadzili dr n. med. Paweł Szymanowski, Pre-

zes PTUG, oraz prof. dr hab. Marcin Jóźwik, Prezes Elekt PTUG. Warsztaty odbyły się na dwóch salach operacyjnych z transmisją obrazu, a w czasie ich trwania ok. dwudziestu uczestników mogło doskonalić swoje umiejętności oraz dzielić się wiedzą i doświadczeniem w przeprowadzaniu zabiegów laparoskopowych.

Pierwszy dzień kongresu rozpoczął się intensywnie – od kolejnych warsztatów praktycznych. Tematyka warsztatów dotyczyła m.in. doskonalenia technik szycia laparoskopowego z wykorzystaniem nowoczesnych trenarzy, natomiast kolejne warsztaty poświęcono zagadnieniu przebiegu badania urodynamicznego zarówno od strony teoretycznej, jak i praktycznej (na żywo) oraz przebiegu badania uroginekologicznego, w tym z wykorzystaniem technik *pelvic floor sonography*. Tematem ostatnich zajęć były podstawy pessaroterapii.

Po konferencji prasowej uczestników zaproszono do strefy wystawców, gdzie mieli szansę zapoznać się z nowoczesnymi produktami i rozwiązaniami technicznymi w dziedzinie uroginekologii oraz porozmawiać z przedstawicielami zaproszonych firm.

Podczas uroczystego rozpoczęcia kongresu w imieniu Polskiego Towarzystwa Uroginekologicznego uczestników powitał dr n. med. Paweł Szymanowski, Prezes PTUG.

Pierwszą sesję rozpoczął wykład prof. Eckharda Petri, który wprowadził uczestników w tematykę powikłań w uroginekologii. Następnie dr med. Michael Anapolski omówił zagadnienie rekonstrukcji dna miednicy z wyszczególnieniem rodzajów pektopeksji. Dr n. med. Magdalena Ptak przedstawiła istotne zagadnienie współpracy między lekarzem i fizjoterapeutą w fizjoterapii uroginekologicznej. Kolejny referat wygłosił Dziekan Wydziału Lekarskiego i Nauk o Zdrowiu prof. dr hab. med. Filip Gołkowski, który omówił zagadnienie specyfiki problemów uroginekologicznych u pacjentek z zaburzeniami układu endokrynnego. Następny referat – mgr położnictwa Elżbiety Kaden – dotyczył istotnej roli okołoporodowej profilaktyki chorób uroginekologicznych, a referat dr. Burgharda Abendsteina dotyczył nowości w leczeniu tylnego kompartymentu. Sesję zakończył referat prof. dr hab. med. Kazimierza Pityńskiego, omawiający anatomię dna miednicy z punktu widzenia operatora uroginekologicznego.

Po przerwie dalsze obrady podzielono na dwie sesje tematyczne: lekarską oraz przeznaczoną dla fizjoterapeutów i położnych.

Podczas sesji lekarskiej obradowano w blokach tematycznych. Pierwszy z nich dotyczył nowoczesnych standardów w diagnostyce uroginekologicznej – skupiono się na technikach diagnostyki obrazowej i przestrzennej w obniżeniu narządów miednicy mniejszej i nietrzymaniu moczu. Kolejny blok tematyczny poruszał tematy związane z uropołożnictwem. Prelegenci szeroko przedstawili aspekty poporodowych schorzeń uroginekologicznych, takich jak zaburzenia statyki narządu rodnego oraz poporodowe wypadanie macicy i odbytnicy. Podkreślono również wagę odpowiedniego planowania i prowadzenia porodu w aspekcie uroginekologii oraz kluczową rolę relacji pacjent–lekarz. Po przerwie

kawowej zaprezentowano referaty w ostatnim bloku tematycznym pierwszego dnia kongresu, dotyczącym wysiłkowego nietrzymania moczu. Problem ten może dotyczyć nawet 1/3 populacji kobiet w Polsce, które często nie wiedzą, że mogą otrzymać skuteczną pomoc lekarską. Jednym z rozwiązań tego problemu może być możliwość wykorzystania telemedycyny w skoordynowanym modelu opieki nad pacjentką. Omówiono także metody leczenia nietrzymania moczu, m.in. operację Burcha czy mini-endoskopię przez pęcherzową; zaprezentowano przy tym cenne wskazówki dotyczące wyboru właściwych taśm podcewkowych w konkretnych przypadkach oraz sposoby postępowania w przypadku możliwych powikłań.

W toczącej się równolegle sesji dla fizjoterapeutów i położnych tematyka referatów dotyczyła m.in. zastosowania metod treningu mięśni dna miednicy jako pierwszoplanowej metody leczenia problemu nietrzymania moczu. Omówiono szeroko rolę właściwego przygotowania kobiety do porodu siłami natury w zapobieganiu i minimalizowaniu poporodowych uszkodzeń dna miednicy, a także skutki i terapię już powstałych uszkodzeń. Poruszono również ważny temat roli treningu w nietrzymaniu moczu u mężczyzn po usunięciu gruczołu krokowego. Po przerwie kawowej tematyka referatów skupiła się wokół zagadnień związanych ze skuteczną rehabilitacją mięśni dna miednicy, w tym wykorzystaniu różnorodnych technik, takich jak wibroterapia i wizualizacja. Poruszono także problem roli rehabilitacji w dysfunkcjach seksualnych.

Drugiego dnia kongresu w sesji lekarskiej obradowano w blokach tematycznych. W pierwszym bloku, „Neurourologia i leczenie pęcherza nadaktywnego", omówiono m.in. możliwości leczenia z wykorzystaniem toksyny botulinowej. Tematyka kolejnego bloku, „Obniżenie narządów miednicy mniejszej", w pierwszej części dotyczyła porównania metod leczenia oraz rekonstrukcji dna miednicy, m.in. technik pochwowych i laparoskopowych oraz technik laserowych, przedstawiono tu także nowe kierunki rozwoju operatywy uroginekologicznej. Następny blok tematyczny, „Leczenie zachowawcze w uroginekologii", zawierał szeroki przekrój tematów, począwszy od problemów nietrzymania moczu u młodych pacjentek, przez genetyczne uwarunkowania obniżenia narządów w miednicy mniejszej i wpływ przypadków guzów w obrębie miednicy mniejszej na schorzenia uroginekologiczne, na roli miejscowego zastosowania estrogenów w leczeniu chorób uroginekologicznych kończąc. W ostatnim z bloków tematycznych – „Seksualność w chorobach dna miednicy" omówiono wpływ chorób uroginekologicznych na seksualność, w tym istotną rolę psychosomatyki, a także poruszono zagadnienia związane ze specyfiką leczenia pacjentów z dystrofią genitalną i pacjentów transseksualnych. Po oficjalnym zakończeniu kongresu odbyło się sympozjum dla pacjentów.

Dla fizjoterapeutów drugi dzień kongresu wiązał się głównie z zajęciami praktycznymi. Uczestnicy mieli do dyspozycji szeroki wybór ciekawych warsztatów, gdzie w niewielkich grupach mogli szczegółowo poznawać wybrane za-

gadnienia. Pierwsza grupa dotyczyła technik rehabilitacyjnych w różnych schorzeniach: „Trening dna miednicy wg koncepcji BeBo®", „Ćwiczenia stabilizacji centralnej a mięśnie dna miednicy", „Terapia w bolesnych miesiączkowaniach", „Rehabilitacja w dysfunkcjach seksualnych", „Rozejście mięśnia prostego brzucha a dysfunkcje miednicy i jamy brzusznej w praktyce fizjoterapeuty". Kolejną grupę tematyczną zajęć stanowiło wykorzystanie nowoczesnych metod obrazowania: „Diagnostyka czynnościowa i terapia mięśni miednicy z wykorzystaniem EMG", a także „Ultrasonografia jako metoda biofeedback w fizjoterapii uroginekologicznej". Ponieważ planowanie i przebieg porodu ma istotny wpływ na rozwój chorób uroginekologicznych w przyszłości, ostatni blok warsztatów dotyczył właśnie tego zagadnienia: „Osteopatyczne przygotowanie do porodu siłami natury", „Ciąża a choroby uroginekologiczne. Adaptacja treningu w okresie ciąży pod kątem przygotowania kobiety do porodu siłami natury", wreszcie – „Koncepcja profilaktyki okołoporodowej w zapobieganiu chorób uroginekologicznych".

W trakcie kongresu prelegenci kładli duży nacisk na rolę profilaktyki, diagnostykę, leczenie zachowawcze, farmakoterapię oraz nowoczesne metody leczenia operacyjnego i nowatorskie podejście do rehabilitacji.

Pełny program konferencji dostępny jest na stronie Polskiego Towarzystwa Uroginekologicznego: https://ptug2018.pl/lekarze/program.

Państwo i Społeczeństwo

2018 (XVIII) nr 3

e-ISSN 2451-0858
ISSN 1643-8299

INSTRUKCJA PRZYGOTOWANIA ARTYKUŁÓW Z ZAKRESU MEDYCYNY I ZDROWIA PUBLICZNEGO

Zasady ogólne

Nadsyłane prace mogą być publikowane w następujących kategoriach:

- oryginalne prace badawcze
- artykuły poglądowe
- opisy przypadków
- recenzje zawierające komentarze do opublikowanych prac innych autorów
- sprawozdania z wydarzeń naukowych (kongresy, sympozja, konferencje naukowe itp.)

Przygotowanie manuskryptu

Strona tytułowa powinna zawierać: pełny tytuł pracy w języku polskim, imiona i nazwiska wszystkich autorów, nazwę instytucji, z której pochodzi praca, nr ORCID wszystkich autorów, a także imię i nazwisko, adres, numer telefonu i e-mail autora odpowiedzialnego za korespondencję z redakcją. Wszystkie powyższe dane zostaną umieszczone na pierwszej stronie artykułu.

Streszczenie w języku polskim wraz z wyborem do 4 słów kluczowych, powinno być umieszczone po stronie tytułowej w tekście każdego rodzaju artykułu i zawierać nie więcej niż 1100 znaków ze spacjami (około 150 słów). Tekst streszczenia należy podzielić na części: Wprowadzenie, Materiał i metody, Wyniki oraz Wnioski. Streszczenie w języku angielskim wraz z angielską wersją tytułu w języku angielskim i słowami kluczowymi należy umieścić na końcu tekstu, po bibliografii. Streszczenie w języku angielskim musi być w pełni zgodne z wersją w języku polskim.

Tekst prac oryginalnych należy podzielić na części: Wprowadzenie, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski. Należy ograniczyć objętość *Wprowadzenia* do informacji niezbędnych dla uzasadnienia celowości przeprowadzonych

badań oraz analizy przedstawionych wyników. Używane w pracy skróty należy wymienić przed wprowadzeniem lub podać ich wyjaśnienie przy pierwszym użyciu w tekście.

Prace poglądowe powinny zawierać: Wprowadzenie, tytuły rozdziałów wynikające z omawianej problematyki, Podsumowanie.

Opisy przypadków powinny zawierać: Wprowadzenie, Opis przypadku, Podsumowanie.

Recenzje – tytuł stanowi informacja bibliograficzna o recenzowanej pracy, poza tym struktura tekstu jak w pracach poglądowych.

Podsumowanie powinno zawierać wysoce syntetyczne ujęcie poruszanego w pracy tematu i nie przekraczać 500 znaków ze spacjami.

Prace mogą być przygotowane w języku angielskim. Zasady identyczne jak dla artykułów w języku polskim, w miejsce streszczenia w języku angielskim należy umieścić streszczenie w języku polskim (dotyczy autorów polskich). W przypadku gdy korekta językowa okaże się wykraczać poza rutynowy *native speaker proofreading* z powodu niezadowalającego poziomu języka angielskiego, artykuł będzie odesłany do autora celem istotnej poprawy w warstwie językowej.

Krój i rozmiar pisma

Tekst artykułu powinien być złożony pismem Times New Roman o wielkości 12 punktów z interlinią 1,5. Terminy i wyrażenia obcojęzyczne należy pisać kursywą (*italic*). W tekście głównym nie należy stosować wytłuszczeń **(bold)** oraz podkreśleń.

Zalecana objętość prac według liczby znaków ze spacjami (z wyłączeniem streszczeń, uwzględniając tabele i ryciny):
Praca oryginalna: 20 000 – 24 000
Artykuł poglądowy: 20 000 – 24 000
Opis przypadku: 20 000 – 22 000
Recenzja: 1000 – 8000
Sprawozdanie z wydarzeń naukowych: 1000 – 8000

Ryciny i tabele

Ryciny i tabele powinny być dostarczone w pliku zawierającym manuskrypt, umieszczone po streszczeniu w języku angielskim. W przypadku przyjęcia artykułu do druku, redakcja może zwrócić się o przesłanie oryginalnych plików graficznych w formacie jpg lub TIFF w rozdzielczości 300 dpi. Każda z rycin i tabel musi być umieszczona na osobnej stronie z podaniem jej numeru oraz tytułu. Opis rycin i tabel powinien wystarczać do zrozumienia ich zawartości bez odnoszenia się do tekstu głównego.

Przykłady:
Tabela 1. Częstość zaburzeń gospodarki węglowodanowej w badanej grupie. A – grupa kontrolna; B – osoby chore; * oznacza wynik istotny statystycznie.
Rycina 1. Średnie stężenie glukozy w surowicy krwi dorosłych mężczyzn w zależności od BMI.

Jednostki danych liczbowych należy podawać w nawiasach kwadratowych. Ryciny zawierające wykresy powinny być przedstawione w formie dwuwymiarowej. Preferowana jest forma tabeli bez linii pionowych oddzielających kolumny, zawierająca linie poziome ograniczające od góry i dołu, linię pozioma oddzielającą tytuły kolumn od danych oraz opcjonalnie poziome linie oddzielające wiersze prezentowanych danych lub złożonych tytułów kolumn (przykład poniżej).

	Stężenie jonów w surowicy krwi		p
	Grupa A ($\bar{x}$±SD)	Grupa B ($\bar{x}$±SD)	
Na^+ [mmol/l]	148,3 ± 6,5	137,2 ± 5,8	0.02*
K^+ [mmol/l]	3,4 ± 0,3	4,5 ± 0,4	0.01*
Ca^{2+} [mmol/l]	2,4 ± 0,1	2,2 ± 0,1	0.08
Mg^{2+} [mmol/l]	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,2	0.20

Akceptowane są materiały w odcieniach szarości, publikacja materiałów kolorowych wymaga wcześniejszych ustaleń z wydawcą. Ponadto w odpowiednim miejscu w tekście należy wprowadzić odnośnik w nawiasie zwykłym (Tab. 1, Ryc. 1). Ilustracje zaczerpnięte z innych prac i podlegające ochronie prawa autorskiego wymagają pisemnej zgody właściciela praw autorskich i powinny być opatrzone informacją bibliograficzną w postaci odsyłacza do literatury, umieszczonego w podpisie rysunku.

Bibliografia

Odwołania do literatury w tekście należy umieszczać w nawiasie kwadratowym z podaniem numeru cytowanej pozycji piśmiennictwa, zgodnie ze spisem umieszczonym na końcu pracy. W przypadku kilku pozycji należy podać wszystkie numery przedzielone przecinkami bez spacji lub zakres – jeżeli są to pozycje kolejne – na przykład: [5,8,12] lub [6-9,14]. Numerowanie cytowanych materiałów zgodne z kolejnością pojawiania się w tekście. Nazwiska wszystkich autorów należy podać z pierwszą literą imienia. W przypadku rozdziałów w książkach należy podać na końcu zakres stron cytowanego rozdziału. Nie zamieszcza się przypisów dolnych, pod tekstem głównym. Tytuł pozycji należy wyróżnić

czcionką pochyłą (*italic*). Wzory sposobu przedstawienia danych bibliograficznych, w zależności od rodzaju źródła, podano poniżej.

- Czasopismo naukowe:

Buchanan JG, Scott PJ, McLachlan EM. *A chromosome translocation in association with periarteritis nodosa and macroglobulinemia*. Am J Med. 1967; 42: 1003–1010.

- Książka:

Davies N. *Europa. Rozprawa historyka z historią*. Znak, Kraków 1998.

- Rozdział w książce:

Grodziski S. *Habsburgowie* [w:] Mączak A (red.). *Dynastie Europy*. Zakład Narodowy im. Ossolińskich, Wrocław 1997; 102–136.

Uwaga

Do pliku zawierającego manuskrypt należy dołączyć oświadczenie podpisane przez autora korespondencyjnego, z podaniem autorów i tytułu pracy, zawierające stwierdzenia:

- praca nie była wcześniej publikowana ani nie jest złożona w innej redakcji,
- manuskrypt został zaaprobowany przez wszystkich współautorów,
- w przypadku zakwalifikowania pracy do druku autorzy zgadzają się na nieodpłatne przeniesienie praw autorskich na Oficynę Wydawniczą AFM,
- w manuskrypcie zawarto informacje co do ewentualnych źródeł finansowania i konfliktów interesów.

Autorów prosimy o podanie numeru ORCID.

Plik manuskryptu oraz plik pdf z wyżej opisanym oświadczeniem, należy przesłać na adres e-mail redakcji: medycynazp@afm.edu.pl Oświadczenie można również przesłać na nr fax: 12 2524666.

Po zgłoszeniu manuskryptu powinni Państwo dostać wiadomość potwierdzającą przyjęcie artykułu i nadanie mu numeru ewidencji redakcyjnej. W przypadku braku otrzymania potwierdzenia w ciągu kilku dni roboczych, uprzejmie prosimy o ponowny kontakt z redakcją.

Państwo i Społeczeństwo

2018 (XVIII) nr 3

e-ISSN 2451-0858
ISSN 1643-8299

ZASADY RECENZOWANIA PUBLIKACJI W CZASOPISMACH[1]

1. Do oceny każdej publikacji powołuje się co najmniej dwóch niezależnych recenzentów spoza jednostki.
2. W przypadku tekstów powstałych w języku obcym, co najmniej jeden z recenzentów jest afiliowany w instytucji zagranicznej innej niż narodowość autora pracy.
3. Rekomendowanym rozwiązaniem jest model, w którym autor(zy) i recenzenci nie znają swoich tożsamości (tzw. *double-blind review proces*).
4. W innych rozwiązaniach recenzent musi podpisać deklarację o niewystępowaniu konfliktu interesów; za konflikt interesów uznaje się zachodzące między recenzentem a autorem:
   - bezpośrednie relacje osobiste (pokrewieństwo, związki prawne, konflikt),
   - relacje podległości zawodowej,
   - bezpośrednia współpraca naukowa w ciągu ostatnich dwóch lat poprzedzających przygotowanie recenzji.
5. Recenzja musi mieć formę pisemną i kończyć się jednoznacznym wnioskiem co do dopuszczenia artykułu do publikacji lub jego odrzucenia.
6. Zasady kwalifikowania lub odrzucenia publikacji i ewentualny formularz recenzencki są podane do publicznej wiadomości na stronie internetowej czasopisma lub w każdym numerze czasopisma.
7. Nazwiska recenzentów poszczególnych publikacji/numerów nie są ujawniane; raz w roku czasopismo podaje do publicznej wiadomości listę recenzentów współpracujących.

[1] Zgodnie z wytycznymi Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego obowiązują od roku 2012.