

Doniesienia naukowe z zakresu medycyny i nauk pokrewnych

Doniesienia naukowe z zakresu medycyny i nauk pokrewnych

Redakcja:
Beata A. Nowak
Kamil Maciąg

Lublin 2017

Recenzenci:

- prof. dr hab. Henryk Figiel
- dr hab. Jolanta Saczko, prof. nadzw.
- dr Agnieszka Marzec
- dr n. farm. Przemysław Kołodziej
- dr n. med. Jolanta Taczała
- dr n. farm. Łukasz Kuźma
- prof. dr hab. Teresa Urbanik-Sypniewska
- dr n. med. Katarzyna Dyndor
- dr Milena Wojciechowska
- dr inż. Andrzej Kurek
- dr Grzegorz Król
- dr Anna Serefko

Wszystkie opublikowane rozdziały otrzymały pozytywne recenzje.

Skład i łamanie:

Ilona Żuchowska

Projekt okładki:

Marcin Szklarczyk

© Copyright by Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o.

ISBN 978-83-65598-48-6

Wydawca:

Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o.

ul. Głowackiego 35/341, 20-060 Lublin

www.wydawnictwo-tygiel.pl

Spis treści

<i>Michał Szewczuk, Karolina Boguszevska, Katarzyna Błaszczak-Świątkiewicz</i> Biologiczna ocena toksyczności wybranych pochodnych benzimidazolu oraz ich wpływu na przebieg cyklu komórkowego	7
<i>Elżbieta Głodek, Paulina Duma-Kocan, Marian Gil</i> Znaczenie zdrowotne wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w obniżaniu ryzyka chorób cywilizacyjnych	25
<i>Iga Bicz, Weronika Wojnar, Ilona Kaczmarczyk-Sedlak</i> Fitoterapia w leczeniu pomocniczym cukrzycy	37
<i>Aldona Gajek, Iga Hołyńska-Iwan</i> Oddziaływanie niklu na skórę ludzi	50
<i>Monika Karasiewicz-Urbańska, Urszula Szkop</i> Znaczenie wybranych lizyn bakteriofagowych w leczeniu zakażeń bakteryjnych	60
<i>Katarzyna Durak, Zbigniew Surowiec, Arkadiusz Miaskowski</i> Zjawisko hipertermii magnetycznej w nanocząstkach tlenków żelaza	73
<i>Bożena Muszyńska, Maciej Łojewski, Konrad Dobosz, Katarzyna Sułkowska-Ziaja</i> Substancje biologicznie aktywne w biomasie z kultur pędowych <i>in vitro</i> <i>Bacopa monnieri</i> L. (Penel) – uaktualnienie	92
<i>Małgorzata Waldowska-Kasprzak, Wioleta Kowalska, Justyna Woś</i> Nowe spojrzenie na biologię komórek iNKT – funkcjonalne różnice pomiędzy subpopulacjami	109
<i>Wioleta Kowalska, Małgorzata Waldowska-Kasprzak, Michał Zarobkiewicz, Magdalena Paziewska</i> Zróżnicowanie fenotypowe i funkcjonalne monocytów u chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową	123
<i>Kamila Anna Czubak, Halina Małgorzata Żbikowska</i> Stres oksydacyjny w przechowywanych składnikach krwi i po przetoczeniu koncentratu krwinek czerwonych w wybranych grupach biorców	132

<i>Grzegorz Wróbel</i> Angioarchitektonika guzów w oparciu o stosowane techniki mikrokorozyjne w obrazie SEM.....	153
<i>Grzegorz Wróbel</i> Zwierzęce modele chorób neurodegeneracyjnych – choroba Alzheimerera	167
<i>Marta Nowak</i> Międzypokoleniowe przemiany rozwoju fizycznego dzieci i młodzieży – przegląd badań	179
<i>Anna Pacian, Teresa Kulik, Karolina Kłodzińska, Elwira Szwedo</i> Postawy zdrowotne kobiet makroregionu lubelskiego wobec profilaktyki raka piersi ..	200
<i>Aleksandra Greloch, Amanda Augustynik, Emil Rozenek, Karolina Sochoń, Janusz Wojtkowski</i> Postępowanie fizjoterapeutyczne w dystrofii mięśniowej typu Duchenne’a.....	212
<i>Emil Bartosz Rozenek, Amanda Maria Augustynik , Aleksandra Greloch, Karolina Sochoń, Janusz Wojtkowski</i> Wybrane metody terapii osób ze spektrum autyzmu	236
<i>Amanda Maria Augustynik, Emil Bartosz Rozenek , Aleksandra Greloch, Karolina Sochoń, Janusz Wojtkowski</i> Metody zooterapii stosowane w autyzmie.....	254
<i>Ewelina Kozłowska, Jarosław Zubrzycki</i> Możliwości zastosowania inżynierii odwrotnej w medycynie.....	273
Indeks autorów	291

Biologiczna ocena toksyczności wybranych pochodnych benzimidazolu oraz ich wpływu na przebieg cyklu komórkowego

1. Wstęp

Problem etiopatogenezy nowotworów zajmuje kluczowe miejsce we współczesnej medycynie. Obecnie najczęściej diagnozowanymi typami nowotworów są rak płuc u mężczyzn i rak piersi u kobiet [1, 2]. Najbardziej rozpowszechnionymi metodami leczenia nowotworów, oprócz zabiegów chirurgicznych, są chemioterapia, radioterapia i immunoterapia [3, 4]. Ich cechą wspólną jest niska selektywność względem komórek chorych i wysoka inwazyjność w stosunku do komórek zdrowych. Dlatego też poszukuje się nowych metod leczenia, których działanie ograniczałoby się tylko do niszczenia tkanek zmienionych w postępie choroby. Ponadto ważnym jest aby skuteczność nowej metody leczenia udało się potwierdzić przy użyciu możliwie najniższej dawki leku, o wiele niższej od stosowanych obecnie.

Na dzień dzisiejszy obiecujące rezultaty uzyskuje się wykorzystując terapię celowaną z zastosowaniem bioredukcyjnych proleków. Ich działanie polega na aktywacji nieaktywnych form związków chemicznych w obrębie tych obszarów guza, w których występuje niedotlenienie tkanek (hipoksja) [5, 6]. W wyniku przekształcenia związku do aktywnego leku następuje zahamowanie cyklu komórkowego komórek nowotworowych i skierowanie ich na naturalną drogę zaprogramowanej śmierci – apoptozy. Głównym przedstawicielem klasy bioredukcyjnych proleków jest tirapazamina [7÷11]. Ze względu na selektywność tych związków w kierunku hipoksji nie wykazują one toksyczności ogólnoustrojowej.

Celem pracy było zbadanie toksyczności nowych pochodnych benzimidazolu z zastosowaniem metod *in vitro* oraz analiza ich wpływu na przebieg cyklu komórkowego ludzkich komórek gruczolakoraka płuc – linii komórkowej A549. Ponadto wykonano test obrazujący sposób różnicowania się komórek pod wpływem badanych związków w celu potwierdzenia ich pro-apoptycznych właściwości.

¹ michal.szewczuk@stud.umed.lodz.pl, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

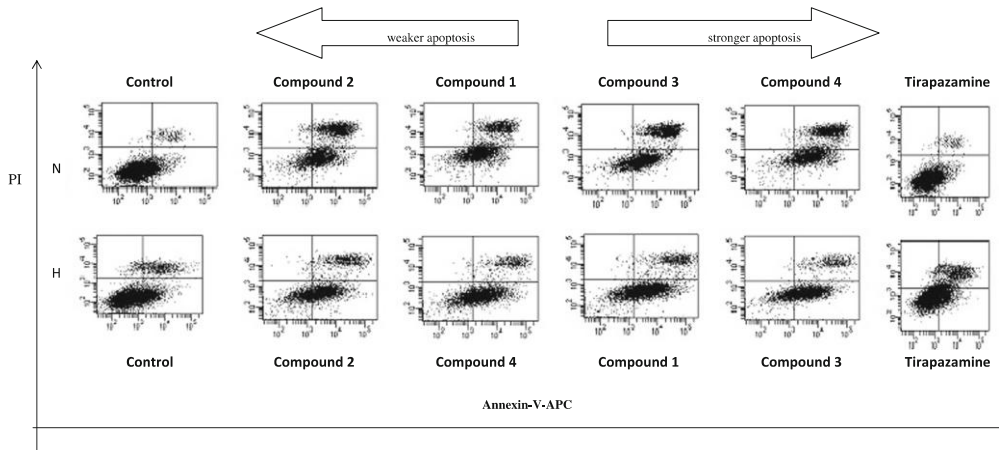
² karolina.boguszewska@stud.umed.lodz.pl, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

³ katarzyna.blaszczak-swiatkiewicz@umed.lodz.pl, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

2. Wyniki i dyskusja

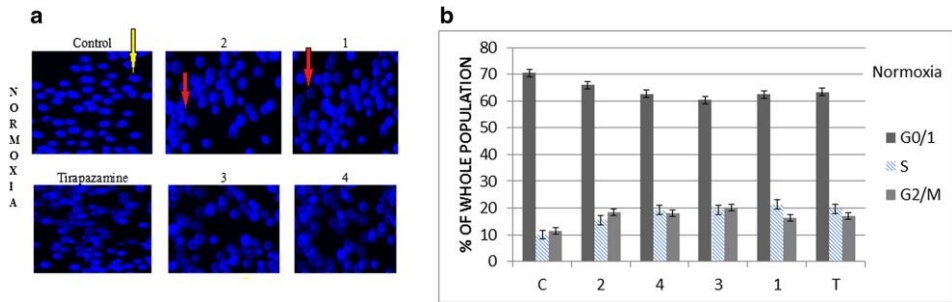
2.1. Benzimidazole i indukcja apoptozy komórek linii A549

Kontynuując badania nad cytotoksycznością nowych pochodnych benzimidazolu przeprowadzono test aneksyny V z jodkiem propidyny (PI) (Rys. 1). Analiza ta pozwoliła na określenie typu śmierci komórkowej, jakiej ulegają komórki pod wpływem badanych związków.

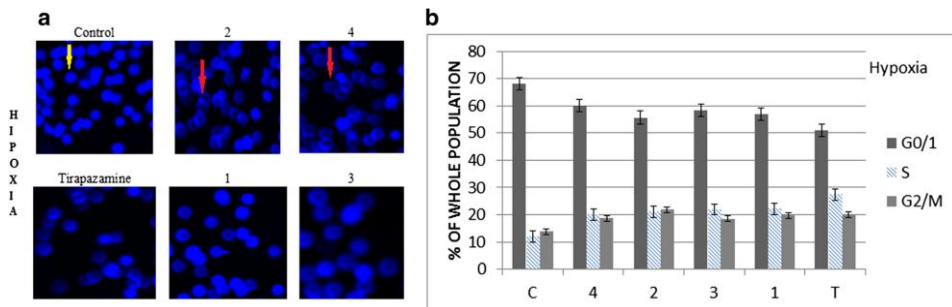


Rys. 1. Wyniki testu aneksyny (Annexin V-APC) i jodku propidyny (PI) w warunkach normoksji (N) i hipoksji (H). Komórki linii A549 traktowano związkami w stężeniu odpowiadającym IC_{50} przez 48 godz. Poszczególne związki opisane jako Compound 1-4 [Źródło: opracowanie własne]

Określono udział komórek żywych, w fazie wczesnej i późnej apoptozy oraz komórek nekrotycznych w hodowli komórkowej linii ludzkiego gruczolaka płuca A549. Głównym punktem analizy była ocena i porównanie stopnia indukowania apoptozy i nekrozy przez badane związki. W ramach badania (aneksyna V + jodek propidyny PI) stwierdzono przewagę ilości komórek we wczesnej apoptozie w porównaniu z innymi komórkami (w późnej apoptozie i nekrozie). Obserwacji dokonano w warunkach hipoksji oraz normoksji (inkubacja trwająca do 48 godz.) (Rys. 2, 3). W próbach traktowanych związkami 1-4 w warunkach hipoksji otrzymano 60% więcej komórek apoptotycznych niż w kontroli, podczas gdy w warunkach normoksji różnica wynosiła 50%. Dokonano ogólnej obserwacji na podstawie wyników przedstawionych na Rys. 1, 2b i 3b, że hipoksja powodują przejście we wczesną apoptozę znacznie większej ilości komórek niż w warunki normoksji (dla wszystkich badanych związków). Najsilniejsze działanie wykazał związek 1 zawierający N-tlenek oraz związek 2, który jest analogiem związku 1 (Rys. 2, 3, część B).



Rys. 2. Wizualizacja komórek apoptotycznych traktowanych badanymi związkami w warunkach normoksji. Komórki wizualizowane odczynnikiem Hoechst (a) oraz wyniki testu aneksyny V i jodku propidyny PI (b). Czerwone strzałki wskazują komórki apoptotyczne, żółte strzałki wskazują komórki normalne. Wyniki przedstawione dla: próby kontrolnej – C, badanych związków – 1-4, tirapazaminy – T, gdzie $p < 0,05$. Wartości wyrażone jako średnia \pm SD, $n \geq 3$ [Źródło: opracowanie własne]



Rys. 3. Wizualizacja komórek apoptotycznych traktowanych badanymi związkami w warunkach hipoksji. Komórki wizualizowane odczynnikiem Hoechst (a) oraz wyniki testu aneksyny V i jodku propidyny PI (b). Czerwone strzałki wskazują komórki apoptotyczne, żółte strzałki wskazują komórki normalne. Wyniki przedstawione dla: próby kontrolnej – C, badanych związków – 1-4, tirapazaminy – T, gdzie $p < 0,05$. Wartości wyrażone jako średnia \pm SD, $n \geq 3$ [Źródło: opracowanie własne]

Dokonując porównania indukcji apoptozy dla pochodnych benzimidazolu i tirapazaminy można zaobserwować korzystne, pro-apoptotyczne działanie nowych związków, szczególnie w warunkach hipoksji (Rys. 2, 3, część B). Największą różnicę w zależności od warunków wykazał związek 3 (58/74% N/H) (Rys. 2, 3, część B). Pozostałe związki można ułożyć w sekwencję odpowiadającą potencjałowi indukowania apoptozy w hipoksji/normoksji: 1>2>4 (Rys. 2, 3, część B). Analiza wyraźnie potwierdziła selektywne działanie N-tlenku (związki 1, 3) w warunkach hipoksji. Ponadto,

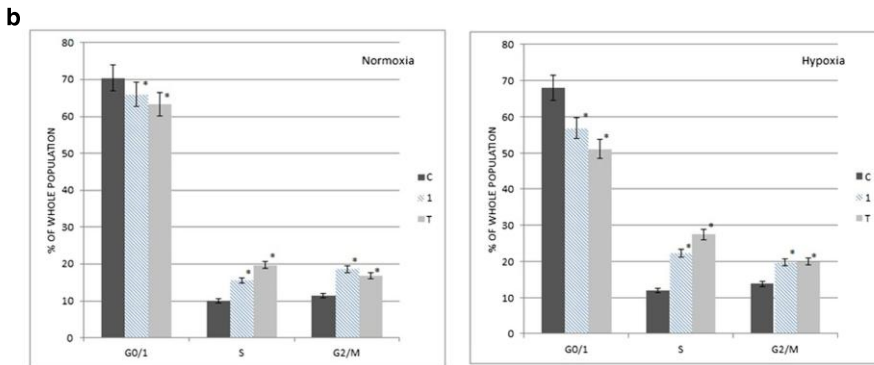
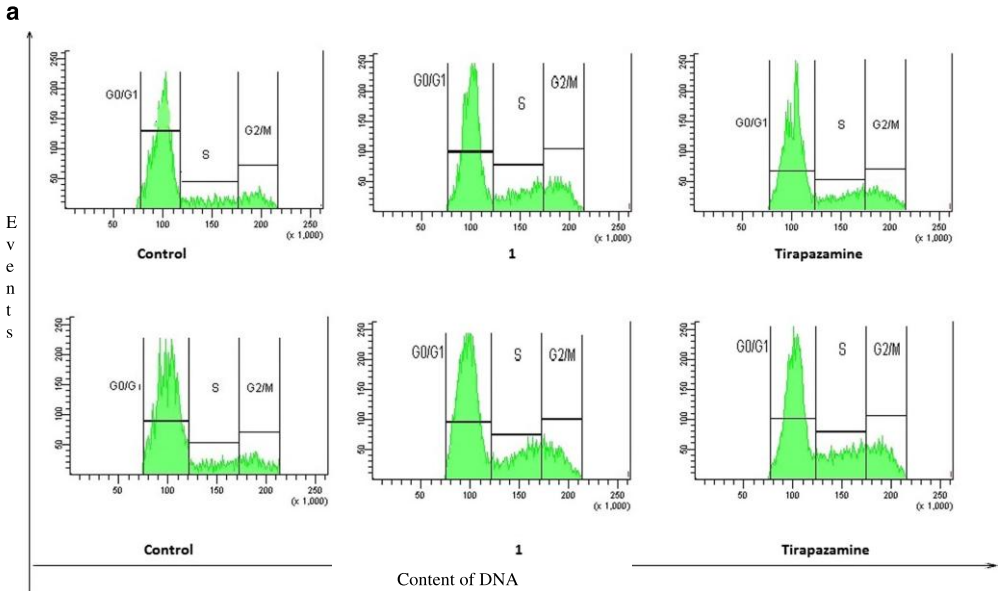
związki zawierające podstawnik nitrofenylowy (związki 1, 2) wykazują silniejszą indukcję apoptozy niż pochodne z podstawnikiem chlorofenylovym (związki 3, 4).

Wyniki testu z aneksyną V i jodkiem propidyny (PI) zostały również potwierdzone poprzez wizualizację komórek apoptotycznych w badanej hodowli (Rys. 2, 3, część A). W warunkach normoksji widoczne jest wyraźne zwiększenie ilości komórek w apoptozie w odniesieniu do kontroli (Rys. 2, 3, część A). Jednakże, w warunkach hipoksji badane związki wykazały też wpływ na dalszy postęp apoptozy (zaobserwowano również nieliczne komórki nieapoptotyczne), który ostatecznie doprowadził do nekrozy. Nekrozę stwierdzono na podstawie obserwacji znacznie mniejszej ilości komórek obecnych w polu widzenia (Rys. 2, 3, część A). Warto zaznaczyć, że wzrost ilości komórek nekrotycznych wynika ze stopniowej śmierci komórek na szlaku apoptozy, a nie zaś z silnego i natychmiastowego działania cytotoksycznego badanych związków na komórki. Wyniki uwzględniają nieznaczną apoptozę i nekrozę w hodowli kontrolnej w warunkach hipoksji i normoksji.

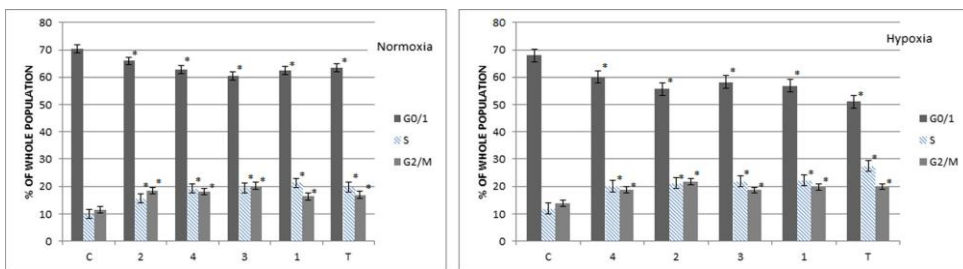
2.2. Benzimidazole i ich wpływ na przebieg cyklu komórkowego

Wszystkie badane związki, zarówno w warunkach normoksji jak i hipoksji, wykazały wpływ na komórki linii A549, w szczególności powodując zwiększenie ilości komórek będących w fazie S cyklu komórkowego. Jednocześnie zaobserwowano zahamowanie wzrostu komórek w fazie G0/1. Największy przyrost ilości komórek w fazie S zaobserwowano pod wpływem związku 1. Ponadto, ten sam związek znacznie bardziej zahamował fazę S w warunkach hipoksji (wzrost 2,2-krotny) niż w warunkach normalnych (wzrost 1,5-krotny) (Wykres 1). Pozostałe związki 2-4 również wykazały specyficzną inhibicję syntezy DNA w fazie S. Warto zaznaczyć, że badanie związku zawierające grupę N-tlenkową (związki 1,3) silniej oddziałują na fazę S cyklu komórkowego w warunkach hipoksji niż normoksji. Dodatkowo, podstawnik nitrofenylowy wpływa na wyższą aktywność pochodnych benzimidazolu niż podstawnik chlorofenylovym w obu badanych seriach. Konsekwencją inhibicji syntezy DNA w fazie S była zwiększona inhibicja podziałów komórkowych w fazie G2/M. Wszystkie oznaczenia zostały przeprowadzone w odniesieniu do związku referencyjnego, tirapazaminy, co pozwoliło na potwierdzenie poprzednio publikowanych wyników opisujących selektywność tego związku względem fazy S cyklu komórkowego, w szczególności w warunkach hipoksji (Wykres 2) [14].

*Biologiczna ocena toksyczności wybranych pochodnych benzimidazolu
oraz ich wpływu na przebieg cyklu komórkowego*



Wykres 1. Procent komórek w różnych fazach cyklu komórkowego po inkubacji ze związkiem 1, w odniesieniu do kontroli (C) i tirapazimini (tirapazaminę, T) w warunkach normoksji (N) i hipoksji (H), gdzie $p < 0,05$. Wartości wyrażone jako średnia \pm SD, $n \geq 3$ [Źródło: opracowanie własne]. (a) Histogram otrzymany po wykonaniu cytometrii przepływowej, określający zawartość DNA w próbach dla związku 1
(b) Specyfikacja przebiegu cyklu komórkowego dla związku 1



Wykres 2. Procent komórek w różnych fazach cyklu komórkowego pod wpływem związków 1-4 przedstawiający specyfikację cyklu komórkowego, w odniesieniu do kontroli (C) i tirapaziminy (T) w warunkach normoksji i hipoksji, gdzie $p < 0,05$. Wartości wyrażone jako średnia \pm SD, $n \geq 3$ [Źródło: opracowanie własne]

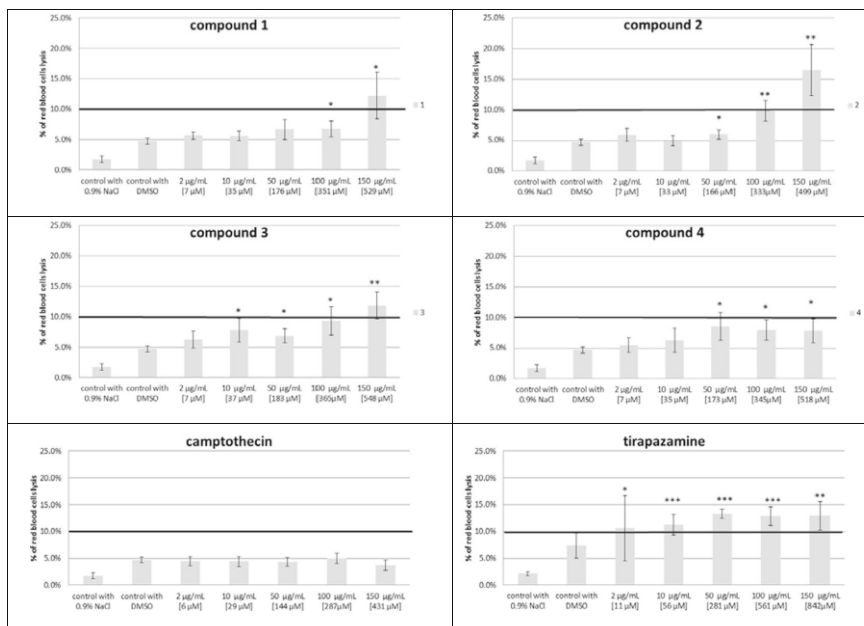
2.3. Benzimidazole i ich wpływ na lizę erytrocytów

Zbadano wpływ czterech pochodnych benzimidazolu (1-4) oraz dwóch związków referencyjnych (kamptotecyna i tirapazamina) na hemolizę ludzkich erytrocytów. Zaobserwowano, że jedynie największe zastosowane stężenia związków 1, 2 i 3 spowodowały nieznaczne przekroczenie dopuszczalnego poziomu 10% zlizowanych erytrocytów w porównaniu do próby kontrolnej (Triton X-100, 0,2%). Poziom 10% hemolizy erytrocytów jest przyjęty jako akceptowalny i potencjalnie bezpieczny, pozwalający zachować spójność błon komórkowych. Dlatego też związki 1, 2 i 3 w zakresie stężeń pomiędzy 2 a 100 $\mu\text{g/ml}$ mogą być traktowane jako biokompatybilne. Związek 4 wykazał biokompatybilność w całym zakresie zastosowanych stężeń – procent lizy erytrocytów nie przekroczył dopuszczalnych 10%. Warto zaznaczyć, że tirapazamina w najniższym badanym stężeniu 2 $\mu\text{g/ml}$ wywołuje hemolizę wyższą niż 10%. Drugi z testowanych związków referencyjnych, kamptotecyna, nie wykazał negatywnego wpływu na błony komórkowe erytrocytów. W tym przypadku otrzymane wyniki nie różniły się znaczenie od wyników dla próby kontrolnej inkubowanej jedynie z rozpuszczalnikiem (DMSO) (Wykres 3).

*Biologiczna ocena toksyczności wybranych pochodnych benzimidazolu
oraz ich wpływu na przebieg cyklu komórkowego*

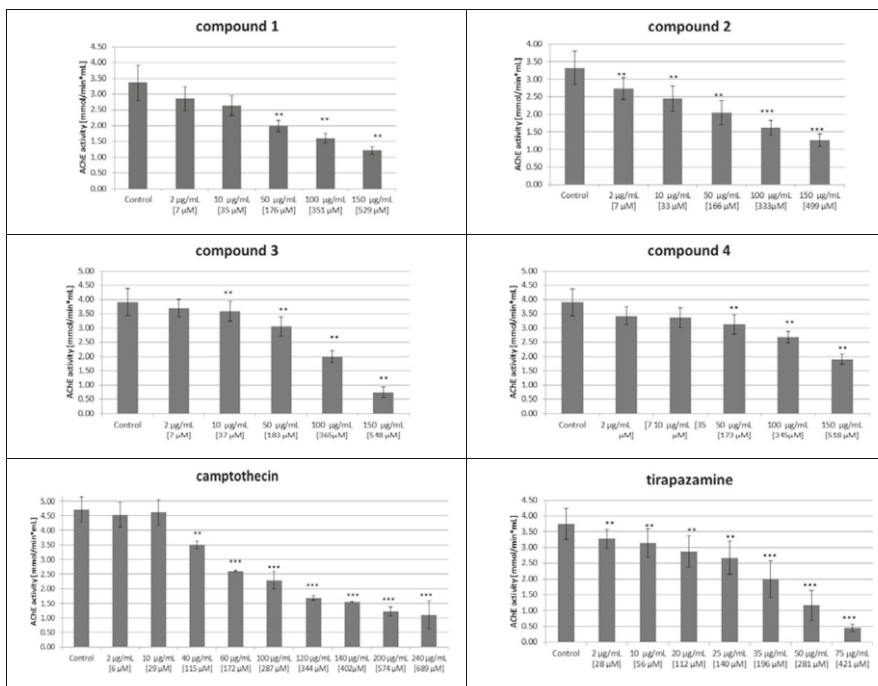
Tabela 1. Wartości IC₅₀ dla enzymu acetylocholinoesterazy ludzkich erytrocytów. Wartości wyrażone jako średnia ±SD, n=5 [Źródło: opracowanie własne]

Związek	IC ₅₀ [μmol/l]	Porównanie IC ₅₀ związków referencyjnych		
		Kamptotecyna	Tirapazamina	Takryna
		399.0 ± 55.9	143.8 ± 53.8	0.239 ± 0.09
1	377.4 ± 59.4	NS; (p=0,608)	p <0.001	p <0.001
2	372.9 ± 59.4	NS; (p=0,719)	p <0.001	p <0.001
3	889,5 ± 26.2	p=0.01	p <0.001	p <0.001
4	306.8 ± 48.2	NS; (p=0.06)	p <0.001	p <0.001



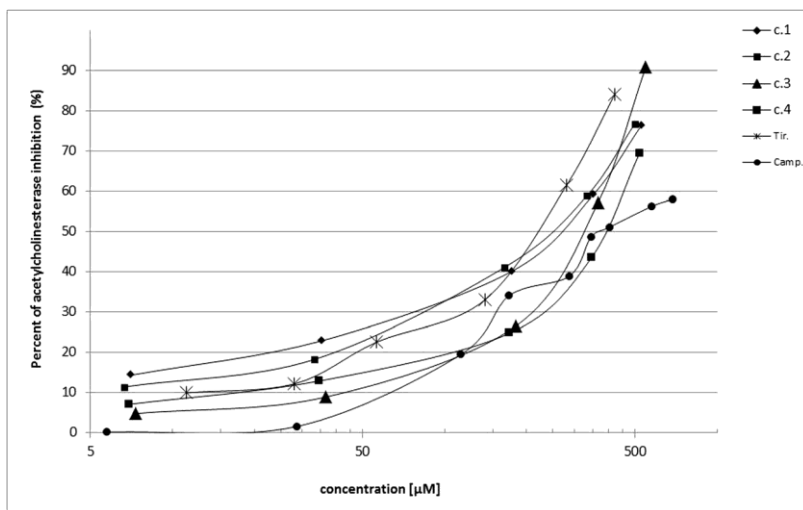
Wykres 3. Procent ludzkich erytrocytów, które uległy lizie pod wpływem badanych związków 1-4, kamptotecyny (camptothecin) i tirapazaminy (tirapazamine) w odniesieniu do próby ze 100% hemolizy, gdzie p=0,06-0,001 i p<0,001 względem kontroli z DMSO, n=5 [Źródło: opracowanie własne]

Kolejnym etapem badania aktywności biologicznej *in vitro* prezentowanych związków (1-4, tirapazamina, kamptotecyna) był test pod kątem inhibicji aktywności acetylocholinoesterazy ludzkich erytrocytów (AChE). Jak przedstawiono na Wykresie 4 wszystkie badane związki przy różnych stężeniach powodowały spadek aktywności AChE. Tirapazamina w całym zakresie stężeń (np. 75 µg/ml – 0,4 mmol/min ml) wykazała najsilniejszą inhibicję enzymu spośród wymienionych związków. Porównując wartość IC₅₀ związków 1, 2 i 4 z wartością IC₅₀ kamptotecyny nie zaobserwowano znacznej różnicy (Tabela 1). Jedynie związek 3 wykazał statystycznie znaczącą i wyższą wartość IC₅₀, co świadczy o jego znacznie słabszym wpływie na aktywność enzymatyczną AChE (889,5±26,2/399,0±55,9, *p*=0,01). Dokonując porównania wartości IC₅₀ dla wszystkich badanych związków z drugim związkiem referencyjnym – tirapazaminą, zaobserwowano mniejszą inhibicję enzymu dla pochodnych benzimidazolu. Dzięki temu można przyjąć, że przedstawione przez nas substancje wykazują potencjalnie mniejsze działania niepożądane. Dodatkowo został zastosowany trzeci związek referencyjny – takryna, jako typowy inhibitor acetylocholinoesterazy. W porównaniu z takryną badane przez nas związki wykazują znikomą inhibicję enzymu AChE (Wykres 5).



Wykres 4. Wpływ badanych związków 1-4, kamptotecyny (camptothecin) i tirapazaminy (tirapazamine) na aktywność acetylocholinoesterazy ludzkich erytrocytów, gdzie *p*=0,06-0,001 i *p*<0,001 względem kontroli, *n*=5 [Źródło: opracowanie własne]

Zależności inhibicji AChE uzyskane poprzez inkubację ludzkich erytrocytów pozyskanych od zdrowych ochotników z badanymi związkami oraz wartości IC_{50} przedstawiono na Wykresie 5 i w Tabeli 1. Na podstawie otrzymanych wyników można wykazać korelację pomiędzy badaniami prowadzonymi *in vitro* i *in vivo* dla przedstawionych pochodnych benzimidazolu. Oba eksperymenty potwierdziły niski poziom potencjalnej inhibicji enzymu AChE.



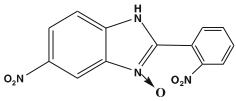
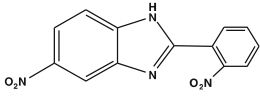
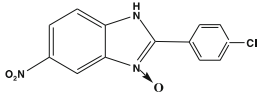
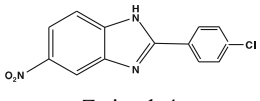
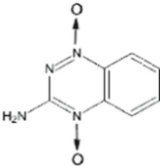
Wykres 5. Inhibicja aktywności enzymu acetylocholinoesterazy (AChE) przez różne stężenia badanych związków (1-4) w odniesieniu do kamptotecyny (Camp) i tirapazaminy (Tir), gdzie $n=5$
[Źródło: opracowanie własne]

3. Część eksperymentalna

3.1. Badane związki

Do badań użyto nowych pochodnych benzimidazolu oraz ich analogów posiadających wiązanie N-tlenkowe. Eksperymenty przeprowadzono zgodnie ze standardowymi metodami badawczymi, z uwzględnieniem modyfikacji wynikających z obserwowanych zależności. Jako związku referencyjnego użyto tirapazaminy ze względu na jej szeroko poznane właściwości pro-apoptotyczne oraz wysoką selektywność w kierunku komórek w stanie hipoksji [12]. Stężenie użytych związków chemicznych dobrano według obliczonego wcześniej wskaźnika IC_{50} [13]. Badane związki oznaczono w kolejności od 1 do 4 (Tabela 2).

Tabela 2. Struktury badanych pochodnych benzimidazolu (1-4) wraz z podstawnikami (R), tirapazaminy oraz ich wartości IC_{50} dla komórek linii A549 w warunkach normoksji (N) i hipoksji (H). Wartości wyrażone jako średnia \pm SD, n=3 [Źródło: opracowanie własne]

	IC_{50} [μ M]	
	Normoksja	Hipoksja
 Związek 1	$460,0 \pm 1,5$	$96,8 \pm 1,9$
 Związek 2	$169,2 \pm 2,5$	$97,4 \pm 1,4$
 Związek 3	$24,4 \pm 2,6$	$56,0 \pm 2,5$
 Związek 4	$36,6 \pm 1,8$	$56,8 \pm 1,5$
 Tirapazamina	$162,2 \pm 0,6$	$29,0 \pm 1,5$

3.2. Linia komórkowa

Linia komórkowa ludzkiego gruczolakoraka płuc – A549 – została zakupiona w Health Protection Agency Culture Collections (ECACC, Salisbury, Wielka Brytania). Hodowlę przeprowadzano przy pomocy medium F12K (HyClone, Loughborough, Wielka Brytania), wzbogaconego w 10% inaktywowaną termicznie płodową surowicę

bydłącą (FBS) (Lonza, Bazylea, Szwajcaria), penicylinę (10000 U/ml) i streptomycynę (10000 µg/ml), przy 5% stężeniu CO₂ w 37°C. Hipoksję uzyskano hodując komórki przy 1% O₂, 5% CO₂, również w 37°C. W obu przypadkach inkubacja trwała 24 godziny.

Zmiany morfologiczne komórek w normoksji i hipoksji, a także aktywność badanych związków oceniano poprzez obserwację pod mikroskopem kontrastowo-fazowym przy 100x powiększeniu (OptaTech, Warszawa, Polska).

3.2.1. Badanie apoptozy oraz cytometria przepływowa

W butelkach T25 wysiano $5 \cdot 10^5$ komórek i inkubowano przez 24 godziny, po czym dodano badane związki oraz tirapazaminę. Następnie inkubowano przez 48 godzin. Po tym czasie komórki przemyto buforem PBS oraz odczepiono od powierzchni butelek roztworem enzymu akutazy. Komórki zawieszono w roztworze buforu (100 µl/ $1 \cdot 10^5$ komórek) z aneksyną V i jodkiem propidyny (4 µl/ $1 \cdot 10^5$ komórek). Po przeprowadzeniu 20-minutowej inkubacji przy braku światła wykonano cytometrię przepływową (FACS Canto II, Becton Dickinson, USA). Komórki w stanie apoptozy i nekrozy uwidoczniono w reakcji z aneksyną V i jodkiem propidyny. Komórki wiążące aneksynę V określa się jako wczesno-apoptotyczne, komórki wiążące aneksynę oraz PI ocenia się jako późno-apoptotyczne i nekrotyczne.

3.2.2. Wizualizacja komórek w stadium apoptozy

W butelkach T25 wysiano $5 \cdot 10^5$ komórek i inkubowano przez 24 godziny, po czym dodano badane związki oraz tirapazaminę. Następnie inkubowano przez 48 godzin. Po tym czasie komórki przemyto buforem PBS oraz odczepiono od powierzchni butelki roztworem enzymu akutazy. Odczepione komórki przemyto i zakonserwowano w 70% etanolu w -21 °C. Do próby dodano barwnik Hoechst 33342 (Thermo Scientific, Warszawa, Polska) w stężeniu 1 µg/ml. Po 20-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej komórki wiążące barwnik (kolor ciemno-niebieski) obserwowano metodą mikroskopii konfokalnej przy 100x powiększeniu (mikroskop Olympus BX61-VS). Procent różnicowanych populacji komórek określono przy użyciu testu z barwnikiem Hoechst (Rys. 2, 3 część A) oraz testu z aneksyną V i jodkiem propidyny (Rys. 2, 3 część B). Żółta strzałka wskazuje komórki zdrowe, czerwona – komórki apoptotyczne.

3.2.3. Pomiar ilości DNA metodą cytometrii przepływowej

We butelkach T25 wysiano $5 \cdot 10^5$ komórek i inkubowano przez 24 godziny, po czym dodano badane związki oraz tirapazaminę. Następnie inkubowano przez 48 godzin. Po tym czasie komórki przemyto buforem PBS oraz odczepiono od powierzchni butelki roztworem enzymu akutazy. Odczepione komórki przemyto przy użyciu 70% roztworu etanolu, inkubowano z roztworem RNazy (100 µg/ml, Sigma-Aldrich, Monachium, Niemcy) i jodku propidyny (50 µg/ml, Sigma-Aldrich, Mona-

chium, Niemcy) przez 30 minut bez dostępu światła, w temperaturze pokojowej. Wykonano cytometrię przepływową i wyliczono zawartość DNA w próbach.

3.3. Badanie toksyczności

3.3.1. Odczynniki

Użyto 0,9% roztworu soli fizjologicznej (0,15 mol/l) oraz 0,1 mol/l buforu fosforanowego o pH = 7,0 i pH = 8,0 (Gliwice, Polska). Kwas 5,5'-ditiobisnitrobenzoesowy (DTNB) i jodek acetylocholino (substrat enzymu) zakupiono w (Sigma-Aldrich, Monachium, Niemcy). Przed wykonaniem eksperymentów rozcieńczono w wodzie destylowanej DTNB (0,1 mol/l), bufor fosforanowy o pH = 7,0 oraz jodek acetylocholino (21,67 mg/ml). Triton X-100 zakupiono w firmie POCH S.A. (Gliwice, Polska). Takryna (Sigma-Aldrich, Monachium, Niemcy) została użyta jako standardowy niekompetycyjny inhibitor enzymu acetylocholinoesterazy.

3.3.2. Materiały

Krew do badań pobrano od zdrowych dawców. Eryocyty odseparowano poprzez wirowanie (10 min., 3000 rpm) w 4 °C i trzykrotnie przemyto 0,9% roztworem soli fizjologicznej. Aktywność enzymu acetylocholinoesterazy określono przy użyciu hemolizowanych erytrocytów, które przechowywano w temperaturze -30 °C przed wykonaniem oznaczenia. Bezpośrednio przed oznaczeniem komórki przechowywano przez 30 minut w temperaturze 37 °C. Raz rozmrożonych komórek nie zamrażano ponownie oraz nie używano do kolejnych oznaczeń.

3.3.3. Metody

Aktywność enzymu acetylocholinoesterazy określono spektrofotometrycznie za pomocą zmodyfikowanej metody Ellmana [17, 18]. Świeżo rozmrożone eryocyty rozcieńczono w buforze fosforanowym o pH = 8,0 w stosunku 1:400. Taki roztwór w ilości 0,96 ml mieszano z 0,01 ml DTNB (1 μmol/ml) i 0,02 ml badanego związku chemicznego o stężeniu od 2 do 150 μg/ml. Próby inkubowano przez 5 minut w temperaturze 37 °C. Reakcję enzymatyczną rozpoczynano poprzez dodanie 0,01 ml jodku acetylocholino (0,75 μmol/ml). Absorbancję prób mierzono w sposób ciągły, przy długości fali λ= 436 nm (spektrofotometr Cecil CE2021, Londyn, Wielka Brytania), przez 6 minut, w temperaturze 37 °C. Dane opracowano przy użyciu programu DATA STREAM CE3000 5.0. Aktywność ludzkiego enzymu acetylocholinoesterazy podano w jednostkach [μg/min·ml]. Z wykresu wyliczono wartości IC₅₀ dla badanych związków, które oznaczają stężenia związków wystarczające do zahamowania aktywności enzymu o 50%.

3.4. Analiza statystyczna

Wszystkie wartości zostały określone jako wartość średnia z uwzględnieniem odchylenia standardowego \pm SD. Wykorzystano test Q-Dixon aby odrzucić wyniki nieistotne statystycznie. Testy statystyczne wykonano przy pomocy komercyjnego oprogramowania (Statistica 10.0, StatSoft). W celu określenia ciągłości zmiennych zastosowano test Shapiro-Wilk. Test t został wykorzystany aby ocenić zmienne w regularnym rozkładzie, zaś test Mann-Whitney wykorzystano aby ocenić zmienne o rozkładzie niestandardowym. Wartość p poniżej 0,05 została uznana jako statystycznie istotna.

3.4.1. Test lizy erytrocytów

Test lizy erytrocytów przeprowadzono zgodnie z opisaną procedurą [19]. Erytrocyty w stężeniu 2% inkubowano z badanymi związkami w temperaturze 37°C. Zastosowano stężenia związków w przedziale od 2 do 150 μ g/ml. Po 1 godz. inkubacji próby odwirowywano (10 min., 3000 rpm), a następnie mierzono absorbancję otrzymanego supernatantu przy długości fali $\lambda = 550$ nm. Hemoliza komórek została wyrażona jako procent uwolnionej hemoglobiny. W celu określenia poziomu 100% uwolnionej hemoglobiny do inkubacji wykorzystano Triton X-100 (0,2 % v/v). Próba kontrolna zawierała rozpuszczalnik (woda lub DMSO) i miała na celu określenie stopnia spontanicznej hemolizy erytrocytów w celu dalszego porównania z wynikami otrzymanymi dla badanych prób.

4. Wnioski

Przeprowadzone badania pozwoliły wykazać pro-apoptotyczne właściwości badanych nowych pochodnych benzimidazolu, których oddziaływanie na komórki nowotworowe ludzkiego nowotworu płuc A549 doprowadziło do dezintegracji komórek, zahamowania cyklu komórkowego i skierowanie ich w szlak naturalnej zaprogramowanej śmierci komórki – apoptozy. Okazało się, że badane związki są w stanie indukować apoptozę komórek zarówno w warunkach hipoksji, jak i w warunkach normoksji, co potwierdziło przypuszczenia o ich selektywności względem komórek zmienionych chorobowo w następstwie rozwoju guza. Ponadto wyniki badań wykazały, że selektywność badanych związków względem hipoksji wzrasta jeżeli związek posiada w swojej strukturze wiązanie N-tlenkowe, co zostało potwierdzone w przypadku związków 1 i 3. Dodatkowo udało się udowodnić, że nowe pochodne benzimidazolu kierują komórki wprost na drogę apoptozy, dzięki czemu zminimalizowana zostaje liczba komórek ulegających nekrozie.

Wszystkie badane pochodne benzimidazolu wykazały potencjał w niszczeniu struktury DNA komórek nowotworowych. Ich wpływ na cykl komórkowy polega na hamowaniu fazy S, dzięki czemu nie dochodzi do dalszej replikacji materiału

genetycznego komórek chorych. Działanie związków polega na inhibicji topoizomerazy I – enzymu odpowiedzialnego za przygotowanie nici DNA do replikacji poprzez jej częściowe rozplecenie [13, 15, 16]. Na tym polu najwyższą aktywnością charakteryzuje się związek 1, głównie dzięki obecności wiązania N-tlenkowego, co potwierdza pozytywny wpływ takiego ugrupowania na badane właściwości związków. Ma to znaczenie zwłaszcza w warunkach hipoksji, gdzie aktywność związku 1 okazała się najwyższa. Zadawalające rezultaty osiągnięto również w próbach ze związkiem 2, który jest analogiem związku 1, ale nieposiadającym wiązania N-tlenkowego.

Dokonano również oceny toksyczności badanych pochodnych benzimidazolu poprzez określenie ich wpływu na hemolizę erytrocytów *in vitro* i *in vivo*. Zgodnie z danymi literaturowymi, wynik poniżej 10% komórek ulegających hemolizie nie jest uznawany za szkodliwy dla organizmu [19]. Wyniki badań wskazują jednoznacznie, że żaden z analizowanych związków nie przyczynił się do wystąpienia hemolizy erytrocytów na poziomie wyższym niż 10%. Dla porównania – tirapazamina, którą zastosowano w badaniu jako związek referencyjny, spowodowała przekroczenie poziomu 10% już przy najniższym stężeniu (2 µg/ml). Kolejny związek referencyjny – kamptotecyna – nie wykazał znaczącego wpływu na ilość erytrocytów ulegających hemolizie. Przedstawione wyniki badania toksyczności względem erytrocytów potwierdzają biokompatybilność nowych pochodnych benzimidazolu, co pozwala na pozytywne prognozy w kontekście dalszych badań nad użyciem tych związków jako proleków o działaniu przeciwnowotworowym w testach na zwierzętach.

Jak wiadomo, acetylocholinoesteraza jest jednym z głównych enzymów obecnych w centralnym i obwodowym układzie nerwowym człowieka. Jednakże niektóre izoformy tego białka są spotykane również w ludzkich fibroblastach, osteoblastach, komórkach nerek czy erytrocytach [17]. Jego rola nie ogranicza się tylko i wyłącznie do katalizy reakcji hydrolizy acetylocholine, ale również udowodniono jego udział w procesach proliferacji komórek i kontrolowaniu ich apoptozy. Podejrzewa się, że ma to związek z hamowaniem nowotworzenia komórek, jednak szczegóły tego procesu pozostają niejasne [19÷21].

Kolejnym krokiem było zbadanie wpływu nowych pochodnych benzimidazolu na aktywność enzymu acetylocholinoesterazy ludzkich erytrocytów. Badanie wykonano stosując dwa dodatkowe związki referencyjne: takrynę – najważniejszy inhibitor tego enzymu, który był stosowany w leczeniu choroby Alzheimer'a (wycofany z obrotu ze względu na wysoką hepatotoksyczność), oraz kamptotecynę – związek będący dobrze znanym inhibitorem topoizomerazy I, który wykazuje dodatkowo właściwości inhibitora acetylocholinoesterazy [13].

Przeprowadzone badania wykazały, że każdy z analizowanych związków posiada zdolność inhibicji enzymu acetylocholinoesterazy ludzkich erytrocytów. Tirapazamina inhibuje enzym w najwyższym stopniu (IC₅₀ dla tego związku okazało się najniższe),

mimo braku doniesień literaturowych w tym zakresie. Najsłabszą inhibicję enzymu acetylocholinoesterazy wykazano przy użyciu związku 3, podczas gdy działanie związków 1, 2 i 4 nie różniło się znacząco od działania kamptotecyny jako związku referencyjnego. Najniższe IC₅₀ spośród wszystkich badanych związków wykazano dla drugiego związku referencyjnego – takryny.

Wiadomo, że inhibicja acetylocholinoesterazy prowadzi do pojawiania się licznych niegroźnych skutków ubocznych wśród pacjentów, takich jak biegunki czy wymioty, jednakże nie wpływają one bezpośrednio na zagrożenie stanu zdrowia. Z powyższych badań wynika, że ryzyko pojawienia się skutków ubocznych w terapii jest podobne bez względu na rodzaj użytego związku. Chociaż ten negatywny wpływ badanych pochodnych benzimidazolu na aktywność acetylocholinoesterazy został jednoznacznie potwierdzony, należy pamiętać, że tirapazamina – związek o najsilniejszym działaniu inhibującym – znajduje się obecnie w 3 fazie badań klinicznych mających na celu potwierdzenie jej skuteczności jako leku przeciwnowotworowego [22]. Nie należy więc traktować wyników powyższego oznaczenia jako czynnika, który mógłby spowodować zaniechanie dalszych badań w kierunku użycia nowych pochodnych benzimidazolu jako skutecznych proleków w terapii przeciwnowotworowej.

Podziękowania

Badania wspierane przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi (50/3-015-01/503-31-001 i 503/3-015-01/503-31-003).

Literatura

1. Online: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
2. Didkowska J., Wojciechowska U., Zatoński W., *Prediction of cancer incidence and mortality in Poland up to the year 2015*, Warszawa 2009
3. Bryant J. L., Meredith S. L., Williams K. J., White A., *Targeting hypoxia in the treatment of small cell lung cancer*, *Lung Cancer* 86, 2014, s. 126-132
4. Tannock I. F., *Oxygen diffusion and the distribution of cellular radiosensitivity in tumours*, *The British Journal of Radiology* 45, 1972, s. 515-524
5. McNally V. A., Patterson A. V., Williams K. J., Cowen R. L., Stratford I. J., Jaffar M., *Antiangiogenic, bioreductive and gene therapy approaches to the treatment of hypoxic tumour*, *Current Pharmaceutical Design* 8, 2002, s. 1319-1333
6. Wilson W. R., Hay M. P., *Targeting hypoxia in cancer therapy*, *Nature Reviews | Cancer* 11, 2011, s. 393-407
7. Guise C. P., Mowday A. M., Ashoorzadeh A., Yuan R., Lin W. H., Wu D. H., Smaill J. B., Patterson A. V., Ding K., *Bioreductive prodrugs as cancer therapeutics: targeting tumor hypoxia*, *Chinese Journal of Cancer* 33(2), 2014, s. 80-86
8. Denny W. A., Wilson W. R., Hay M. P., *Developments in design of bioreductive drug*, *The British Journal of Cancer Research* 74, 1996, s. 32-38

9. Patterson L. H., Craven M. R., Fisher G. R., Teesdalepittle P., *Aliphatic amine N-oxides of DNA binding agents as bioreductive drugs*, *Oncology Research* 6, 1994, s. 533-538
10. Schellens J. H. M., *Phase I and Pharmacologic Study of the Novel Indoloquinone Bioreductive Alkylating Cytotoxic Drug E09*, *Journal of the National Cancer Institute* 86, 1994, s. 906-912
11. McKeown S. R., Cowen R. L., Williams K. J., *Bioreductive Drugs: from Concept to Clinic*, *Clinical Oncology* 19, 2007, s. 427-442
12. Błaszczak-Świątkiewicz K., Mirowski M., Kaplińska K., Kruszyński R., Trzęsowska-Kruszyńska A., Mikiciuk-Olasik E., *New benzimidazole derivatives with potential cytotoxic activity – study of their stability by RP-HPLC*, *Acta Biochemica Polonica* 59 (2), 2012, s. 279-288
13. Błaszczak-Świątkiewicz K., Mikiciuk-Olasik E., *New benzimidazole derivatives as topoisomerase I inhibitors – synthesis and fluorometric analysis*, *Acta Poloniae Pharmaceutica in Drug Research* 70 (3), 2013, s. 451-458
14. Lin P. S., Ho K. C., Yang S. J., *Tirapazamine (SR 4233) interrupts cell cycle progression and induces apoptosis*, *Cancer Letters* 105(2), (1996), s. 249-55
15. Jin S., Kim J. S., Sim S. P., Liu A., Pilch D. S., Liu L. F., LaVoie E. J., *Heterocyclic bibenzimidazole derivatives as topoisomerase I inhibitors*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 10, 2000, s. 719-723
16. Alpan A. S., Gunes H. S., Topcu Z., *1H-Benzimidazole derivatives as mammalian DNA topoisomerase I inhibitors*, *Acta Biochimica Polonica* 54, 2007, s. 561-565
17. Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V. J., Featherstone R. M., *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*, *Biochemical Pharmacology* 7 1961, s. 88-95
18. Sikora J., Szymański P., Janus M., Mikiciuk-Olasik E., *Test in vitro for the assessment of the biological activity of acetylcholinesterase inhibitors*, *Problemy Terapii Monitorowanej* 21 (4), 2010, s. 239-244
19. Markowicz-Piasecka M., Mikiciuk-Olasik E., Sikora J., *Stability of erythrocyte membrane and overall hemostasis potential – A biocompatibility study of mebrotfenin and other iminodiacetic acid derivatives*, *Pharmacological Reports* 67, 2015, s. 1230-1239
20. Hui-Jun X., Ren-Pei W., Jing-Jing L., Ling-Juan Z., Zhao-Shen L., *Role of acetylcholinesterase in lung cancer*, *Thoracic Cancer* 6, 2015, s. 390-398
21. Xiaolei Y., Changsong Z., Chen Y., Zhou T., *Upregulation of Acetylcholinesterase Mediated by p53 Contributes to Cisplatin-Induced Apoptosis in Human Breast Cancer Cell*, *Journal of Cancer* 6(1), 2015, s. 48-53
22. Wilson W. R., Hay M. P., *Targeting hypoxia in cancer therapy*, *Nature Reviews Cancer* 1, 2011, s. 393-410

Biologiczna ocena toksyczności wybranych pochodnych benzimidazolu oraz ich wpływu na przebieg cyklu komórkowego

Najczęściej diagnozowanym rodzajem nowotworów na świecie są rak płuca u mężczyzn (21%) oraz rak piersi u kobiet (22%). Leczenie onkologiczne na ogół obejmuje operację, nieselektywną chemioterapię, radioterapię oraz leczenie hormonalne. Podczas gdy ostatnia z metod oparta jest na zmianie środowiska komórek nowotworowych, środki cytostatyczne i cytotoksyczna chemioterapia nie wykazują selektywnej aktywności przeciwnowotworowej. Wpływają one na proliferację komórek, a ich działanie nieuchronnie prowadzi do uszkodzenia zdrowych tkanek. Toksyczność ogólnoustrojowa jest jednym z głównych skutków ubocznych w leczeniu tego typu, dlatego skuteczna terapia przeciwnowotworowa powinna uwzględniać wiedzę na temat wpływu związków na cykl komórkowy.

Jedną z nowych strategii terapii przeciwnowotworowej obejmuje stosowanie bioredukcyjnych proleków, których głównym przedstawicielem jest tirapazamina. Terapia prolekowa wykorzystuje hipoksję tkanek w celu rozróżnienia komórek prawidłowych i nowotworowych. Cechą charakterystyczną związków bioredukcyjnych jest ich selektywność wobec komórek niedotlenionych, dzięki czemu toksyczność ogólnoustrojowa nie występuje.

Przedstawione badania obejmowały wstępną ocenę toksyczności nowych pochodnych benzimidazolu z wykorzystaniem metod przesiewowych *in vitro* (test hemolizy erytrocytów i pomiar aktywności AChE). Wpływ badanych związków na przerwanie cyklu komórkowego ludzkich komórek gruczolakoraka płuca linii A549 określano za pomocą odczynnika rybonukleazy. Ponadto oceniono stopień zróżnicowania komórek. Podział na komórki wczesno- i późno-apoptotyczne oraz komórki nekrotyczne przedstawiono jako funkcję proapoptotycznych właściwości badanych pochodnych benzimidazolu. Wykorzystano w tym celu test aneksyny V-APC, a wizualizację przeprowadzono za pomocą testu Hoechst.

Przeprowadzone badania potwierdziły proapoptotyczne właściwości testowanych związków objawiające się zdolnością do indukowania apoptozy, zarówno w warunkach normoksji jak i hipoksji. Oznaczenie zawartości DNA wykazało, że pochodne benzimidazolu posiadają zdolność do przerywania cyklu komórkowego badanych komórek w fazie S. Otrzymane wyniki potwierdzają korzystne parametry biologiczne nowych pochodnych benzimidazolu, zwłaszcza w ramach poszukiwania nowych związków cytotoksycznych z grupy selektywnych środków przeciwnowotworowych. Badania przeprowadzone w warunkach normoksji i hipoksji wykazały, że czynnikiem zapewniającym selektywność w warunkach hipoksji jest obecność struktury N-tlenku. W odniesieniu do związku referencyjnego, poziom aktywności wszystkich badanych związków jest wysoki, co świadczy o właściwym doborze podstawników pierścienia benzimidazolu.

Badania biologicznej aktywności pochodnych benzimidazolu powinny być kontynuowane ze szczególnym uwzględnieniem innych linii komórkowych, co pozwoli na ocenę wpływu tych związków na różne rodzaje nowotworów.

Słowa kluczowe: Aktywność przeciwnowotworowa, Pochodne benzimidazolu, Bioredukcyjne proleki, Toksyczność benzimidazoli

Biological evaluation of the toxicity and the cell cycle interruption by some benzimidazole derivatives

The most common globally diagnosed cancers are the lung cancer in men (21%) and breast cancer in women (22%). Cancer treatment generally includes surgery, non-selective chemotherapy, radiotherapy and hormonal therapy. While the last listed method is strictly based on the environmental change in tumor tissue, the cytostatic chemotherapy agents or cytotoxic drugs generally do not possess the selective antitumor activity. Most of them affect cell proliferation and can damage normal tissue as well. Systemic toxicity is one of the major shortcomings of therapies listed above. Effective anticancer therapy should take into account knowledge of the effect of the compounds on the cell cycle.

One of the new strategies of anticancer therapy includes application of bioreductive drugs with tirapazamine as major representative. The bioreductive therapy uses hypoxia as the target for main differences between normal and cancer cells. The distinguishing characteristic feature of these compounds from the group of cytotoxic substances is their selectivity for hypoxic cells which in turn provides an opportunity to reduce the systemic toxic effects.

This study provided the initial evaluation of the toxicity of new benzimidazole derivatives using *in vitro* screening methods (erythrocyte hemolysis test and AChE inhibition test). The effect of these compounds on the interruption of the cycle of human lung adenocarcinoma cells (A549) was determined by using the ribonuclease reagent. In addition, an assessment of the degree of differentiation of cells was tested. The division into early or late apoptotic cells and necrotic cells was specified as a function of the pro-apoptotic properties of tested benzimidazole derivatives. It was determined by Annexin V-APC test and visualized by Hoechst test.

The performed tests showed pro-apoptotic properties of the tested compounds related to their ability to induce significant apoptosis in both normoxia and hypoxia conditions and the immediate elimination of the undesirable necrosis. The DNA content assay showed that the benzimidazoles possess the ability to interrupt S phase of tumor cell cycle. These results confirm the preferred biological parameters of new benzimidazole derivatives especially in the context of the searching for new cytotoxic compounds from the group of selective anticancer agents. This research conducted in normoxia and hypoxia proved the stability of these properties and clearly indicated the structure of the N-oxide as the factor ensuring the selectivity in hypoxia. With regard to the reference compound, the level of activity of all tested compounds is high, which demonstrates the accuracy of the selection of the studied structure with the characteristic substituents of the benzimidazole ring.

The study of benzimidazole biological activity should be continued especially as an aspect of broadening cell line types. This would allow evaluating their features against different types of tumors.

Keywords: Anticancer activity, Benzimidazole derivatives, Bioreductive agents, Toxicity of benzimidazole

Znaczenie zdrowotne wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w obniżaniu ryzyka chorób cywilizacyjnych

1. Wprowadzenie

Od wielu lat naukowcy prowadzą badania, na podstawie których starają się odpowiedzieć na pytania, od czego zależy zdrowie człowieka. Dużą rolę odgrywają czynniki endogenne (uwarunkowania genetyczne), jednak należy także zwrócić uwagę na istotną rolę czynników egzogennych (środowiskowych).

Żywność jest uznawane za najważniejszy czynnik środowiskowy odpowiedzialny za stan zdrowia we wszystkich okresach życia człowieka, a szczególnie w okresie wczesnego dzieciństwa. Zwłaszcza w pierwszych latach życia dieta może programować metabolizm ustrojowy, poprzez oddziaływanie na aktywność enzymów, układ wewnętrzny oraz immunologiczny. Właściwe żywienie dzieci i młodzieży wpływa istotnie na prawidłowy rozwój i dobry stan zdrowia oraz jest najlepszym sposobem profilaktyki niektórych chorób cywilizacyjnych, które występują w późniejszych latach życia, lecz początki mogą mieć już w dzieciństwie [1].

Do głównych chorób cywilizacyjnych zalicza się:

- choroby układu krążenia na podłożu miażdżycy, w tym najczęstsze to choroba niedokrwienna serca z konsekwencją zawałów oraz udary mózgu;
- nadciśnienie tętnicze;
- nowotwory złośliwe;
- otyłość, alergie, psychozy i nerwice;
- niektóre choroby układu pokarmowego;
- choroby zwyrodnieniowe – przeciążeniowe [2];
- podwyższone stężenie cholesterolu i zaburzenia gospodarki lipidowej;
- cukrzycę typu 2;
- osteoporozę [1].

¹ egłodek@ur.edu.pl, Katedra Przetwórstwa i Towaroznawstwa Rolniczego, Wydział Biologiczno-Rolniczy, Uniwersytet Rzeszowski

² pduma@ur.edu.pl, Katedra Przetwórstwa i Towaroznawstwa Rolniczego, Wydział Biologiczno-Rolniczy, Uniwersytet Rzeszowski

³ mgil@ur.edu.pl, Katedra Przetwórstwa i Towaroznawstwa Rolniczego, Wydział Biologiczno-Rolniczy, Uniwersytet Rzeszowski

Choroby te są główną przyczyną zgonów w krajach rozwiniętych i rozwijających się, a także wpływają na jakość, a czasami skrócenie życia. Badania i obserwacje kliniczne wskazują, iż zmieniając sposób żywienia można zmniejszyć ryzyko występowania przewlekłych chorób niezakaźnych [3].

Powiedzenie Hipokratesa – ojca medycyny „Niechaj wasze pożywienie będzie lekarstwem i lekarstwem waszym – pożywienie” jest wciąż aktualne, co potwierdza współczesna wiedza medyczna i żywieniowa [2].

Prawidłowe żywienie człowieka polega na całkowitym pokryciu zapotrzebowania organizmu na energię i wszystkie składniki pokarmowe, potrzebne do rozwoju i zachowania zdrowia [4]. Najbardziej skoncentrowanym źródłem energii w pożywieniu człowieka są tłuszcze, które są źródłem kwasów tłuszczowych, w tym niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (NNKT) oraz witamin rozpuszczalnych w tłuszczach (A, E, D) [4÷5]. Tłuszcze są źródłem, z którego organizm czerpie składniki do budowy komórek, tkanek i narządów oraz do syntezy niektórych substancji biologicznie czynnych (eikozanoidów), a zwłaszcza prostaglandyn zaliczanych do hormonów tkankowych.

W tłuszczach żywności występują kwasy tłuszczowe, które w zależności od liczby wiązań podwójnych dzieli się na:

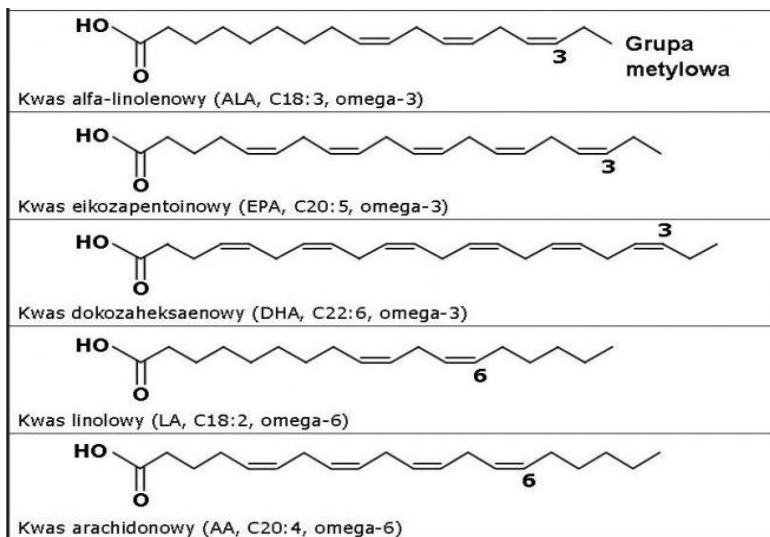
- nasycone SFA (Saturated Fatty Acids);
- jednonienasycone MUFA (Monounsaturated Fatty Acids);
- wielonienasycone PUFA (Polyunsaturated Fatty Acids) [4].

2. Charakterystyka chemiczna i źródła wielonienasyconych kwasów tłuszczowych

Wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA) zawierają w cząsteczce co najmniej dwa wiązania podwójne i 18 lub więcej atomów węgla w łańcuchu alkilowym. Należą do nich:

- kwas linolowy (LA) (C18:2), n-6;
- kwas α -linolenowy (ALA) (C18:3), n-3;
- kwas γ -linolenowy (GLA) (C18:3), n-6;
- kwas arachidonowy (AA) (C20:4), n-6;
- kwas eikozapentaenowy (EPA) (C20:5), n-3;
- kwas dokozaheksaenowy (DHA) (C22:6), n-3 (rys. 1) [6÷8].

Powszechnie wyróżnia się dwie rodziny wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, kwasy omega-6 (n-6) oraz kwasy omega-3 (n-3). Wynika to ze zróżnicowanych właściwości biologicznych związanych z położeniem wiązań podwójnych pomiędzy terminalną grupą metylową a 9 atomem węgla w cząsteczce. Węgiel grupy $-\text{CH}_3$ nazywa się węglem omega. Wiązania podwójne są rozdzielone przez co najmniej jedną grupę metylenową [6, 7].



Rys. 1. Wzory strukturalne kwasów omega-3 i omega-6 [9]

Kwasy polienowe (PUFA) nie są syntetyzowane przez organizm człowieka ze względu na brak układów enzymatycznych zdolnych do wprowadzania wiązań podwójnych w pozycjach n-6 oraz n-3 łańcucha węglowego, dlatego też muszą być codziennie dostarczane wraz z pożywieniem [5, 10]. Szczególnie istotne dla prawidłowego funkcjonowania organizmu są długołańcuchowe wielonienasycone kwasy tłuszczowe z rodziny n-3: kwas dokozaheksaenowy (DHA) i kwas eikozapentaenowy (EPA). Dzielne zapotrzebowanie pokarmowe na te kwasy nie jest jednoznacznie określone i waha się od 0,1 do 1,6g. Według zaleceń prawidłowego żywienia ważna jest wzajemna proporcja kwasów tłuszczowych z rodziny n-6 do n-3 w diecie [5, 11], która powinna wynosić (4-5):1, nie przekraczając wartości 10:1. Nadmierna dysproporcja pomiędzy kwasami z rodziny n-6 do n-3 w diecie może zaburzyć równowagę w ilości syntetyzowanych, często działających antagonistycznie eikozanoidów, prowadząc do powstawania określonych stanów patologicznych [5].

Głównymi przedstawicielami wielonienasyconych kwasów n-3 są kwasy: α -linolenowy (ALA), dokozaheksaenowy (DHA) i eikozapentaenowy (EPA). Podstawowym źródłem kwasu α -linolenowego w diecie człowieka są oleje roślinne- rzepakowy, sojowy, lniany oraz inne tłuszcze pochodzenia roślinnego uzyskiwane w wyniku procesów przeestryfikowania, między innymi tzw. margaryny miękkie. Szczególnie bogaty w ten kwas jest olej lniany oraz olej z lnianki, w których kwas ten stanowi odpowiednio 52% i 40% wszystkich kwasów tłuszczowych. W oleju rzepakowym ALA stanowi około 9% kwasów tłuszczowych, a w sojowym około 6% [12].

Unikatowym źródłem bogatym w EPA i DHA są ryby, a w szczególności ryby tłuste, takie jak makrela, łosoś, śledź, szprot, sardynki [4, 8, 10, 12÷18]. Poziom EPA i DHA oraz ich wzajemne proporcje w tłuszczu rybim zależą od gatunku i stanu fizjologicznego ryb, pory roku oraz akwenu. Przykładem mogą być ryby mórz północnych, zawierające więcej EPA i mórz południowych, zawierające więcej DHA [4, 15, 16, 19].

Ponadto ryby żyjące w stanie naturalnym charakteryzują się większą zawartością kwasów tłuszczowych omega-3, a mniejszą omega-6, niż te same gatunki hodowlane [4, 16, 19].

Średnią zawartość długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych omega-3 w wybranych rybach i bezkręgowcach przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Średnia zawartość EPA i DHA w wybranych rybach i bezkręgowcach w g/100g

	Śledź	Dorsz	Makrela	Pstrąg	Krab	Ostryga
Tłuszcz ogółem	9,0	0,7	13,9	7,7	1,0	2,0
EPA	0,7	0,1	0,9	0,1	0,2	0,3
DHA	0,9	0,2	1,6	0,5	0,1	0,2

Źródło: [15]

Zasobnymi źródłami kwasów omega-6 są oleje roślinne: słonecznikowy, kukurydziany, z nasion wiesiołka [8, 16, 17] oraz żółtka jaj, tłuste ryby morskie i owoce morza [8].

3. Rola wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w organizmie człowieka w wybranych schorzeniach

Badania obserwacyjne i kliniczne wskazują, iż zmieniając sposób żywienia można zmniejszyć ryzyko występowania przewlekłych chorób niezakaźnych, które są główną przyczyną zgonów w krajach rozwiniętych. Dlatego też WHO oraz towarzystwa naukowe opracowują rekomendacje dotyczące zasad prawidłowego żywienia oraz zasad leczenia dietetycznego w poszczególnych chorobach.

W profilaktyce i leczeniu przewlekłych chorób niezakaźnych niezbędne jest ograniczenie spożycia tłuszczu ogółem, kwasów tłuszczowych nasyconych oraz izomerów trans nienasyconych kwasów tłuszczowych. Z badań epidemiologicznych wynika, że wysokie spożycie tych tłuszczów dodatnio koreluje z ryzykiem choroby niedokrwiennej serca, nowotworów, cukrzycy i otyłości [3, 20].

Zamiast tłuszczów pochodzenia zwierzęcego należy do diety wprowadzić tłuszcze roślinne, które są źródłem wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Istotne znaczenie dla prawidłowej diety w prewencji chorób cywilizacyjnych ma wprowadzenie do diety ryb, zawierających wielonienasycone kwasy tłuszczowe n-3 [3].

3.1. Wpływ WKT na rozwój i zdrowie dziecka

Żywnienie należy do najważniejszych czynników środowiskowych odpowiedzialnych za stan zdrowia we wszystkich okresach życia człowieka, a szczególnie w okresie wczesnego dzieciństwa. W ustalaniu zaleceń żywieniowych dla dzieci istotna jest nie tylko ilość dostarczanego w pożywieniu tłuszczu, ale również udział poszczególnych kwasów tłuszczowych [1].

Kwasy omega-3, a zwłaszcza kwas dokozaheksaenowy, odgrywają znaczącą rolę w rozwoju mózgu dzieci. Uczestniczą również w budowie siatkówki oka, wpływają korzystnie na rozwój poznawczy oraz poziom inteligencji niemowląt i małych dzieci [8, 21]. Spożywanie odpowiednich ilości kwasów omega-3 wpływa na prawidłowy rozwój płodu [1, 8], wyższą średnią masę urodzeniową noworodków, a w konsekwencji za prawidłowy rozwój noworodka i małego dziecka. W okresie życia płodowego dziecko czerpie długołańcuchowe wielonienasycone kwasy tłuszczowe przez łożysko od matki. Najbardziej decydującym dla rozwoju mózgu i narządu wzroku płodu jest trzeci trymestr ciąży. W tym czasie zachodzi intensywne gromadzenie kwasu DHA w tkance mózgowej. Szczególnie narażone na niedobory długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych są wcześniaki. Niedobór kwasów omega-3 powoduje zaburzenia w rozwoju i funkcjonowaniu układu nerwowego u dzieci urodzonych przedwcześnie. Przedwczesny poród uniemożliwia gromadzenie kwasu DHA przez płód w tkankach i dziecko musi go czerpać z pokarmu, ponieważ własna synteza nie jest wystarczająca. Pokarm kobiecy zawiera procentowo dużą ilość tłuszczu oraz ma optymalny i unikalny skład [1]. Mleko matki zawiera LA, ALA, DHA oraz EPA, których ilość jest uzależniona od diety matki, natomiast mleko krowie nie zawiera DHA i EPA, ma także niską zawartość ALA, dlatego bardzo istotne jest karmienie niemowląt piersią [8].

Zgodnie z zaleceniami w Polsce kobiety ciężarne i niemowlęta powinny przyjmować 1-1,5g na dobę kwasów DHA i EPA. Dzieci matek, które w czasie ciąży stosowały dietę bogatą w ryby, mają wyższy poziom inteligencji i rzadziej chorują na zespół nadpobudliwości psychoruchowej (ADHD). Kwasy tłuszczowe omega-3 odpowiadają za poziom serotoniny w organizmie, co zapobiega depresji poporodowej. Spożywanie kwasów omega-3 przez matkę w okresie ciąży i przez niemowlę podczas pierwszego roku życia, zmniejsza ryzyko wystąpienia chorób alergicznych w późniejszym okresie życia dziecka [8, 22].

3.2. Choroby układu sercowo-naczyniowego

Od wielu lat bada się wpływ spożywania ryb oraz kwasów omega-3 na układ sercowo-naczyniowy. Wiele badań potwierdziło ich udział w zmniejszaniu ryzyka

zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych [8, 10, 11, 14, 23]. Kwasy omega charakteryzują się działaniem antyarytmicznym, przeciwzakrzepowym, przeciwmiażdżycowym, oraz poprawiają funkcje śródbłonna naczyniowego, redukują stężenie triglicerydów i obniżają ciśnienie tętnicze [8, 14].

W populacjach tradycyjnie charakteryzujących się wysokim spożyciem ryb takich jak Eskimosi zamieszkujący Grenlandię, rdzenni mieszkańcy Alaski, Japończycy stwierdza się niską częstość chorób układu krążenia. Obserwacje prowadzone przez 20 lat w 7 krajach (tzw. Seven Country Study) wykazały, że wśród osób, które spożywały średnio 30g ryb morskich dziennie śmiertelność z powodu choroby niedokrwiennej serca (ChNS) była o 50% niższa w porównaniu do osób rzadko spożywających ryby. Natomiast amerykańskie badania US Physicans Health Study pokazały, że spożywanie co najmniej jednego posiłku zawierającego ryby w ciągu tygodnia zmniejsza ryzyko nagłej śmierci sercowej o 48% [11].

Kwasy omega-3 wykazują także działanie przeciwzakrzepowe, co zapobiega tworzeniu się skrzepów wewnątrznaczyniowych [8, 15]. Działanie przeciwzakrzepowe długołańcuchowych kwasów tłuszczowych omega-3 wynika z przedłużenia czasu krwawienia poprzez zmniejszanie podatności płytek krwi do zlepiania się w wyniku hamowania tworzenia substancji silnie protrombotycznych (TXA₂, interleukina 1(IL-1), lipoproteina a i PAF (platelet aggregation factor)), wzrostu poziomu prostacyklin hamujących agregację płytek oraz zwiększenia aktywności tkankowych aktywatorów plazminogenu (t-Pa) i angiotensyny III. Efekt ten jest widoczny szczególnie u Eskimosów, u których obserwuje się znacznie dłuższy czas krwawienia niż wśród Europejczyków, co zapobiega tworzeniu się skrzepów wewnątrznaczyniowych [15].

Kwasy tłuszczowe omega-3 (DHA i EPA) wpływają korzystnie na gospodarkę lipidową w organizmie człowieka poprzez obniżanie stężenia cholesterolu całkowitego, triglicerydów oraz cholesterolu frakcji LDL jednocześnie podwyższając stężenie cholesterolu frakcji HDL we krwi. Zaobserwowano, że dieta bogata w ryby wpływa na zmniejszenie triglicerydów o 38% i zwiększenie stężenia cholesterolu frakcji HDL o 25% nie powodując zmian w stężeniu cholesterolu frakcji LDL. Rezultaty tych badań sugerują, że wzrost stężenia cholesterolu frakcji HDL o 1mg/dl zmniejsza ryzyko wieńcowe o około 2-3%. Kwasy tłuszczowe DHA i EPA poprzez działanie hipolipemizujące i korzystny wpływ na śródbłonek naczyniowy odgrywają istotną rolę w prewencji rozwoju miażdżycy hamując adhezję i agregację płytek krwi [14, 24].

3.3. Choroby nowotworowe

Obecnie obserwuje się gwałtowny wzrost zachorowalności na nowotwory, dlatego też szczególny nacisk kładzie się na profilaktykę pierwotną i poszukuje składników zapobiegających ich rozwojowi. Choroby nowotworowe charakteryzują się podwyższonym stężeniem kwasów omega-6 we krwi, które z udziałem enzymu cyklooksygenazy 2 (COX-2) mogą zostać przekształcone w eikozanoidy, które przyspieszają rozwój guzów nowotworowych [8]. Dowiedziono, że nadmiar kwasu linolowego

(z szeregu omega-6) w diecie jest powiązany z podwyższoną zachorowalnością na raka gruczołu krokowego, jelit oraz piersi. Uważa się natomiast, że kwasy omega-3 wykazują działanie antynowotworowe, co potwierdzają dane epidemiologiczne wśród populacji spożywających duże ilości ryb. Wykazano, że kwas DHA przyczynia się do apoptozy komórek nowotworowych okrężnicy oraz redukuje wzrost komórek rakowych gruczołu sutkowego. Zaobserwowano także wpływ EPA i DHA na stężenie prostaglandyny E2 w komórkach nowotworowych płuca odpowiedzialnej za postęp procesu nowotworowego oraz tworzenie przerzutów [17].

Stężenie kwasów omega-3 jest mniejsze w tkankach nowotworowych niż w tkankach prawidłowych. Dlatego też przyspieszony wzrost nowotworu może być wynikiem zaburzenia odpowiedniego stosunku kwasów omega-6 do omega-3 [8].

3.4. Otyłość i zespół metaboliczny

Otyłość jest jedną z najpoważniejszych chorób cywilizacyjnych, ponieważ sprzyja rozwojowi dyslipidemii, choroby wieńcowej, cukrzycy typu 2 oraz nadciśnienia tętniczego. Wielonienasycone kwasy tłuszczowe omega-3 odgrywają istotną rolę w profilaktyce i leczeniu otyłości [8, 25]. Osoby z prawidłową masą ciała mają wyższe stężenie kwasów omega-3 w osoczu w porównaniu do osób otyłych.

Osoby dorosłe z nadwagą, spożywając dietę bogatą w kwasy omega-3, odczuwają mniejszy głód dwie godziny po posiłku niż osoby, które stosują dietę ubogą w te kwasy. Kwasy EPA i DHA korzystnie wpływają na przyspieszenie metabolizmu, zmniejszają apetyt oraz zwiększają uczucie sytości, co prowadzi do ograniczenia spożycia żywności.

Inne skutki zaobserwowano podczas metabolizmu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych omega-6, głównie kwasu arachidonowego. W procesie tym powstają endokannabinoidy biorące udział w regulacji apetytu i przemiany materii. Aktywują receptory kannabinoidów CB1 i CB2 w mózgu, wątrobie, tkance tłuszczowej i przewodzie pokarmowym, powodując wzrost apetytu, a tym samym większą akumulację tkanki tłuszczowej. Kwasy tłuszczowe omega-3 i omega-6 mogą regulować odkładanie się tkanki tłuszczowej w organizmie, a tym samym wpływać na masę ciała. Wraz ze wzrostem otyłości rośnie częstotliwość występowania zespołu metabolicznego, co przyczynia się do powstawania chorób układu krążenia oraz cukrzycy typu 2 [8].

W prewencji otyłości wykazano korzystny wpływ diety śródziemnomorskiej, w której znajdują się kwasy omega-3 [26, 27].

3.5. Działanie przeciwzapalne

Stany zapalne spowodowane są nadmiernym wytwarzaniem eikozanoidów – prostaglandyny E₂ i leukotrienów B₄, które powstają z kwasów omega-6. Zwiększone spożycie kwasów omega-3 w diecie w stosunku do omega-6, a więc wzrost stężenia EPA i DHA w organizmie, zmniejsza częstość występowania wielu chorób przewlekłych o podłożu zapalnym. Przeciwzapalne działanie kwasów EPA i DHA zaobserwowano

u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów, wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, toczeniem rumieniowatym, chorobą Crohna, łuszczycą i migrenowym bólem głowy [8].

Reumatoidalne zapalenie stawów jest najczęstszą układową chorobą reumatyczną [17]. Stosowanie kwasów omega-3 przyczynia się do zmniejszenia sztywności porannej, łagodzi bóle kostne, wpływa na poprawę sprawności fizycznej oraz zmniejszenie stosowania dawek niesteroidowych leków przeciwzapalnych [8, 28]. Uznaje się, że skuteczna dawka EPA i DHA wynosi 3g na dobę. Powoduje ona skuteczne zmniejszenie leukotrienów B₄ uwalnianych z granulocytów obojętnochłonnych wraz ze spadkiem interleukiny 1 uwalnianej z monocytów. Oba te mediatory są przyczyną procesu zapalnego w reumatoidalnym zapaleniu stawów. Kwasy tłuszczowe omega-3 działają wspomagająco na przebieg terapii, nie mogą jednak zastąpić standardowego leczenia [17].

Korzystny wpływ kwasów omega-3 zaobserwowano również w leczeniu dzieci chorych na młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów. Jest to najczęstsza przewlekła choroba reumatyczna stawów u dzieci, która charakteryzuje się stanem zapalnym i bólem stawów, gorączką, zmęczeniem, wysypką oraz zapaleniem błony naczyniowej oka. Celem leczenia jest łagodzenie bólu, zmniejszenie obrzęku, zapobieganie uszkodzeniu stawów i powikłaniom. Dieta bogata w kwasy omega-3 łagodzi objawy kliniczne i aktywność choroby oraz zmniejsza zapotrzebowanie na niesteroidowe leki przeciwzapalne [8].

Najnowsze badania wskazują związek atopowego zapalenia skóry z zaburzonym metabolizmem kwasu linolowego. Udowodniono bowiem w badaniach skuteczność kwasów omega-6 w atopowym zapaleniu skóry. Bardzo wysokie dawki kwasu linolowego bądź niewielkie dawki kwasu γ -linolenowego zmniejszają świąd wywołany przez dermatozę [17].

3.6. Zaburzenia psychiczne i choroby układu nerwowego

Wielonienasycone kwasy tłuszczowe omega-3 pełnią w organizmie człowieka trzy kluczowe role – strukturalną w budowie komórek, są źródłem eikozanoidów oraz biorą udział w transdukcji sygnału między komórkami. Zarówno kwas dokozahexaenowy jak i kwas eikozapentaenowy są niezbędne w procesach rozwojowych i czynnościowych ośrodkowego układu nerwowego, w tym dojrzewania neuronów, ich migracji, synaptogenezy, plastyczności, neurogenezy oraz neurotransmisji. Tłuszcze stanowią 50-60% suchej masy mózgu, natomiast DHA stanowi do 50% całej frakcji błonowych fosfolipidów mózgu [29].

Dane epidemiologiczne wskazują na zależność między spożyciem ryb w poszczególnych regionach świata a występowaniem depresji. Zwiększona zachorowalność na depresję zaobserwowano w regionach, w których występuje niskie spożycie kwasów omega-3 [17, 29].

Poziom EPA w mózgu jest bardzo niski w porównaniu z DHA. EPA może mieć korzystny wpływ na pracę mózgu i zapobiegać zaburzeniom nastroju, ponieważ popra-

wia przepływ krwi, zapewniając lepszy dostęp składników odżywczych, np. glukozy do mózgu. Zwiększenie poziomu EPA wpływa na poprawę funkcjonowania naczyń.

Deficyt DHA powoduje zaburzenia stabilności błony komórkowej w neuronach oraz przekazywania serotoniny, norepinefryny i dopaminy, przyczyniając się do powstawania zaburzeń poznawczych i zaburzeń nastroju występujących np. w depresji.

Pozytywny wpływ wielonienasyconych kwasów tłuszczowych z rodziny omega-3 zaobserwowano w leczeniu zaburzeń psychicznych i chorób układu nerwowego, w tym depresji, schizofrenii oraz choroby Alzheimera [30].

Choroba Alzheimera jest najbardziej rozpowszechnioną wśród starszych osób postępującą, degeneracyjną chorobą ośrodkowego układu nerwowego, charakteryzującą się ubytkami neuronalnymi. Najbardziej znaczącym objawem tej choroby jest utrata pamięci oraz zaburzenia nastroju, funkcji poznawczych, osobowości i zachowania. Jest ona leczona objawowo poprzez koncentrowanie się na zaburzeniach pamięci i poprawie funkcji poznawczych. Oznakami choroby Alzheimera jest występowanie blaszek amyloidowych, nazywanych blaszkami starczymi, w ścianach naczyń krwionośnych i stopniowe zanikanie kory mózgowej. Badania zasugerowały, że wielonienasycone kwasy tłuszczowe omega-3 łagodzą objawy tej choroby. Wykazano wpływ DHA na wzmacnianie działania neuronów, ochraniając dendryty przed patologicznymi zmianami. Kwasy tłuszczowe omega-3 uznano za istotny czynnik obniżający ryzyko rozwoju choroby Alzheimera [31].

3.7. Wpływ WKT na skórę

Skóra stanowi barierę ochronną utrzymując równowagę między środowiskiem wewnętrznym a zewnętrznym organizmu. Mimo, że jest stosunkowo cienka, jeśli jest zdrowa, doskonale spełnia swoje funkcje ochronne. Możliwe jest to dzięki warstwie rogowej naskórka charakteryzującej się specyficzną strukturą. Istotną rolę spełniają również lipidy oraz keratynocyty wpływające na utrzymanie właściwego nawilżenia skóry.

Czynniki egzogenne i endogenne mogą zaburzyć prawidłowy skład lipidów, a przez to funkcje bariery ochronnej naskórka. Czynnikiem egzogennym mogą być detergenty, promieniowanie UV oraz inne czynniki atmosferyczne. Do czynników endogennych zalicza się wszelkie procesy chorobowe skóry, stany zapalne oraz zaburzenia metabolizmu ceramidów i WKT w naskórku.

Deficyt kwasu linolowego i α -linolenowego wiąże się z objawami suchej skóry. W przypadku prawidłowo przebiegających procesów fizjologicznych GLA uzyskiwany jest na drodze reakcji enzymatycznej z LA. Wraz z wiekiem zmniejsza się ilość delta-6 desaturazy, zatem maleje stężenie GLA i innych substancji aktywnych biologicznie, powstających w toku dalszych przemian biochemicznych tego kwasu. Niedobór LA, czy też zaburzenia metabolizmu GLA są przyczyną występowania wielu schorzeń skóry w tym nadmiernego wysuszenia. Niedobór delta-6 desaturazy oraz ceramidów występuje

np. w atopowym zapaleniu skóry. Zaburzenia metabolizmu NNKT są jedną z możliwych przyczyn powstawania łuszczycy. W przypadku suchości skóry wywołanej deficytem lub zaburzeniami metabolizmu WKT, obserwuje się zaburzenia keratynizacji czyli rogowacenia naskórka. Za regulację tych procesów odpowiedzialne są prostaglandyny. Zaburzenia tego typu notuje się w takich schorzeniach jak trądzik pospolity, łuszczycyca, rybia łuska i atopowe zapalenie skóry. Skuteczność stosowania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w przypadku suchości skóry jest potwierdzone badaniami. Zaleca się w tych schorzeniach stosowanie diety bogatej w NNKT, a szczególnie w kwasy omega-3 w celu poprawy kondycji skóry [6].

4. Podsumowanie

Zmiana stylu życia, a zwłaszcza poprawa nawyków żywieniowych odgrywa istotną rolę w prewencji przewlekłych chorób niezakaźnych. Podstawą postępowania jest utrzymanie prawidłowej masy ciała oraz ograniczenie spożycia tłuszczów zwierzęcych na rzecz tłuszczów roślinnych i ryb, które są źródłem wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Szczególne istotne dla organizmu człowieka są kwasy tłuszczowe omega-3 i omega-6. W Polsce spożycie kwasów omega-3 jest niewystarczające. W celu obniżenia ryzyka występowania chorób cywilizacyjnych spożycie kwasów EPA i DHA powinno wynosić 0,5g na dzień. Szczególnie ważne są wzajemne proporcje kwasów tłuszczowych n-6 do n-3 w diecie, powinny one wynosić (4-5):1. Nadmierna dysproporcja pomiędzy kwasami n-6 do n-3 może prowadzić do powstawania stanów patologicznych, spowodowanych zaburzeniami w syntezie eikozanoidów.

Liczne badania potwierdzają, że kwasy te pozytywnie wpływają na układ sercowo-naczyniowy, funkcjonowanie osób z zaburzeniami psychicznymi, wykazują działanie przeciwzapalne, wspomagają leczenie chorób nowotworowych, otyłości i innych chorób cywilizacyjnych. Kwasy omega znajdują zastosowanie w monoterapii niektórych schorzeń, są również wykorzystywane jako środki umożliwiające obniżenie dawki leków podstawowych.

Literatura

1. Pac-Kożuchowska E., *Kwasy tłuszczowe omega-3 a stan zdrowia dzieci*, Endokrynologia Pediatria 7 4(25), 2008, s. 49-53
2. Szymański A., *Dieta a zdrowie*, Zeszyty Naukowe WSKFiT 9, 2014, s. 11-18
3. Kłosiewicz-Latoszek L., *Zalecenia żywieniowe w prewencji chorób przewlekłych*, Probl Hig Epidemiol 90(4), 2009, s. 447-450
4. Marciniak-Łukasik K., *Rola i znaczenie kwasów tłuszczowych omega-3*, ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość 6(79), 2011, s. 24-35
5. Łoźna K., Kita A., Styczyńska A., Biernat J., *Skład kwasów tłuszczowych zalecanych w profilaktyce chorób cywilizacyjnych*, Probl Hig Epidemiol 93(4), 2012, s. 871-875
6. Bojarowicz H., Woźniak B., *Wielonienasycone kwasy tłuszczowe oraz ich wpływ na skórę*, Probl Hig Epidemiol 89(4), 2008, s. 471-475

7. Przysławski J., *Podstawowe składniki odżywcze. II. 3. Tłuszczowce (lipidy)*, [w:] Gertig H., Przysławski J. (red.): *Bromatologia – zarys nauki o żywności i żywieniu*, Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa 2007
8. Sicińska P., Pytel E., Kurowska J., Koter-Michalak M., *Suplementacja kwasami omega w różnych chorobach*, *Postępy Hig Med. Dosw* (online) 69, 2015, s. 838-852
9. Usydus Z., Szlinder-Richert J., *Wielonienasycone kwasy tłuszczowe z rodziny omega-3*, <http://www.rybynapolskimrynku.pl/2010/10/wielonienasycone-kwasy-tluszczowe-z-rodziny-omega-3/> (24. 09. 2016r.)
10. Broncel M., *Blaski i cienie stosowania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych omega-3 w chorobie niedokrwiennej serca – wyniki badania ALPHA OMEGA*, *Kardiologia Oparta na Faktach* 4, 2010, s. 326-332
11. Nowicka G., *Ryby – źródło wielonienasyconych kwasów tłuszczowych o kluczowym znaczeniu dla zdrowia: wpływ rzeźci na obniżenie ich prozdrowotnego działania*, *Studia Ecologiae et Bioethicae* 3, 2005, s. 117-125
12. Dybkowska E., *Rola kwasów tłuszczowych w żywieniu i zdrowiu człowieka*, [w:] Wolska-Adamczyk A. (red.): *Znaczenie racjonalnego żywienia w edukacji zdrowotnej*, WSiZ, Warszawa 2015
13. Stańczykiewicz B., Nowacki D., Jakubik M., Rymaszewska J., *Wpływ kwasów omega-3 (DHA) na zaburzenia ośpienne, w tym chorobę Alzheimera w badaniach zwierzęcych*, *Psychogeriatra Polska* 7(2), 2010, s. 71-82
14. Wcisło T., Rogowski W., *Rola wielonienasyconych kwasów tłuszczowych omega-3 w organizmie człowieka*, *Via Medica* 11, 3, 2006, s. 39-43
15. Kolanowski W., *Długolańcuchowe wielonienasycone kwasy tłuszczowe omega-3 – znaczenie zdrowotne w obniżaniu ryzyka chorób cywilizacyjnych*, *Bromat. Chem. Toksykol.* XL 3, 2007, s. 229-237
16. Stołyhwo-Szpajer M., Piękosz K., Bellwon J., Stołyhwo A., Rynkiewicz A., *Wielonienasycone kwasy tłuszczowe i ich wpływ na czynniki ryzyka miażdżycy ze szczególnym uwzględnieniem ciśnienia tętniczego*, *Via Medica* 5, 3, 2001, s. 211-219
17. Domagała P., Żuralska R., Mziray M., *Rola niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych oraz ich znaczenie w wybranych schorzeniach*, *Pielęgniarstwo XXI wieku* 1(46), 2014, s. 27-30
18. Bałasińska B., Jank M., Kulasek G., *Właściwości i rola wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w utrzymaniu zdrowia ludzi i zwierząt*, *Życie Weterynaryjne* 85(9), 2010, s. 749-756
19. Holman R.T., *The slow Discovery of the importance of omega3 essential fatty AIDS in human health*, *J. Nutr.* 128, 1998, s. 427-433
20. Wallach S.K., Mozaffarian D., *Trans fatty AIDS and non lipid risk factors*, *Curr Athroscler Rep.* 11, 2009, s. 423-433
21. Innis S.M., Friesen R.W., *Essential n-3 fatty acids in pregnant women and early visual acuity maturation in term infants*, *Am. J. Clin. Nutr.* 87, 2008, s. 548-557
22. Furuholm C., Warstedt K., Fageras M., Falth-Magnusson K., Larson J., Fredriksson M., Duchon K., *Allergic disease in infants up to 2 years of age in relation to plasma omega-3 fatty acids and maternal fish oil supplementation in pregnancy and lactation*, *Pediatr. Allergy Immunol.* 22, 2011, s. 505-514

23. Zdrojewicz Z., Adamek M., Machelski A., Wójcik E., *Wpływ kwasów tłuszczowych (omega) zawartych w rybach na organizm człowieka*, Medycyna Rodzinna 3(18), 2015, s. 137-143
24. Bartkowiak R., Wożakowska-Kapłon B., Janion M., *Znaczenie omega-3 wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w zapobieganiu chorobom serca i naczyni-dotychczasowy stan wiedzy*, Pol. Przegl. Kardiol. 4, 2002, s. 385-387
25. Ahima R.S., Antwi D.A., *Brain regulation of appetite and satiety*, Endocrinol. Metab. Clin. North A. 37, 2008, s. 811-823
26. Wolańska D., Kłosiewicz-Latoszek L., *Struktura spożycia kwasów tłuszczowych a profil lipidowy u osób z nadwagą i otyłością*, Rocz Państw Zakł Hig 2(63), (2012), s. 155-162
27. Mizgier M., Jeszka J., Jarząbek-Bielecka G., *Rola diety śródziemnomorskiej w zapobieganiu nadwadze i otyłości, niektórym chorobom dietozależnym oraz jej wpływ na długość życia*, Nowiny Lekarskie 6 (79), 2010, s. 451-454
28. Jańczyk W., Socha P., *Kliniczne efekty suplementacji wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi ω-3*, Standardy Medyczne/Pediatrics 6, 2009, s. 10-17
29. Krawczyk K., Rybakowski J. *Potencjalizacja leków przeciwdepresyjnych kwasami tłuszczowymi omega-3 w depresji lekoopornej*, Psychiatria Polska 4, 2014, s. 585-598
30. Wilczyńska A., *Kwasy tłuszczowe w leczeniu i zapobieganiu depresji*, Psychiatria Polska 4, 2013, s. 657-666
31. Wilczyńska A., *Kwasy tłuszczowe w diecie człowieka a jego funkcjonowanie poznawcze i emocjonalne*, Neuropsychiatria i Neuropsychologia 7(1), 2012, s. 35-42

Znaczenie zdrowotne wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w obniżaniu ryzyka chorób cywilizacyjnych

Szczególne znaczenia dla wartości tłuszczów jadalnych ma skład kwasów tłuszczowych, a zwłaszcza zawartość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Kwasy polienowe (PUFA) nie są syntetyzowane w organizmie człowieka i muszą być dostarczane z pożywieniem. Ważną cechą PUFA jest ich rola w zapobieganiu szeregu schorzeń określanych mianem chorób cywilizacyjnych. Wśród nich wyróżniamy dwie grupy: kwasy omega-3 i omega-6. Głównym źródłem kwasów omega-3 są przede wszystkim tłuste ryby morskie. Natomiast w kwasy omega-6 obfitują przede wszystkim oleje roślinne.

W pracy przedstawiono budowę, źródła występowania kwasów omega-3 i -6, określono ich terapeutyczny wpływ na różne choroby.

Słowa kluczowe: żywienie, kwasy omega-3, kwasy omega-6

Health importance polyunsaturated fatty acid in reducing the risk of life-style related diseases

The nutritional value of edible fats depends mainly on fatty acid composition, especially of polyunsaturated fatty acid content. PUFA cannot be synthesized in the human body and must be supplied with food. An important feature of PUFA is their role in the prevention of several diseases called 'lifestyle diseases'.

The unsaturated fatty acids are classified into two groups: omega-3 and omega-6. The main source of omega-3 acids are predominantly fat-rich sea fish. Omega-6 acids are present in large amounts mainly in plants oils.

The purpose of this study is to present the structure and sources of omega-3 and omega-6 fatty acids and discuss the problems concerning the therapeutic use of these compounds in various disorders.

Keywords: nutrition, omega-3 fatty acids, omega-6 fatty acids

Fitoterapia w leczeniu pomocniczym cukrzycy

1. Wstęp

Cukrzyca jest przewlekłą chorobą metaboliczną o zróżnicowanej etiologii, która występuje, gdy komórki β trzustki nie są w stanie wytwarzać wystarczającej ilości insuliny, bądź gdy organizm nie potrafi skutecznie wykorzystać tego hormonu. Cukrzyca charakteryzuje się chroniczną hiperglikemią, która prowadzić może do zaburzeń w metabolizmie węglowodanów, lipidów oraz białek, czego następstwem mogą być powikłania naczyniowe, nerkowe, siatkówkowe oraz neuropatyczne [1]. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO, *ang. World Health Organization*) oraz Amerykańskie Towarzystwo Diabetologiczne (ADA, *ang. American Diabetes Association*) rozróżnia cztery typy cukrzycy: cukrzycę typu 1 (autoimmunologiczną, idiopatyczną), cukrzycę typu 2 (środowiskową, o podłożu genetycznym), cukrzycę ciężarnych oraz inne specyficzne typy cukrzycy [2].

Terapia cukrzycy opiera się przede wszystkim na wyrównywaniu zaburzeń metabolicznych, łagodzeniu i zapobieganiu powikłaniom choroby, jak również dąży ona do poprawy jakości życia pacjentów chorych na cukrzycę. Wśród metod stosowanych w leczeniu cukrzycy wyróżnia się leczenie nefarmakologiczne obejmujące zmianę stylu życia, leczenie farmakologiczne oraz leczenie chorób towarzyszących w tym schorzeń będących powikłaniami cukrzycy. Pomocniczo w leczeniu cukrzycy oraz towarzyszących jej powikłań stosuje się również substancje roślinne, w których stwierdzono obecność związków hipoglikemizujących o różnym mechanizmie działania.

2. Cel pracy oraz metodyka

Celem niniejszej pracy było przedstawienie oraz sklasyfikowanie ze względu na mechanizm działania substancji roślinnych, stosowanych pomocniczo w leczeniu cukrzycy oraz jej powikłań. Wybrano najczęściej opisywane w piśmiennictwie gatunki roślin. Przegląd literatury oparto na publikacjach dostępnych w bazie PubMed.

¹ igussa@wp.pl, Katedra i Zakład Farmakognozji i Fitochemii, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

² Katedra i Zakład Farmakognozji i Fitochemii, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

³ Katedra i Zakład Farmakognozji i Fitochemii, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

3. Fitoterapia cukrzycy

Obecnie we wspomaganiu leczenia cukrzycy oraz jej powikłań zyskuje na znaczeniu stosowanie preparatów pochodzenia roślinnego. Związane jest to z coraz częściej publikowanymi doniesieniami naukowymi na temat korzystnych właściwości farmakologicznych preparatów roślinnych, co w konsekwencji prowadzi do wprowadzenia na rynek produktów o udowodnionym działaniu hipoglikemicznym. Zwykle preparaty te będące mieszkankami ziołowymi zalecane są pomocniczo w leczeniu cukrzycy w połączeniu z lekami przeciwcukrzycowymi oraz we wczesnym stadium cukrzycy typu 2. Podstawowe leki, które są powszechnie stosowane w leczeniu cukrzycy na całym świecie, zostały uzyskane właśnie z roślin. Metformina (dimetylobiguanid) będąca obecnie najczęściej przepisywanym doustnym lekiem przeciwcukrzycowym, swoje pochodzenie zawdzięcza biguanidom obecnym w liściach rutwy lekarskiej (*Galega officinalis*).

Fitoterapeutyki stosowane pomocniczo w leczeniu cukrzycy oraz w terapii powikłań cukrzycowych możemy podzielić ze względu na mechanizm działania na:

- substancje roślinne o działaniu hipoglikemicznym (inhibitory α -amylazy, inhibitory α -glukozydazy, surowce zwiększające wydzielanie insuliny, surowce nasilające działanie insuliny);
- substancje roślinne stosowane w terapii powikłań cukrzycowych (inhibitory lipazy, inhibitory reduktazy aldozowej);
- substancje roślinne stosowane w celu ochrony komórek β trzustki przed apoptozą.

3.1. Substancje roślinne stosowane pomocniczo w leczeniu cukrzycy o działaniu hipoglikemicznym

Za właściwości hipoglikemiczne roślin odpowiadają związki chemiczne zwane glukokininami. Po wyizolowaniu insuliny z surowicy młodych cieląt, Collip i Best odnotowali obecność substancji insulinopodobnej w materiale roślinnym, nazwaną później glukokininą. Odkrycie tego hormonu w tkankach roślin wyższych, jak również w mikroorganizmach, było przełomem, gdyż wskazywało na korelację niektórych procesów fizjologicznych pomiędzy królestwem roślin a zwierząt [3]. Wysłunięto hipotezę, iż w organizmach bogatych w glikogen muszą istnieć hormony spełniające funkcję insuliny. W procesy wzrostu i rozwoju roślin zaangażowana jest glukoza, która magazynowana jest w postaci skrobi, będącej odpowiednikiem glikogenu obecnego w organizmach zwierzęcych. Ze względu na zbliżoną budowę aminokwasową i prawdopodobną możliwość wiązania się z receptorem insulinowym glukokininy, poprzez naśladowanie szlaków sygnałowych ludzkiej insuliny, okazały się skuteczne w regulacji stężenia glukozy we krwi. W badaniach przeprowadzonych na szczurach z indukowaną cukrzycą typu 1, wykazano, że podanie wyizolowanych glukokinin wraz

z inhibitorami proteaz wykazuje działanie hipoglikemiczne [4]. Stwierdzono również, że związki te hamują wytwarzanie i zaburzają funkcję glukagonu poprzez aktywację ścieżki sygnałowej kinazy 3-fosfatydyloinozytolu [5÷7].

Rośliny wytwarzają składniki, które służą im jako naturalne środki odstraszające szkodniki i patogeny. Do takich związków należą inhibitory hamujące aktywność enzymów trawiennych owada prowadząc do jego śmierci np. inhibitory α -amylazy, inhibitory proteinaz. Te właściwości stwarzają możliwości zastosowania tych związków w leczeniu chorób o podłożu metabolicznym [8]. Wśród różnych gatunków roślin wyróżnia się takie, które syntetyzują inhibitory α -amylazy i α -glukozydazy zmniejszające wchłanianie glukozy z przewodu pokarmowego i w ten sposób zmniejszające stężenie glukozy we krwi.

Do najważniejszych surowców roślinnych o działaniu hipoglikemicznym należą: kora cynamonowca (*Cinnamomum cassia*), owocnia fasoli zwyczajnej (*Phaseolus vulgaris*), ziele rutwicy lekarskiej (*Galega officinalis*), kłącze perzu właściwego (*Agropyron repens*), liść i korzeń pokrzywy zwyczajnej (*Urticae dioica*), liść miłorzębu japońskiego (*Ginkgo biloba*), liść morwy białej (*Morus alba*), nasiona kozieradki pospolitej (*Trigonella foenum-graecum*) oraz liść borówki czernicy (*Vaccinium myrtillus*).

3.1.1. Inhibitory α -amylazy

Enzym α -amylaza (E.C.3.2.1.1) występuje w układzie pokarmowym. Odpowiedzialny jest za katalizowanie reakcji rozkładu polisacharydów (np. skrobi) poprzez hydrolizę wiązań α -1,4-glikozydowych, co skutkuje powstaniem cząsteczek o skróconym łańcuchu polisacharydowym (np. disacharydu maltozy). W dalszym etapie maltoza jest rozkładana do manosacharydu, jakim jest glukoza, gdyż tylko monosacharydy mogą być wchłonięte z układu pokarmowego. Inhibitory α -amylazy hamując rozkład polisacharydów pośrednio mogą zmniejszać wchłanianie glukozy i w ten sposób obniżać stężenie glukozy we krwi.

Do substancji roślinnych syntetyzujących związki wykazujące aktywność inhibitorów α -amylazy należy przede wszystkim owocnia fasoli zwyczajnej (*Phaseolus vulgaris*). Nasiona są bogate w glikoproteiny, aminokwasy, kwas krzemowy, sole mineralne (chrom, sód, potas, krzem), kwasy fenolowe, jak również w trygonelinę. Za działanie przeciwcukrzycowe odpowiedzialna jest krzemionka, aminokwas arginina, chrom, a przede wszystkim glikoproteina nazwana fasolaminą. W nasionach tej rośliny występują 3 izoformy fasolaminy (α -A1, α -A12, α -AIL). Tylko izoforma α -A1 odpowiedzialna jest za hamowanie aktywności ludzkiej α -amylazy trzustkowej. Glikoproteina ta występuje wyłącznie w liścieniach dojrzałych nasion fasoli zwyczajnej. Fasolamina zmniejsza aktywność α -amylazy występującej u ssaków i owadów, natomiast nie oddziałuje na ten enzym w tkankach roślinnych [9].

Badacze stwierdzili, iż preparaty zawierające surową glikoproteinę wyizolowaną z nasion fasoli zwyczajnej wykazują zbyt małą aktywność farmakologiczną oraz charakteryzują się małą stabilnością farmakokinetyczną. W celu poprawy profilu farmakologicznego, opracowali zagęszczony produkt będący inhibitorem α -amylazy. Stwierdzono, że produkt w warunkach *in vitro* powodował inaktywację α -amylazy znajdującej się w ślinie oraz dwunastnicy. Wykazano również, że aktywność inhibitora α -amylazy jest ściśle uzależniona od zastosowanej dawki [10].

3.1.2. Inhibitory α -glukozydazy

Właściwości hamowania aktywności α -glukozydazy opisano dla wyciągów wodnych: morwy białej (*Morus alba*), miłorzębu japońskiego (*Ginkgo biloba*), pokrzywy zwyczajnej (*Urtica dioica*), mniszka lekarskiego (*Taraxacum officinale*), jemioli pospolitej (*Viscum album*) oraz mirtu zwyczajnego (*Myrtus communis*). Preparaty pozyskane z tych gatunków roślin stosowane są najczęściej w postaci doustnej w przebiegu cukrzycy typu 2 [11÷13].

Enzym α -glukozydaza (EC 3.2.1.20) należy do klasy hydrolaz. Wytwarzany jest przez zlokalizowane w zagłębieniach jelita cienkiego gruczoły. Specyfika α -glukozydazy jest ukierunkowana głównie na hydrolizę wiązań α -1,4-glikozydowych oligosacharydów oraz polisacharydów, choć w tym ostatnim przypadku reakcje te zachodzą wolniej, bądź wcale. Produktem końcowym reakcji jest glukoza, która wchłania się z układu pokarmowego do krwioobiegu. W wyniku działania inhibitorów α -glukozydazy zmniejsza się w układzie pokarmowym rozkład polisacharydów, a w ten sposób również ilość glukozy wchłanianej do krwi.

Morwa biała (*Morus alba*) tradycyjnie uprawiana jest w Chinach. Za cenne leczniczo uznano korzeń, liść, jak również owoc tej rośliny. Na szczególną uwagę zasługują liście morwy białej ze względu na obecność licznych związków biologicznie czynnych. Wśród nich wyróżnić można flawonoidy (rutyna, kwercetyna), fitosterole (β -sitosterol), olejek eteryczny, kwasy organiczne, witaminy (A, B₁, B₂, C), mikroelementy, jak również alkaloid 1,5-dideoksy-1,5-imino-D-sorbitol (DNJ) [14]. Udowodniono, iż DNJ wykazuje aktywność inhibitora α -glukozydazy obecnej w jelicie cienkim, dzięki czemu zapobiega rozkładowi oligosacharydów do monosacharydów [11]. Prócz właściwości hipoglikemicznych, alkaloid ten zwiększa stężenie adiponektyny, która odpowiedzialna jest za nasilenie wrażliwości komórek tkanki mięśniowej i hepatocytów na insulinę [15].

Miłorząb japoński (*Ginkgo biloba*) jest prawdopodobnie jedną z najcenniejszych i najstarszych roślin leczniczych wykorzystywanych w dziejach medycyny naturalnej. Pozyskiwane z liści miłorzębu związki biologicznie czynne mają udowodnione działanie usprawniające krążenie krwi, zapobiegające tworzeniu się zakrzepów, wzmacniające ścianę naczyń krwionośnych oraz ochronne na komórki nerwowe.

Ekstrakty z liści miłorzębu japońskiego stosowane są również w problemach z koncentracją i zaburzeniach pamięci [16]. Wyciągi z liścia miłorzębu japońskiego mogą również obniżać stężenie glukozy we krwi. Badania *in vitro* przeprowadzone przez Sukito i Tachibana [12] potwierdziły, że związki zawarte w metanolowym wyciągu z liści *Ginkgo biloba* mają zdolność zmniejszania aktywności α -glukozydazy. W eksperymencie tym stwierdzono, że głównymi związkami chemicznymi odpowiedzialnym za ten efekt są kwasy ginkgolowe. Przydatność standaryzowanego ekstraktu z liści miłorzębu wykazano również w terapii powikłań cukrzycowych, takich jak retinopatie, nefropatie.

3.1.3. Substancje roślinne zwiększające wydzielanie insuliny

Do substancji roślinnych zwiększających wydzielanie insuliny zalicza się przede wszystkim nasiona kozieradki pospolitej (*Trigonella foenum-graecum*). Nasiona swoje działanie zawdzięczają obecności aminokwasu 4-hydroksyzoleucyny. Sauvaire i wsp. [17] wykazali, że 4-hydroksyzoleucyna zwiększa wydzielanie insuliny w sposób indukowany glukozą w stężeniu w zakresie od 100 μ mol/l do 1 mmol/l poprzez bezpośredni wpływ na komórki β trzustki. Stymulujący wpływ aminokwasu na te komórki jest ściśle zależny od stężenia glukozy. Rzeczywiście przy zbyt niskim (3 mmol/l) lub prawidłowym stężeniu glukozy (5 mmol/l) 4-hydroksyzoleucyna nie wykazuje aktywności stymulującej sekrecję insuliny. Jej aktywność stwierdza się dopiero, gdy stężenie glukozy we krwi wzrośnie ponad wartość fizjologiczną (6,6-16,7 mmol/l). Badacze wykazali ponadto, że 4-hydroksyzoleucyna nie oddziałuje z innymi naturalnymi i syntetycznymi agonistami wydzielania insuliny (leucyna, arginina, tolbutamid, aldehyd glicerynowy). Badania te wskazują, że 4-hydroksyzoleucyna mając aktywność insulintropową może być traktowana jako potencjalnie nowy lek w leczeniu cukrzycy typu 2.

3.1.4. Substancje roślinne nasilające działanie insuliny

Do najważniejszych substancji roślinnych nasilających działanie insuliny należą: kora cynamonowca (*Cinnamomum sp.*), owocnia fasoli zwyczajnej (*Phaseolus vulgaris*), liść borówki czernicy (*Vaccinium myrtillus*) oraz ziele rutwicy lekarskiej (*Galega officinalis*).

Khan i wsp. [18] dowiedli, że ekstrakty niektórych przypraw mają działanie insulino-podobne, bądź nasilające działanie insuliny. Wśród najczęściej stosowanych przypraw na uwagę zasługuje kora cynamonowca. Cynamonowiec jest wiecznie zielonym drzewem, które tradycyjnie rośnie w krajach azjatyckich. Kora cynamonowca posiada udokumentowane działanie antyalergiczne, przeciwgorączkowe, przeciwutleniające oraz antydiabetyczne [19, 20]. Potencjalny wpływ nasilający działanie insuliny wykazano

w wielu badaniach *in vitro*. Kannappan i wsp. [21] potwierdzili, że związkami chemicznymi odpowiedzialnymi za działanie insulinopodobne kory cynamonowca jest rozpuszczalny w wodzie polimer metylohydroksychalkon (MHCP). Okazało się, że MHCP jest wysoce skuteczny, zapewniając podobną aktywność biologiczną jak insulina. Wykazuje skuteczność nie tylko w zwiększeniu transportu glukozy do komórek, ale także w stymulowaniu syntezy glikogenu, który magazynowany jest w wątrobie oraz w mięśniach i wykorzystywany w okresach szczytowego zapotrzebowania na energię. MHCP okazał się działać synergistycznie z insuliną zapewniając efekt znacząco większy niż suma efektów obserwowanych po podaniu każdego z nich osobno.

Substancje roślinne takie jak owoce fasoli zwyczajnej, liść borówki czernicy oraz ziele rutwicy lekarskiej bogate są w chrom, którego obecność warunkuje prawidłowe działanie insuliny. W wielu badaniach wykazano, że pierwiastek ten uczestniczy w prawidłowej regulacji gospodarki węglowodanowej, jak również lipidowej. Mechanizm działania chromu polega na zwiększaniu liczby receptorów dla insuliny oraz na ich aktywacji [22].

3.2. Substancje roślinne stosowane w terapii powikłań cukrzycowych

Wśród powikłań cukrzycowych możemy wyróżnić zaburzenia wynikające z makro- i mikroangiopatii. Do powikłań cukrzycy będących konsekwencją mikroangiopatii zalicza się: retinopatię, nefropatię, neuropatię, zespół stopy cukrzycowej. Retinopatia cukrzycowa jest najczęstszym powikłaniem cukrzycy dotyczącym zaburzeń mikrokrążenia. Ryzyko jej wystąpienia lub innych powikłań mikronaczyniowych w cukrzycy zależy zarówno od czasu trwania jak i stopnia nasilenia hiperglikemii. Jednym z powodów rozwoju retinopatii u pacjentów chorych na cukrzycę są zaburzenia metaboliczne, w którym kluczową rolę odgrywa reduktaza aldozowa. Enzym ten uczestniczy w pierwszej reakcji szlaku polioliowego. Zwiększona aktywność reduktazy aldozowej prowadzi więc do nasilenia tego szlaku, czego wynikiem jest wzmożona synteza sorbitolu (poliolu) z glukozy. Akumulacja sorbitolu pociąga za sobą wzrost ciśnienia osmotycznego w komórkach i rozwój powikłań mikronaczyniowych, w tym retinopatii cukrzycowej [15]. W leczeniu tego powikłania stosuje się najczęściej leki będące inhibitorami reduktazy aldozowej.

Nefropatia cukrzycowa jest natomiast najczęstszą przyczyną niewydolności nerek u osób chorych na cukrzycę. Patologiczne zmiany w nerkach obejmują większość błony podstawnej kłębuszków nerkowych prowadząc w konsekwencji do niewydolności nerek. Na ogół mechanizm powstawania tego schorzenia jest podobny jak w przypadku retinopatii cukrzycowej [23].

Neuropatia cukrzycowa według Amerykańskiego Towarzystwa Diabetologicznego definiowana jest jako obecność objawów dysfunkcji nerwów obwodowych u chorych

na cukrzycę, po wykluczeniu innych przyczyn [24]. Tak jak w przypadku innych powikłań mikronaczyniowych, ryzyko rozwoju neuropatii cukrzycowej jest proporcjonalne zarówno do nasilenia, jak i czasu trwania hiperglikemii. Dokładny mechanizm uszkodzeń nerwów obwodowych towarzyszących cukrzycy nie jest znany, lecz prawdopodobnie związany jest z akumulacją polioli (sorbitol) oraz stresem oksydacyjnym [25].

W makroangiopatii cukrzycowej proces arteriosklerozy prowadzi do zmniejszenia światła tętnic w całym organizmie. Miażdżycza tętnic wynika z przewlekłego zapalenia i uszkodzenia ich ściany. W odpowiedzi na uszkodzenia i zapalenie śródbłonna naczyń, utlenione lipidy z frakcji LDL kumulują się w ścianie tętnic, by następnie monocyty zróżnicowane do makrofagów mogły gromadzić się na utlenionych lipidach, tworząc komórki piankowe. Te natomiast stymulują proliferację makrofagów, przyciąganie limfocytów T oraz akumulację kolagenu. Efektem tego procesu jest tworzenie się bogatych w lipidy blaszek miażdżycowych [26].

Jak przedstawiono powyżej główny mechanizm powstawania powikłań cukrzycowych wynika z zaburzeń w metabolizmie lipidów, węglowodanów i białek. Stąd też wśród fitofarmaceutyków stosowanych w terapii powikłań cukrzycowych wyróżnia się inhibitory lipazy trzustkowej oraz inhibitory reduktazy aldozowej.

3.2.1. Inhibitory lipazy trzustkowej

Obecnie poświęca się wiele uwagi inhibitorom lipazy, których mechanizm działania polega między innymi na zmniejszeniu wchłaniania lipidów z układu pokarmowego. W ten sposób inhibitory lipazy mogą przyczynić się do wyrównania gospodarki cholesterolowo-lipidowej organizmu i zapobiegać makroangiopatii cukrzycowej. Z drugiej strony inhibitory lipazy mogą chronić komórki β przed postępującym wyniszczeniem powodowanym akumulacją lipidów w trzustce. Ochroniając komórki β trzustki inhibitory lipazy mogą zapewnić prawidłowe wydzielanie insuliny przez te komórki.

Lipaza trzustkowa (EC 3.1.1.3) w układzie pokarmowym bierze udział w metabolizmie lipidów do wolnych kwasów tłuszczowych i monoacyloglicerolu. W dalszym etapie kwasy tłuszczowe mogą być wchłonięte z układu pokarmowego. Inhibitory lipazy trzustkowej hamując wchłanianie lipidów pośrednio mogą regulować stężenie glukozy we krwi. W tkance tłuszczowej rozkład lipidów umożliwia lipaza triacyloglicerolowa. Aktywność tego enzymu jest ściśle uzależniona od stężenia insuliny. Niedobór insuliny podczas nieleczonej cukrzycy typu 1 powoduje zmniejszenie aktywności enzymu, natomiast insulinoterapia zwiększa aktywność lipazy [27].

Podczas stosowania tetrahydrolipostatyny (Orlistat), podstawowego leku o udo- wodnionym działaniu hamującym wchłanianie lipidów, obserwuje się liczne działania niepożądane, w tym: hiperurykemię, biegunkę, nudności, podrażnienie żołądka czy

zaburzenie czynności wątroby. Obecnie dąży się więc do wprowadzenia na rynek farmaceutyczny produktów, które wykazują maksimum aktywności przy jednoczesnym minimum działań niepożądanych. Takimi lekami mogą okazać się wyciągi otrzymane z różnych gatunków roślin, u których stwierdzono występowanie związków o charakterze inhibitorów lipazy trzustkowej: strączyńiec (*Cassia mimosoides*), herbata chińska (*Camelia sinensis*), rozwar wielkokwiatowy (*Platycodon grandiflorum*), ambrozja bylicolistna (*Ambrosia artemisiifolia*), wrzos pospolity (*Calluna vulgaris*), cytryna zwyczajna (*Citrus limon*), pochryzyn japoński (*Dioscorea nipponica*), *Salacia reticulata*, wierzba mandżurska (*Salix matsudana*), lukrecja (*Glycyrrhiza uralensis*), jałowiec pospolity (*Juniperus communis*), czy też kozieradka pospolita (*Trigonella foenum graecum*) [28÷32].

W celu zbadania wpływu związków pochodzenia roślinnego, jako inhibitorów lipazy trzustkowej na procesy trawienia lipidów, Kim i Kang [33] wykorzystali w swoich badaniach wodno-etanolowe ekstrakty z 19 roślin leczniczych. Eksperyment był wykonany w warunkach *in vitro* z zastosowaniem metody pH-Stat przy użyciu tributyriny jako substratu. Obliczono wartość IC₅₀ dla każdej badanej próbki (stężenie badanego związku, przy którym zachodzi 50% inhibicja aktywności katalitycznej enzymu). Kontrolę pozytywną stanowił orlistat będący silnym inhibitorem lipazy trzustkowej. Odnotowano, że wodny ekstrakt z kory jałowca pospolitego (*Juniperus communis*) wykazywał najwyższą aktywność inhibitora lipazy trzustkowej.

Liczne badania wykazały, że inhibitory lipazy trzustkowej występujące w roślinach to saponiny lub polifenole. W przypadku pochryzyny japońskiego (*Dioscorea nipponica*) inhibitorem lipazy trzustkowej okazała się saponina pod nazwą dioscyna [34]. Również w wodnym ekstrakcie z korzenia rozwaru wielkokwiatowego (*Platycodon grandiflorus*) za własności inhibitujące aktywność lipazy trzustkowej odpowiadały frakcje saponinowe [35]. Głównym związkiem o właściwościach hamowania aktywności lipazy trzustkowej w strączyńcu (*Cassia mimosoides*) okazał się 3,4,7-trihydroksyflawon [36], natomiast w kłączu alpinii lekarskiej (*Alpinia officinarum*) 3-metyloeter galanginy [37].

3.2.2. Inhibitory reduktazy aldozowej

Reduktaza aldozowa (EC. 1.1.2) jest kluczowym enzymem w szlaku polioli. Znaczenie tego enzymu zostało wykazane w patogenezie wielu powikłań cukrzycowych takich jak neuropatia, retinopatia oraz nefropatia. Pod wpływem zwiększenia aktywności reduktazy aldozowej dochodzi do gromadzenia się nadmiaru sorbitolu w komórkach, co skutkuje ich obrzękiem, zmianą struktury i funkcji. Wśród substancji roślinnych zawierających związki chemiczne o charakterze inhibitorów reduktazy aldozowej można wyróżnić liść morwy białej (*Morus alba*). Jak wykazały badania zdolność zmniejszania aktywności reduktazy aldozowej w liściach morwy białej wykazują flawonoidy

– kwercetyna i rutyna [38]. Bhanuprakash i wsp. [39] stwierdzili, że rutyna jako inhibitor reduktazy aldozowej hamuje akumulację sorbitolu w ludzkich erytrocytach w warunkach wysokiego stężenia glukozy *in vivo*.

Goodarzi i wsp. [40] przeprowadzili badania z wykorzystaniem szczurów z indukowaną cukrzycą typu 1 za pomocą streptozotocyny, które podzielono na 6 grup eksperymentalnych. Grupę pierwszą, drugą i trzecią stanowiły szczury zdrowe, którym podawano odpowiednio wodę, kwercetynę i naryngeninę. Grupa czwarta, piąta oraz szósta to szczury z indukowaną cukrzycą typu 1 otrzymujące odpowiednio wodę, kwercetynę i naryngeninę. Wykazano, że podawanie kwercetyny szczurom z cukrzycą typu 1 spowodowało w soczewkach istotnie statystyczne zmniejszenie aktywności reduktazy aldozowej w porównaniu do grupy nie otrzymującej flawonoidów.

3.3. Substancje roślinne stosowane w celu ochrony komórek β trzustki przed apoptozą

Stres oksydacyjny może być przyczyną uszkodzenia komórek β trzustki u osób chorych na cukrzycę. Definiowany jest jako stan zaburzonej równowagi między obecnością reaktywnych form tlenu, a działaniem antyoksydantów [41]. Reaktywne formy tlenu odpowiedzialne są za uszkodzenie białek, lipidów, materiału genetycznego oraz zmianę struktury i funkcji węglowodanów, co w konsekwencji prowadzi do śmierci komórek. Do substancji roślinnych stosowanych w celu ochrony komórek β trzustki przed stresem oksydacyjnym można zaliczyć owoc oliwki europejskiej (*Olea europaea*).

Liczne badania epidemiologiczne wskazują, że dieta śródziemnomorska, która obfituje w oliwę z owoców oliwki, jest skuteczna w profilaktyce chorób układu krążenia i cukrzycy, przede wszystkim ze względu na zawartość jednonienasyconych kwasów tłuszczowych. Natomiast w liściach oliwki europejskiej stwierdzono znaczne ilości polifenoli. Głównym polifenolem występującym w liściu oliwki jest oleuropeina [42]. Dane literaturowe potwierdziły zdolność oleuropeiny do obniżenia ciśnienia tętniczego krwi, hamowania agregacji płytek krwi oraz jej działanie antyoksydacyjne [43–45]. W środowisku kwaśnym żołądka oleuropeina ulega hydrolizie do aktywnego metabolitu hydroksytyrozolu, który również posiada właściwości antyoksydacyjne oraz zdolność do neutralizowania reaktywnych form tlenu [46].

W cukrzycy mechanizm działania oleuropeiny polega na hamowaniu procesu peroksydacji lipidów oraz zmniejszaniu ekspresji genów zaangażowanych w procesy adipogenezy [47]. W badaniach przeprowadzonych przez Murotomi i wsp. [48] zano-towano, że podawanie suplementu diety zawierającego oleuropeinę w ilości przekraczającej 35% (w/w) szczurom z indukowaną cukrzycą typu 2 przez okres 4 tygodni spowodowało korzystne zmiany w parametrach stresu oksydacyjnego w porównaniu do grupy kontrolnej. Wyniki tych badań wskazują na ochronny wpływ oleuropeiny na komórki β trzustki w wyniku działania antyoksydacyjnego.

4. Podsumowanie

Przedstawione w niniejszej pracy dane, świadczą, że substancje roślinne oraz pozyskane z nich izolowane związki farmakologicznie czynne mogą u osób chorych na cukrzycę wpływać na różne ścieżki metaboliczne. Ze względu na zróżnicowany mechanizm działania i duży profil bezpieczeństwa substancje roślinne stosowane są pomocniczo w leczeniu cukrzycy oraz w terapii powikłań cukrzycowych. Mimo, iż w eksperymentach przeprowadzonych na modelach zwierzęcych oraz w badaniach klinicznych dowiedziono ich działania hipoglikemicznego, to jednak jest ono zbyt słabe, aby konkurować z lekami przeciwcukrzycowymi.

Literatura

1. Albert K. G., Zimmet P. Z., *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus precisional report of a WHO consultation*, Diabetic Medicine 15(7), 1998, 539-53
2. *Polskie Towarzystwo Diabetologiczne*, Diabetologia. Tom 4, Supplement A, 2015
3. Collip J. B., *A new hormone present in plant tissue*, The Journal of Biological Chemistry 56 1923, s. 513-543
4. Azevedo C. R., Maciel F. M., Silva L. B., Ferreira A. T. S., Cunha M., Machado O. L. T., Fernandes K. V. S., Oliveira A. E. A., Xavier-Filho J., *Isolation and intracellular localization of insulin-like proteins from leaves of Bauhinia variegata*, Brazilian Journal of Medical and Biological Research 39(11), 2006, s. 1435-1444
5. Bovet L., Muller M. O., Siegenthaler P. A., *Three distinct lipid kinase activities are present in spinach chloroplast envelope membranes: Phosphatidylinositol phosphorylation is sensitive to wortmannin and not dependent on chloroplast ATP*, Biochemical and Biophysical Research Communications 289, 2001, 269-275
6. Hong Z., Verma D. P. S., *A PtdIns 3-kinase is induced during soybean nodule organogenesis and is associated with membrane proliferation*, Proceedings of the National Academy of Sciences 91, 1994, 9617-9621
7. Kaneko K., Shirohara T., Araki E., Matsumoto K., Taguchi T., Motoshima H., Yoshizato K., Kishikawa H., Shichiri M., *Insulin inhibits glucagon secretion by the activation of PI3-kinase in In-R1-G9 cells*, Diabetes Research and Clinical Practice 44(2), 1999, s. 83-146
8. Patricia B. Pelegriani, Fung T. Lay, Andre M. Murad, Marilyn A. Anderson, Octavio L. Franco, *Novel insights on the mechanism of action of α -amylase inhibitors from the plant defensin family*, Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2008, s. 719-729
9. Moreno J., Altabela T., Chrispeels M. J., *Characterization of α -amylase-inhibitor, a lectin-like protein in the seeds of Phaseolus vulgaris*, Plant Physiology 92(3), 1990, s. 703-709
10. Layer P., Dimagno E., Carlson G. L., *Partially purified white bean amylase inhibitor reduces starch digestion in vitro and inactivates intraduodenal amylase in humans*, Gastroenterology 88(6), 1985, s.1895-902
11. Wen C. W., Lin X. D., Dong M. J., Deng M. J., *An evaluation of 1-Deoxynojirimycin oral administration in Eri Silkworm through fat body metabolomics based on (1) H nuclear magnetic resonance*, BioMed Research International, 2016

12. Sukito A., Tachibana S., *Potent α -glucosidase inhibitors isolated from Ginkgo biloba leaves*, Pakistan Journal of Biological Sciences 17(11), 2014, s.1170-1778
13. Onal S., Timur S., Okutucu B., Zihnioqlu F., *Inhibition of alpha-glucosidase by aqueous extracts of some potent antidiabetic medicinal herbs*, Preparative Biochemistry and Biotechnology 35(1), 2005, s.29-36
14. Xu B., Zhang D. Y., Liu Z.Y., Zhang Y, Liu L., Wu G. H., *Rapid determination of 1-deoxyojirimycin in Morus alba L. leaves by direct analysis in real time (DART) mass spectrometry*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 114, (2015), s. 447-454
15. Tsuduki T., Kikuchi I., Kimura T., Nakagawa K., Miyazawa T., *Intake of mulberry 1-deoxyojirimycin prevents diet-induced obesity through increases in adiponectin in mice*, Food Chemistry 139, 2013, s. 16-23
16. Singh B., Pushpinder K., Gopichand, R. D. Singh, P. S. Ahuja., *Biology and chemistry of Ginkgo biloba*, Fitoterapia 79, 2008, 401-418
17. Sauvaire Y, Petit P, Broca C, Manteghetti M, Baissac Y, Fernandez-Alvarez J, Gross R, Roye M, Leconte A, Gomis R, Ribes G., *4-hydrokysisoleucine: a novel amino acid potentiator of insulin secretion*, Diabetes. 1998, 47(2):206-210
18. Khan A, Bryden N. A, Polansky M. M, Andrerson R. A., *Insuling potentiating factor and chromium content of selected foods and spices*, Biological Trace Element Research 24, 1990,183-188
19. K. Torizuka., *Basic lecture of kampo medicine: pharmacological effect of cinnamon*, Kampo Medicinals 11, 1998, 431-436
20. Dhuley J. N., *Anti-oxidant effects of cinnamon (Cinnamomum verum) bark and greater cardamon (Ammomum subulatum) seeds in rats fed high fat diet*, Indian Journal of Experimental Biology 37, 1999,:238-242
21. Kannappan S, Jayaraman T, Rajasekar P, Ravichandran M. K, Anuradha C. V., *Cinnamon bark extract improves glucose metabolism and lipid profile in the fructose-fed rat*, Singapore Medical Journal 47(10), 2006, 858-63
22. Davis M., Vincent J., *Chromium oligopeptide activates insulin receptor tyrosine kinase activity*, Biochemistry 36,1997, 4382-4385
23. Gross J. L, de Azevedo M. J, Silveiro S. P, Canani L. H, Caramori M. L, Zelmanovitz T., *Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention and treatment*, Diabetes care 28, 2005,164-176
24. *Association, American Diabetes. Standards of medical care in diabetes*, Diabetes Care 30, 2007,;S4-S41
25. Boulton A. J, Vinik A. L, Arezzo J. C, Bril V, Feldman E. L, Freeman R, Malik R. A, Maser R. E, Sosenko J. M, Ziegler D., *Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association*, Diabetes Care 28, 2005, 956-962
26. Bojle P. J., *Diabetes mellitus and macrovascular disease: mechanisms and mediators*, American Journal of Medicine 120, 2007, S12-S17
27. Lunagariya N. A, Patel N. K., Jagtap S. C., Bhutani K., *Inhibitors of pancreatic lipase: state of the art and clinical perspectives*, EXCLI Journal 13, 2014, 897-921
28. Pari L., Monisha P., Jalaludeen A., *Beneficial role of diosgenin on oxidative stress in aorta of streptozotocin induced diabetic rats*, European journal of pharmacology 691(1-3), 2012,143
29. Han L. K., Kimura Y., Kwashima M., *Anti-obesity effects in rodents of dietary teasaponin, a lipase inhibitor.*, International Journal of Obesity 25, 2001, 1459-1464

30. Zhao H. L., Kim Y. S., *Determination of the kinetic properties of platycodin d for the inhibition of pancreatic lipase using a 1,2-diglyceride- based colorimetric assay*, Archives of Pharmacal Research 27, 2014,1048-1052
31. Sharma N, Sharma V. K., Seo S. Y., *Screening of some medicinal plants for anti-lipase activity*, Journal of Ethnopharmacology 97, 2005,453-456
32. Moreno D. A., Ilic N., Poulev A., Raskin I., *Effects of arachis hypogaea nutshell extract on lipid metabolic enzymes and obesity parameters*, Life Sciences 78, 2006, 2797-2803
33. Kim H. Y., Kang M. H., *Screening of Korean Medicinal Plants for Lipase Inhibitory Activity*. Phytotherapy research 19, 2005, 359-361
34. Kwon C. S, Sohn H. Y, Kim S. H, Kim J. H, Son K. H, Lee J. S, Lim J. K, Kim J. S., *Anti-obesity effect of Dioscorea nipponica Makino with lipase-inhibitory activity in rodents*, Bioscience Biotechnology and Biochemistry 67, 2003,1451-1456
35. Han L. K, Xu B. J, Kimura Y, Zheng Y, Okuda H. *Platycodi Radix affects lipid metabolism in mmice with hight fat diet-induced obesity*, Journal of Nutrition 130, 2000, 2760-2764
36. Yamamoto M, Shimura S, Itoh Y, Ohsaka T, Egawa M, Inoue S., *Anti-obesity effects of lipase inhibitor CT-II, an extract from edible herbs, Nomame Herba, on rats fed a high-fat diet*. International Journal of Obesity 24, 2000,758-764
37. Shin J. E, Han M. J, Kim D. H., *3-methylethergalangin isolated from Alpinia officinarum inhibits pancreatic lipase*, Biological and Pharmaceutical Bulletin 23(1), 2003, 47-53
38. Kim D. S., Kang Y. M., Jin W. Y., Sung Y. Y., Choi G., *Antioxidant activities and polyphenol content of Morus alba leaf extracts collected from varying regions*, Biomedical Reports, 2014, 675-680
39. Bhanuprakash Reddy G, Muthenna P, Akileshwari C, Saraswat M., Petrash M., *Inhibition of aldose reductase and sorbitol accumulation by dietary rutin*, Current Science 101(9), 2011
40. Goodarzi M. T, Zal F, Malakooti M, Safari M. R, Sadeghian S., *Inhibitory activity of flavonoids on the lens aldose reductase of healthy and diabetic rat*,.Acta Medica Iranica 44(1), 2006, 41-45
41. Sies H, Cadenas E., *Oxidative stress: damage to intact cells and organs*, Philosophical Transactions of the Royal Society 311(1152), 1985, 617-631
42. Soler-Rives C, Espín J. C, Wichers H. J., *Review oleuropein and related compounds*, Journal of the Science of Food and Agriculture 80, 2000;1013-23
43. Susalit E., Agus N., Effendi I., Tjandrawinata R., Nofiarny D., Perrinjaquet-Moccetti T., Verbruggen M., *Olive (Olea europaea) leaf extract effective in patients with stage-I hypertension: Comparison with Captopril*, Phytomedicine 18, 2011, 251-25
44. Petroni M. L., Jazrawi R. P., Grundy A., Lanzin I. A., Pigozzi M. G., Biasio A., Heaton K. W., Virjee J., Northfield T. C., *Prospective, multicenter study on value of computerized tomography (CT) in gallstone disease in predicting response to bile acid*, Molecules 21(6), 2016, 708
45. Misra A., Singhal N., Khurana L., *Obesity, the metabolic syndrome, and type 2 diabetes in developing countries: Role of dietary fats and oil*,. The Journal of American College of Nutrition 29 (3), 2010, 289S-301S
46. Edgecombe S., Stretch G. L., Hayball P. J., *Oleuropein, an antioxidant polyphenol from olive oil, is poorly absorbed from isolated perfused rat intestine*, Nutrition Journal 130, 2000; 2996-3002

47. Santiago-Mora R., Casado-Díaz A., de Castro M. D., Quesada-Gómez J. M., *Oleuropein enhances osteoblastogenesis and inhibits adipogenesis: The effect on differentiation in stem cells derived from bone marrow*, Osteoporosis International 22, 2011, 675-684
48. Murotomi K., Umeno A., Yasunaga M., Shichiri M., Ishida N., Koike T., Matsuo T., Abe H., Yoshida Y., Nakajima Y., *Oleuropein-rich diet attenuates hyperglycemia and impaired glucose tolerance in type 2 diabetes model mouse*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 63(30), 2015, 6715-22

Fitoterapia w leczeniu pomocniczym cukrzycy

Cukrzyca jest przewlekłą chorobą metaboliczną, która charakteryzuje się niedostatecznym wydzielaniem insuliny, bądź brakiem wrażliwości tkanek na ten hormon. Przewlekła hiperglikemia może prowadzić do wystąpienia powikłań naczyniowych, siatkówkowych, nerkowych, neuropatycznych oraz metabolicznych w tym w metabolizmie węglowodanów, białek i lipidów. Terapia cukrzycy opiera się przede wszystkim na wyrównywaniu zaburzeń metabolicznych, łagodzeniu i zapobieganiu powikłaniom choroby, jak również dąży ona do poprawy jakości życia pacjentów chorych na cukrzycę. Wśród metod stosowanych w leczeniu cukrzycy wyróżnia się leczenie niefarmakologiczne obejmujące zmianę stylu życia, leczenie farmakologiczne oraz leczenie chorób towarzyszących w tym schorzeń będących powikłaniami cukrzycy. Obecnie na rynek farmaceutyczny wprowadzane są coraz nowsze preparaty pochodzenia roślinnego o udowodnionym działaniu hipoglikemicznym, które stosowane są pomocniczo w cukrzycy oraz towarzyszących jej powikłań. Przyczyną tego zjawiska są coraz częściej publikowane doniesienia naukowe na temat korzystnych właściwości farmakologicznych preparatów roślinnych. Są to najczęściej mieszanki ziołowe, które zalecane są w terapii cukrzycy w połączeniu z lekami przeciwcukrzycowymi oraz pomocniczo we wczesnym stadium cukrzycy typu 2. Celem niniejszej pracy było przedstawienie oraz sklasyfikowanie surowców roślinnych stosowanych pomocniczo w leczeniu cukrzycy oraz jej powikłań ze względu na ich mechanizm działania.

Słowa kluczowe: cukrzyca, powikłania cukrzycy, fitoterapia, mechanizm działania

Phytotherapy in the auxiliary treatment

Diabetes mellitus is a common metabolic disorder, which is characterized by insufficient insulin secretion, or lack of tissue sensitivity to this hormone. Chronic hyperglycemia can lead to vascular, retinal, renal, neuropathic and metabolic complications including alterations in carbohydrates, proteins and lipids metabolism. Treatment of the diabetes is based primarily on compensation of metabolic disorders, mitigation and prevention of complication of the disease. Moreover, one of the main aims of such treatment is to improve the quality of life of diabetic patients. Among the methods used in the treatment of diabetes there are non-pharmacological treatment including lifestyle changes, pharmacological treatment of diabetes itself, and treatment of diseases associated with diabetes complications. Currently, newer and newer herbal products with proven hypoglycemic, which are used in the alternative diabetes and associated complications are introduced to the pharmaceutical market. The reason of such interest is increasing number of scientific reports indicating the beneficial pharmacological properties of herbal supplements. Among them, the most common are herbal mixtures, which are recommended in the treatment of diabetes mellitus in combination with antidiabetic drugs or as a treatment of the early stage of type 2 diabetes. The purpose of this study was to present and classify plant materials used alternatively for the treatment of diabetes and its complications due to their mechanism of action.

Keywords: diabetes mellitus, diabetes complications, phytotherapy, mechanism of action

Oddziaływanie niklu na skórę ludzi

1. Wstęp/Wprowadzenie

Skóra pełni w ciele człowieka i zwierząt wiele podstawowych funkcji. Jedną z najważniejszych jest ochrona narządów wewnętrznych przed działaniem środowiska zewnętrznego, tj. czynników mechanicznych, fizycznych, chemicznych i bakteryjnych. Dzięki swej znacznej powierzchni, wysokiemu stopniowi zróżnicowania anatomicznego oraz swoistości czynności biologicznych, skóra jest narządem niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania organizmu jako całości [1, 2].

Skóra składa się z powłoki właściwej, przydatków (włosy, paznokcie, gruczoły skórne) oraz naczyń krwionośnych. Powłoka właściwa posiada budowę warstwową, w jej skład wchodzi trzy warstwy, są to: naskórek (z łac. *epidermis*), skóra właściwa (z łac. *corium*) oraz tkanka podskórna (z łac. *subcutis*). Sam naskórek również składa się z warstw. Idąc od najgłębszej są to warstwa podstawna, warstwa kolczysta, warstwa ziarnista oraz warstwa rogowa. Jego grubość wynosi około 100µm i składa się z żywych komórek: keratynocytów. Warstwy tworzone przez te komórki, ulegają procesowi keratynizacji w różnym stopniu, w zależności od poziomu [2, 3].

Najbardziej zewnętrzną okrywą jest warstwa rogowa (z łac. *Stratum corneum*) i jest ona najbardziej narażona na działanie czynników zewnętrznych. Powłoka ta również jest tworem złożonym z trzech stref: jasnej, zbitej oraz rogowaciejącej, ulegającej złuszczeniu. Łącznie jej grubość ocenia się na około 10 µm. Tworzą ją płasko ułożone, ściśle przylegające komórki keratynocytów, pozbawione jądra, tj. korneocyty. Są one komórkami martwymi, powstającymi w ostatnim etapie rogowacenia, zbudowane prawie całkowicie z keratyny. Białka keratynowe, dzięki zdolności wiązania wody, nadają jej elastyczność. Keratyna wraz z płaszczem lipidowym, obecnym na powierzchni warstwy rogowej, reguluje procesy wchłaniania oraz przenikania do skóry substancji [3, 4].

Celem pracy był przegląd najnowszych danych literaturowych dotyczących wpływu niklu i jego pochodnych na skórę ludzi. Szczegółowa analiza piśmiennictwa

¹ aldona.gajek09@gmail.com, student analityki medycznej, Koło przy Katedrze Patobiochemii i Chemii Klinicznej, Wydział farmaceutyczny, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

² igaholynska@cm.umk.pl, Pracownia Elektrofizjologii Skóry i Tkanki Nabłonkowej, Katedra Patobiochemii i Chemii Klinicznej, Wydział farmaceutyczny, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

pozwoiliła uporządkować informacje omawiające patomechanizmy leżące u podłoża alergii kontaktowej na nikiel. Samo schorzenie oraz jego leczenie stanowią wyzwanie dla lekarzy z powodu rozpowszechnienia i stanowią narastający problem społeczny.

2. Charakterystyka pierwiastka niklu

Nikiel jest pierwiastkiem chemicznym z grupy metali przejściowych w układzie okresowym. Należy do grupy VIIIb [5]. Jest pierwiastkiem o masie atomowej równej 58,6934. Nie wykazuje odmian alotropowych. Jest metalem ciężkim, który jest podatny na obróbkę plastyczną na gorąco, ale również na zimno [6]. Jego gęstość wynosi $8,9\text{g/cm}^3$, temperatura topnienia 1453°C , temperatura wrzenia 2732°C , jest barwy srebrzystobiałej. Formą o największym znaczeniu w toksykologii jest forma dwuwartościowa, jest to zarazem forma, w której występuje on najczęściej, może on jednak występować na -1, 0, +1, +2, +4 stopniu utlenienia [5, 7, 8]. Nikiel może występować w postaci związków nieorganicznych, do najważniejszych z nich należą: siarczan niklowy, wodorotlenek niklowy, chlorek niklowy i tlenek niklowy oraz karbonyłek niklu $\text{Ni}(\text{CO})_4$ [5].

Nikiel jest wykorzystywany jako element stopów przy otrzymywaniu stali nierdzewnej. Jego związki kompleksowe są stosunkowo trwałe. Natomiast bezwodne sole mają zazwyczaj barwę żółtą, a uwodnione – zieloną. Lotne sole niklu zabarwiają płomień na kolor żółtozielony [7, 9]. Jego zastosowanie jest duże, m.in. używany jest do katalizowania syntez organicznych. Związki niklu używane są również do barwienia szkła oraz emalii. Wiele produktów wyposażenia, np. armatura łazienkowa, czy kuchenna, są pokryte warstwą niklu w celu uzyskania odpowiedniej trwałości. Metal ten znajduje zastosowanie w protezach dentystycznych, ale również ortopedycznych, w spawalnictwie, galwanizacji, pojazdach mechanicznych, urządzeniach technicznych oraz w jubilerstwie [10÷12]. Wykorzystuje się go również do produkcji sprzętu laboratoryjnego, elektrod, stali stopowych, tworzyw sztucznych, w przemyśle chemicznym i spożywczym [5].

Jest piątym najczęściej występującym pierwiastkiem na ziemi, ustępuje takim pierwiastkom jak: żelazo, tlen, krzem i magnez [13]. Pierwiastek ten stanowi ok. 0,008% składu skorupy ziemskiej, jego śladowe ilości znajdują się w glebie, wodzie, biosferze i powietrzu [5]. Najwyższe stężenia niklu zawierają lateryt, nikelin i pentlandyt, są to również minerały, które posiadają największe znaczenie przemysłowe [10].

W niewielkich ilościach nikiel jest konieczny do prawidłowego rozwoju organizmu. Fizjologicznie, dzięki jego obecności, enzymy ulegają aktywacji (m.in. tyrozynaza, arginaza, deoksyrybonukleaza), zwiększa się aktywność hormonalna, struktury kwasów nukleinowych ulegają stabilizacji, następuje również regulacja metabolizmu tłuszczów.

U zwierząt wyższych, w tym u ludzi, pierwiastek ten, prawdopodobnie poprzez regulację metabolizmu witaminy B₁₂, bierze udział w procesie erythropoezy [13, 14].

Ze względu na powszechność występowania tego pierwiastka w pokarmie, nie stwierdza się jego niedoborów w organizmach. Niedostateczna jego ilość jednak powoduje zmniejszenie zużycia tlenu w wątrobie i zwiększenie nagromadzenia tłuszczów. Brak niklu może wywoływać obniżenie poziomu hemoglobiny we krwi oraz zahamowanie wzrostu. Mogą również zachodzić zaburzenia w pigmentacji i zmiany w naskórku. Zapotrzebowanie na nikiel u dorosłego człowieka wynosi około 25-35 µg/dzień [5, 10].

3. Transport jonów

Transport bierny przez błonę to transport niewymagający nakładu energii ze strony komórki, przebiegający zgodnie z gradientem stężeń, w odróżnieniu od transportu aktywnego, który wymaga dostarczenia energii i odbywa się wbrew gradientowi stężeń.

Jeśli chodzi o transport jonów przez błonę, przykładem transportu biernego są kanały jonowe. Tworzą je grupy białek, dzięki temu jony mogą przemieszczać się, zgodnie z gradientem stężeń, pomiędzy cytoplazmą a środowiskiem zewnętrznym. Posiadają one unikalny mechanizm, służący regulacji owych kanałów, którym jest bramkowanie przez różne czynniki. Wyróżnia się kanały zależne od potencjału błony komórkowej oraz kanały, które są bramkowane przez cykliczne nukleotydy, a także kanały zależne od ligandów i kanały regulowane przez drugie przekazywniki [15].

Kanały bramkowane napięciem są selektywne, jeśli idzie o rozróżnianie kationów. Wykazują wyraźną zależność przewodnictwa od potencjału błonowego [15]. Różnicę potencjałów można zaobserwować po obu stronach błony żywej komórki. Potencjał spoczynkowy błony, zgodnie z przyjętymi zasadami, zapisuje się ze znakiem minus. Oznacza to, że wewnątrz komórki, względem otoczenia, jest ujemne. W zależności od tkanki, jego wielkość może ulegać zmianie od -9 do -100 mV [16].

Za pomocą różnych związków chemicznych można regulować (inaktywować bądź aktywować) białka błonowe, tworzące kanały i pompy jonowe, w ten sposób można ingerować w przepływ elektrolitów przez komórki [17].

Mechanizmy transportu aktywnego, w zależności od nakładów energetycznych komórki, można podzielić na bezpośrednie pompy jonowe oraz układy przenoszące jony pośrednio, zależne od nakładów energii. Pompy ATP-azy hydrolizują ATP i uzyskaną w tym procesie energię zamieniają na niezbędną do transportu jonów przez błonę. Pompy te, po wychwyceniu jonu, zmieniają energię wiązania jonu i swój stan konformacji, przenoszą jon i uwalniają go po drugiej stronie błony [15].

Jeśli chodzi o wpływ niklu na transport jonów, to największy związek ma on z kanałami wapniowymi. Dzięki nim przedostaje się do komórki, konkurując z wapniem. Został również zaproponowany jako selektywny bloker kanałów wapniowych niskonapięciowych typu T. Jednakże badania na sklonowanych wysokonapięciowych kanałach wapniowych wykazały, że pewne podtypy, jak $\alpha 1E$, są również blokowane przy mikromolowych stężeniach $NiCl_2$ [18]. Niezdolność jonu Ni^{3+} do makroskopowej dezaktywacji kanałów sugeruje, że napięciозależne kanały wapniowe (VGCC z ang. *voltage-gated calcium channel*) mogą się zamykać lub inaktywować przy obłożeniu przez jednego z antagonistów (np. Ni^{3+} , La^{3+}). To z kolei oznacza, że w warunkach fizjologicznych przy nieobecności antagonisty, w tym jonów niklu, co najmniej jeden z jonów Ca^{2+} pozostaje uwieczony w zamkniętym lub inaktywowanym kanale [19].

4. Wpływ niklu na komórkę

Działanie związków niklu zaklasyfikowano jako rakotwórcze. Jego kancerogenne działanie sprowadza się do hipotezy zdolności przenikania tego jonu do komórki za pomocą transportera jonów dwuwartościowych (DMT1 z ang. *divalent metal transporter 1*). Nikiel może konkurować z żelazem, zarówno na poziomie zewnątrzkomórkowym, gdzie zapobiega transportowi żelaza do komórki, jak i wewnątrzkomórkowym, gdzie konkuruje o miejsce wiązania w miejscu aktywnym enzymów. Wynika to z podobieństwa obu pierwiastków pod względem struktury atomowej i promieni jonowych [20]. Transport niklu do wnętrza komórki zależy od pięciu białek, oznaczonych jako NikA-NikE [21].

Nikiel jest wprowadzany do komórek drogą dyfuzji, endocytozy oraz przez kanały wapniowe. W organizmie zostaje zaburzona homeostaza wapnia, ze względu na, wcześniej wspomnianą, konkurencję podczas wnikania do komórki, głównie za pomocą tychże kanałów. Wiadomo o jego oddziaływaniu na kanały potasowe, wapniowe, jak i różne receptory, w tym na transporter metali (DMT) w przewodzie pokarmowym. Działanie to jest jednak przedmiotem ciągłych badań [22, 23].

Nikiel penetruje tkankę skórną i aktywuje keratynocyty, prowadzi to do uwalniania cytokin takich jak interleukina 1 (IL-1 z ang. *interleukin 1*) i czynnik martwicy nowotworu α (TNF α z ang. *tumor necrosis factor α*). Następnie nikiel ulega przytwierdzeniu do białek głównego kompleksu zgodności tkankowej (MHC z ang. *major histocompatibility complex*) obecnych na powierzchni komórek Langerhansa i dendrytycznych, które są pobudzane przez cytokiny uwalniane z sąsiednich keratynocytów [24].

W tabeli 1 przedstawiono zbiorczo poszczególne mechanizmy działania niklu na organizm człowieka.

Tabela 1 Mechanizmy działania niklu w organizmie.

Poziom działania	Rola niklu
Komórki	<ol style="list-style-type: none"> 1. Składnik i aktywator tyrozynaz, argininaz, deoksynukleaz. 2. Reguluje metabolizm witaminy B₁₂. 3. Selektywny bloker napięciowych kanałów wapniowych. 4. Generuje wolne rodniki •OH⁻, H₂O₂, •O₂⁻ 5. Inhibitor procesów naprawy DNA, powoduje wypadnięcie sekwencji DNA.
Tkanki	<ol style="list-style-type: none"> 1. Zaburza metabolizm wapnia, wypiera wapń z połączeń z białkami. 2. Wypiera mikroelementy z połączeń z białkiem transportowym – DMT. 3. Konkuruje z żelazem, magnezem, kobaltem i cynkiem o miejsce wiązania w enzymach i białkach strukturalnych.
Skóra	<ol style="list-style-type: none"> 1. Aktywuje keratynocyty do uwalniania IL-1 i TNFα. 2. Łączy się z resztą histydyny i aktywuje białka MHC w limfocytach B. 3. Oddziałuje w formie haptenu w kompleksowych reakcjach w komórkach APC.

5. Toksyczność niklu

Nikiel i jego związki charakteryzuje mała toksyczność ostra, dość rzadko notowane są przypadki zatruc. Najbardziej toksyczny jest karbonyłek niklu, który do organizmu wnika przez skórę, ale główne objawy zatruc ostrego są spowodowane wnikaniem drogą oddechową. Jego duże stężenia mogą powodować: wymioty, bóle i zawroty głowy, nudności, duszności i kaszel, uszkodzenie błon śluzowych i oskrzeli, zapalenie płuc, także ogólne osłabienie. Może dochodzić do uszkodzenia narządów mięsnych oraz mózgu. W ciężkich przypadkach zdarza się, że dochodzi do śmierci [11, 13].

Nikiel powoduje stres oksydacyjny, dlatego przewlekłe jego działanie toksyczne objawia się m.in. poprzez tworzenie wolnych rodników, takich jak •OH⁻, H₂O₂, •O₂⁻. Długotrwałe działanie tego metalu w wysokich stężeniach może narazić na osłabienie odporności wrodzonej. Nikiel powoduje obniżenie stężenia manganu, magnezu, a także cynku w niektórych narządach mięsnych, gdyż jego nadmiar wpływa na metabolizm w/w metali [11, 13, 25].

Negatywnym skutkiem dostania się cząsteczek niklu do organizmu może być również wpływ na ekspresję genów markerów zapalnych. Skutkuje to negatywnym wpływem na funkcjonowanie i liczbę komórek progenitorowych śródbłonna,

mianowicie zmniejszoną ich ilość w szpiku kostnym, która prowadzi do zwiększonej progresji miażdżycy [26].

Toksyczność tego pierwiastka może objawić się powstaniem komórek nowotworowych, zaburzeniami metabolizmu białek osocza oraz zmianami w chromosomach. Wywołuje wypadnięcie sekwencji DNA, inhibicję procesów naprawy oraz powoduje zaburzenia jego syntezy, aktywując deoksyrybonukleazy [5, 13].

6. Alergia

Chociaż różne metale są znane jako mogące powodować uczulenia, nikiel jest najczęstszą przyczyną alergii na metale. Alergia na metal jest sklasyfikowana jako choroba zapalna o opóźnionym typie nadwrażliwości [24].

Z powodu dużego rozpowszechnienia tego metalu, uczulenia na nikiel występują niezależnie od grupy zawodowej. Najczęściej jednak występują u galwanizerów, ale mogą również występować u elektryków, kasjerów, metalowców i u osób zawodowo korzystających ze środków czystości.

Najbardziej szkodliwymi związkami niklu są jego sole, natomiast nikiel metaliczny i tlenek niklu nie powodują uczuleń.

Cechą charakterystyczną alergii na nikiel jest to, że zmiany mogą również występować w miejscach oddalonych od bezpośredniego kontaktu [4].

Klinicznie, ze względu na przyczynę, alergia może objawiać się w postaci kontaktowego zapalenia skóry, liszaja, potnicy oraz zespołu pieczenia w ustach. Co więcej, u pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi obserwuje się zwiększoną częstość występowania alergii na metale [24].

Uczulenie na ten metal może również skutkować takimi objawami jak: astma oskrzelowa, nieżyt nosa, alergiczne zapalenie spojówek oraz pokrzywka z współistniejącymi objawami brzuszными [12, 27].

Badania wykazują, że siarczan niklu (II) ma najwyższy wskaźnik uczulania [24]. Obecnie szacuje się, że odsetek uczulonych na nikiel wynosi ok. 18% w Europie, ok. 19% w Wielkiej Brytanii, ok. 18% w Turcji, 22% w Chinach i ok. 16% w USA [28÷29]. Choroba ta diagnozowana jest głównie za pomocą testów płatkowych. Kilka raportów wykazało, że usunięcie przyczynowego metalu może skutecznie poprawić objawy alergiczne [24]

Jony niklu są silnymi alergenami lub haptenami, które penetrując skórę, doprowadzają do aktywacji komórek nabłonkowych, które wytwarzają cytokiny, bądź chemokiny. Następują wówczas kompleksowe reakcje immunologiczne, obejmujące aktywację komórek prezentujących antygen (APC z ang. *antigen presenting cell*) i komórek T. Aktywowane komórki migrują do węzłów chłonnych, gdzie prezentują dany alergen. Późniejsza ekspozycja na ten sam alergen powoduje aktywację komórek T specyficznych, które po dostaniu się do krwiobiegu wywołują w ciągu 48-72 godzin

widoczny objaw nadwrażliwości. Dokładne mechanizmy molekularne prowadzące do alergii na metale nie są jednak dobrze poznane [24].

W 1991 roku Romagnoli i inni udowodnili po raz pierwszy, że nikiel może wiązać się do reszty histydyny w białku wiążącym MHC. Naukowcy uważają, że alergeny metalu chętnie wchodzi w interakcje z jednym bądź wieloma motywami wiążącymi metale, prezentowanymi przez własne białka, połączone z białkami MHC. Dwanaście lat później teoria ta zyskała jeszcze na znaczeniu, gdy okazało się, że można izolować ludzkie komórki T reaktywne z niklem, w połączeniu ze specyficznymi białkami MHC, w ludzkich i mysich komórkach B, ale nie w innych niedojrzałych komórkach antygenowych [28].

W życiu codziennym często stykamy się z przedmiotami i produktami, które mogą powodować uczulenia na metale, takie jak nikiel i kobalt. Ograniczenie ilości niklu, które mogą zostać uwolnione z elementów przeznaczonych do długotrwałego kontaktu ze skórą istnieje od 2001 roku w ramach regulacji UE. "Długotrwały kontakt ze skórą" został określony w 2014 roku ECHA (*European Chemicals Agency*), jako "potencjalnie więcej niż 10 minut przy trzech lub większej liczbie razy w ciągu dwóch tygodni lub 30 minut jeden lub więcej razy w ciągu dwóch tygodni". Dostępność informacji o uwalnianiu niklu z komputerów i laptopów jest bardzo ograniczona. Odnotowano dwa przypadki pacjentów uczulonych na nikiel z alergicznym kontaktowym zapaleniem skóry, wywołanym przez uwalnianie niklu z laptopów Apple. W badaniu 20 laptopów Apple MacBook™, gdzie wykorzystano test punktowy dla niklu, który wykrywa obecność tego pierwiastka na powierzchni komputerów, stwierdzono, że 35% komputerów były pozytywnych dla niklu. Zgodnie z definicją "Długotrwałego kontaktu ze skórą", laptopy powinny kwalifikować się jako potencjalne źródła ekspozycji skóry na metale. Kontakt ze skórą wynikający z korzystania z komputera przenośnego może przyczynić się do skumulowanej dawki niklu na skórę, który może być problematyczny dla osób z tendencją do nadwrażliwości i/lub uczulonych [30].

Alergia na nikiel jest powszechna, zarówno u dzieci, jak i u dorosłych, a u osób uczulonych może wystąpić alergiczne kontaktowe zapalenie skóry po powtarzalnym lub długotrwałym kontakcie skórnym z metalowymi przedmiotami, uwalniającymi nikiel w nadmiernych ilościach. Chociaż u dzieci obserwuje się mniejszą częstość występowania alergii na nikiel niż u dorosłych, nadal jest ona niepokojąco wysoka. Powody pozostają niejasne, ale badania sugerują, że dzieci są uczulane we wczesnym wieku i, co ciekawe, ostatnie badania pokazują, że 34,4% zabawek 212 dzieci zakupiona w Danii i Stanach Zjednoczonych z odsłoniętymi elementami metalowymi, poddane badaniu z dimetylglioksymem (DMG), uwalniają nikiel. Co ważne, doniesiono o przypadkach alergicznego kontaktowego zapalenia skóry u dzieci, wynikających z kontaktów z zabawkami, co czyni je istotnym źródłem alergii na nikiel i zapalenia skóry [31].

7. Podsumowanie

W codziennym życiu kontaktujemy się z przedmiotami metalowymi lub zawierającymi metal. Alergia na metal została sklasyfikowana jako choroba zapalna o opóźnionym typie nadwrażliwości. Chociaż różne metale są znane jako mogące powodować uczulenia, nikiel jest najczęstszą przyczyną alergii na metal. Z powodu swojego rozpowszechnienia, reakcje uczuleniowe na nikiel występują niezależnie od grupy zawodowej. Nikiel może powodować również reakcje uczuleniowe u dzieci. Duże jego stężenie np. po długotrwałym kontakcie z zabawkami uwalniającymi nikiel, może powodować obniżenie odporności wrodzonej, a także wczesną immunizację na nikiel, która w późniejszym czasie może objawić się alergią. Wszystkie mechanizmy powstawania nadwrażliwości i/lub alergii na ten metal nie są w pełni poznane. Udowodniono działanie niklu na prezentację antygenów, produkcję cytokin oraz zmiany w transporcie jonów w komórkach budujących tkankę skórną. Jednak nie wszystkie patomechanizmy działania niklu, czy też możliwe interakcje z elementami strukturalnymi skóry zostały wyjaśnione. Prowadzenie dalszych badań nad działaniem niklu i opisywanie uzyskanych wyników, w odczuciu autorów, wydaje się być uzasadnione i potrzebne.

Literatura

1. <http://fraktalla.com/info/Dermatologia>
2. <http://ammaterialy.w.interiowo.pl/derm/jablo.pdf>
3. Martini M., *Kosmetologia i farmakologia skóry*, Wydawnictwo lekarskie PZWL, Warszawa, 2008, s. 39-42
4. Jabłońska S., Chorzeński T., *Choroby skóry dla studentów medycyny i lekarzy*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 1994, s. 18-160
5. Chmielnicka J., *Metale i metaloidy*, [w:] *Toksykologia*. red. W. Seńczuk, PZWL, Warszawa, 2002, s. 412-417
6. Dobrzański L., *Materiały inżynierskie i projektowanie materiałowe. Podstawy nauki o o materiałach i metaloznawstwo*, Wydawnictwo naukowo-techniczne, Warszawa, 2006, s. 731-732
7. Drapała T., *Żelazowce, kobaltowce, nikielowce*, [w:] *Chemia ogólna nieorganiczna z zadaniami*, Wydawnictwo SGGW, Warszawa, 2002, s. 416-420
8. Szmaj Z. S., Lipiec T., *Chemia analityczna z elementami analizy instrumentalnej*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 1996, s. 202-204, 258-260
9. *Chemia analityczna*, pod red. Kocjana R, PZWL, Warszawa 2002, s. 270-272, 284-286
10. Orłowski Cz., *Metale*, [w:] *Podstawy toksykologii*, red. Piotrowski J.K., Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, 2006
11. Kabata-Pendias A., Pendias H., *Biogeochemia pierwiastków śladowych*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1999
12. Wojciechowska M., Kołodziejczyk J., Gocki J., Kartuzi Z., *Nadwrażliwość na nikiel*; *Alerg Astma Immun* 13(3), 2008, 136-140
13. Śpiewak R., Piętowska J., *Nikiel – alergen wyjątkowy. Od struktury atomu do regulacji prawnych*, *Alergologia Immunologia* 3 (3-4), 2006, s. 58-62

14. Nielsen H., Ph.D.: *Is Nickel Nutritionally Important?*, Nutrition Today, 1993, s.14-19
15. *Fizjologia człowieka z elementami fizjologii stosowanej i klinicznej pod redakcją prof. dra hab. med. Władysława Z. Traczyka*, prof. dra hab. med. Trzebskiego A, Wydawnictwo lekarskie PZWL, Warszawa 2004, s. 34-38
16. Ganong W. F., *Fizjologia: podstawy fizjologii lekarskiej*, PZWL, Warszawa, 1994, 46-47, s. 52-53
17. <http://kf.sggw.pl/nauka/pracownia-komory-ussinga/>
18. Lee J., Gomora J., Cribbs L., Perez-Reyes E., *Nickel Block of Three Cloned T-Type Calcium Channels: Low Concentrations Selectively Block $\alpha 1H$* , January 2009
19. Mlinar B., Enyeart J., *Block of current through T-type calcium channels by trivalent metal cations and nickel in neural rat and human cells*, Journal of Physiology 469, 1993, pp. 639-652
20. Davidson T., Chen H., Garrick M. D., D'Angelo G., Costa M., *Soluble nickel interferes with cellular iron homeostasis*, Molecular and Cellular Biochemistry 279, 2005, s.157-162
21. Cherrier M. V., Cavazza C., Bochet C., Lemaire D., Fontecilla-Camps J.C., *Structural characterization of a putative endogenous metal chelator in the periplasmic nickel transporter Nika*, Biochemistry 47, 2008, s. 9937-9943
22. Cucu D., Simaels J., Van Driessche W., Zeiske W., *External Ni^{2+} and ENaC in A6 Cells: Na^{+} Current Stimulation by Competition at a Binding Site for Amiloride and Na^{+}* ; Journal of Membrane Biology 194 (1), 2003, s. 33-45
23. Magistretti J., Brevi S., De Curtis M., *Ni^{2+} slows the activation kinetics of high-voltage-activated Ca^{2+} currents in cortical neurons: evidence for a mechanism of action independent of channel-pore block*; Journal of Membrane Biology 179 (3), 2001, s. 243-262
24. Masako S., Rieko A., Akiko Y., Takaaki T., Yasusei K. and Naozumi I., *Molecular Mechanisms of Nickel Allergy*, International Journal of Molecular Sciences, Feb 2016
25. A. Rorbach-Dolata, Z. Marchewka, i A. Piwowar, *Biochemiczna kancerogeneza wybranych metali ciężkich w raku pęcherza moczowego*, Postępy Biochem. t. 61, nr 2, , ss. 176-182,
26. Liberda E. N., Cuevas A. K., Gillespie P. A., Grunig G., Qu Q., Chen L. C., *Exposure to inhaled nickel nanoparticles causes a reduction in number and function of bone marrow endothelial progenitor cells*, Inhalation Toxicology 22 (2), 2010, s. 95-99
27. Karaś Z., *Nikiel w środowisku a objawy chorobowe*; Nowiny Lek 74(4), 2005, 416-418
28. Thyssen J. P., Linneberg A., Menné T i wsp., *The epidemiology of contact allergy in the general population – prevalence and main findings*, Contact Dermatitis 57. 2007; 287-299
29. Uter W, Hegewald J, Aberer i wsp., *First results of the european surveillance system of contact allergies*, The European standard series in 9 European countries, 2002/2003, Contact Dermatitis 53, 2005; 136-145
30. Midander K., Hurtig A., Borg Tornberg A. and Julander A., *Allergy risks with laptop computers – nickel and cobalt release*, Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institutet, SE-171 77, Stockholm, Sweden, 2016 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd Contact Dermatitis, 74, 353-359
31. Line E. K. Overgaard, Kristiane A. Engebretsen, Peter Jensen, Jeanne D. Johansen and Jacob P. Thyssen, *Nickel released from children's toys is deposited on the skin*, National Allergy Research Centre, Department of Dermato-Allergology, Herlev and Gentofte University Hospital, University of Copenhagen, 2900 Hellerup, Denmark, John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd 380 Contact Dermatitis, 2016, 74, 373-384

Oddziaływanie niklu na skórę ludzi

Skóra pełni w ciele człowieka wiele funkcji. Jedną z nich jest funkcja ochronna przed działaniem czynników środowiska zewnętrznego, tj. czynników fizycznych, chemicznych i bakteryjnych. Jest ona narządem niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania organizmu. W związku z tym, że jest ona najbardziej zewnętrznym narządem w ciele człowieka, jest tym samym najbardziej narażona na działanie związków zawartych w środowisku zewnętrznym. Zbudowana jest z komórek zwanych keratynocytami, które jak każda komórka prowadzą transport jonów przez błonę. Za pomocą kanałów jonowych, szczególnie wapniowych, do komórek dostaje się również nikiel. Nikiel jest piątym najczęściej występującym pierwiastkiem na ziemi. Jest powszechnie wykorzystywany w protezach dentystycznych, jubilerstwie, pojazdach mechanicznych, w przemyśle spożywczym i chemicznym. Jony niklu są silnymi alergenami, które penetrując skórę, doprowadzają do aktywacji komórek nabłonkowych, które wytwarzają cytokiny, które w efekcie doprowadzają do aktywacji komórek prezentujących antygen (APC), co w połączeniu z częstym wykorzystywaniem tego pierwiastka w przemyśle, nierzadko prowadzi do powstania alergii na nikiel. Alergia została zakwalifikowana, jako choroba cywilizacyjna XXI wieku. Według ostatnich badań uczulenia na nikiel mogą powodować również praca przy komputerze oraz długotrwały kontakt z zabawkami dziecięcymi, do których produkcji użyty został nikiel. Alergia ta jest diagnozowana głównie za pomocą testów płatkowych, a niektóre badania wskazują, że usunięcie metalu, będącego przyczyną alergii, tu niklu, skutecznie poprawia objawy alergiczne. Tematem pracy jest analiza literatury dotyczącej wpływu niklu na skórę u ludzi.

Słowa kluczowe: nikiel, keratynocyty, alergia, nadwrażliwość, skóra

The influence of nickel on human skin

The skin has many functions in the human body. One of them is the protective function against external environmental factors, f.ex. physical, chemical and microorganisms factors. This organ is necessary for the proper functioning of the body. Therefore, it is a most outer organ in the human body; it is thus most exposed to the compounds contained in the external environment. It is composed of cells called keratinocytes, which, like every cell in human body, lead ion transport through the membrane. Using the ion channels, specifically calcium, nickel gets into cells as well. Nickel is the fifth most common element on earth. It is commonly used in dental prostheses, jewelry, motor vehicles, food and chemical industries. Nickel ions are potent allergens, which penetrate the skin, lead to the activation of epithelial cells that produce cytokines, which in the end lead to the activation of antigen presenting cells (APC), which, combined with the frequent use of this element in the industry, often leads to the formation of nickel allergy. Allergy was classified as a disease of civilization 21st century. According to a recent study nickel allergy can also be caused by working at the computer and prolonged contact with children's toys, in production of which was used nickel. This allergy is diagnosed mainly by patch testing, and some studies suggest that the removal of metal, which causes allergies, here nickel, effectively improves allergic symptoms. The theme of this publication is the analysis, of literature which relates to the effect of nickel on human skin.

Keywords: Nickel, keratinocytes, allergy, hypersensitivity, skin

Znaczenie wybranych lizyn bakteriofagowych w leczeniu zakażeń bakteryjnych

1. Wstęp

Antybiotyki stosowane są od wielu lat w zwalczaniu chorób zakaźnych ludzi i zwierząt. Jeszcze do niedawna były najskuteczniejszą bronią w walce z zakażeniami bakteryjnymi. Jednak już w chwili odkrycia tej grupy leków znane było zjawisko oporności na antybiotyki [1]. O antybiotykooporności mówimy, gdy dany antybiotyk traci zdolność do inhibicji wzrostu i podziału bakterii. Z reguły wyróżnia się dwa typy antybiotykooporności – wrodzoną i nabytą. Oporność wrodzona jest naturalną niewrażliwością względem niektórych antybiotyków, jednak poważniejszym problemem jest antybiotykooporność nabyta. Spowodowana jest ona selektywną presją środowiska na skutek stosowania antybiotyków w medycynie do leczenia infekcji bakteryjnych, w weterynarii do promowania wzrostu oraz w profilaktyce u zwierząt gospodarskich. W odpowiedzi na presję środowiska drobnoustroje uruchomiły systemy adaptacyjne do nowych warunków, wykorzystując do tego celu szereg skomplikowanych mechanizmów genetycznych. Mechanizmy te opierają się na selekcji szczepów bakterii, które oporność na antybiotyk uzyskały w wyniku spontanicznej mutacji genomu, wertykalnego transferu genów oporności, czy też horyzontalnego transferu genów oporności [2]. Wzrost antybiotykooporności bakterii ma ogromne znaczenie w ochronie zdrowia. Odnotowuje się coraz większy problem z zakażeniami wywołanymi przez bakterie Gram-dodatnie odporne jednocześnie na kilka antybiotyków [3]. Wśród nich szczególnie niebezpieczne są gronkowce odporne na metycylinę (MRSA-methycillin resistant *Staphylococcus aureus*) oraz pneumokoki odporne na penicyliny (PRSP-penicilin resistant *Streptococcus pneumoniae*). Okazuje się również, że w przypadku infekcji wywołanych przez powszechnie występujące szczepy gronkowców i paciorkowców wankomycyna, będąca często „antybiotykiem ostatniej szansy” jest nieskuteczna [4]. Według danych epidemiologicznych w ostatnich latach istotną rolę w etiologii zakażeń szpitalnych stwarzających trudności terapeutyczne stanowią również bakterie Gram-ujemne, głównie *Acinetobacter baumani* oraz *Pseudomonas aeruginosa* [5]. Bakterie te wykazują

¹monika_karasiewicz@sggw.pl, Samodzielny Zakład Biologii Mikroorganizmów Wydział Rolnictwa i Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

²urszula_szkop@sggw.pl, Samodzielny Zakład Biologii Mikroorganizmów, Wydział Rolnictwa i Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

równoczesną oporność na kilka różnych klas antybiotyków. Dodatkowym efektem szerokiego stosowania antybiotyków w terapii zakażeń bakteryjnych jest wzrost częstości występowania działań niepożądanych. Działania niepożądane antybiotykoterapii, które obserwuje się zarówno u ludzi, jak i u zwierząt, wiązane są między innymi z zaburzeniami prawidłowego, fizjologicznego mikrobiomu.

Problem antybiotykooporności jest coraz większy, a choroby wywołane przez antybiotykoo odporne bakterie są niebezpieczne [6]. Dotyczy to szczególnie pacjentów leczonych szpitalnie oraz osób z upośledzoną czynnością układu immunologicznego. Wobec wzrastającej oporności bakterii oraz zagrożeń, jakie niesie ze sobą powszechne stosowanie antybiotyków należy skupić się na poszukiwaniu metod alternatywnych dla tych związków. Jedną z nich może stać się biokontrola zakażeń bakteryjnych z wykorzystaniem lizyn bakteriofagowych.

Lizyny to bakteriofagowe enzymy o właściwościach litycznych wykorzystywane w celu degradacji peptydoglikanu [7]. Każda z lizyn ma określoną aktywność enzymatyczną i działa na jedno z czterech głównych wiązań w peptydoglikanie [8]. Mimo iż lizyny bakteriofagowe nie stanowią jednorodnej grupy białek, to pełnią tą samą funkcję biologiczną. Poprzez hydrolizę peptydoglikanu w ścianie komórkowej bakterii biorą udział w uwalnianiu wirionów potomnych z komórki gospodarza [9]. Po zniszczeniu peptydoglikanu następuje liza komórki gospodarza. Typ rozwoju bakteriofaga prowadzący do produkcji wirionów potomnych i lizy komórki gospodarza nazywa się rozwojem litycznym [7].

W związku z występowaniem w rozwoju litycznym fagów takich enzymów jak lizyny pojawiła się idea wykorzystania ich właściwości w leczeniu i profilaktyce zakażeń bakteryjnych [10].

Lizyny fagowe zbudowane są z dwóch domen obejmujących przeciwległe końce białka [10]. Na końcu aminowym (N-końiec) znajduje się domena katalityczna odpowiadająca za enzymatyczną aktywność (muramidazy, glukozaminidazy, endopeptydazy lub amidazy), która trawi specyficzne wiązania w peptydoglikanie. W niektórych przypadkach domena katalityczna może być zbudowana z kilku subdomen [11]. Przykładem jest lizyna PlyC wyizolowana z bakteriofaga C1 przeciwko *Streptococcus* z grupy C. Zawiera w swojej domenie katalitycznej dwie oddzielne podjednostki PlyCA i PlyCB, z których tylko PlyCA wykazuje aktywność enzymatyczną. Na końcu karboksylowym (C-końiec) znajduje się domena wiążąca (cel wall-binding domain) odpowiadająca za wiązanie odpowiedniego substratu w ścianie komórkowej bakterii gospodarza [7]. Substratem jest zazwyczaj reszta węglowodanowa specyficzna dla danego enzymu. Pozwala to na określenie stopnia swoistości, ponieważ domena wiążąca odnajduje swoisty substrat tylko w bakteriach wrażliwych na dany enzym. Obydwie domeny enzymu połączone są odcinkiem łącznikowym tzw. linkerem [10].

Dodatkowo na specyfikę działania lizyn bakteriofagów wskazuje porównanie sekwencji enzymów tej samej klasy. Wykazało ono wysoką homologię sekwencji znajdujących się w obrębie domeny katalitycznej oraz bardzo niską homologię sekwencji w obrębie domeny wiążącej [10].

W przypadku lizyny Cpl-1 faga *Streptococcus pneumoniae* zaobserwowano dodatkowo charakterystyczną strukturę przestrzenną przyjmującą konformację „hairpin” tzw. spinki do włosów [7]. Przestrzenne zbliżenie domeny katalitycznej i domeny wiążącej sugeruje, że wzajemnie na siebie oddziałują zanim C-koniec zwiąże się z odpowiednim substratem w ścianie komórkowej bakterii. Struktura przestrzenna lizyny Cpl-1 jest pierwszą całkowicie poznaną i opisaną strukturą. Aktualnie trwają badania mające na celu ustalenie, czy struktura „hairpin” jest charakterystyczna tylko dla Cpl-1, czy też jest cechą wspólną wszystkich lizyn [7].

2. Przeciwbakteryjna aktywność wybranych enzymów litycznych

W środowisku występuje wiele bakterii. Do tej pory nie istnieją żadne stuprocentowo skuteczne środki przeciwinfekcyjne przeznaczone do zwalczania kolonizujących bakterii chorobotwórczych i działające na wszystkie możliwe szczepy patogenne [12]. W związku z tym, podjęto próby funkcjonalnej charakterystyki lizyn bakteriofagowych w celu ich wykorzystania do zapobiegania zakażeniom bakteryjnym, jako bezpiecznych i specyficznych enzymów niszczących bakterie chorobotwórcze [13].

Lizyny wykazują wysoką specyficzność wobec określonych gatunków, a nawet szczepów bakterii. W praktyce pozwala to na dobór lizyny w zależności od rodzaju patogenu będącego przyczyną choroby bez naruszania korzystnej mikrobioty. Dodatkowym atutem swoistości lizyn jest również to, że ogranicza ona możliwość powstania oporności. Lizyny nie wywierają presji selekcyjnej na bakterie dla których nie są swoiste [14].

Lizyny jako cząsteczki białka mniejsze od wirionu faga posiadają mniej determinantów antygenowych. Zmniejsza to ryzyko wystąpienia odpowiedzi immunologicznej. Również z uwagi na swoją wielkość, lizyny mogą łatwiej penetrować zakażone tkanki. Dodatkowo wykorzystanie lizyn pozwala wyeliminować ryzyko związane z horyzontalnym transferem genów [14].

Na podstawie przeprowadzonych *in vivo* badań enzymów specyficznych dla *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* oraz *P. aeruginosa* można wnioskować, że preparaty zawierające lizyny mogą być stosowane w celu ograniczenia występowania tych bakterii w środowisku, a także w domach opieki i szpitalach, czego skutkiem byłoby zmniejszenie częstości zakażeń wywołanych przez te patogeny [14÷18].

2.1. Lizyny wykazujące aktywność przeciwko bakteriom Gram-dodatnim

2.1.1. Znaczenie lizyny PlyC faga C1 paciorkowców

Lizyna PlyC bakteriofaga C1 zdolnego do swoistej infekcji *Streptococcus* z grupy C jest enzymem o masie 50 kDa i występuje jako dimer. Była pierwszą endolizyną wykorzystaną jako preparat antybakteryjny [14]. Najbardziej wrażliwą na działanie tej lizyny grupą *Streptococcus* okazała się grupa A. Badania wykazały, że enzym PlyC jest zdolny zabijać *in vitro* każdy z 10 szczepów grupy A różnych typów serologicznych. Paciorkowce z grupy C i E również okazały się podatne na działanie tego enzymu, jednak w mniejszym stopniu. Natomiast bakterie z grup B, D, F, G, L oraz N są niewrażliwe na działanie PlyC. Dodatkowo sprawdzono aktywność PlyC wobec innych patogenów jamy ustnej, takich jak: *S. oralis*, *S. mutans*, *S. intermedius* [15]. Bakterie te okazały się nie podatne na działanie enzymu. Dla porównania przebadano także inne bakterie występujące wśród mikrobioty jamy ustnej. Spośród Gram-dodatnich były to *Staphylococcus epidermidis* i *Staphylococcus aureus* a spośród Gram-ujemnych *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* oraz *Neisseria lactamicus*. Pomimo podobieństwa w budowie peptydoglikanu wszystkich wyżej wymienionych bakterii, nie były one wrażliwe na lityczne działanie enzymu PlyC. Świadczy to o swoistości działania lizyny. Wąskie spektrum działania jest wskazane, aby enzym został zastosowany jako środek przeciwbakteryjny, ponieważ selektywnie zabija potencjalnie chorobotwórcze paciorkowce (grupy A i C) i nie wpływa negatywnie na rodzimą mikrobiotę jamy ustnej [14].

Lityczna aktywność PlyC jest bardzo wysoka a enzym działa szybko. Analiza wykonana pod mikroskopem elektronowym wykazała, że po 15 sekundach działania lizyny następuje wyraźna degradacja ściany komórkowej i śmierć bakterii [15]. W innym doświadczeniu *in vitro* wykazano, że 1000U lizyny powoduje zniszczenie około 10^7 komórek *Streptococcus sp.* już po 5 sekundach od ekspozycji [14]. Jeden U to standardowa jednostka enzymatyczna, która wyraża ilość enzymu katalizującą przemianę 1 μ mola substratu w czasie 1 minuty w warunkach optymalnych. Co więcej, tylko pojedyncza dawka podana do jamy ustnej myszy przed infekcją *Sterptococcus* z grupy A była wystarczająca, aby zapewnić istotną ochronę przed kolonizacją nabłonka śluzówki górnych dróg oddechowych. W grupie badanej poddanej działaniu lizyny PlyC jedynie 28,5% myszy zostało zainfekowanych. Natomiast w grupie kontrolnej, której nie podano lizyny, aż 70,5% myszy zostało zainfekowanych. U myszy, które zostały zainfekowane pomimo leczenia lizyną, liczba bakterii tworzących kolonie (jednostek tworzących kolonie, od ang. *colony forming units*, CFU) na ogół była niższa lub kolonizacja została wyeliminowana w ciągu 48 godzin. W przypadku myszy kontrolnych, liczba jednostek tworzących kolonie wzrosła w ciągu 48 godzin, a jedna mysz nie przeżyła. Ponadto po upływie 2 godzin od

doustnego podania 500U lizyny PlyC silnie zainfekowanym myszom. nie wykryto obecności paciorkowców.

W związku z tym, że badania potwierdziły lityczną aktywność lizyny PlyC stwierdzono, że okresowe podawanie enzymu może pomóc w wyeliminowaniu paciorkowców z nabłonka błony śluzowej górnego odcinka układu oddechowego [15].

2.1.2. Znaczenie lizyny LysK przeciw gronkowcom

LysK jest bakteriofagową lizyną wyizolowaną z bakteriofaga K infekującego *Staphylococcus aureus* [16]. Jest białkiem monomerycznym złożonym z 495 aminokwasów. Wykazuje szerokie spektrum aktywności litycznej przeciw gronkowcom metycylinoopornym, wankomycyno opornym, czy też teicoplaninoopornym. Analiza sekwencji białka LysK za pomocą programu BLAST wykazała, że posiada ono trzy domeny. N-końcowa domena katalityczna określana, jako CHAP to aminohydrolaza/peptydaza cysteino/histydyno zależna. C-końcowa domena wiążąca odpowiedni epitop w ścianie komórkowej bakterii to SH3_5. Natomiast trzecia, środkowa domena to amidaza N-acetylmuramylo-L-alaninowa. Każda domena hydrolazowa katalizuje hydrolizę peptydoglikanu niezależnie od pozostałych domen [17].

Takie właściwości LysK sugerują, że może ona być skutecznym środkiem w walce z infekcjami wywołanymi przez gronkowce [16]. Lizynę LysK eksymowano w bakteriach kwasu mlekowego [17]. Lizaty *Lactococcus sp.* zawierające rekombinowaną lizynę testowano przeciwko metycylinoopornemu szczepom *S. aureus* (MRSA) izolowanym od pacjentów hospitalizowanych [18]. Badanie aktywności litycznej LysK przeprowadzono za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym, który zawierał zabite komórki bakteryjne *S. aureus*. Po renaturacji białek rozdzielonych elektroforetycznie w żelu strefa lityczna pojawiła się w postaci przezroczystego prążka na wysokości odpowiadającej masie 54 kDa w pasie próbki zawierającej białko kodowane przez gen *lysK* indukowany nizyną. W przypadku próbki zawierającej gen kodujący LysK, ale pochodzącej z hodowli nieindukowanej nizyną także pojawiła się strefa lityczna jednak była mało wyraźna. W pozostałych próbach kontrolnych nie zaobserwowano żadnych przejawów aktywności litycznej [18].

Lityczną aktywność LysK testowano także na żywych szczepach metycylinoopornych *S. aureus*. Do hodowli płynnej *S. aureus* dodawano lizat zawierający LysK. Już po godzinie od dodania lisatu zauważono spadek liczby komórek gronkowców o 99% w porównaniu ze stanem wyjściowym [18].

Doświadczenia te potwierdziły aktywność lityczną rekombinowanej LysK w *Lactococcus sp.* i pokazały, że lizyna ta może rozkładać peptydoglikan ścian komórkowych metycylinoopornych szczepów *S. aureus* [16÷18].

Potwierdzenie litycznej aktywności lizyny LysK przeciw szczepom MRSA skłoniło naukowców do analizy zakresu jej aktywności wobec innych szczepów *S. aureus* jak również innych rodzajów *Staphylococcus sp.*

Zakres aktywności lizyny LysK badano za pomocą metody dyfuzyjno-krażkowej na szalkach Petriego, na których uprzednio wysiano określone gatunki i szczepy bakterii. Wyniki odczytywano po całonocnej inkubacji w temperaturze 37°C. Zarówno koagulazododatnie jak i koagulazoujemne gronkowce oraz lekooporne szczepy uległy lizie po dodaniu ekstraktu z *L. lactis* zawierającego lizynę LysK. Dotyczyło to zarówno autoklawowanych jak i żywych gronkowców, w tym szczepów wywołujących zapalenie wymion u bydła, szczepów MRSA izolowanych od pacjentów hospitalizowanych, opornych na wankomycynę szczepów *S. aureus*, a także szczepów opornych na teikoplaninę. Rekombinowana lizyna LysK nie była zdolna do lizy innych bakterii Gram-dodatnich, takich jak *Listeria innocua*, *Bacillus cereus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* [18].

Lizyna LysK ekstrahowana z bakterii kwasu mlekowego, wykazująca aktywność lityczną wobec szerokiego spektrum gronkowców może mieć powszechne zastosowanie do leczenia zakażeń metycylinoopornymi szczepami *S. aureus*, wankomycynoopornymi szczepami *S. aureus* oraz szczepami *S. aureus* będącymi etiologicznym podłożem zapalenia gruczołu mlekowego u bydła. Dodatkowo nie działa na inne bakterie Gram-dodatnie z różnych rodzajów, w tym także szczepy bakterii probiotycznych. Sugeruje to, że LysK jest specyficzna dla *Staphylococcus sp* [16÷19]

Możliwość wykorzystania LysK, jako środka terapeutycznego lub profilaktycznego w walce z zakażeniami *Staphylococcus sp*. ma duże znaczenie. *S. aureus* jest szczególnie niebezpieczny gdyż prawie 90% szczepów wykazuje oporność na penicylinę i inne antybiotyki z grupy penicylin [19]. Wśród pacjentów zakażonych szczepami *S. aureus* opornymi na metycylinę (MRSA) umieralność wynosi 31% [20]. W związku z tym, wykorzystanie litycznych aktywności LysK otwiera nowe perspektywy w walce z tak niebezpiecznymi patogenami jak gronkowce.

2.2. Lizyny wykazujące aktywność przeciwko bakteriom Gram-ujemnym

Bakterie Gram-ujemne mogą być częścią prawidłowej mikrobioty człowieka. Jednak w sprzyjających warunkach (hospitalizacja, antybiotykoterapia, choroby przewlekłe, przerwanie ciągłości skóry) bakterie te mogą być odpowiedzialne za zakażenia krwi, zakażenia układu moczowego, zapalenia płuc, zakażenia ran pooperacyjnych oraz pooperacyjnych. Bakterie Gram-ujemne są coraz częstszym czynnikiem etiologicznym zakażeń związanych z opieką zdrowotną [21]. Według ostatnich danych opublikowanych przez Narodowy System Bezpieczeństwa Opieki Zdrowotnej w Stanach Zjednoczonych ponad 30% zakażeń szpitalnych wywołanych jest przez patogeny Gram-ujemne. Patogeny Gram-ujemne są czynnikami etiologicznymi 47% przypadków zapalenia płuc oraz 45% przypadków zakażeń układu moczowego. Na oddziałach intensywnej terapii patogeny Gram-ujemne odpowiadają za blisko 70% oportunistycznych zakażeń szpitalnych [22]. Do najczęściej izolowanych bakterii Gram-ujemnych odpowiedzialnych za występowanie zakażeń szpitalnych

należą fermentujące pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz niefermentujące pałeczki z gatunku *Acinetobacter baumannii* i *Pseudomonas aeruginosa* [21]. Na obszarze Unii Europejskiej zakażenia szpitalne wywołane przez wyżej wymienione patogeny występują u 4,1 miliona pacjentów. Szacuje się, że tego typu zakażenia powodują w Europie około 25000 zgonów rocznie [23].

Bakterie Gram-ujemne stanowią szczególnie problem ze względu na liczne mechanizmy oporności, obecność lipopolisacharydu, białek błony zewnętrznej i pomp wielolekowych. Dlatego zastosowanie odpowiedniej terapii do eradykacji bakterii patogennych nastęrcza wiele trudności [24]. Szansę na nowy sposób leczenia zakażeń wywołanych przez patogeny Gram-ujemne daje wykorzystanie enzymów litycznych pochodzenia bakteriofagowego. Jednakże wykorzystanie enzymów litycznych bakterio-fagów w walce z patogenami Gram-ujemnymi niesie ze sobą pewne trudności. Ograniczona liczba lizyn stosowanych przeciwko bakteriom Gram-ujemnym związana jest z różnicami w budowie ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych [25]. Obecność błony zewnętrznej (OM, ang. *outer membrane*) u patogenów Gram-ujemnych stanowi nieprzepuszczalną barierę dla mniejszych cząstek hydrofilowych niż enzymy, chroniąc tym samym warstwę peptydoglikanu przed działaniem litycznym lizyn podanych z zewnątrz [26]. Inną cechą charakterystyczną jest również struktura peptydoglikanu. Bakterie Gram-ujemne mają charakterystyczną strukturę peptydoglikanu (chemotyp A1 γ) z bezpośrednim wiązaniem krzyżowym między kwasem mezo-diaminopimelinowym i D-alaniną dwóch przylegających łańcuchów glikanu. W związku z tym, lizyny izolowane z bakteriofagów infekujących dowolny gatunek Gram-ujemny są aktywne enzymatycznie względem peptydoglikanu każdego innego szczepu bakterii Gram-ujemnych, w odróżnieniu od wysoce specyficznego działania lizyn przeciwko bakteriom Gram-dodatnim [27].

Zidentyfikowano kilka lizyn wykazujących aktywność w stosunku do bakterii Gram-ujemnych. Efektywniejsze działanie lizyn możliwe było głównie dzięki zastosowaniu dodatkowego czynnika w postaci EDTA, lub jak pokazują ostatnie badania, dzięki obecności w środowisku działania lizyny słabego kwasu organicznego (cytrynowego lub jabłkowego). Zastosowanie dodatkowego czynnika spowodowało permeabilizację OM umożliwiając lizynie dostęp do peptydoglikanu [28]. Przykłady takich lizyn przedstawiono poniżej.

2.2.1. Znaczenie lizyny ABgp46

Lizynę ABgp46 wyizolowano z bakteriofaga vb_AbaP_CEB1 przeciwko *Acinetobacter*. Jest enzymem zawierającym 185 aminokwasów o przewidywanej masie cząsteczkowej 23,1 kDa. Lizyna ABgp46 działa jako hydrolaza peptydoglikanu i została zaklasyfikowana do rodziny 19 glikozydaz CAZY GH19, które trawią nierozgałęzione łańcuchy polimerów N-acetyloglukozaminy [29]. Badania w warunkach *in vitro* wykazały, że rekombinowana lizyna ABgp46 wykazuje nieznaczną aktywność wobec

baterii Gram-ujemnych z wyjątkiem szczepów *Acinetobacter baumani*. Niektóre szczepy *Acinetobacter* były wrażliwe w niewielkim stopniu i działanie lizyny powodowało spadek ilości żywych komórek o jedną do dwóch jednostek logarytmicznych. Po dodaniu do lizyny ABgp46 kwasu cytrynowego lub jabłkowego, w pH 4,0 zaobserwowano szersze spektrum działania. Stwierdzono, że poprawa efektywności działania lizyny ABgp46 spowodowana była destabilizacją OM przez kwas organiczny. Zastosowanie kwasu organicznego doprowadziło do obniżenia wewnętrznego pH bakterii i akumulację substancji toksycznych. Lizyna ABgp46 wykazywała najwyższą skuteczność przeciwko *Acinetobacter baumani*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* oraz *Cronobacter sakazaki*. Jest to szczególnie ważne, gdyż *Cronobacter sakazaki* to patogen będący czynnikiem etiologicznym zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych i martwiczego zapalenia jelita grubego u niemowląt. Infekcja *Cronobacter sakazaki* obarczona jest 80% śmiertelnością. [30]. Dostępne dane literaturowe wskazują, że lizyna ABgp46 wykazuje aktywność przeciwko patogenom stanowiącym najbardziej narastający problem w medycynie, zarówno ze względów epidemiologicznych, jak i terapeutycznych. Lizynę ABgp46 można wykorzystać w preparatach komercyjnych, takich jak kremy i balsamy do stosowania miejscowego w leczeniu infekcji skórnych związanych z trądzikiem lub jako preparat w leczeniu i profilaktyce zakażeń tkanek miękkich i ran pooperacyjnych [31].

2.2.2. Artilizyny – chimeryczne lizyny bakteriofagowe

Domeny lizyn fagowych mogą działać niezależnie od siebie zachowując specyficzność. W związku z tym w wyniku fuzji różnych domen można stworzyć nowe białka o zwiększonych możliwościach zastosowania w walce z patogenami [32]. Badania prowadzone nad synergicznym działaniem lizyn doprowadziły do stworzenia tzw. artilizyn. Stanowią one nową klasę skutecznych, enzymatycznych związków antybakteryjnych prezentujących unikalny model działania. Są to rekombinowane białka fuzyjne [33]. Artilizyny zawierają lizynę kodowaną przez bakteriofaga w połączeniu ze specyficznym polikationowym nonapeptydem. Lizyna bakteriofagowa degraduje peptydoglikan, natomiast polikationowy nonapeptyd destabilizuje błonę zewnętrzną bakterii Gram-ujemnych i umożliwia dotarcie lizyny do substratu [34]. Przykładem takich enzymów fuzyjnych jest artilizyna Art-17, Art.-014, czy artilizyna Art.-085 [35]. Artilizyna Art-175 zawiera zmodyfikowany wariant lizyny KZ144, kodowanej w genomie dużego bakteriofaga phiKZ infekującego *P. aeruginosa*, będącej w N-terminalnej fuzji z peptydem SNAP-29 (ang. *sheep myeloid antibacterial peptide*). Wykazano wysoką wrażliwość komórek *P. aeruginosa* oraz *A. baumannii* w fazie stacjonarnej na działanie artilizyny Art-175. Enzym ten zabija zarówno komórki aktywnie dzielące się jak również komórki przetrwałe (ang. *persisters*). Komórki przetrwałe stanowią niewielką frakcję populacji bakteryjnej wykazujące tolerancyjną na traktowanie wysokimi dawkami antybiotyków [33]. Badania wykazały,

że artilizyna Art-175 jest w stanie całkowicie zlikwidować populację komórek przetrwałych *P. aeruginosa*. Związane jest to z modelem działania artilizyn. Artilizyny trawią specyficzne wiązanie w peptydoglikanie w przeciwieństwie do antybiotyków, które hamują szlaki metaboliczne patogenu. Potencjalna aktywność antibakteryjna artilizyny Art-175 była testowana *in vivo* na psach [34, 35, 27]. Zaletą tego enzymu jest również szybkość działania. Zaobserwowano całkowitą lizę gęstego inokulum *A. baumannii* (10^9 CFU/ml) w ciągu dwóch godzin od aplikacji minimalnej dawki artilizyny Art-175 hamującej wzrost (MIC – *minimal inhibitory concentration*). Artilizyny po aplikacji są zdolne do obniżenia procentu żywych bakterii w ciągu 30 minut o 4 do 5 jednostek logarytmicznych. Co istotne, nie zauważono wytworzenia przez badane szczepy oporności na zastosowane enzymy w ciągu 20 cykli eksperymentalnych, podczas gdy dla stosowanej równolegle ciprofloxacyny oporność pojawiła się już po 7 cyklach podawania MIC [35].

Artilizyny są ukierunkowanymi czynnikami antibakteryjnymi prezentującymi nowy model działania. Wykazują działanie zarówno przeciwko bakteriom Gram-dodatnim takim jak *S. aureus*, jak również dzięki obecności specyficznego peptydu, przeciwko bakteriom Gram-ujemnym takim jak *P. aeruginosa*. Prowadzone są dalsze badania mające na celu produkcję artilizyn przeciwko kolejnym groźnym patogenom ludzi i zwierząt [31÷35]

3. Podsumowanie

Lizyny to m.in. bakteriofagowe enzymy lityczne wykorzystywane w celu degradacji peptydoglikanu infekowanych komórek bakteryjnych [7]. Dzięki swym wyjątkowym właściwościom, takim jak wysoka specyficzność wobec określonych gatunków, a nawet szczepów bakterii oraz wysoka aktywność katalityczna, mogą stać się skutecznym narzędziem w walce z infekcjami bakteryjnymi. Pierwszą endolizyną wykorzystaną jako preparat antibakteryjny była bakteriofagowa lizyna PlyC faga C1 paciorkowców. Jej okresowe podawanie może pomóc w wyeliminowaniu paciorkowców z nabłonka błony śluzowej górnego odcinka układu oddechowego [14]. Na uwagę zasługuje fakt, że lizyny poza specyficzną eliminacją patogenów nie wpływają na normalną, korzystną mikrobiotę [10]. Jest to szczególnie ważne gdyż taką właściwość lizyn można wykorzystać do kontroli zakażeń szpitalnych i pozaszpitalnych. Jednym z podstawowych patogenów odpowiedzialnych za zakażenia szpitalne i pozaszpitalne u ludzi jest *Staphylococcus aureus*. Największym problemem związanym z gronkowcowymi zakażeniami jest bardzo szybkie rozprzestrzenianie się szczepów opornych na antybiotyki, w tym również metycylinę, co w praktyce oznacza oporność na wszystkie stosowane antybiotyki β -laktamowe. Badania przeprowadzone nad lityczną aktywnością lizyny LysK wykazały, że może być użyta do walki ze *S. aureus*. Lizyna LysK wykazuje szerokie spektrum aktywności litycznej przeciw gronkowcom metycylinoopornym,

wankomycynoopornym oraz teicoplaninoopornym, a nabycie oporności *S. aureus* na działanie LysK jest mało prawdopodobne [16].

Za szereg zakażeń szpitalnych odpowiedzialne są również bakterie Gram-ujemne. Do jednych z najbardziej niebezpiecznych Gram-ujemnych patogenów oportunistycznych należą bakterie z rodzaju *Acinetobacter* oraz *Pseudomonas*. Zakażenia wywołane przez te patogeny są szczególnie niebezpieczne dla osób z obniżoną odpornością, ponieważ prowadzą do ropnych infekcji ran pooperacyjnych i pooparzeniowych (*Pseudomonas aeruginosa*), zapalenia płuc, zapalenia otrzewnej, czy też zakażenia dróg moczowych (*Acinetobacter baumani*). Podjęto zatem próbę identyfikacji lizyn wykazujących aktywność w stosunku do bakterii Gram-ujemnych. Przykładem może być lizyna ABgp46 wyizolowana z bakteriofaga vb_AbaP_CEB1 przeciwko *Acinetobacter*. Lizyna ABgp46 wykazywała najwyższą skuteczność przeciwko *Acinetobacter baumani*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* oraz *Cronobacter sakazaki*. Wyjątkowe właściwości lizyn fagowych skłoniły naukowców do stworzenia chimerycznych lizyn, które posiadają aktywność lityczną przeciwko więcej niż jednej bakterii [33]. Artilizyna Art-175 jest rekombinowanym białkiem fuzyjnym zawierającym lizynę połączoną ze specyficznym polikationowym nonapeptydem, umożliwiającym dotarcie lizyny do substratu w peptydoglikanie bakterii Gram-ujemnych. Wykazano wysoką wrażliwość *P. aeruginosa* oraz komórek *Acinetobacter baumannii* w fazie stacjonarnej na działanie artilizyny Art-175. Dodatkową zaletą tego enzymu jest fakt, że zabija zarówno komórki aktywne metabolicznie, jak również komórki przetrwałe (ang. *persisters*), które mogą stać się podłożem etiologicznym kolejnego zakażenia. Stworzenie chimerycznej lizyny Art.-175 aktywnej wobec drobnoustrojów wywołujących wtórne zakażenia szpitalne pokazało, że można skonstruować wielofunkcyjną lizynę, która wykazuje specyficzność wobec dwóch patogenów jednocześnie. Stwarza to nowe możliwości w leczeniu wszelkich chorób zakaźnych ludzi, które mogą być spowodowane przez mieszane infekcje bakteriami *Acinetobacter baumannii* i *Pseudomonas aeruginosa*.

W dobie narastającej antybiotykooporności wzrasta znaczenie lizyn bakteriofagowych [7]. Stają się one alternatywą dla antybiotyków również poprzez to, że są stosunkowo łatwe do wyprodukowania w dużych ilościach i w stanie oczyszczonym. Ponieważ szacuje się, że istnieje 10^{31} cząstek faga na Ziemi, możliwości identyfikacji nowych enzymów litycznych są ogromne. Być może za kilka lat fagowe enzymy lityczne staną się istotnym i powszechnie wykorzystywanym środkiem w walce z bakteriami chorobotwórczymi. Kolejnym wyzwaniem na przyszłość będzie również skutecznie wykorzystanie lizyn jako substancji zapobiegającym infekcjom bakteryjnym.

Literatura

1. Dzierżanowska D., *Antybiotykoterapia praktyczna*, Wydanie V, ISBN 978-83-7522-013-1, α medica press, 2009, s. 38-68
2. Drzewiecki A. Heczko B. P., Wójkowska-Mach J., *Lekooporność i antybiotykoterapia zakażeń. Podręcznik dla zespołów kontroli zakażeń*, ISBN 978-83-200-3474-5. Wyd. I, PZWL, Warszawa 2009, s. 125-160
3. Tacconelli E., De Angelis G., Cataldo M.A., Pozzi E., Cauda R., *Does antibiotic exposure increase the risk of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolation? A systematic review and meta-analysis*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61, 2008, s. 26-38
4. Chang S., Sievert D.M., Hageman J.C., Boulton M.L., Tenover F.C., Downes F.P., Shah S., Rudrik J.T., Pupp G.R., Brown W.J., Cardo D., Fridkin S.K. *Infection with vancomycin-resistant Staphylococcus aureus containing the vanA resistance gene*, *The New England Journal of Medicine*, 348 (2003), s. 1342-1347
5. Dzierżanowska-Fangrat K., Dzierżanowska D., *Zakażenia wywoływane przez odporne bakterie Gram (-) – wyzwania i możliwości terapeutyczne*, *Zakażenia* 6, 2006, s. 18-22
6. Srinivasan A., Dick J. D., Perl T. M., *Vancomycin resistance of staphylococci*, *Clinical Microbiology Reviews* 15, 2002, s. 430-438
7. Fishetti V. A., *Bacteriophage lysins as effective antibacterials*, *Current Opinion in Microbiology* 11, 2008, s. 393-400
8. Brzozowska E., Bazan J., Gamian A., *Funkcje białek bakteriofagowych*, *Postępy Higieny Medycyny Doświadczalnej* 65, 2011, s. 167-176
9. Wang, I. N., Smith, D. L., Young, R., *Holins: the protein clocks of bacteriophage infections*, *Annual Reviews in Microbiology* 54, 2000, s. 799-825
10. Fischetti V. A., *Bacteriophage lytic enzymes: novel anti – infectives*, *Trends in Microbiology*, 13, 2005, s. 491-496
11. Nelson D., Schuch R., Chahales P., *PlyC: A Multimeric Bacteriophage Lysin*, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(2006), s. 10765-10770
12. Hudson I., *The efficacy of intranasal mupirocin in the prevention of staphylococcal infections: a review of recent experience*, *Journal of Hospital Infection* 27 (1994), s. 81-98
13. Eiff C. V., Becker K., Machka K., Stammer H., Peters G., *Nasal carriage as a source of Staphylococcus aureus bacteremia*, *The New England Journal of Medicine* 344 (2001), s. 11-16
14. Borysowski J., Weber-Dąbrowska B., Górski A., *Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents*, *Experimental Biology and Medicine* 231 (2006), s. 366-377
15. Nelson D., Loomis L., Fischetti V. A., *Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme*, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (2001), s. 4107-4112
16. Filatova L. Y., Becker S. C., Donovan D. M., Gladilin A. K., Klyachko N. L., *LysK, the enzyme lysing Staphylococcus aureus cells: Specific kinetic features and approaches towards stabilization*, *Biochimie* 92 (2010), s. 507-513
17. Backer S. C., Foster-Frey J., Donovan D. M., *The phage K lytic enzyme LysK and lysostaphin act synergistically to kill MRSA*. *FEMS Microbiology Letters* 287 (2008), s. 185-191

18. O'Flaherty S., Coffey A., Meaney W., Fitzgerald G. F., Ross R. P., *The recombinant phage lysin LysK has a broad spectrum of lytic activity against clinically relevant staphylococci, including methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, Journal of Bacteriology 187 (2005), s. 7161-7164
19. de Ruyter P. G. G. A., Kuipers O. P. and de Vos W. M., *Controlled gene expression systems for Lactococcus lactis with the food-grade inducer nisin*, Applied and Environmental Microbiology 62 (1996), s. 3662-3667
20. Hickey R. M., Twomey D. P., Ross R. P., Hill C., *Production of enterolysin A by a raw milk enterococcal isolate exhibiting multiple virulence factors*, Microbiology 149 (2003), 655-664
21. Cantóna R, Horcajadad J. P, Oliver A, Garbajosaa P. R, Vila J., *Inappropriate use of antibiotics in hospitals: the complex relationship between antibiotic use and antimicrobial resistance*, Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 31 (2013), s. 3-11
22. Weinstein, R. A., Gaynes R., Edwards J. R., *Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli*, Clinical Infectious Diseases C 41 (2005), s. 848-854
23. UK 5 Year Antimicrobial Resistance (AMR) Strategy 2013-2018 Annual Progress Report And Implementation Plan (2014)
24. Fair R. J, Tor Y., *Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century*, Perspectives in Medicinal Chemistry 6 (2014), 25-64
25. Briers, Y., Lavigne, R., *Breaking barriers: expansion of the use of endolysins as novel antibacterials against Gram-negative bacteria*, Future Microbiology 10 (2015), s. 377-390
26. Vaara M., Brade H., Opal S. M., Vagel N., Morrinson D. C., *Lipopolysaccharide and the permeability of the bacterial outer membrane, in endotoxin in health and disease*, Boca Raton, FL: CRC Press, (1999), s. 31-39
27. Walmagh M., Boczkowska B., Grymonprez B., Briers Y., Drulis-Kawa Z., Lavigne R., *Characterization of five novel endolysins from Gram-negative infecting bacteriophages*, Applied Microbiology and Biotechnology 97(10) (2013), s. 4369-4375
28. Oliveira H, Thiagarajan V, Walmagh M, Sillankorva S, Lavigne R, Neves-Petersen M. T., *A Thermostable salmonella phage endolysin, Lys68, with broad bactericidal properties against gram-negative pathogens in presence of weak acids*, PLoS ONE 9 (2014), e108376. doi:10.1371/journal.pone.0108376
29. Cantarel B. L., Coutinho P. M., Rancurel C., Bernard T., Lombard V., Henrissat B., *The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics*, Nucleic acids research 37 (2009), s. 233-238
30. Alakomi H. L., Skyttä E., Saarela M., Mattila-Sandholm T., Latva-Kala K., Helander I. M., *Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane*, Applied and Environmental Microbiology 66 (2000), s 2001-2005
31. Oliveira H., Boas D. V., Mesnage S., Kluskens D. L., Lavigne R., Sillankorva S., Secundo F., Azeredo J., *Structural and enzymatic characterization of ABgp46, a novel phage endolysin with broad anti-Gram-negative bacterial activity*, Frontiers in Microbiology 7 (2016), doi: 10.3389
32. Donovan D. M, Dong S., Garrett W., Rousseau G. M., Moineau S., Pritchard D. G., *Peptidoglycan hydrolase fusions maintain their parental specificities*, Applied and Environmental Microbiology 72 (2006), s. 2988-2996

33. Defraigne V., Scheurmans J., Grymonprez B., Govers S. K., Aertsen A., Fauvart M., Michiels J., Lavigne R., Briers Y., *Efficacy of Artilysin® Art-175 against resistant and persistent Acinetobacter baumannii*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy (2016), AAC-00285
34. Briers Y, Walmagh M., Puyenbroeck V., Cornelissen A., Cenens W., Aertsen A., Oliveira H., Azeredo J., Verween G., Pirnay J. P., Miller S., Volckaert G., Lavigne R., *Engineered endolysin-based „Artilynsins” to combat multidrug-resistant Gram-negative pathogens*, MBio. 5 (2014), e01379-14 doi:10.1128/mBio.01379-14
35. Briers Y., Walmagh M., Grymonprez B., Biebl M., Pirnay J.-P., Defraigne V., Michiels J, Cenens W., Aertsen A., Miller S., Lavigne R., *Art-175 is a highly efficient antibacterial against multidrug-resistant strains and persists of Pseudomonas aeruginosa*, Antimicrob Agents Chemotherapy (2014). doi:10.1128/ AAC.02668-14

Znaczenie wybranych lizyn bakteriofagowych w leczeniu zakażeń bakteryjnych

Antybiotyki stosowane są powszechnie od wielu lat w zwalczaniu bakteryjnych chorób zakaźnych ludzi i zwierząt. Skutkiem tego jest pojawianie się, rozprzestrzenianie i selekcja szczepów antybiotykoopornych. Opcje terapeutyczne zakażeń bakteryjnych zaczęły ulegać wyczerpaniu. W związku z tym, podjęto próby funkcjonalnej charakterystyki lizyn bakteriofagowych w celu ich wykorzystania do zwalczania kolonizujących bakterii chorobotwórczych, jako bezpiecznych i specyficznych enzymów. Lizyny to bakteriofagowe enzymy hydrolizujące peptydoglikan w ścianie komórkowej bakterii. Każda z lizyn ma określoną aktywność enzymatyczną i działa na jedno z czterech głównych wiązań w peptydoglikanie. Lizyny wykazują wysoką swoistość wobec określonego gatunku lub szczepu bakterii bez zakłócania normalnej mikrobioty. Jednocześnie charakteryzują się szybkim działaniem, a prawdopodobieństwo nabycia oporności bakterii na lizynę jest niskie. W związku z tym, lizyny stwarzają nowe możliwości w walce z zakażeniami bakteryjnymi i stają się alternatywą dla antybiotyków. Dodatkowo modułowa budowa lizyn zapewnia możliwość tworzenia zaprojektowanych lizyn (lizyny chimeryczne, artilizyny) o pożądanych właściwościach, obejmujących na przykład szersze spektrum działania, czy zwiększoną aktywność.

Słowa kluczowe: lizyny bakteriofagowe, lizyny chimeryczne, artilizyny, aktywność lityczna, antybiotykooporne bakterie

Significance of the selected bacteriophage lysins in the treatment of bacterial infections

Antibiotics have been used for many years for the treatment of bacterial infectious diseases affecting human and animals. Consequently, bacterial resistance to antibiotics increases. Treatment of diseases caused by antibiotic-resistant bacteria is difficult and often ineffective. Therefore, bacteriophage lysins can be used for the treatment of colonizing pathogenic bacteria as safe and specific enzymes. Lysins are highly evolved enzymes produced by bacteriophage, that hydrolyze peptidoglycan layer in the bacterial cell wall. Each of the lysins has a specific enzymatic activity and acts on one of the four major bonds in the peptidoglycan. Lysins are highly specific with respect to certain species, subspecies or strains of bacteria. Lysins have an advantage over antibiotics because they only kill their target pathogens without disturbing the natural microbiota. Additionally, they act quickly and the probability that bacteria acquire resistance to a lysine is low. Therefore, lysins open new opportunities in the fight against bacterial infections and become an alternative to antibiotics. Moreover, the modular structure of lysins provides an opportunity to create engineered lysins (chimeolysins, artilysins) with desired properties, including for example extended killing spectrum or enhanced activity.

Keywords: phage lysins, lytic activity, chimeolysins, artilisins, antibiotic resistant bacteria

Zjawisko hipertermii magnetycznej w nanocząstkach tlenków żelaza

1. Wstęp

Etymologiczne znaczenie pojęcia „hipertermia” opiera się na generowaniu ciepła w organizmie żywym, a w zastosowaniach klinicznych w miejscu nowotworu [1]. Temperatura lokalnego środowiska guza powoduje zmiany fizjologii komórek chorych, co ostatecznie prowadzi do ich apoptozy. Zazwyczaj wzrost temperatury wynosi w granicach od 41 °C do 46 °C, co przyczynia się do procesów degradacji wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych takich jak denaturacja białek czy agregacja [2, 3]. Efektywność hipertermii zależy od temperatury wytwarzanej w docelowych miejscach, czasu ekspozycji i specyfiki guza. Istnieją trzy główne rodzaje hipertermii: lokalna, regionalna i całego ciała. Lokalna hipertermia obejmuje działanie ciepła tylko na niewielkim obszarze (np. guz), regionalna odnosi się do większych obszarów takich jak cały organ lub tkanka, natomiast hipertermia całego ciała stosowana jest w przypadku leczenia przerzutów komórek nowotworowych w obrębie całego organizmu [4, 5].

W niniejszej pracy zostaną przedstawione aspekty techniczne i fizyczne magnetycznej hipertermii z użyciem nanocząstek żelaza oraz wyniki badań własnych nanocząstek Fe_3O_4 uzyskanych metodą współstrącenia z roztworu.

2. Historia hipertermii

Pierwsze wzmianki o onkologicznym zastosowaniu hipertermii odnotowano w XVIII wieku, kiedy to powiązano zahamowanie rozwoju raka z jednoczesnym występowaniem gorączki wywołanej malarią (Kizowitz, Francja 1779). W 1866 W. Busch (Niemcy) opisał potwierdzoną histologicznie całkowitą remisję mięsaka twarzy po dwukrotnej infekcji zakaźną chorobą skóry (różą), wywołującą gorączkę [6]. W drugiej połowie XIX wieku praktyka terapii podwyższoną temperaturą powodowaną przez różne infekcje była stosowana nie tylko w Niemczech i Francji, ale także w Rosji [7]. Metoda ta (nazywana terapią gorączką lub hipertermią) skutkowałą ustąpieniem objawów raka nawet do 8 lat [8]. Pod koniec XIX wieku William B. Coley, chirurg kości, opisał 38 chorych z potwierdzonym zaawansowanym rakiem, leczonych wysoką

¹ kasiadur@wp.pl, Instytut Fizyki, Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki UMCS w Lublinie

² zbigniew.surowiec@umcs.pl, Instytut Fizyki, Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki UMCS w Lublinie

³ arek.miaskowski@up.lublin.pl, Katedra Zastosowań Matematyki i Informatyki UP w Lublinie

gorączką wywołaną przez różę [9]. Coley stworzył tak zwaną „toksynę Coley’a” czyli mieszaną szczepionkę bakteryjną (*mixed bacterial vaccine, MBV*), pierwszy wyspecjalizowany pirogen o standaryzowanym składzie, który wyprodukowano przemysłowo [8, 9]. W tym samym czasie onkologia przeżywała rewolucję na tle naukowym i technologicznym (odkrycie promieniowania X w 1895 r. oraz radu w 1898 r.), co skutkowało rozwinięciem się takich metod terapii jak: radioterapia, brachyterapia i chemioterapia. W rezultacie zainteresowanie hipertermią znacznie zmalało, chociaż nadal używano toksyny Coley’a na terenie USA czy Europy. Postawa środowiska medycznego względem leczenia ciepłem stała się sceptyczna. Coley sam nigdy w swoich pracach nie wyróżnił temperatury, jako podstawowego mechanizmu przeciwnowotworowego. Niemniej jednak wielokrotnie podkreślał, że im większa i dłuższa gorączka tym lepsze efekty leczenia. Pomysł osobnego zastosowania ciepła, jako terapii pojawił się w 1898 roku, kiedy to szwedzki ginekolog Westermarck opublikował raport na temat stosowania długoterminowego, lokalnego ogrzewania chorych miejsc przy pomocy cewki metalowej ogrzewanej w obiegu wody do 42-44°C. Między innymi opisał kilka pozytywnych rezultatów w przypadkach nieoperacyjnego raka szyjki macicy. Był pierwszym, który wykazał zdolność długotrwałego ogrzewania guzów bez uszkodzenia zdrowych tkanek [10]. W kolejnych latach pojawiły się potwierdzenia korzystnego wpływu podwyższonej temperatury na degradację chorób nowotworowych. Przeprowadzono liczne badania na organizmach zwierzęcych (szczególnie gryzoni) traktując zmiany nowotworowe temperaturą wynoszącą 42-47°C [11].

Nowe możliwości przed zastosowaniem terapii ciepłem otworzył koniec wieku XIX, kiedy to angielski fizyk James C. Maxwell sformułował teorię elektromagnetyzmu (1873 r.), a niemiecki fizyk Heinrich Hertz potwierdził ją, konstruując oscylator fal elektromagnetycznych (1886 r.). Jedną z pierwszych osób, które zwróciły uwagę na możliwość wykorzystania prądu zmiennego o wysokiej częstotliwości w technikach terapeutycznych był Nikola Tesla (publikacja w „*Electrical Engineer*”) [12]. Jednak za ojca terapii opartej na elektromagnetyzmie, który ustanowił podstawy pojemnościowego i indukcyjnego ogrzewania tkanek stał się francuski fizyk i fizjolog Jacques-Arsene d’Arsonval [12÷15]. W latach 1881-98 przeprowadził serię eksperymentów, przepuszczając m.in. przez własne ciało prąd o różnych natężeniach w wyniku, czego doświadczył uczucia ciepła. To z kolei skutkowało zastosowaniem prądu o wysokich częstotliwościach do leczenia wielu schorzeń. Pacjenci byli umieszczani w ogromnej cewce indukcyjnej, gdzie przez 15-20 minut poddawano ich działaniu pola elektromagnetycznego. Inni z kolei byli leczeni na tzw. leżankach kondensatorowych, gdzie przepuszczano przez nich prąd rzędu 350-450 mA przez 6 minut dziennie. Urządzenia te opracowane przez d’Arsonval’a cieszyły się dużą popularnością począwszy od leczenia zaburzeń krążenia krwi poprzez choroby metaboliczne, a kończąc na gruźlicy i układzie nerwowym [12, 16].

Na początku XX wieku opracowano podstawy diatermii (von Zeyneck) jako metody głębokiego i pojemnościowego ogrzewania zmiennym polem magnetycznym o częstotliwości 0,5-2 MHz [17]. Intensywne badania prowadzone przez niemieckich (Karl Franz Nagelschmidt, Christoph Müller [18]) i austriackich uczonych (Gottwald Schwarz [19]) doprowadziły do rozwinięcia diatermii krótkofalowej, stosującej częstotliwości z przedziału 100-300 MHz. Od tego momentu, wysoka temperatura została zakwalifikowana jako oddzielny czynnik leczniczy. W późnych latach 30 podwyższona temperatura została oficjalnie uznana jako biologiczny efekt zmiennego pola magnetycznego o wysokiej częstotliwości [20].

Lata po II wojnie światowej, bogate w liczne eksperymenty, spowodowały rozwinięcie hipertermii jako odrębnej metody leczenia w połączeniu z zmiennym polem magnetycznym o określonej częstotliwości. W 1950 roku A.E. Gessler wraz z współpracownikami doniósł o skutecznej destrukcji nowotworu gruczołu piersiowego u myszy przez zastosowanie hipertermii z użyciem mikrofal o częstotliwości 2,45 MHz bez jakiegokolwiek uszkodzenia zdrowych tkanek [21]. W latach 60 XX wieku w Duke University, USA, B. Woodhall wraz z zespołem badawczym przeprowadzili regionalną hipertermię pacjentom z nowotworami szyi i głowy, następnie zaczęto studiować lokalną hipertermię (42 °C, 27,12 MHz) w sprzężeniu z innymi technikami leczenia schorzeń (np. z hemoperfuzją jelita) [22]. Druga połowa XX wieku zaowocowała szeregiem badań na temat kompatybilności hipertermii i stosowania środków zakwaszających nowotwory (Manfred von Ardenne). Wprowadzono koncepcję selektywnej, wielofazowej terapii nowotworowej oraz podział na hipertermię lokalną i całego ciała. Pomimo tak dynamicznego rozwoju termicznej metody, napotkano na wiele trudności np. brak równomiernego ogrzewania całej objętości guza czy brak wyraźnej terapeutycznej granicy ogrzewania [23].

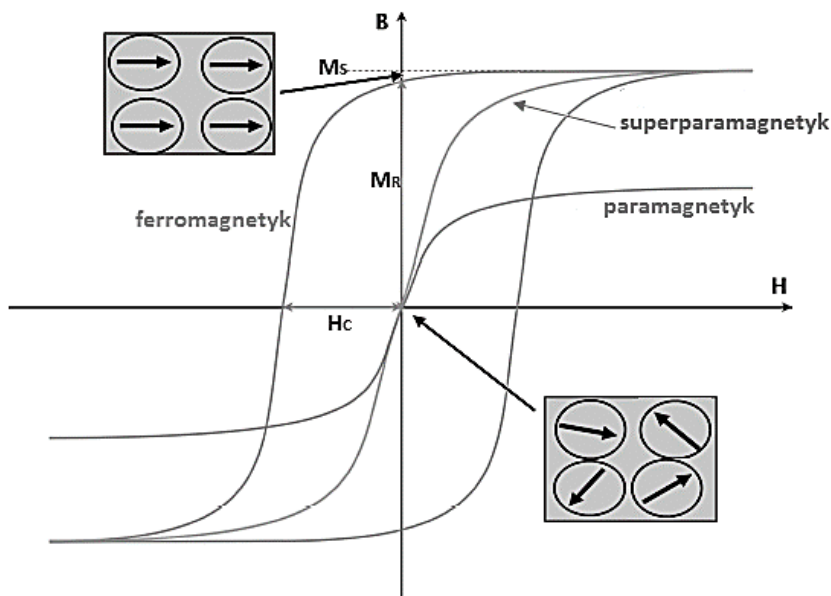
Obecnie hipertermia jest skuteczną metodą leczenia stosowaną w onkologii, której efektywność znacznie wzrasta w połączeniu z chemioterapią czy radioterapią. Pomimo obszernej literatury, nadal nie są znane wszystkie mechanizmy odpowiedzialne za śmierć komórek nowotworowych podczas terapii ciepłem. Cały czas są opracowywane nowe sposoby ogrzewania. Poszerzenie możliwości zapewnił rozwój nanotechnologii i wykorzystanie cieczy magnetycznych, co przyczyniło się do przejścia hipertermii na wyższy stopień zaawansowania.

3. Fizyczne podstawy hipertermii

Rozpatrując mechanizm zaangażowany w transfer ciepła, posługujemy się trzema skalami długości: skala nano określona przez wielkość cząstek magnetycznych (5÷100 nm), skala mikro (5÷20 µm) charakteryzująca wielkość komórki i skala makro odnosząca się do rozmiarów tkanki docelowej (nowotworu) zazwyczaj powyżej 2 mm. W zależności od użytego materiału magnetycznego wyróżnia się różne mechanizmy

generowania ciepła: opornościowe ogrzewanie spowodowane prądami wirowymi, magnetyczne ogrzewanie spowodowane wydzielaniem energii w związku z obiegiem pętli histerezy (cząsteczki wielodomenowe) oraz ogrzewanie magnetyczne będące skutkiem procesów relaksacji Néel'a i Brown'a (nanocząstki) [24, 25].

Fakt, iż różne materiały magnetyczne inaczej zachowują się w obecności zewnętrznego pola magnetycznego jest kluczowy w celu zrozumienia, dlaczego niektóre nanocząstki oddają ciepło lepiej niż pozostałe. Wyróżniamy trzy podstawowe typy materiałów mających zastosowanie w technikach magnetycznych: paramagnetyki, superparamagnetyki i ferromagnetyki. Najprostszym sposobem opisanie reakcji tych materiałów na przyłożone pole magnetyczne jest wykreślenie krzywej namagnesowania w zależności od wartości przyłożonego pola (tzw. pętla histerezy, rysunek 1). Wyróżniamy trzy główne parametry pętli histerezy: magnetyzacja nasycenia M_s (oznacza wartość graniczną, do której zmierza krzywa w regionie wysokiego pola; zostaje osiągnięta, gdy wszystkie momenty magnetyczne w materiale są zgodne z zewnętrznym polem), remanencja M_r – zachowanie namagnesowania przy zerowym polu magnetycznym (indukcja szczątkowa) oraz koercja H_c reprezentująca pole, przy którym wypadkowa magnetyzacja próbki jest równa zero.



Rysunek 1. Pętla histerezy dla różnych materiałów magnetycznych. Kwadraty przedstawiają orientację momentów magnetycznych pojedynczych domen nanocząstek wraz ze wzrastającą wartością pola magnetycznego. Opracowanie własne na podstawie [26, 27]

Dla pola zmiennego w czasie, obszar wewnątrz pętli odpowiada ciepłu generowanemu podczas jednego cyklu [24]. W przypadku paramagnetyków i superparamagnetyków odnotowuje się brak pozostałości magnetycznej pod nieobecność pola magnetycznego. Kiedy zostanie przyłożone wzrastające pole magnetyczne (H), momenty magnetyczne atomów tych materiałów ustawiają się zgodnie z kierunkiem pola magnetycznego i magnetyzacja (M) wzrasta. W momencie, gdy wszystkie momenty magnetyczne ustawią się zgodnie z zewnętrznym polem magnetycznym, namagnesowanie osiąga maksymalną wartość (magnetyzacja nasycenia M_s). Po osiągnięciu tej wartości, dalszy wzrost przykładanego pola nie powoduje zmian w magnetyzacji próbki. Natomiast w materiale ferromagnetycznym wykazującym namagnesowanie spontaniczne, struktura podzielona jest na domeny, czyli obszary grupujące momenty magnetyczne o tej samej orientacji. Gdy taki materiał osiągnie temperaturę powyżej temperatury Curie (T_C dla żelaza 770°C) zachowuje się jak paramagnetyk (momenty magnetyczne ustawiają się zgodnie z przyłożonym polem). Natomiast schłodzenie materiału poniżej T_C powoduje gwałtowną zmianę w ferromagnetyku. W zewnętrznym polu domeny porządkują się, namagnesowanie jest następstwem przesuwania tzw. ścian domenowych, które dążą do zwiększenia obszaru domeny namagnesowanej zgodnie z zewnętrznym polem magnetycznym. Dodatkowo dochodzi do obrotu całych domen do kierunku pola magnetycznego. Energia związana z procesem tworzenia domen wzrasta wraz ze zmniejszeniem rozmiarów cząstek magnetycznych [27, 28].

4. Hipertermia magnetycznych nanocząstek żelaza

Hipertermia oparta na magnetycznych nanocząstkach została wprowadzona i przetestowana przez R. K. Gilchrist'a w 1957 roku w celu ogrzania węzłów chłonnych u psów [29]. Dalsze prace wykazały duże prawdopodobieństwo zastosowania takiego wariantu także u ludzi. Nanocząstki magnetyczne (*Magnetic Nanoparticles* – MNPs) pod działaniem przyłożonego z zewnątrz prądu zmiennego (AC) mogą generować pewną ilość ciepła, proporcjonalną do częstotliwości przyłożonego pola. Ze względu na wymagane niewielkie rozmiary cząstek magnetycznych (poniżej 100nm), metoda ta może zrewolucjonizować dotychczasową terapię przeciwnowotworową. Jej kluczową zaletą jest możliwość ogrzewania tylko obszaru tarczowego guza (tam gdzie nagromadzone są nanocząstki), przy jednoczesnym zachowaniu zdrowych tkanek, co zostało potwierdzone w testach klinicznych [30]. Najnowsze osiągnięcia w chemii pozwoliły na bezpośrednie kierowanie nanocząstek do komórek rakowych, poprzez użycie dodatkowych, wyspecjalizowanych związków powierzchniowo czynnych.

4.1. Magnetyczne nanocząstki

Ciekawą odmianą magnetyzmu jest superparamagnetyzm, charakterystyczny dla niektórych materiałów ferromagnetycznych (lub ferrimagnetycznych) występujących w formie bardzo drobnych krystalitów (*NPs – nanoparticles*). Takie drobne cząstki rozpatrywane są jako pojedyncze domeny mające swoje momenty magnetyczne, które pod wpływem zewnętrznego zmiennego pola magnetycznego zaczynają fluktuować. Ich zastosowanie w medycynie jest korzystniejsze niż nanocząstek ferromagnetycznych, z tego względu, iż po wyłączeniu zewnętrznego pola, nie wykazują namagnesowania. Dyssypacja energii w takich pojedynczo-domenowych nanocząstkach następuje głównie poprzez dwa procesy: relaksację Neel'a i relaksację Brown'a. Pierwszy opiera się na zmianach orientacji spinów magnetycznych, a co za tym idzie także namagnesowania w obrębie każdej nanocząstki. Czas relaksacji Neel'a określany jest wzorem [23]:

$$\tau_N = \tau_0 \exp\left(\frac{KV}{k_B T}\right), \quad (1)$$

gdzie τ_0 jest stałą wartością z zakresu $10^{-9} - 10^{-13}$ s; K to stała anizotropii magnetycznej, charakterystyczna dla danego materiału, V określa objętość nanocząstki, k_B to stała Boltzmanna, a T temperatura. Ten typ relaksacji jest silnie uzależniony od wielkości nanocząsteczek. Dominuje przy niewielkich rozmiarach jako szybszy proces (mniejsza cząsteczka potrzebuje mniej energii do rotacji jej momentu magnetycznego).

W przypadku drugiego mechanizmu, tzw. relaksacji Browna cząsteczki mogą się w pewnym stopniu obracać jako całość, zależy to zarówno od parametrów hydrodynamicznych cząsteczki jaki i ośrodka otaczającego. Wyrażenie na czas relaksacji przedstawia się następująco:

$$\tau_B = \frac{3\eta V_H}{k_B T}, \quad (2)$$

gdzie η to lepkość ciekłego ośrodka, V_H to hydrodynamiczna objętość cząsteczki. Mechanizm Browna także zależy od wielkości krystalitów, ale również w dużej mierze od lepkości ośrodka, w którym te krystality się znajdują. Duża lepkość ośrodka spowalnia rotację. Relaksacja Browna dominuje w przypadku większych nanocząstek. W hipertermii lepiej stosować małe krystality z przeważającym mechanizmem Neel'a, gdyż po wprowadzeniu do organizmu może nastąpić zmiana lepkości, co przyczyni się do spowolnienia lub całkowitego zahamowania rotacji całych nanocząstek. Przez połączenie omówionych wyżej czasów otrzymamy całkowity czas relaksacji cząstek:

$$\tau = \frac{\tau_B \tau_N}{\tau_B + \tau_N}. \quad (3)$$

Przyłożenie pola zewnętrznego oscylującego szybciej niż zachodzące procesy relaksacyjne skutkuje wydzieleniem ciepła, spowodowane opóźnieniem w relaksacji momentu magnetycznego [27]. Taką dyssypację ciepła (P) określa się równaniem:

$$P = \mu_0 \chi'' f H^2, \quad (4)$$

gdzie μ_0 to przenikalność, χ'' – podatność magnetyczna, f – częstotliwość przyłożonego pola oraz H – jego natężenie.

4.2. Parametry wykorzystywane w hipertermii magnetycznej

Ilość energii pochłanianej podczas ekspozycji na promieniowanie elektromagnetyczne szacowana jest na podstawie współczynnika absorpcji właściwej SAR (*Specific Absorption Rate*) wyrażonego w watach na gram (W/g), często określanego też jako właściwa starta mocy SLP (*Specific Loss Power*) [27]:

$$SAR = C \frac{\Delta T}{\Delta t}, \quad (5)$$

gdzie C to pojemność cieplna próbki, $\frac{\Delta T}{\Delta t}$ – początkowe nachylenie krzywej grzania w zależności od czasu. SAR zależy od wielu czynników takich jak: rozmiary i kształt nanocząsteczek, modyfikacja ich powierzchni, nasycenie magnetyczne cząstek, częstotliwość i amplituda przykładanego pola magnetycznego.

W hipertermii wskazane są duże wartości współczynnika SAR, dlatego tak ważne jest kontrolowanie właściwości fizycznych i chemicznych nanocząstek np. podczas ich syntezy. Osiągnięcie pożądanego SAR, zmniejsza także ilość wprowadzanych do organizmu krystalitów. Superparamagnetyczne nanocząstki, w których obserwuje się mechanizmy Neel'a i Brown'a generują większą ilość ciepła (a tym samym wyższe wartości SAR) przy niższych parametrach pola magnetycznego niż cząsteczki ferromagnetyczne. Wartość SAR wzrasta wraz ze wzrostem częstotliwości i amplitudy pola zewnętrznego. Porównanie wartości SAR otrzymywanego przez różne grupy badawcze napotkało pewne trudności, związane ze zróżnicowaniem parametrów doświadczalnych (pomiaru przy różnej amplitudzie i częstotliwości pola, brak zapewnienia warunków adiabatycznych). Mając na uwadze powyższe przeszkody, wprowadzono nową wielkość pozwalającą w sposób bardziej bezpośredni porównywać wydajności grzejne superparamagnetycznych nanocząstek. Jest to rzeczywista strata mocy ILP (*Intrinsic Loss Power*). ILP uzyskuje się poprzez normalizację SAR względem częstotliwości i amplitudy, a więc jest niezależny od pola magnetycznego [26, 31÷34]:

$$ILP = \frac{SAR}{fH^2}, \quad (6)$$

gdzie f – częstotliwość pola magnetycznego, H – natężenie pola. Zarówno SAR jak i ILP są zasadniczymi miarami rozproszenia energii, wyznaczanymi w pomiarach kalorymetrycznych, powszechnie używanymi w hipertermii.

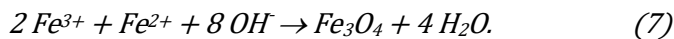
4.3. Materiały magnetyczne stosowane w hipertermii

Wiele różnych związków zostało przebadanych pod względem ich potencjalnego wykorzystania w hipertermii np. Fe, Co i Ni w formie metalicznej i w postaci tlenków. Czyste metale wykazują największe namagnesowanie nasycenia, lecz ich zastosowanie biomedyczne jest ograniczone ze względu na ich toksyczność i niewielką trwałość chemiczną (szybko się utleniają). Dużym zainteresowaniem cieszą się nanocząstki tlenków żelaza, charakteryzujące się niską toksycznością, biokompatybilnością oraz możliwością modyfikacji powierzchni [25]. Dodatkowo mogą być metabolizowane przez hem oksygenazy-1 z wytworzeniem hemoglobiny we krwi, co przyczynia się do utrzymania homeostazy żelaza w komórce [35]. Można je otrzymać metodami hydrotermalnymi i solwotermalnymi (zachodzącymi w podwyższonej temperaturze, rolę rozpuszczalnika spełnia woda albo rozpuszczalnik organiczny), przez powierzchniową wymianę redox, napyłanie w próżni, metody kondensacji w fazie ciekłej lub metody współstrącania. Ostatnie stały się dość popularne ze względu na powtarzalność i łatwość syntezy. Polegają na współstrąceniu jonów np. żelaza Fe^{2+} i Fe^{3+} z wodnych roztworów ich soli (np. chlorków) w środowisku zasadowym. Ważnym aspektem podczas otrzymywania nanocząstek jest kontrola ich wielkości (jak wspomniano wcześniej, od wielkości krystalitów zależy moc grzejna) poprzez odpowiednie dobranie parametrów syntezy m.in.: wybór soli, określenie stosunku jonów Fe^{2+}/Fe^{3+} , temperatura reakcji, wartość pH i siła jonowa rozpuszczalnika [36, 37]. Optymalny rozmiar nanocząstek stosowanych w hipertermii magnetycznej nadal jest przedmiotem dyskusji, głównie ze względu na brak danych podsumowujących dotychczasowe badania. Z biologicznego punktu widzenia już cząsteczki poniżej 100 nm są odpowiednie do penetracji tkanek, jednak w przypadku hipertermii preferowane są mniejsze rozmiary nanocząstek zawierające się w granicach 5÷40 nm, co pozwala na lepsze wypełnienie komórek nowotworowych [22]. Właściwości nanomateriałów są zależne także od ich kształtu i powierzchni [35]. Powierzchnię można łatwo modyfikować poprzez tzw. opłaszczanie (czyli zsyntetyzowanie pewnego rodzaju powłoki, płaszczka). Cząsteczki takie nazywane są typem *core-shell*, czyli rdzeń-powłoka. Rdzeniem jest zazwyczaj materiał nieorganiczny o właściwościach magnetycznych (np. Fe_3O_4), natomiast powłokę stanowi najczęściej związek organiczny powierzchniowo czynny (np.: chitozan, poliglikol etylenowy czy DMSA). Tak otrzymane struktury cieszą się dużym zainteresowaniem ze względu na wielofunkcyjność i zróżnicowane właściwości. Powłoka polimerowa zwiększa stabilność i biokompatybilność nanomateriałów, zapewnia hydrofilowość. Umożliwia także dołączenie do swojej powierzchni różnych ligandów (np. leków), co jest wykorzystywane w terapiach celowanych. Zapobiega również aglomeracji nanocząstek, które posiadając duże momenty magnetyczne mają tendencję do grupowania się w większe zespoły na skutek oddziaływań dipolowych

5. Część doświadczalna

5.1. Synteza

W pracy przeprowadzono syntezę magnetycznych nanocząstek Fe_3O_4 metodą współstrącania z roztworu, zgodnie z reakcją [37]:

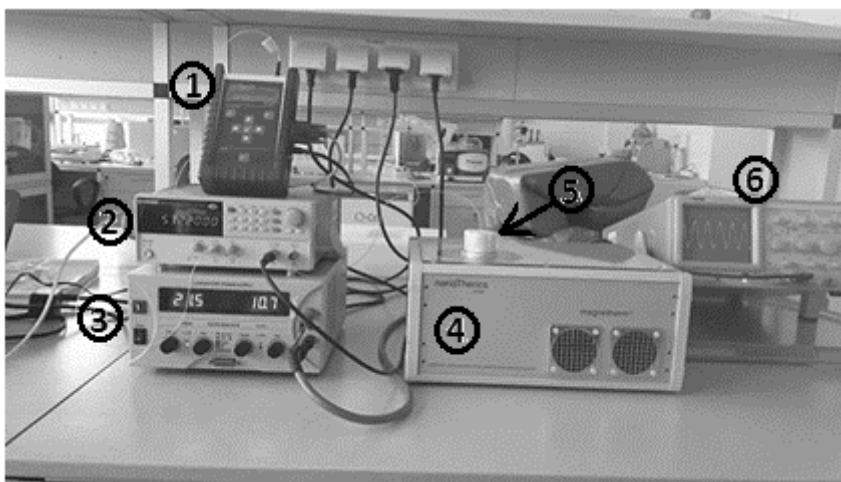


Pierwszym etapem było odważenie stechiometrycznych ilości chlorków żelaza III i II (w stosunku molowy 2:1), a następnie rozpuszczenie każdej odważki w 2,5 ml wody destylowanej. Oba roztwory wymieszano i kroplami dodawano do wcześniej przygotowanego 13,5 ml roztworu amoniaku (25% cz.d.a.). Reakcja współstrącania przebiegała w temperaturze pokojowej. Powstająca ciemnobrunatna zawiesina, była poddawana ciągłemu działaniu mieszadła magnetycznego, w celu zapewnienia ciągłości procesu. Tak otrzymany osad zdekantowano, a następnie przepłukano wodą destylowaną w 3 partiach po 30 ml. Końcowym etapem było opłaszczanie spreparowanych nanokrystalitów surfaktantem DMSA (kwasem mezo-2,3-dimerkaptobursztynowym) o stężeniu $2,7 \cdot 10^{-3}$ M.

5.2. Pomiary

Tak przygotowana próbka była badana pod kątem struktury krystalograficznej, wielkości nanocząstek, własności magnetycznych oraz kalorymetrycznych. Pomiary dyfrakcji rentgenowskiej były wykonane przy użyciu dyfraktometru X'Pert PW 3040/60 firmy Philips z lampą miedzianą. Analizę uzyskanych widm przeprowadzono przy użyciu programu X'Pert High Score Plus. Badania mössbauerowskie zostały przeprowadzone na absorbencie proszkowym za pomocą spektrometru mössbauerowskiego pracującego w geometrii transmisyjnej. Grubość absorbentu (próbki) wynosiła 30 mg/cm^2 . Źródłem promieniowania był izotop ^{57}Co w matrycy rodowej o aktywności ok 50mCi. Pomiary zostały wykonane w zakresie temperatur od 3,7K do temperatury pokojowej. Własności cieplne zsyntezowanej próbki były badane przy użyciu układu pomiarowego Nanotherics Magnetherm (rysunek 2) [39].

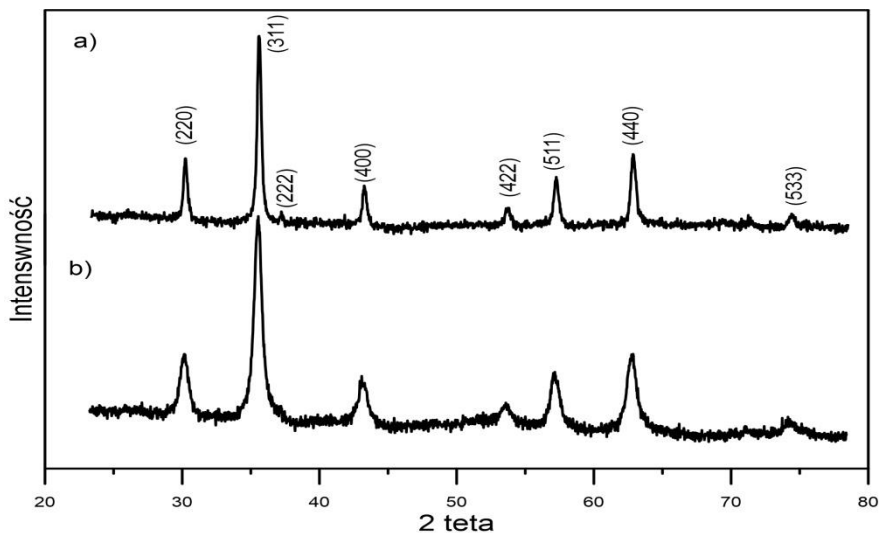
Pomiary wykonano dla dwóch wartości amplitudy pola magnetycznego 8 mT i 16 mT oraz częstotści 532 kHz. W tych pomiarach próbka była w postaci ferrocieczy. Temperatura próbki była rejestrowana za pomocą sondy optycznej z próbkowaniem co 1s.



Rysunek 2. Aparatura do pomiaru właściwości cieplnych próbki Nanotherics Magnetherm. 1 – termometr optyczny, 2 – generator częstotliwości, 3 – zasilacz wysokiego napięcia, 4 – Nanotherics Magnetherm, 5 – próbka, 6 – oscyloskop

6. Analiza wyników

W celu uzyskania informacji o strukturze krystalograficznej oraz o rozmiarach wielkości krystalitów zostały wykonane badania dyfrakcji rentgenowskiej. Na rysunku 3 jest pokazane widmo rentgenowskie proszkowego magnetytu (rys. 3a) oraz widmo uzyskane dla zsyntezowanej próbki (rys 3b). Układ refleksów obserwowanych dla widma badanej próbki jest analogiczny jak dla wzorcowego magnetytu. W widmie badanej próbki nie stwierdzono dodatkowych linii mogących świadczyć o zanieczyszczeniach innymi dodatkowymi fazami. Analiza numeryczna widm została wykonana metodą Ritvelda [40]. Stała sieci badanej próbki wynosi $8,367(2)\text{\AA}$ i jest nieznacznie mniejsza niż w przypadku komercyjnego magnetytu ($8,375(2)\text{\AA}$). Istotną różnicą między widmami jest szerokość połówkowa linii. Na poszerzenie linii wpływa wielkość krystalitów, im mniejsze są ziarna krystalitów tym szersze linie rentgenowskie. W przypadku widma magnetytu wzorcowego linie są bardzo wąskie i świadczą o dużych rozmiarach krystalitów. W badanej próbce średnia wielkość krystalitów wyznaczona za pomocą metody Debaye-Scherer'a [41] wynosi $14.2(4)\text{ nm}$. Można zatem stwierdzić, iż w wyniku syntezy uzyskano nanocząstki magnetytu o rozmiarach odpowiednich do badań hipertermii magnetycznej.



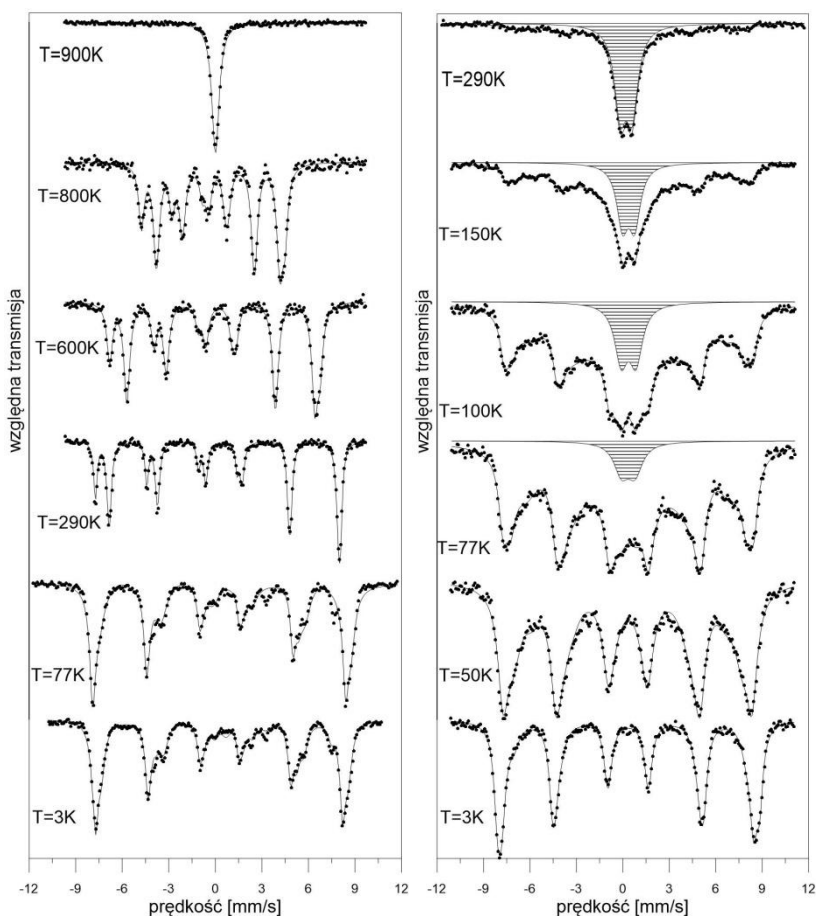
Rysunek 3. Widmo rentgenowskie magnetytu w postaci objętościowej a) oraz nanocząstek magnetytu o rozmiarach 14,2 nm b). Opracowanie własne

Spektroskopia mössbauerowska jest bardzo czułym i wygodnym narzędziem do badania własności magnetycznych różnych materiałów [42]. Za jej pomocą jest możliwe określenie parametrów struktury nadsubtelnej takich jak przesunięcie izomeryczne, rozszczepienie kwadrupolowe oraz wewnętrzne pole magnetyczne. Pierwszy z tych czynników informuje o gęstości elektronowej w miejscu jądra atomowego, drugi o oddziaływaniu gradientu pola elektrycznego powłoki elektronowej z momentem kwadrupolowym jądra. Jeżeli atom posiada stabilny w czasie i przestrzeni moment magnetyczny (jest w strukturze uporządkowanej magnetycznie) to w miejscu jądra występuje pole magnetyczne, a w widmie obserwuje się sześć linii (sekstet). Jeżeli jądro próbnika mössbauerowskiego znajduje się w takim lokalnym otoczeniu, iż występuje gradient pola elektrycznego w nieobecności pola magnetycznego, to w widmie można zaobserwować dwie linie tzw. dublet. W przypadku, gdy lokalne otoczenie próbnika posiada symetryczny rozkład ładunku w widmie, obserwuje się pojedynczą linię (monolinię). Zatem jeżeli widmo składa się z sekstetu lub kilku sekstetów to badany związek jest ferro lub ferrimagnetykiem natomiast pojawienie się dubletu lub monolinii świadczy o tym, że badany materiał jest paramagnetykiem lub wykazuje cechy superparamagnetyczne.

Na rysunku 4a pokazano widma mössbauerowskie magnetytu wykonane w kilku temperaturach. Widma wykonane w temperaturze 3K oraz 77K są niemal identyczne. Obserwowane linie nie są symetryczne gdyż składają się z pięciu składowych. Związane

są one z różnym lokalnym otoczeniem jonów żelaza w sieci krystalograficznej magnetytu. Powyżej temperatury 77K następuje tzw. przejście Verweya [43] i widmo zmienia się w sposób radykalny. Widmo to można rozłożyć na dwa sekstety o stosunku powierzchni 1:2. Jest to konsekwencja umiejscowienia jonów żelaza w magnetycie, który posiada strukturę odwróconego spinelu. Komórka elementarna zawiera 32 jony O^{2+} , osiem jonów Fe^{3+} w otoczeniu tetraedrycznym (podsieć A) oraz osiem jonów Fe^{3+} i osiem jonów Fe^{2+} w otoczeniu oktaedrycznym (podsieć B). Wraz ze wzrostem temperatury, aż do 800K charakter widma nie zmienia się w sposób zasadniczy. Można zaobserwować stopniowe zmniejszenie rozszczepienia linii w sekstecie świadczące o zmniejszaniu się wewnętrznego pola magnetycznego wraz temperaturą. Powyżej temperatury Curie ($T_c=856$ K) [44] magnetyt przechodzi do stanu paramagnetycznego, dlatego też widmo uzyskane w temperaturze 900K składa się z pojedynczej monolinii.

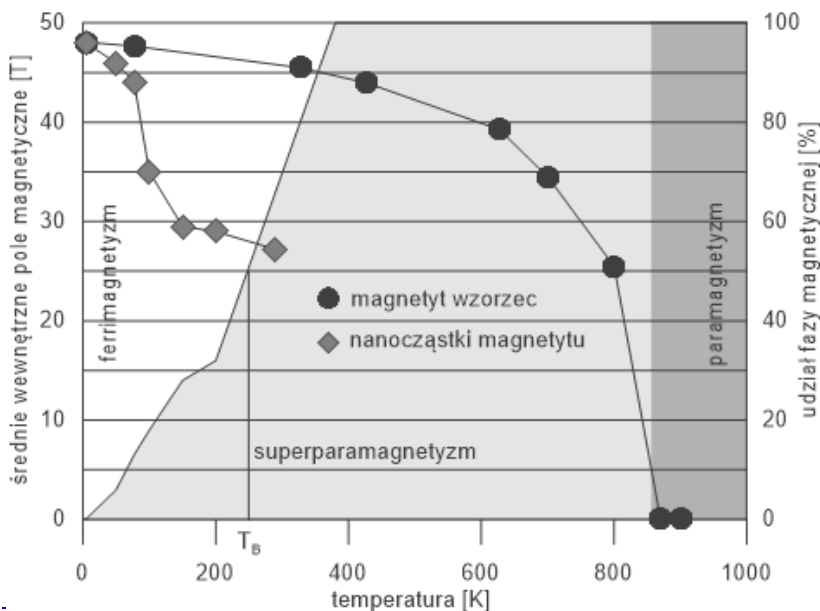
Zupełnie inna jest temperaturowa ewolucja widm uzyskanych dla magnetytu w postaci nanocząstek (rys. 4b). Najbardziej zbliżone kształtem oraz parametrami oddziaływań nadsztylnych są widma uzyskane w najniższych temperaturach. Wraz ze wzrostem temperatury wzrasta szerokość linii. W widmach uzyskanych w temperaturze powyżej 50 K pojawia się dodatkowa składowa, obszar zacieniony na rysunku 4b. Jest to tzw. dublet superparamagnetyczny. Jest on cechą charakterystyczną dla nanomateriałów. Gdy rozmiary cząstek są dostatecznie małe, energia magnetycznej anizotropii jest porównywalna lub mniejsza niż energia termiczna. Wtedy następuje pokonanie bariery energetycznej, co skutkuje pojawieniem się spontanicznych fluktuacji wektora magnetyzacji cząstki i staje się ona superparamagnetyczna. Momenty magnetyczne atomów wewnątrz nanocząstki są sprzężone natomiast fluktuacjom ulega wypadkowy wektor magnetyzacji cząstki. Całe nanocząstki zachowują się jak atomy paramagnetyczne. Ze wzrostem temperatury energia termiczna jest coraz większa i coraz więcej nanocząstek ulega fluktuacjom superparamagnetycznym. Fluktuacje te są związane z czasem relaksacji Neela opisanym wzorem (1). Zakres występowania fazy superparamagnetycznej pokazano na rysunku 5. W temperaturze pokojowej niemalże cała próbka znajduje się w stanie superparamagnetycznym.



Rysunek 4a. Widmo mössbauerowskie magnetytu uzyskane z zakresie temperatur od 3K do 800K

Rysunek 4b. Widmo mössbauerowskie nanocząstek magnetytu otoczone surfaktantem DMSA uzyskane z zakresie temperatur od 3K do temperatury pokojowej. Wewnętrzny zaciemniony obszar odzwierciedla nanocząstki w fazie superparamagnetycznej. Opracowanie własne

W analizowanej próbce temperatura blokowania T_B , zdefiniowana jako temperatura, przy której połowę powierzchni widma stanowi składowa superparamagnetyczna, wynosi około 250 K.



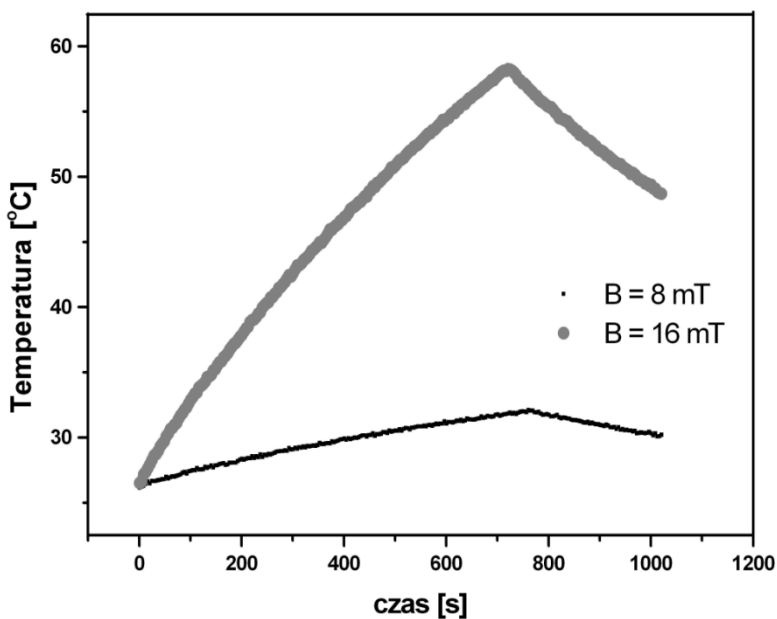
Rysunek 5. Zależność średniego wewnętrznego pola magnetycznego od temperatury dla magnetytu oraz nanocząstek magnetytu. Diagram faz magnetycznych, opracowanie własne

Na rysunku 5 pokazano zależność średniego wewnętrznego pola magnetycznego od temperatury dla magnetytu w postaci objętościowej oraz nanocząstek magnetytu. W zakresie temperatur od 3K do temperatury pokojowej wartość średnia wewnętrznego pola magnetycznego w badanej próbce zmniejszała się w większym stopniu niż w przypadku magnetytu wzorcowego. Związane jest to głównie z rozkładem objętości w badanej próbce wokół objętości krytycznej oraz nieuporządkowaniem atomów na powierzchni nanocząstek. O oddziaływaniu występującym między nanocząstkami może świadczyć asymetryczny kształt linii w widmie. Ten rodzaj oddziaływania przyczynia się do podwyższenia temperatury blokowania, ale jest zanedbywany dla nanocząstek z otoczkami.

Zatem na podstawie analizy widm mössbauerowskich można wyciągnąć wniosek, iż zsyntezowana próbka posiada oczekiwane własności superparamagnetyczne wymagane w terapii hipertermią.

Wyniki badań kalorymetrycznych pokazano na rysunku 6. Pomiar wzrostu temperatury ferrocieczy w funkcji czasu wykonano dla dwóch wartości pola magnetycznego 8 mT oraz 16 mT o częstotliwości 532,2 kHz. Do badań użyto próbki w postaci wodnej zawiesiny nanocząstek magnetytu o stężeniu 46 mg/ml. Próbkę

znajdowała się w zmiennym polu magnetycznym przez 720 s następnie pole zostało wyłączone i próbka zaczęła się ochładzać. Wzrost temperatury w polu o niższej wartości w ciągu 12 minut wyniósł 6°C natomiast dwukrotne zwiększenie natężenia pola magnetycznego spowodowało wzrost temperatury o 32°C w analogicznym czasie. Wartości SAR oraz ILP zostały wyznaczone biorąc pod uwagę prostoliniową część krzywej nagrzewania (w analizowanym przypadku było to 7,5 min) wykorzystując metodę zaproponowaną przez Wildeboera [45]. Uzyskane wartości współczynnik absorpcji właściwej wyniósł odpowiednio $0,92 \pm 0,03 \text{ W/m}$ oraz $5,44 \pm 0,07 \text{ W/m}$ dla pola o wartości 8 i 16 mT.



Rysunek 6. Wzrost temperatury ferrofluidu w funkcji czasu dla dwóch wartości pola magnetycznego o częstotliwości 532,2 kHz. Opracowanie własne

Jak można zaobserwować na rysunku 6 zsyntezowana próbka wykazuje dobrą tendencję do nagrzewania się w zewnętrznym zmiennym polu magnetycznym. Przy odpowiednio dobranej wartości pola oraz jego częstotliwości wzrost temperatury próbki do wartości pożądaných w hipertermii osiąga się już po kilku minutach.

7. Podsumowanie

W pracy przedstawiono badania dotyczące wykorzystania nanocząstek w hipertermii cieczy magnetycznych. W tym celu zsyntezowano nanocząstki magnetytu metodą współstrącania z roztworu. Aby zapobiec agregacji nanocząstki zostały opłaszczane surfaktantem DMSA. Uzyskany ferrofluid był następnie analizowany pod kątem przydatności do badań hipertermii magnetycznej. Przeprowadzono badania dyfrakcji rentgenowskiej, na podstawie których potwierdzono obecność magnetytu oraz określono rozmiary nanocząstek. Wyznaczone w badaniach XRD wielkości ziaren krystalitów (14,2 nm) są odpowiednie przy terapii hipertermią. Przeprowadzone badania mössbauerowskie z kolei wykazały, iż badana próbka wykazuje własności superparamagnetyczne. Ukazano różnicę własności magnetycznych w magnetycie w postaci nanocząstek w postaci objętościowej. Przeprowadzono również badania kalorymetryczne z wykorzystaniem systemu Nanotherics Magnetherm. Badana ferrociecz wykazała tendencję do szybkiego nagrzewania się w zewnętrznym zmiennym polu magnetycznym. Uzyskane wyniki pozwalają wnioskować, iż zsyntezowana próbka posiada odpowiednie rozmiary nanoczątek Fe_3O_4 o właściwościach superparamagnetycznych, co czyni je pożądanymi w technice hipertermii cieczy magnetycznej.

Literatura

1. Kumar C. S. S. R., Mohammad F., *Magnetic Nanomaterials for Hyperthermia-based Therapy and Controlled Drug Delivery*, Adv Drug Deliv Rev. 2011, 63(9), s.789-808
2. Loo G. V., Saelens X., Gulp M. V., MacFarlane M., Martin S. J., Vandenabeele P., *The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet*. Cell Death Differ, 2002; 9:1031-1042. [PubMed:12232790]
3. Goldstein L. S., Dewhirst M. W., Repacholi M., Kheifets L., *Summary, conclusions and recommendations: adverse temperature levels in the human body*, Int. J. Hyperther. 2003; 19:373-384
4. Habash R. W. Y., Bansal R., Krewski D., Alhafid H., *Thermal therapy. Part 2: Hyperthermia techniques*, Critical Reviews™ in Biomed. Eng. 2006; 34:491-542
5. Falk M. H., Issels R. D., *Hyperthermia in oncology*, Int. J. Hyperther. 2001; 17:1-18
6. Busch W., *Über den Einfluss welche heftigere Erysipeln zuweilig auf organisierte Neubildungen ausuben*, Verhandlungen des Naturhistorischen Vereines der Preussischen Rheinlande und Westphalens, vol. 23, pp. 28-30, 1866
7. Rosenblum A. S., *Relation of febrile diseases to the psychoses*, Archives of Dermatological Research, vol. 48, pp. 52-58, 1943, translation from Trudi vrach. Odessk. g. boln., 1876-77, vol. 2, part B, by S. J. Zakon, with comments by C. A. Neymann
8. Bruns P., *Die Heilwirkung des Erysipels auf Geschwulste*, Beitrage zur Klinischen Chirurgie, vol. 3, pp. 443-466, 1887
9. Coley W. B. II, *Contribution to the knowledge of sarcoma*, Annals of Surgery, vol. 14, no. 3, pp. 199-220, 1891

10. Westermarck F., *Über die behandlung des ulcerierenden Cervixcarcims mittels konstanter Wärme*, Zentralblatt für Gynäkologie, vol. 22, pp. 1335-1337, 1898.
11. Westermarck N., *Effect of heat upon rat-tumors*, Skandinavisches Archiv für Physiologie, vol. 52, p. 257, 1927
12. Gas P., *Essential Facts on the History of Hyperthermia and their Connections with Electromedicine*, Electrical Review, 12b/20111
13. d'Arsonval A., *Action de l'électricité sur les êtres vivants*, in Exposé des Titres et Travaux Scientifique de Dr. A. d'Arsonval, Imprimerie de la Cours d'Appel, Paris, France, 1894
14. d'Arsonval A., *Action physiologique de courants alternatifs a grand fréquence*, Archives de Physiologie Normale et Pathologique, vol. 5, no. 401-408, pp. 780-790, 1893
15. d'Arsonval A., *Dispositifs pour la mesure des courants alternatifs de toutes fréquences*, Comptes Rendus de la Societe de Biologie, vol. 21, pp. 450-451, 1896
16. Guy A. W., *History of biological effects and medical applications of microwave energy*, IEEE Trans. on Microwave Theory&Technique, MTT 32: 1182-1200, 1984
17. von Zeynek R. R., von Bemd E., von Preysz W., *Ueber Thermopenetration, klinische Wochenschrift*, Wien, Austria, 1908
18. Seegenschmiedt M. H., Fessenden P., Vernon C. C. (Eds.), *Thermoradiotherapy and thermochemotherapy*, Vol. 1 Biology, Physiology and Physics, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 1995
19. Bast R. C. Jr., Kufe D. W., Pollock R. E., Weichselbaum R. R., Holland J. F., Frei E. F. (Eds.), *Cancer Medicine*, Hamilton: Decker, 2000
20. *Medicine: fever therapy*, Times, 1937
21. Gessler A. E., McCarty K. S., Parkinson M. C., *Eradication of spontaneous mouse tumors by high frequency radiation. I. Biological part*, Experimental Medicine and Surgery, vol. 8, no. 2-4, pp. 143-167, 1950
22. Shingleton W. W., *Selective heating and cooling of tissue in cancer chemotherapy*, Annals of Surgery, vol. 156, pp. 408-416, 1962
23. Roussakow S. *The History of Hyperthermia Rise and Decline*, Hindawi Publishing Corporation Conference Papers in Medicine, 2013
24. Ortega D., Pankhurst Q. A., *Magnetic hyperthermia*, Nanoscience: Volume 1: Nanostructures through Chemistry, 2013, s. 60-88
25. Andrä W., Nowack H., *Magnetism in Medicine. A Handbook*, eds. Hergt R., Andrä W., 2007, pp. 550-570
26. Giustini J. A., Petryk A. A., Cassim M. S., Tate A. J., Baker I., Hoopes P. J., *Magnetic nanoparticle hyperthermia in cancer treatment*, Nano Life, 2010, 1(01n02)
27. Hervault A., Thanh N. T. K., *Magnetic nanoparticle-based therapeutic agents for thermochemotherapy treatment of cancer*, Nanoscale, 6(2014), 11553-11573
28. Griffiths D. J., *Introduction to Electrodynamics*. 3rd edn.. Upper Saddle River, NJ: Prentice-Hall; 1999. p. 280-281
29. Gilchrist R. K., Medal R., Shorey W. D., Hanselman R. C., Parrott J. C., Taylor C. B., *Selective inductive heating of lymph nodes*, Ann. Surg., 1957, 146, 596-606

30. Maier-Hauff K., Ulrich F., Nestler D., Niehoff H., Wust P., Thiesen B., Orawa H., Budach V., Jordan A., *Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme*, J. Neurooncol., 2011, 103, 317-324
31. Suto M., Hirota Y., Mamiya H., Fujita A., Kasuya R., Tohji K., Jeyadevan B., *Magnetic Nanomaterials for Hyperthermia-based Therapy and Controlled Drug Delivery*, Magn J., Magn. Mater., 2009, 321, 1493-1496
32. Liu X. L., Fan H. M., Yi J. B., Yang Y., Choo E. S. G., Xue J. M., Fan D. D., Ding J., *Optimization of surface coating on Fe₃O₄ nanoparticles for high performance magnetic hyperthermia agents*, J. Mater. Chem., 2012, 22, 8235
33. Hergt R., Dutz S., *Magnetic Particle Hyperthermia – Biophysical Limitations of a Visionary Tumour Therapy*, J. Magn. Magn. Mater., 2007, 311, 187-192
34. Andreu I., Natividad E., *Hyperthermia*, Int. J. 2013, 29, 739-751
35. Kumar C. S. S. R., Mohammad F., *Magnetic Nanomaterials for Hyperthermia-based Therapy and Controlled Drug Delivery*, Adv Drug Deliv Rev. 2011, 63(9), s.789-808
36. Ruiz A., Morais C. P., de Azevedo B. R., Lacava Z. G. M., Villanueva A., Morales M., *Magnetic nanoparticles coated with dimercaptosuccinic acid: development, characterization, and application in biomedicine*, J Nanopart Res (2014), s. 2-20
37. Perigo E. A., Hemery G., Sandre O., Ortega D., Garaio E., Plazaola F., Teran F. J., *Fundamentals and advances in magnetic hyperthermia*, Applied Physics Reviews 2, 041302, (2015)
38. Kubiak T., *Wykorzystanie pokryć z poli(glikolu etylenowego) i chitozanu do zapewnienia biokompatybilności nanocząstkom w aplikacjach biomedycznych*, Polim. Med. 2014, 44, 2, s. 119-127
39. <http://www.nanotherics.com>
40. <http://www.pharmaceuticalonline.com/doc/xpert-highscore-plus-mdash-x-ray-powder-patte-0001>
41. Przedmojski J., *Rentgenowskie metody badawcze w inżynierii materiałowej*, Warszawa 1990
42. Sharma V. K., Klingelhofer G., Nishida T., *Mossbauer Spectroscopy: Applications in Chemistry, Biology, and Nanotechnology*, Wiley 2013
43. Dézsi I., Fetzter C., Gombkötő Á., Szűcs I., Gubicza J., Ungár T. *Phase transition in nanomagnetite*, Journal of Applied Physics 103, 104312, 2008
44. Levy D., Giustetto R., Hoser A., *Structure of magnetite (Fe₃O₄) above the Curie temperature: a cation ordering study*, Phys Chem Minerals (2012) 39:169-176
45. Wildeboer R. R., Southern P., Pankhurs Q. A., *On the reliable measurement of specific absorption rates and intrinsic loss parameters in magnetic hyperthermia materials*, J. Phys. D: Appl. Phys. 47, 495003, 2014

Zjawisko hipertermii magnetycznej w nanocząstkach tlenków żelaza

Szybki rozwój nauki stał się głównym fundamentem badań, prowadzonych w obrębie medycyny z zakresu diagnozy i leczenia schorzeń onkologicznych. Coraz większą uwagę przykuwa dość młoda, a zarazem dynamiczna dziedzina zwana nanotechnologią. W połączeniu z medycznymi metodami obrazowania i terapii stwarza możliwości wczesnej ingerencji w rozwój choroby nowotworowej. Szczególnym uznaniem cieszą się nanocząstki żelaza i jego tlenków (maghemit i magnetyt), posiadające właściwości magnetyczne. Dodatkowo zastosowanie powłok opłaszczających nanocząstki, zwiększa ich stabilność, biokompatybilność oraz powinowactwo do wybranych struktur biochemicznych. Specyficzne właściwości magnetycznych nanomateriałów w dużej mierze zależą od ich kształtu, rozmiaru a także sposobu syntezy. W skojarzeniu z metodą hipertermii, nanocząstki wprowadzone do obszarów tarczowych powodują zwiększenie ich temperatury nawet do 48°C, prowadząc do apoptozy komórek nowotworowych.

Celem pracy była synteza magnetycznych nanocząstek Fe_3O_4 metodą współstrącania z roztworu. Tak otrzymane nanocząstki opłaszczono surfaktantem DMSA. Kolejnym etapem była charakterystyka otrzymanych nanocząstek. W tym celu posłużono się spektroskopią Mössbauerowską oraz dyfrakcją rentgenowską. Właściwości cieplne próbek zmierzono za pomocą systemu Nanotherics Magnetherm. Dysypację energii magnetycznej w próbce ferrocieczy mierzono za pomocą zależności termodynamicznej wyrażonej poprzez współczynnik absorpcji właściwej (SAR). Uzyskane wyniki pozwoliły jednoznacznie wnioskować o właściwościach superparamagnetycznych nanocząstek Fe_3O_4 , co czyni je pożądanymi w technice hipertermii cieczy magnetycznej.

Słowa kluczowe: hipertermia magnetyczna, nanocząstki, superparamagnetyzm

Magnetic hyperthermia in iron oxide nanoparticles

The rapid development of science has become the foundation of the research conducted within the field of medical diagnosis and treatment of oncological diseases. More and more attention is drawn quite young and dynamically growing branch of science called nanotechnology. Main applications of nanomaterials in medicine are: production of contrast agents (MRI), modern drug delivery systems and the destruction of tumors using hyperthermia.

Additional coverage of nanoparticles with a polymer “coat” increases their stability, biocompatibility and affinity to specific biochemical structures. The specific magnetic properties of nanomaterials to a large extent depend on their shape, size and method of synthesis. In combination with the hyperthermia, magnetic nanoparticle causes a temperature increase inside the tumor up to 48°C, which leads to its apoptosis.

Aim of this work was the synthesis of magnetic nanoparticles Fe_3O_4 by co-precipitation method. Thus obtained nanoparticles were coated with DMSA (meso-2,3-dimercaptosuccinic acid). The next step was to characterize the obtained nanoparticles. For this purpose the Mössbauer spectroscopy and X-ray diffraction are used. The heating properties of the samples were measured using the Nanotherics Magnetherm system. The magnetic energy dissipation in a ferrofluid sample was measured using the thermodynamic relation expressed in terms of SAR, under adiabatic condition of the sample. Obtained results shows the unique superparamagnetic properties of Fe_3O_4 nanoparticles, which make them desirable in hyperthermia ferrofluid technique.

Keywords: magnetic hyperthermia, nanoparticles, superparamagnetism.

Substancje biologicznie aktywne w biomasie z kultur pędowych *in vitro* *Bacopa monnieri* L. (Penel) – uaktualnienie

1. Wstęp

Bacopa monnieri L. Pennell (Brahmi) – bakopa drobnolistna jest rośliną dwuliścienną z rodziny *Scrophulariaceae*. Jest to jedna z najważniejszych roślin indyjskiego systemu leczniczego Aryveda. Jest ona małym pnącym zieleń z licznymi płożącymi się pędami o długości 10-30 cm. Liście są mięsiste, podługzane i siedzące, w jasno zielonym kolorze. Posiada małe (do 0,5 cm), jasno fioletowe kwiaty z 4-5 płatkami. Poza Indiami występuje w Nepalu, Chinach, Wietnamie, na Sri Lance i Florydzie, na stanowiskach do wysokości 1300 m n.p.m. Naturalnym środowiskiem występowania *B. monnieri* są podmokłe tereny, bagna i płytko woda. Obecnie dostępne, komercyjne ekstrakty z ziela bakopy (*Bacopae Herba*) poprawiają ogólne funkcjonowanie organizmu, a przede wszystkim układu immunologicznego [1÷7]. Badania kliniczne potwierdzają także dobre efekty w zastosowaniu ekstraktów z ziela tej rośliny w odbudowie funkcji mentalnych u dzieci cierpiących na ADHD, aktywizacji funkcji poznawczych u osób po udarze mózgu lub cierpiących na padaczkę [2, 3]. Najważniejsze związki czynne tej rośliny to saponiny triterpenowe zwane bakozydami, alkaloidy takie jak bramina i herpestyna oraz związki flawonoidowe. Główne ich działania polegają na zwiększeniu przepływu krwi w mózgu, polepszeniu koncentracji, działaniu antydepresyjnym, przeciwzapalnym, przeciwbakteryjnym, przeciwnowotworowym [1, 2]. Ekstrakty z ziela *B. monnieri* są stosowane, jako wspomagające w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych (np. choroba Alzheimera czy Parkinsona) [2, 4, 7, 8].

Celem pracy było opisanie pozostałych metabolitów wtórnych, które mogą decydować o działaniu biologicznym *B. monnieri*. Zawartość związków fenolowych i indolowych, kwasów tłuszczowych oraz biopierwiastków oznaczano w materiale

¹ muchon@poczta.fm, Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

² maciek@lojewski.pl, Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

³ uran16@o2.pl, Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

⁴ mfzaja@poczta.fm, Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

pozyskiwanym z kultur *in vitro* o powtarzalnych i maksymalnych zawartościach metabolitów biologicznie aktywnych.

W eksperymentach wykorzystano materiał z kultur pędowych *in vitro Bacopa monnieri*. Wyjściowy materiał pozyskano z firmy IVPLANT w formie pędowych kultur *in vitro*. Eksperymentalne kultury *in vitro B. monnieri* w płynnym podłożu Murashiga & Skooga (MS) prowadzono przy stałym, sztucznym oświetleniu (światło białe, 4 W/m², LF-40 W lampa Tungfram F33) w temperaturze 25°C±2°C. Co 4 tygodnie kultury pasażowano i zbierano świeżą biomasę, którą następnie mrożono i liofilizowano (liofilizator Freezone 4.5, Labconco; temp.: -40°C) [9÷12].

Zliofilizowany materiał był ekstrahowany metanolem w perkolatorze (do utraty barwy rozpuszczalnika). Ekstrakt metanolowy zagęszczono na wyparce próżniowej w temperaturze łaźni 40°C.

Do analizy zawartości związków indolowych (L-tryptofan, serotonina) oraz fenolowych (kwas chlorogenowy, kwas neochlorogenowy i kwas kawowy) w otrzymanych ekstraktach metanolowych wykorzystano metodę RP-HPLC. Analizy tą metodą prowadzono przy użyciu urządzenia Hitachi z pompą: L-7100; kolumna: Purospher® RP-18 (4 x 200 mm, 5 µm) termostatowanej w temperaturze 25°C; szybkość przepływu 1 mL/min. Do analizy związków indolowych zastosowano układ izokratyczny: etanol/woda/kwas octowy 20:79,2:0,8 (v/v/v). Analizę kwasów fenolowych metodą RP-HPLC przeprowadzono w układzie rozwijającym: rozpuszczalnik A: metanol/0,5% kwas octowy 1:4 (v/v), i rozpuszczalnik B: metanol. Gradient stężeń był następujący: 0% B, 0-25 min; 0-30% B, 25-35 min; 30-50% B, 35-45 min; 50-100% B, 45-50 min; 100% B 50-55 min; 100-0% B, 55-57 min; 0% B, 57-67 min. [12]. Chromatogramy rejestrowano za pomocą detektora UV przy długościach fali 205 (związki fenolowe) i 280 nm (związki indolowe). Identyfikację związków oznaczanych w ekstraktach dokonano przez porównanie widm UV i czasów retencji ich pików z czasami retencji pików substancji wzorcowych [12]. Zawartość metabolitów oznaczono, przez porównanie pól powierzchni pików oznaczonych związków z polami powierzchni pików odpowiednich substancji wzorcowych na podstawie wyznaczonych dla wzorców krzywych kalibracyjnych i wyrażono ją w mg/g s.m.

Kwasy tłuszczowe ekstrahowano roztworem chloroformu i metanolu (2 : 1 v/v) ze sproszkowanego materiału (pędy uzyskane z kultur *in vitro B. monnieri*) po liofilizacji. Analizę FAME (estrów metylowych kwasów tłuszczowych) przeprowadzono przy użyciu chromatografii gazowej (GC) Agilent 6890N – z kolumną kapilarną J&W DB-23 (60 m, ID 0,25 mm, 0,25 M) i detektorem FID. Do identyfikacji kwasów tłuszczowych wykorzystano czasy retencji standardów FAME z Supelco (47801) [12]. Pola pików zmierzono stosując funkcję integratora (Chemstation) [12].

Biopierwiastki oznaczono metodą ASA w biomasie z kultur pędowych *in vitro B. monnieri*, a wyniki zostały opublikowane w dwóch publikacjach [9, 11]. W pracy

Łojewskiego i wsp. (2014) zbadano wpływ związków organicznych: kwasu antranilowego, L-tryptofanu, seryny lub nieorganicznych: siarczanu(VI) magnezu lub wodorosparginianu cynku dodanych do pożywki na akumulację fizjologicznie aktywnych biopierwiastków. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów udowodniono, że największą efektywność w uzyskaniu bogatej w substancje fizjologicznie aktywne (związki indolowe, fenolowe, biopierwiastki) biomasy, uzyskuje się suplementując pożywkę następującymi związkami organicznymi: kwasem antranilowym, seryną i siarczanem(VI) magnezu. Rezultaty opublikowane przez Łojewskiego i wsp. (2014) wzięto pod uwagę do przygotowania zmodyfikowanego podłoża MS do kolejnego eksperymentu (dodatku kwasu antranilowego lub seryny w kombinacji z siarczanem(VI) magnezu) [11].

2. Analiza zawartości metabolitów wtórnych w biomasie z kultur pędowych *in vitro* *Bacopa monnieri*

2.1. Związki indolowe

Analizę związków indolowych metodą RP-HPLC przeprowadzono w ekstraktach metanolowych z biomasy otrzymanej z pędowych kultur *in vitro* *B. monnieri*. W celu walidacji zastosowanej metody wyznaczono dokładność, precyzję, zakres liniowości, granicę wykrywalności oraz granicę oznaczalności [12]. Związkami indolowymi oznaczonymi w kulturach pędowych *in vitro* *B. monnieri* były L-tryptofan i serotonina. Zostały one oznaczone w biomasie badanego gatunku na podłożu MS oraz z dodatkiem 0,10 g/L siarczanu(VI) magnezu; 0,10 g/L wodorosparginianu cynku; 0,10 g/L L-tryptofanu; 0,25 g/L seryny; 0,50 g/L seryny oraz 0,50 mg/L kwasu antranilowego (MS1) (Tabela 1.).

Najwyższe (nie uwzględniając wyników z biomasy z dodatkiem 0,1 g/L L-tryptofanu) ilości L-tryptofanu i serotoniny uzyskano w materiale pochodzącym z kultur pędowych *in vitro* *B. monnieri* z dodatkiem 0,1 g/L wodorosparginianu cynku i wynosiły one odpowiednio 0,72 mg/g s.m. i 1,19 mg/g, s.m. W porównaniu z kontrolą, stężenia te są sześciokrotnie (L-tryptofan) i czterokrotnie (serotonina) wyższe. Kolejne najwyższe stężenie związków indolowych otrzymano w przypadku biomasy prowadzonej na pożywce zawierającej 0,1 g/L siarczanu(VI) magnezu: odpowiednio 0,44 mg/g s.m i 0,56 mg/g s.m. W przypadku dodatku L-tryptofanu do podłoża obserwowano blisko dziesięciokrotny wzrost jego poziomu w materiale uzyskanym z kultur pędowych *in vitro* *B. monnieri*. Sugeruje to, że dodany związek przechodzi z pożywki do kultur pędowych *B. monnieri*. Uzyskanie akumulacji tego związku w badanym materiale jest istotne, ponieważ L-tryptofan przechodzi przez barierę krew-mózg i jest prekursorem serotoniny w mózgu. Serotonina, generowana

endogennie w mózgu odgrywa decydującą rolę w regulowaniu snu, lęku, agresji, temperatury ciała, nastroju, przebiegu procesu dojrzewania, regeneracji i hamowaniu procesu starzenia się komórek, przyczyniając się tym samym do ogólnego wzmocnienia systemu odpornościowego organizmu [2]. Cynk i magnez są aktywatorami wielu enzymów [9]. Może to wyjaśniać zwiększony wzrost poziomu metabolitów wtórnych po ich dodaniu do pożywki.

L-Tryptofan i serotonina były oznaczane np. w cebulach *Allium sativum* (ok. 0,1 mg/g s.m. L-tryptofanu), w kulturach pędowych *in vitro* *Hypericum perforatum* (0,1 mg/g s.m. L-tryptofanu) [13], czy w owocnikach jadalnego gatunku grzyba *Leccinum scabrum* (ok. 0,27 mg/g s.m. L-tryptofanu i 0,2 mg/g s.m. serotoniny) [14]. porównując uzyskane wyniki z danymi literaturowymi stwierdzić, że zawartość L-tryptofanu i serotoniny w biomasie z kultur pędowych *in vitro* *B. monnieri* są wysokie.

Tabela 1. Zawartość związków indolowych w biomasie z kultur pędowych *in vitro* *Bacopa monnieri*

Związki indolowe	L-Tryptofan	Serotonina
	mg/g s.m.	mg/g s.m.
MS1 (kontrola)	0,11±0,14	0,29±0,16
MS1 + 0,1 g/L siarczan magnezu	0,44±0,05	0,56±0,04
MS1 + 0,1 g/L wodorosparginian cynku	0,72±0,04	1,19±0,21
MS1 + 0,1 g/L L-Tryptofan	1,04±0,10	0,31±0,19
MS1 + 0,25 g/L Seryna	0,15±0,04	0,13±0,03
MS1 + 0,5 g/L Seryna	0,25±0,05	0,38±0,06
MS1 + 0,5 mg/L kwas antranilowy	0,37±0,01	0,29±0,02

Dane przedstawiono jako wartości średnie ± SD z trzech oznaczeń [13].

2.2. Kwasy fenolowe

Związki fenolowe oznaczano w tym samym materiale, jak w przypadku analizy związków indolowych, a stanowiły go hodowane *in vitro* pędy *B. monnieri*. Oznaczonymi związkami fenolowymi były: kwas chlorogenowy (zawartości wahały się w zakresie od 0,20 mg/g s.m. do 0,70 mg/g sm), kwas neochlorogenowy (od 0,11 mg/g

s.m. do 0,40 mg/g s.m.) i kwas kawowy (od 0,01 mg/g s.m. do 0,04 mg/g s.m.). Największy, tj. ok. 3-krotny wzrost całkowitej zawartości oznaczonych związków fenolowych zaobserwowano w kulturach pędowych *B. monnieri* hodowanych w warunkach *in vitro* w płynnym podłożu Murashiga & Skooga z dodatkiem 0,50 g/L seryny i wynosił 1,13 mg/g s.m. (MS 1). Natomiast w przypadku kultury kontrolnej całkowita zawartość oznaczonych związków fenolowych wynosiła 0,36 mg/g (s.m.). Wyniki przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Zawartość wolnych związków fenolowych w biomacie z kultur pędowych *in vitro* *B. monnieri*

	kwas chlorogenowy	kwas neochlorogenowy mg/g sm	kwas kawowy
MS1 (kontrola)	0,20±0,22	0,15±0,15	0,01±0,01
MS1 + 0,1 g/L siarczan magnezu	0,43±0,33	0,40±0,26	0,03±0,03
MS1 + 0,1 g/L wodorooasparginian cynku	0,37±0,07	0,24±0,04	0,02±0,00
MS1 + 0,1 g/L L-Tryptofan	0,28±0,19	0,11±0,03	0,04±0,02
MS1 + 0,25 g/L Seryna	0,36±0,05	0,21±0,02	0,02±0,00
MS1 + 0,5 g/L Seryna	0,70±0,38	0,40±0,25	0,03±0,00
MS1 + 0,5 mg/L kwas antranilowy	0,67±0,38	0,11±0,03	0,02±0,01

Dane przedstawiono jako wartości średnie ± SD z trzech oznaczeń [13].

Fizjologiczna aktywność antyoksydacyjna kwasów fenolowych była przyczyną wyboru tych związków do oznaczenia ich zawartości w biomacie z kultur *in vitro* licznych roślin leczniczych jak i również w materiale z kultur pędowych *in vitro* *B. monnieri*.

W piśmiennictwie naukowym można znaleźć jedynie dane dotyczące całkowitej zawartości (ang. *total phenols*) związków fenolowych w ziele *B. monnieri*, pozyskanym z rośliny rosnącej w warunkach glebowych [1÷6]. W badaniach Łojewskiego i wsp. 2014, 2016 oznaczono zawartość trzech różnych wolnych związków fenolowych w biomacie z kultur pędowych *in vitro* *B. monnieri*. Najwyższe stężenie kwasu chlorogenowego (0,70 mg/g s.m.) i kwasu neochlorogenowego (0,40 mg/g s.m.) stwierdzono w kulturach rosnących z dodatkiem 0,5 g/L seryny, natomiast kwasu kawowego (0,04 mg/g s.m.) w biomacie hodowanej z dodatkiem 0,1 g/L L-tryptofanu.

Dla porównania w kulturach *in vitro* *Exacum affine* zawartość kwasu chlorogenowego wynosiła (0,12 mg/g s.m.) [15]. W przypadku liści *Ribes nigrum* zawartość oznaczonych

związków fenolowych wynosiła: kwas chlorogenowy 0,1 mg/g sm., kwas neochlorogenowy 0,14 mg/g s.m. [16]. W nasionach *Setaria italica* wykazane ilości kwasów fenolowych były następujące: kwas chlorogenowy 0,1 mg/g, s.m. i kwas kawowy 0,04 mg/g s.m. [17].

Stwierdzona po raz pierwszy zawartość wolnych kwasów fenolowych w ekstraktach z materiału uzyskanego z kultur pędowych *in vitro B. monnieri* w przeprowadzonym eksperymencie może wpływać na właściwości badanego surowca, takie jak np. przeciwzapalne, żółciopędne, przeciwmiażdżycowe, hipoglikemiczne, immunostymulujące, antyoksydacyjne, oraz przeciwwirusowe i bakteriostatyczne [12]. Z tego powodu kultury te stanowią mogą interesujący materiał do dalszych badań nad akumulacją związków fenolowych.

2.3. Kwasy tłuszczowe

Spośród oznaczonych nasyconych kwasów tłuszczowych w kulturach pędowych *in vitro B. monnieri* w największych ilościach występował kwas palmitynowy (32,6%). Jest on powszechnie występującym kwasem tłuszczowym w organizmach zwierząt, roślin i mikroorganizmów. Kwas stearynowy (11,7%) jest drugim pod względem zawartości nasyconym kwasem tłuszczowym występującym w badanej biomacie z kultur pędowych *in vitro B. monnieri*. W przypadku badanych nienasyconych kwasów tłuszczowych największy odsetek stanowił kwas linolowy (17,0%). Jest to jeden z niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych, zaliczanych do grupy kwasów omega-6, a jego ważna funkcja w organizmie człowieka polega na udziale w biosyntezie kwasu arachidonowego [18]. Kolejnym pod względem zawartości nienasyconym kwasem tłuszczowym w badanym materiale jest kwas oleinowy (15,7%). Kwas oleinowy może utrudniać postęp adrenoleukodystrofii, choroby wpływającej na gruczoły nadnerczy i mózgu [18]. Kwas oleinowy jest też odpowiedzialny za działanie hipotensyjne [18]. Kolejnym występującym w największych ilościach w badanej biomacie nienasyconym kwasem tłuszczowym był kwas mirystynowy (12,6%). W przeciwieństwie do poprzednich dwóch kwasów tłuszczowych rzadziej występuje on w organizmach żywych. Jednym z głównych źródeł tego kwasu tłuszczowego są oleje z nasion roślin z rodziny *Myristicaceae*, zawierające go w ilości do 30%. Na podstawie informacji z piśmiennictwa wiadomo, że ma on działanie przeciwnowotworowe przeciwko komórkom raka prostaty z lini LNCaP [17].

Kwasy tłuszczowe oznaczono w materiale pochodzącym z kultur pędowych *in vitro B. monnieri* prowadzonej na pożywce MS1, ponieważ stosowane dodatki nie miały wpływu na zawartość kwasów tłuszczowych (Tabela 3).

Tabela 3. Zawartość procentowa kwasów tłuszczowych w biomacie z kultur *in vitro* *B. monnieri* [13]

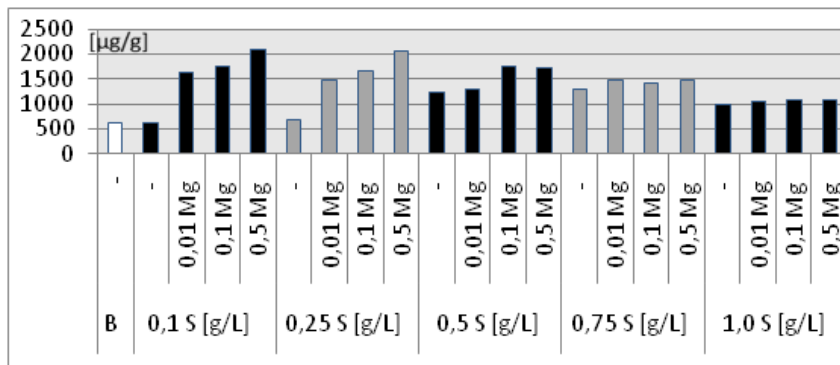
Nasycone kwasy tłuszczowe	
kwasy palmitynowy	32,6 %
kwasy stearynowy	11,7 %
kwasy mirystynowy	5,2 %
kwasy kaprynowy	1,7 %
kwasy laurynowy	1,6 %
kwasy pentadekanowy	0,6 %
Nienasycone kwasy tłuszczowe	
kwasy linolowy	17 %
kwasy oleinowy	15,7 %
kwasy mirystooleinowy	12,6 %
kwasy <i>cis</i> -10-pentadekanowy	0,8 %
kwasy palmitooleinowy	0,4 %

Kwasy tłuszczowe w biomacie z kultur pędowych *in vitro* *B. monnieri* występujące w największej ilości, to nasycone pochodne (53,4%). Dominującym kwasem tłuszczowym z tej grupy jest kwas palmitynowy (32,6%). Całkowita zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych jest nieco niższa niż w przypadku nasyconych kwasów tłuszczowych (NKT) i wynosiła 46,5%. Największy udział w składzie NKT posiadają: kwas linolowy, kwas oleinowy i kwas mirystooleinowy (odpowiednio 17,0%, 15,7%, 12,6%). Kwas oleinowy zmniejsza ryzyko peroksydacji lipidów, co przeciwdziała tworzeniu się płytek miażdżycowych [19]. Spożywanie olejów roślinnych przyczynia się również do zmniejszenia stężenia cholesterolu frakcji LDL, substancji zwiększających krzepliwość krwi i zwiększenia stężenia cholesterolu frakcji HDL oraz antyoksydantów [19]. Kwas *cis*-10-pentadekanowy i kwas palmitooleinowy stwierdzono w małych ilościach: 0,8% i 0,4% [13].

3. Biopierwiastki oznaczone w biomacie z kultur *in vitro* *Bacopa monnieri*

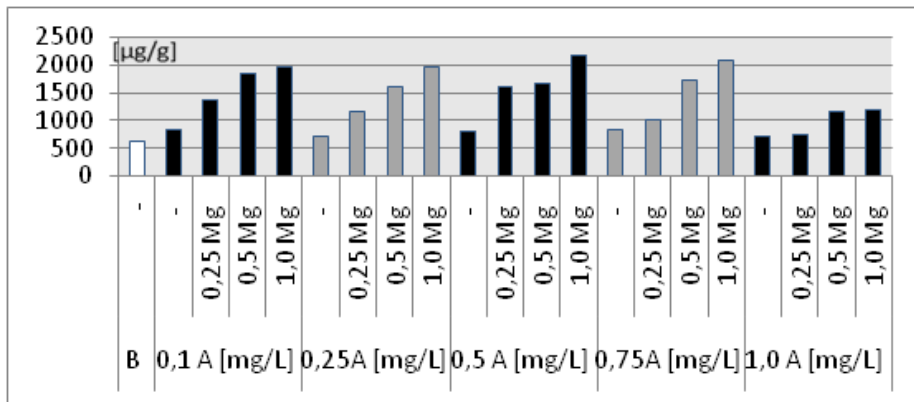
Materiał pochodzący z kultur pędowych *in vitro* *B. monnieri* prowadzonych na pożywkach płynnych MS z dodatkiem seryny lub kwasu antranilowego i wzbogaconych w jony magnezu(II), charakteryzuje się zwiększoną zdolnością do akumulacji tego pierwiastka. Należy zauważyć, że dodatek nawet minimalnych ilości magnezu (0,01 g/L Mg) skutkuje większą akumulacją tego pierwiastka w biomacie w porównaniu do próby kontrolnej (bez dodatku magnezu). Biorąc pod uwagę kultury prowadzone na pożywkach z dodatkiem seryny i jonów magnezu(II) (w stężeniach od 0,01 do 0,5 g/L pożywki) stwierdzono, że zwiększenie stężenia Mg(II) w podłożu powodowało zauważalny wzrost akumulacji tego pierwiastka w biomacie. Jednak dotyczyło to tylko

przypadku, kiedy seryna była dodawana w stężeniach 0,10 i 0,25 g/L. Przy wzrastającej dawce seryny (0,50; 0,75; 1,00 g/L) wzrost akumulacji Mg(II) był niewielki. Stwierdzono korelację pomiędzy wzrostem stężeń Mg(II) w pożywce, a jego akumulacją w biomacie z kultur *in vitro* *B. monnieri* (Ryc.1.)



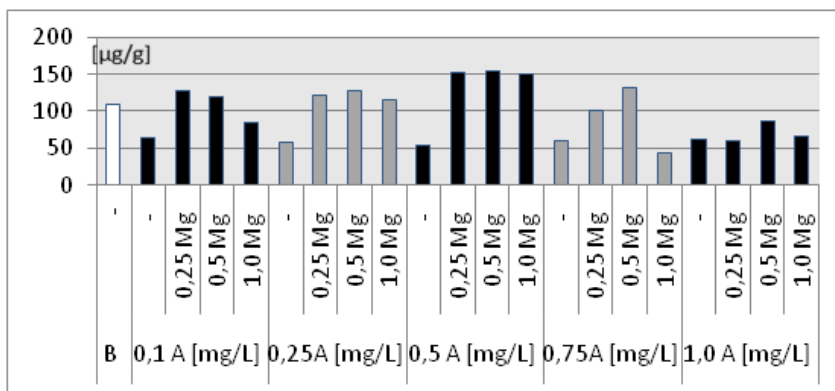
Ryc.1. Zawartość magnezu [µg/g s.m.] w biomacie z kultur pędowych *B. monnieri* na podłożu MS1 wzbogacanym seryną; B – kontrola, S – seryna

Największą zawartość tego pierwiastka w biomacie z kultur *in vitro* *B. monnieri* uzyskano na pożywce z dodatkiem 0,5 mg/L kwasu antranilowego i 1,0 g/L Mg(II) i wynosiła ona 2163 µg/g s.m. (Ryc.2.).

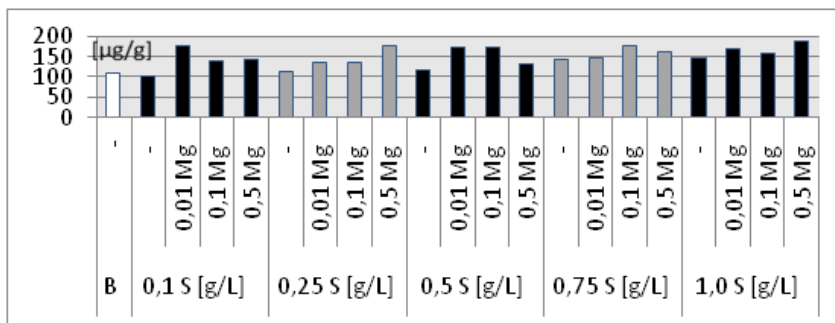


Ryc. 2. Zawartość magnezu [µg/g s.m.] w biomacie z kultur pędowych *B. monnieri* na podłożu MS1 wzbogacanym kwasem antranilowym; B – kontrola, A – kwas antranilowy

W przypadku kolejnego analizowanego pierwiastka – cynku; jego stężenie w biomacie z kultur *in vitro* *B. monnieri* mieściło się w zakresie 44,3-189,3 $\mu\text{g/g}$ s.m., jednak w przypadku kultur prowadzonych bez żadnych dodatków (kontrola) stężenie wynosiło 110,1 $\mu\text{g/g}$ s.m. W większości badanych próbek, dodatek kwasu antranilowego lub seryny z dodatkiem soli Mg(II) nie powodował statystycznie istotnych różnic w akumulacji cynku w biomacie *B. monnieri* [9, 11] (Ryc.3. i 4).



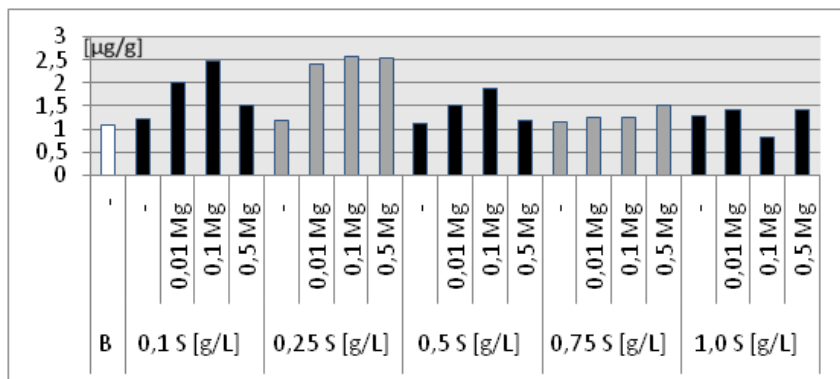
Ryc.3. Zawartość cynku [$\mu\text{g/g}$ s.m.] w biomacie z kultur pędowych *B. monnieri* na podłożu MS1 wzbogacającym kwasem antranilowym



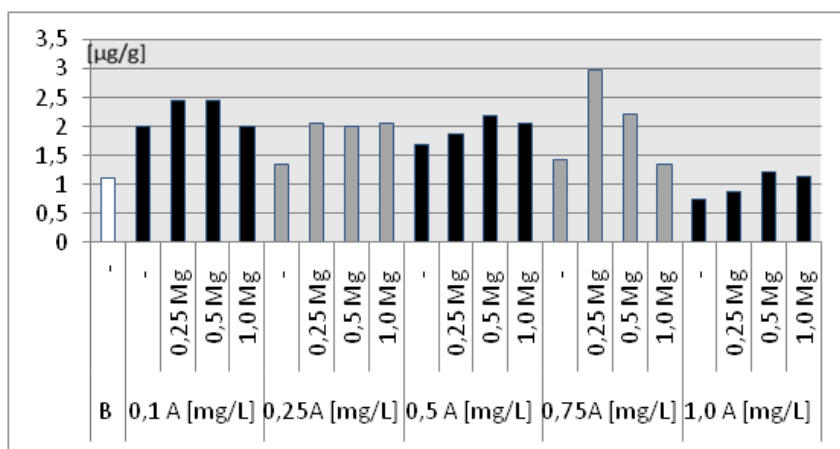
Ryc.4. Zawartość cynku [$\mu\text{g/g}$ s.m.] w biomacie z kultur pędowych *B. monnieri* na podłożu MS1 wzbogacającym seryną; B – kontrola, S – seryna

Podobną tendencję odnotowano w kolejnych eksperymentach, dotyczących akumulacji miedzi w kulturach *in vitro* *B. monnieri* [9]. Stężenie miedzi mieściło się w zakresie 0,75-2,98 $\mu\text{g/g}$ s.m., natomiast w próbie kontrolnej wynosiło 1,10 $\mu\text{g/g}$ s.m. Dodatek seryny lub kwasu antranilowego w obu przypadkach (bez dodatku soli

magnezu), nie powodował statystycznie istotnego zwiększenia akumulacji Cu – wyniki zawartości tego pierwiastka wahały się w zakresie: 0,75-1,44 $\mu\text{g/g}$ s.m. Największy wzrost akumulacji Cu otrzymano w kulturach z dodatkiem 0,25 g/L seryny i 0,10 g/L Mg (2,56 $\mu\text{g/g}$ s.m.), jak również, w kulturach z dodatkiem 0,75 mg/L kwasu antranilowego i 0,25 g/L Mg (2,98 $\mu\text{g/g}$ s.m.) (Ryc.5. i 6.).

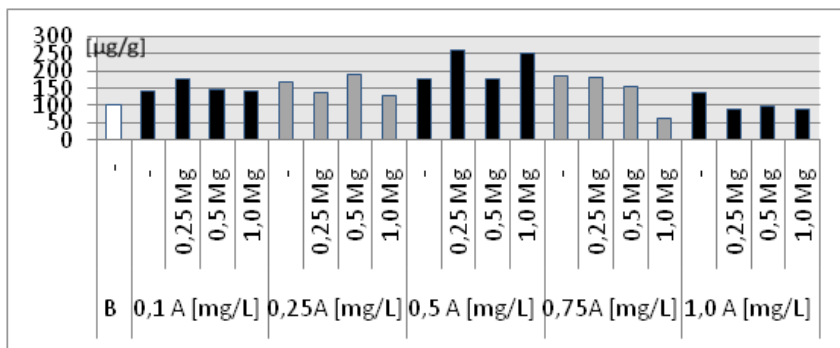


Ryc.5. Zawartość miedzi [$\mu\text{g/g}$ s.m.] w biomase z kultur pedowych *B. monnieri* na podłożu MS1 wzbogacającym seryną; B – kontrola, S – seryna

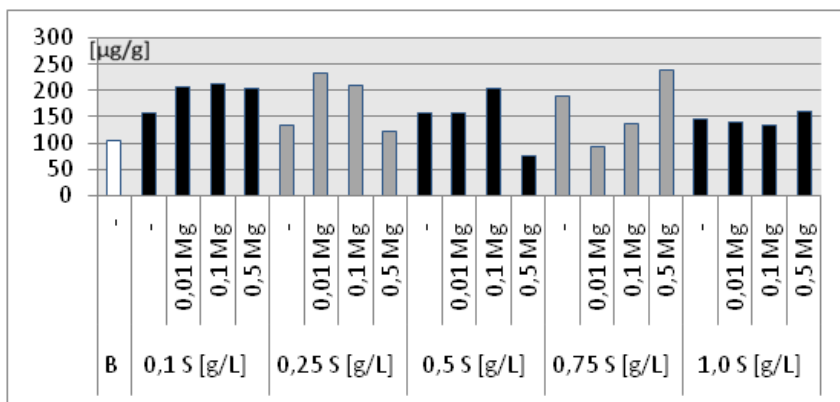


Ryc.6. Zawartość miedzi [$\mu\text{g/g}$ s.m.] w biomase z kultur pedowych *B. monnieri* na podłożu MS1 wzbogacającym kwasem antranilowym; B – kontrola, A – kwas antranilowy

Oznaczone stężenie żelaza w biomase z kontrolnych kultur *in vitro* *B. monnieri* wynosiło 103,2 $\mu\text{g/g}$ s.m. W tym przypadku, wzbogacanie seryną bądź kwasem antranilowym (bez dodatku Mg) podłoża podstawowego MS skutkowało wzrostem akumulacji Fe w uzyskanej biomase i wynosiło: 132,1-189,5 $\mu\text{g/g}$ s.m. Ponadto, największą zawartość żelaza (259,6 $\mu\text{g/g}$ s.m.) w biomase, oznaczono w materiale z kultur wzbogaconych w 0,50 mg/L kwasu antranilowego i 0,25 g/L Mg. Wynik ten jest porównywalny z najwyższą akumulacją żelaza w biomase z kultur pędowych *in vitro* *B. monnieri* z dodatkiem seryny i magnezu (0,25 g/L seryny i 0,01 g/L Mg-233,9 $\mu\text{g/g}$ sm) [9, 11] (Ryc.7. i 8.)

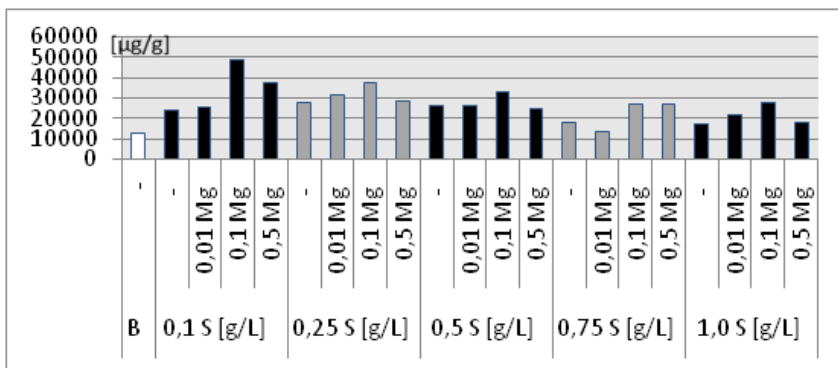


Ryc.7. Zawartość żelaza [$\mu\text{g/g}$ s.m.] w biomase z kultur pędowych *B. monnieri* na podłożu MS1 wzbogacany kwasem antranilowym; B – kontrola, A – kwas antranilowy

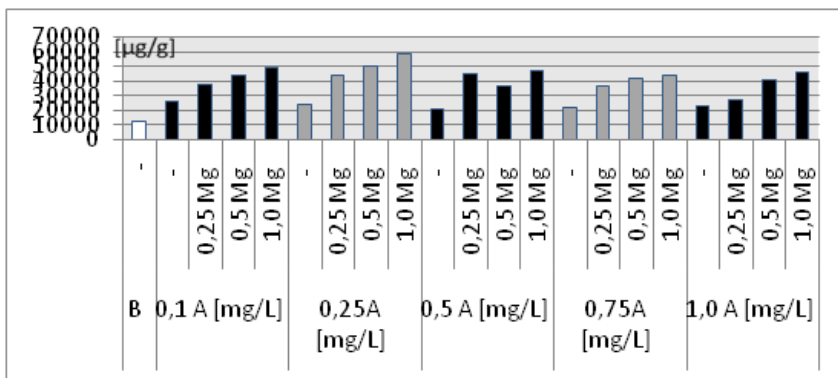


Ryc.8. Zawartość żelaza [$\mu\text{g/g}$ s.m.] w biomase z kultur pędowych *B. monnieri* na podłożu MS1 wzbogacany seryną; B – kontrola, S – seryna

Oznaczona ilość potasu w biomase z kultur kontrolnych *B. monnieri* była wysoka i wynosiła 12,3 mg/g s.m. Akumulacja K w biomase z kultur pędowych *in vitro* *B. monnieri* z dodatkiem seryny wahała się w zakresie od 16,8 do 49,0 mg/g s.m. (Ryc.9.), natomiast w biomase z kultur z dodatkiem kwasu antranilowego była w zakresie 20,6-58,9 mg/g s.m. (Ryc.10.).



Ryc.9. Zawartość potasu [µg/g s.m.] w biomase z kultur pędowych *B. monnieri* na podłożu MS1 wzbogacanym seryną; B – kontrola, S – seryna

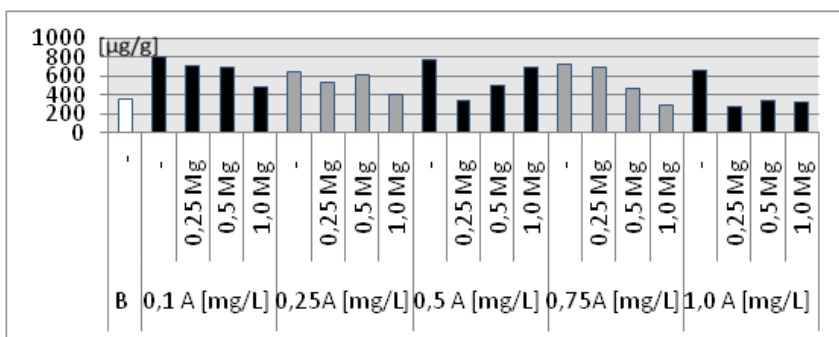


Ryc.10. Zawartość potasu [µg/g s.m.] w biomase z kultur pędowych *B. monnieri* na podłożu MS1 wzbogacanym kwasem antranilowym; B – kontrola, A – kwas antranilowy

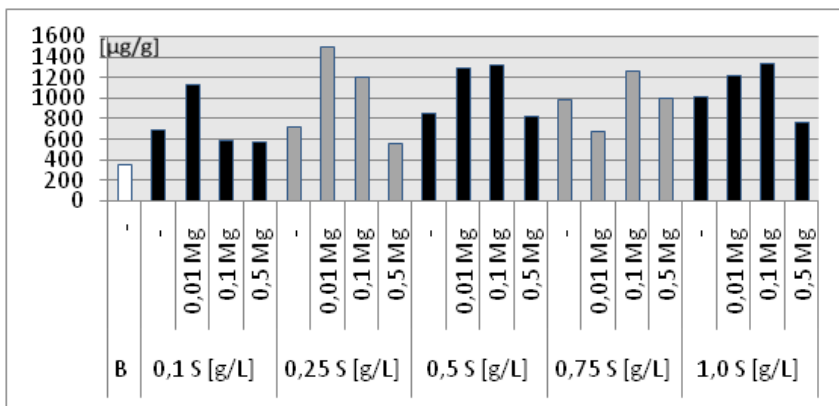
W kulturach pędowych *in vitro* *B. monnieri* zawierających serynę i Mg(II), wzrost stężenia potasu w otrzymanym materiale był najwyższy na pożywkach zawierających do 0,10 g/L Mg(II). Wyższe stężenie Mg(II) niż 0,10 g/L w pożywce prowadzi do zmniejszenia akumulacji potasu w biomase. W przypadku pożywek zawierających

kwasy antranilowe, im wyższe było stężenie Mg, tym większe było stężenie potasu w biomacie (do 58,9 mg/g s.m. w pożywce zawierającej 0,25 g/L kwasu antranilowego i 1 g/L Mg).

Stężenie sodu w materiale z pędowych kultur *in vitro* *B. monnieri* z dodatkiem seryny wahało się w zakresie 0,6-1,5 mg/g s.m. W kulturach z dodatkiem kwasu antranilowego stężenie sodu było w przedziale od 0,28 do 0,80 mg/g s.m. Stwierdzono, że zdolność akumulacji sodu w biomacie z kultur *in vitro* z dodatkiem seryny była skorelowana ze wzrostem stężenia magnezu, ale tylko do poziomu 0,1 g/L. W przypadku kultur *in vitro* *B. monnieri* z dodatkiem kwasu antranilowego stwierdzono, że najlepsze wyniki uzyskano po dodaniu tylko kwasu antranilowego (Ryc.11.i 12.).



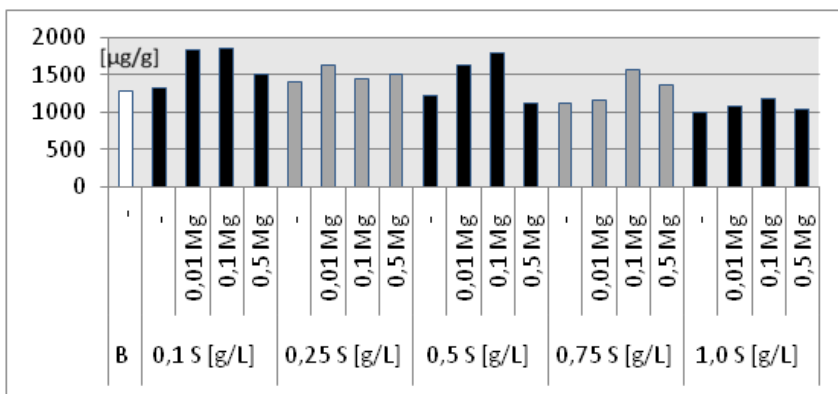
Ryc.11. Zawartość sodu [µg/g s.m.] w biomacie z kultur pędowych *B. monnieri* na podłożu MS1 wzbogaconym kwasem antranilowym; B – kontrola, A – kwas antranilowy



Ryc.12. Zawartość sodu [µg/g s.m.] w biomacie z kultur pędowych *B. monnieri* na podłożu MS1 wzbogaconym seryną; B – kontrola, S – seryna

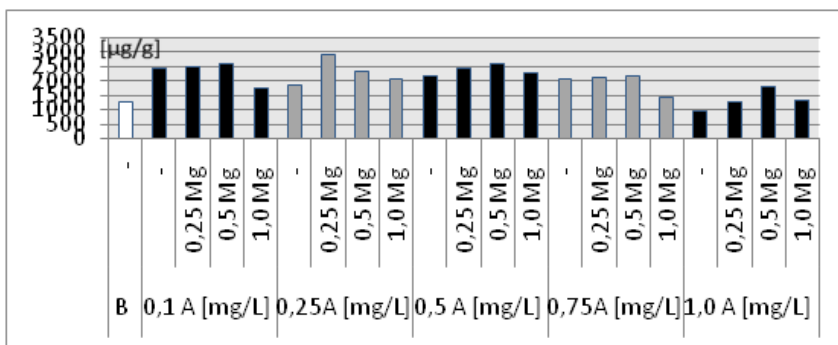
Suplementacja magnezem spowodowała spadek stężenia sodu w badanej biomacie [9, 11].

Przeprowadzona analiza ilości wapnia w otrzymanej biomacie z kultur *in vitro* *B. monnieri* wykazuje, że na pożywkach wzbogaconych w serynę i magnez zawartość wapnia jedynie nieznacznie wzrasta (w zakresie zastosowanych stężeń Mg od 0,01 do 0,10 g/L) (Ryc.13).



Ryc.13. Zawartość wapnia [µg/g s.m.] w biomacie z kultur pędowych *B. monnieri* na podłożu MS1 wzbogaconym seryną; B – kontrola, S – seryna

Suplementacja Mg w wyższym stężeniu (0,50 g/L) powoduje zmniejszenie zawartości Ca w biomacie *B. monnieri*. Podobny efekt zaobserwowano w przypadku prowadzenia kultur *B. monnieri* z dodatkiem kwasu antranilowego (Ryc.14).



Ryc.14. Zawartość wapnia [µg/g s.m.] w biomacie z kultur pędowych *B. monnieri* na podłożu MS1 wzbogaconym kwasem antranilowym; B – kontrola, A – kwas antranilowy

Zdolność akumulacji wzrastała w wyniku suplementacji magnezem w stężeniach 0,25 i 0,50 g/L, natomiast dodatek w stężeniu 1,0 g/L powodował zahamowanie akumulacji wapnia w biomacie.

4. Podsumowanie

Zastosowanie powyżej opisanych eksperymentów pozwoliło uzyskać kultury pędów *Bacopa monnieri* charakteryzujące się wysokim przyrostem biomasy.

Modyfikacje podłoża MS polegające na jego wzbogacaniu siarczanem magnezu, wodorosparginianem cynku, L-tryptofanem, seryną i kwasem antranilowym w różnych stężeniach, pozwoliły uzyskać efektywniejszą akumulację substancji o działaniu leczniczym, tj. związków indolowych, kwasów fenolowych, kwasów tłuszczowych i biopierwiatków.

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów stwierdzono możliwość wpływania przez odpowiedni dobór prekursorów na otrzymywanie biomasy *B. monnieri* o zwiększonej biosyntezie farmakologicznie czynnych metabolitów wtórnych.

Literatura

1. Singh H. K., *Brain enhancing ingredients from Ayurvedic medicine: quintessential example of Bacopa monniera, a narrative review*, *Nutrients*, 5 (2013), s. 478-497
2. Muszyńska B., Łojewski M., Rojowski J., Opoka W., Sułkowska-Ziaja K., *Surowce naturalne mające znaczenie w profilaktyce i wspomagające leczenie depresji*, *Psychiatria Polska*, 49 (2015), s. 435-453
3. Gohil K., Jagruti P., *A review on Bacopa monniera: current research and future prospects*, *International Journal of Green Pharmacy*, 4 (2010), s. 1-9
4. Aguiar S., Borowski T., *Neuropharmacological review of the nootropic herb Bacopa monnieri*, *Rejuvenation Research*, 16 (2013), s. 313-326
5. Deb D. D., Kapoor P., Dighe R. P., Padmaja R., Anand M. S., D'Souza P., Deepak M., Murali B., Agarwal A., *In vitro safety evaluation and anticlastogenic effect of BacoMind on human lymphocytes*, *Biomedical and Environmental Sciences*, 21 (2008), s. 7-23
6. Vishnoi S., Agarwal R. C., *Chemopreventive action of Bacopa monnieri (brahmi) hydromethanolic extract on DMBA- induced skin carcinogenesis in Swiss Albino Mice*, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2 (2013), s. 197-202
7. Kalyani M., Lingaraju S. M., Salimath B. P., *A pro-apoptotic 15-kDa protein from Bacopa monnieri activates caspase-3 and downregulates Bcl-2 gene expression in mouse mammary carcinoma cells*, *Journal of Natural Medicines*, 67 (2013), s.123-136
8. Madhavi T., Mahitha B., Mallikarjuna K., Sushma N. J., *Therapeutic effect of Bacopa monniera against aluminum induced toxicity in medulla oblongata of albino rat*, *Journal of Medical Sciences*, 13(2013), s. 465

9. Łojewski M., Muszyński B., Smalec A., Reczyński W., Opoka W., Sułkowska-Ziaja K., *Development of optimal medium content for bioelements accumulation in Bacopa monnieri (L.) in vitro culture*, Applied biochemistry and biotechnology, 174 (2014), s. 1535-1547
10. Łojewski M., Pomierny B., Muszyńska B., Krzyżanowska W., Budziszewska B., Szewczyk A., *Protective effects of Bacopa Monnieri on hydrogen Peroxide and staurosporine: induced damage of human neuroblastoma SH-SY5Y Cells*, Planta medica. 82 (2016), s. 205-210
11. Łojewski M., Krakowska A., Reczyński W., Szewczyk A., Muszyńska B., *Analysis of elements and bacosides in in vitro shoot culture of Bacopa monnieri*, Acta Physiologiae Plantarum. 38 (2016), s. 1-10
12. Muszyńska B., Łojewski M., Sułkowska-Ziaja K., Szewczyk A., Gdula-Argasińska J., Hałaszk P., *In vitro cultures of Bacopa monnieri (L. Pennell) and an analysis of selected groups of biologically active metabolites in their biomass*, Pharmaceutical Biology, 4 (2016), s. 1-11
13. Muszyńska B., Ekiert H., Kwiecień I., Maślanka A., Zodi R., Beerhues L., *Comparative analysis of therapeutically important indole compounds in in vitro cultures of Hypericum perforatum cultivars by HPLC and TLC analysis coupled with densitometric detection*, Natural Product Communications, 9 (2014), s. 1437-144
14. Muszyńska B., Sułkowska-Ziaja K., Wójcik A., *Levels of physiologically active indole derivatives in the fruiting bodies of some edible mushrooms (Basidiomycota) before and after thermal processing*, Mycoscience, 54 (2013), s. 321-326
15. Gdula-Argasińska J., Czepiel J., Woźniakiewicz A., Wojtoń K., Grzywacz A., Woźniakiewicz M., Librowski, *T. n-3 Fatty acids as resolvents of inflammation in the A549 cells*, Pharmacological Reports, 67 (2015), s. 610-615
16. Skrzypczak-Pietraszek E., Słota J., Pietraszek J., *The influence of L-phenylalanine, methyl jasmonate and sucrose concentration on the accumulation of phenolic acids in Exacum affine Balf. f. ex Regel shoot culture*, Acta Biochimicum Polonarium, 61(2014), s. 47-53
17. Vagiri M., Conner S., Stewart D., Andersson S. C., Verrall S., Johansson E., Rumpunen K., *Phenolic compounds in blackcurrant (Ribes nigrum L.) leaves relative to leaf position and harvest date*, Food Chemistry, 172 (2015), s. 135-142
18. Zhang L. Z., Liu R. H., *Phenolic and carotenoid profiles and antiproliferative activity of foxtail millet*, Food Chemistry, 174 (2015), s. 495-501
19. Teres S., Barcelo-Coblijn G., Benet M., Alvarez R., Bressani R., Halver J. E., Escriba P. V., *Oleic acid content is responsible for the reduction in blood pressure induced by olive oil*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 105 (2008), s. 13811-13816

Substancje biologicznie aktywne w biomasie z kultur pędowych *in vitro* *Bacopa monnieri* L. (Penel) – uaktualnienie

Bacopa monnieri L. Pennell (Brahmi) jest rośliną dwuliścienną z rodziny *Scrophulariaceae*. Jest to jedna z najważniejszych roślin indyjskiego systemu leczniczego Aryuveda. Obecnie dostępne, komercyjne ekstrakty z tego surowca poprawiają ogólne funkcjonowanie organizmu, a przede wszystkim układu immunologicznego. Badania kliniczne potwierdzają także dobre efekty w zastosowaniu tego surowca w odbudowie funkcji mentalnych u dzieci cierpiących na ADHD, aktywizacji funkcji poznawczych u osób po udarze mózgu lub cierpiących na padaczkę. Najważniejsze związki czynne tej rośliny to saponiny triterpenowe zwane bakozydami, alkaloidy takie jak bramina i herpestyna oraz związki flawonoidowe. Główne ich działania polegają na zwiększeniu przepływu krwi w mózgu, polepszeniu koncentracji, działaniu antydepresyjnym, przeciwzapalnym, przeciwbakteryjnym, przeciwnowotworowym, *B. monnieri* jest stosowana, jako wspomagająca w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych.

Celem pracy było opisanie na podstawie aktualnych badań pozostałych metabolitów, które mogą mieć wpływ na działanie biologiczne surowca. Zawartość związków fenolowych, indolowych, kwasów tłuszczowych oraz biopierwiastków oznaczano w materiale pozyskiwanym z pędowych kultur *in vitro* *B. monnieri* o powtarzalnych i maksymalnych zawartościach metabolitów biologicznie aktywnych.

Słowa kluczowe: *Bacopa monnieri*, związki indolowe i fenolowe, kwasy tłuszczowe, biopierwiastki

Biologically active compounds found in *Bacopa monnieri* biomass – an update

Bacopa monnieri L. Pennell (Brahmi) is a dicotyledonous plant from the *Scrophulariaceae* family. It is one of the most important plants of Indian medicine system Aryuveda. Currently available commercial extracts from this material improve the general well-being of (human) organism, but – above all, the functioning of immune system. Clinical research also confirms good effects during application of this plant in recovering mental functions in children suffering from ADHD and activation of cognitive functions in patients after a stroke or with epilepsy. The most important compounds of this plant are triterpene saponines called bacosides, alkaloids such as brahmin and herpestin and flavonoid compounds. Main action of these compounds involves an increase in cerebral blood flow and improvement of concentration. Substances found in *B. monnieri* also show antidepressant, anti-inflammatory, antibacterial, antitumor action and are used auxiliary in treatment of neurodegenerative diseases. The primary mechanism of action of these substances is basing on an activation of cholinergic system.

The aim of this work was to describe – basing on current research – additional metabolites which can influence biological activity of this plant. The presence of phenol and indole compounds, fatty acids and bioelements was determined in the material obtained from *B. monnieri* shoot *in vitro* cultures characterized by maximum reproducible contents of biologically active metabolites.

Keywords: *Bacopa monnieri*, indole and phenolic compounds, fatty acids, bioelements

Nowe spojrzenie na biologię komórek iNKT – funkcjonalne różnice pomiędzy subpopulacjami

1. Wstęp

Jak ukazują badania prowadzone na przestrzeni przeszło 20 lat, peptydy nie są jedynymi antygenami rozpoznawanymi przez limfocyty T. Jedną z populacji limfocytów T, komórki NKT (*natural killer T cells*) znacznie poszerza zakres antygenów rozpoznawanych przez nasz układ odpornościowy. Komórki NKT odpowiadają swoiście na prezentowane antygeny lipidowe i glikolipidowe, wykorzystując występujące na ich powierzchni receptory dla limfocytów T (TCR). Jednakże w odróżnieniu od konwencjonalnych limfocytów, które rozpoznają jeden epitop lub najwyżej kilka, pojedynczy receptor TCR komórek NKT może reagować z licznymi antygenami zarówno własnymi jak i obcymi. Dlatego pomimo niewielkiej liczności w organizmie (0,1-1% we krwi obwodowej), ilość antygenowo swoistych komórek NKT jest wystarczająca do wywołania istotnej reakcji immunologicznej [1-3]. Obok cech charakterystycznych dla limfocytów T, komórki NKT wyróżnia współwystępowanie cech swoistych dla komórek NK [4]. Sama nazwa tej subpopulacji limfocytów nawiązuje właśnie do powyższego pierwotnego opisu, będącego podstawą klasyfikowania komórek jako NKT. Na ich powierzchni są obecne receptory typowe dla komórek NK: mysie NKT posiadają receptory Ly49, receptory należące do rodziny NKG2, CD94 oraz NK1.1. Na ludzkich komórkach NKT często identyfikuje się podobne markery, włączając CD56, CD161, CD94, NKG2D oraz NKG2A [5, 6]. Tak jak komórki NK, NKT mogą oddziaływać na inne komórki w mechanizmie bezpośredniej cytotoksyczności poprzez uwalnianie granzymów i perforyny [7].

Zarówno mysie jak i ludzkie NKT wykazują ekspresję różnych receptorów i ligandów związanych z limfocytami T o charakterze stymulującym oraz hamującym, np. CD28 oraz CD154, których ekspresja zależy od stopnia aktywacji komórki. Biorąc pod uwagę obecność koreceptorów CD4 i CD8, ludzkie i mysie komórki NKT obejmują

¹ malgorzatawaldowska@gmail.com, Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej, II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

² wioleta.kowalska91@gmail.com, Katedra i Zakład immunologii Klinicznej, II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

³ justyna.wos1@gmail.com, Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej, II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

komórki CD4+CD8- oraz CD4-CD8- (tzw. subpopulacja *double negative* DN); jedynie u ludzi zaobserwowano subpopulację CD4-CD8+ (CD8 $\alpha\alpha^+$ i CD8 $\alpha\beta^+$) [5, 8].

Od czasu odkrycia komórek NKT w późnych latach 80-tych [9], znacznie wzrosła wiedza na temat ich biologii oraz pełnionych przez nie funkcji. Obecnie wiemy, iż koekspresja markerów typowych dla komórek NK, a także cząsteczek CD3 i receptorów TCR- $\alpha\beta$ nie definiuje w sposób wyczerpujący populacji komórek NKT; takie komórki zdają się stanowić część szerszej rozumianej rodziny komórek NKT [7]. Udowodniono, że na powierzchni pewnej części NKT owe markery w ogóle nie występują [10], a ich obecność na innych komórkach NKT zależy od stopnia ich dojrzałości czy aktywacji [11, 12]. Ponadto, nasilenie ekspresji cząsteczek takich jak CD161/NK1.1 obserwowane jest także na konwencjonalnych limfocytach T w trakcie ich aktywacji [10]. Dlatego obecnie, przy klasyfikacji komórek NKT bierze się pod uwagę rodzaj używanych łańcuchów tworzących receptory TCR oraz rodzaj cząsteczki związanej z antygenem lipidowym [13]. Najlepiej poznana została populacja komórek NKT, która posiada niezmiennie receptory TCR oraz rozpoznaje antygeny prezentowane przez niepolimorficzne glikoproteiny podobne do cząsteczek MHC klasy I – CD1d. Populacja tych komórek znana jest pod nazwą *invariant* NKT (iNKT), klasyczne NKT lub komórki NKT typu I [14]. W niniejszej pracy autorzy pragną przedstawić najnowsze wiadomości dotyczące komórek iNKT, ze zwróceniem szczególnej uwagi na istnienie funkcjonalnego zróżnicowania w obrębie tej populacji. Profil cytokin uwalnianych przez komórki iNKT może decydować o pełnieniu przez nie roli wzmacniania, bądź tłumienia odpowiedzi immunologicznej [15].

2. Komórki *invariant* NKT (iNKT)

Nazwa komórek *invariant* NKT (iNKT) nawiązuje do budowy receptorów TCR $\alpha\beta$, występujących na ich powierzchni. Części zmienne są kodowane przez ograniczony zasób segmentów genowych, które tworzą niezmienny łańcuch α (u ludzi Va24Ja18, u myszy Va14Ja18). Jest on sparowany z łańcuchem β , powstającym w wyniku rearanżacji ograniczonej puli segmentów genowych, najczęściej V β 11 u ludzi, a u myszy V β 8, V β 7 lub V β 2 [16]. Bezwzględny udział Va14Ja18 w tworzeniu łańcucha α został udowodniony przy badaniach z użyciem transgenicznych myszy Va14 [17], jak również myszy Ja18^{-/-} pozbawionych dojrzałych iNKT [18]. Takie receptory umożliwiają komórkom iNKT rozpoznawanie antygenów lipidowych, ignorowanych przez konwencjonalne limfocyty T. Pierwszym zidentyfikowanym antygenem rozpoznawanym przez tę grupę komórek stanowił α -galaktozyloceramid (α -GalCer). Glikolipid ten został odkryty przez zespół pod kierunkiem Kawano podczas poszukiwania związków pochodzących z gąbek morskich obdarzonych aktywnością przeciwnowotworową [14]. α -GalCer szybko stał się standardowym narzędziem, pozwalającym na kontynuowanie badań nad komórkami iNKT w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*. Będąc

doskonałym ligandem zarówno dla mysich, jak i ludzkich iNKT, umożliwił obserwacje zmian, jakie zachodzą podczas aktywacji tych komórek przy rozpoznaniu odpowiedniego antygeny. Należy zaznaczyć, iż pomimo używania ograniczonej puli receptorów TCR, komórki iNKT są znakomicie przystosowane do rozpoznawania szeregu antygenów lipidowych komórek prawidłowych, jak i antygenów bakterii, grzybów, pasożytów [19, 20], a także komórek nowotworowych [21]. O bardzo dużym potencjale terapeutycznym komórek iNKT świadczy fakt, iż wszystkie ludzkie iNKT współdzielą niezmienny receptor TCR i odpowiadają na podobne kompleksy antygen/CD1d, dlatego stale prowadzone są badania nad α -GalCer i innymi ligandami [22]. Na przestrzeni ostatnich lat zidentyfikowano kilka naturalnych antygenów endogennych, wskazując na ich zaangażowanie w proces dojrzewania komórek iNKT oraz ich autoreaktywność. Temat ten został szeroko zaprezentowany w pracy poglądowej autorstwa Anderson i wsp. [20]. Udowodniono, że stymulacja receptorów TCR komórek iNKT za pomocą szeroko stosowanego w warunkach laboratoryjnych syntetycznego ligandu α -GalCer, prowadzi do gwałtownego uwolnienia dużych ilości cytokin, typowych dla limfocytów Th1, Th2 oraz Th17. Dotychczas potwierdzono, że komórki iNKT potrafią syntezować IL-2, IL-4, IFN- γ , IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, TNF, TGF β , a także liczne chemokiny i czynniki wzrostu, np. czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF) [11]. Ponadto, komórki iNKT mogą być efektywnie stymulowane w wyniku pośredniego wpływu cytokin produkowanych przez aktywowane komórki prezentujące antygeny (*antigen presenting cells*, APC) [23, 24]. Same będąc źródłem tak licznie uwalnianych cytokin, mogą wywierać istotny wpływ na komórki układu odpornościowego oraz kształt odpowiedzi immunologicznej. Postuluje się ich udział w wielu schorzeniach przewlekłych oraz ostrych stanach zapalnych, m.in. w chorobach zakaźnych, nowotworach oraz autoimmunizacji [25, 26].

Zdolność jednej populacji komórek do produkcji tak różnorodnych cytokin zależy od wielu czynników. Decydujące znaczenie dla zmiany profilu cytokinowego ma przede wszystkim jakość sygnału płynącego z TCR, np. użycie różnych analogów α -GalCer skutkuje zmianą ilości uwalnianego IFN- γ oraz IL-4 [27, 28]. Istotna jest także natura samej komórki APC prezentującej antygeny komórkom iNKT w kontekście cząsteczki CD1d [28]. Ponadto, obserwacje ostatnich lat wskazują na istnienie niejednorodności w szeregach komórek iNKT. Pobudzenie różnorodnych funkcjonalnie subpopulacji komórek iNKT, będzie skutkowało promowaniem innych efektów ich działania [29]. W oparciu o preferowany rodzaj uwalnianych cytokin oraz typ czynnika transkrypcyjnego ulegającego ekspresji, wśród komórek iNKT wyróżniono subpopulację NKT1, NKT2, NKT17 analogicznie do subpopulacji limfocytów pomocniczych T CD4⁺. Dodatkowo, udowodniono istnienie także komórek NKT_{FH}, analogicznie do T_{FH} oraz NKT10 [30, 31].

2.1. Komórki NKT1

Subpopulacja NKT1 pod wieloma względami przypomina limfocyty Th1. Podobnie jak one, NKT1 wykazują wysoką ekspresję czynnika transkrypcyjnego Tbet, a po pobudzeniu główną produkowaną przez nie cytokiną jest IFN- γ [Rys.1]. Cytokina ta odpowiada za zaangażowanie komórek NKT1 w odpowiedź przeciwwirusową oraz przeciwnowotworową. NKT1 mogą również uwalniać IL-4, jednak w dużo mniejszym stężeniu niż podczas wcześniejszych etapów dojrzewania w grasicy. Badania prowadzone na szczepie myszy C57BL/6 świadczą o tym, że komórki NKT1 stanowią większość komórek iNKT będących na trzecim stopniu dojrzałości CD44⁺ NK1.1⁺. Brak ekspresji czynnika Tbet skutkuje istotną redukcją subpopulacji NKT1 [32]. Na powierzchni NKT1 znajduje się IL-15R α (CD122), a utrata IL-15 także prowadzi do zmniejszenia się liczby NKT1. W obu przypadkach jednocześnie wzrasta częstość występowania i ilość subpopulacji NKT2 i NKT17 [33].

Wykazano, iż istotna dla przeżycia komórek iNKT jest proteina Id2. Udowodniono jej silną ekspresję właśnie w komórkach subpopulacji NKT1 [34]. Białka Id (inhibitor of differentiation/DNA synthesis) należą do podrodziny białek HLH, zawierających domenę Helix-Loop-Helix, dzięki której formują heterodimery z białkami E i uniemożliwiają ich związanie ze specjalnymi miejscami wiążącymi DNA (tzw. E box sites) [35]. W wyniku utraty ekspresji białka Id2, obserwowano obniżenie odsetka subpopulacji NKT1 [34].

Subpopulacja NKT1 zlokalizowana jest głównie w wątrobie. U myszy generalnie identyfikuje się ją jako komórki NK1.1⁺/CD4^{+/+}/CD122^{high}.

2.2. Komórki NKT2

Kolejna subpopulacja komórek, NKT2 również odznacza się unikalnym profilem transkrypcyjnym. Niewątpliwie na uwagę zasługuje czynnik transkrypcyjny PLZF. Kieruje on różnicowaniem tymocytów w komórki będące źródłem IFN- γ , IL-4 oraz IL-17, poprzez promowanie ekspresji różnych genów. Jego ekspresja ulega częściowym zmianom, co odzwierciedla się w kształtowaniu poszczególnych subpopulacji komórek iNKT następująco: NKT17 (PLZF^{int}), NKT1 (PLZF^{low}) oraz w przypadku wczesnych prekursorów iNKT oraz NKT2 (PLZF^{high}) [36]. Zatem w subpopulacji NKT2 utrzymany zostaje podwyższony poziom ekspresji czynnika PLZF [37]. Badania prowadzone na myszach BALB/c posiadających liczne komórki NKT2 dostarczyły dowodów, iż komórki PLZF⁺TBET⁻ nie mogą ulec przekształceniu w NKT1. Uwagę badaczy zwrócił także inny czynnik transkrypcyjny GATA-3, którego kontroli podlega wiele etapów różnicowania konwencjonalnych limfocytów T. GATA-3 kieruje polaryzacją limfocytów w stronę komórek Th2 oraz stanowi bezpośredni czynnik ekspresji genów dla cytokin typu Th2 [38]. Udowodniono, iż czynnik ten reguluje

także powstawanie, przeżycie, aktywację i funkcje efektorowe komórek iNKT. Autorzy wskazują GATA3 jako istotny czynnik dla ostatecznego różnicowania komórek w stronę NKT2 [39]. Podobnie do powyżej omówionej subpopulacji NKT1, w regulacji różnicowania subpopulacji NKT2 istotną rolę odgrywają białka Id. W doświadczeniach prowadzonych na myszach Id3-GFP wykazano, że komórki PLZF⁺NKT2 odznaczają się wysoką ekspresją białka Id3 [34].

Subpopulacja NKT2 produkuje głównie IL-4, chociaż jest również zdolna do uwalniania innych cytokin typu Th2: IL-9, IL-19 oraz IL-13. NKT2 posiadają na swojej powierzchni receptor dla IL-25 (IL-17RB), podobnie jak komórki NKT17. W zwiększonych ilościach są obecne w płucach, gdzie będąc źródłem cytokin typu Th2 przyczyniają się do rozwoju nadreaktywności dróg oddechowych w mechanizmie zależnym od IL-25 [40].

2.3. Komórki NKT17

Kolejną subpopulację komórek iNKT odkryto w 2007 roku. W związku z jej zdolnością do uwalniania IL-17A pod wpływem stymulacji α -GalCer czy podczas infekcji, nazwano je komórkami NKT17 [30]. Ich obecność wykazano zarówno u myszy, jak i u ludzi. Podobnie do konwencjonalnych komórek NKT uwalniających IFN- γ /IL-4, NKT17 również powstają w grasicy i odpowiadają na tetrametry CD1d związane z glikolipidami [30, 41]. Komórki te u myszy wykazują ekspresję czynnika transkrypcyjnego ROR- γ t (retinoid-related orphan receptor γ t). Wyróżnia je również odmiennym fenotyp, gdyż są CCR6⁺/IL-17RB⁺/NK1.1⁻/CD4⁻ [33], chociaż sugeruje się, że tymocyty z których powstają w grasicy przechodzą przez etap CD4⁺.

Przypuszcza się, iż drogi rozwoju komórek iNKT ROR- γ t⁺ oraz konwencjonalnych iNKT w grasicy rozchodzą się na dość wczesnym etapie [42]. Komórki iNKT różnicują się w kierunku NKT17 przy przejściu prekursorów ze stopnia 2 różnicowania się w grasicy [41] [Rys.1]. Na proces ten, oprócz ROR- γ t wpływa wiele czynników wewnętrznych i zewnętrznych.

Niewątpliwie kluczowa rola przypada TGF- β . Kontrola różnicowania prekursorów w stronę NKT17 w wykonaniu TGF- β znacznie różni się od ich wpływu na powstawanie innych iNKT. W przeciwieństwie do konwencjonalnych limfocytów iNKT, aktywacja pod wpływem TGF- β szlaku z udziałem SMAD4 jest kluczowa dla kontroli różnicowania limfocytów ROR γ t⁺ iNKT. Oprócz zapewnienia przeżycia tych komórek, cząsteczka SMAD4 odpowiada za produkcję IL-17 oraz ekspansję tych komórek na obwodzie w odpowiedzi na proces zapalny [43]. Wykazano, iż NKT17 wyróżniają się wysoką ekspresją receptora TGF β RII, a także nasiloną fosforylacją SMAD2/3, białek, które wiążą się ze SMAD4 i jako kompleksy SMAD2/SMAD4 oraz SMAD3/SMAD4 przemieszczają się do jądra komórkowego i wywołują ekspresję

odpowiednich genów [44]. Utrata SMAD4 podczas dojrzewania prowadzi do istotnego obniżenia ilości komórek NKT17 w wyniku nasilenia ich apoptozy [43]. Ponadto, istotną rolę w dojrzewaniu tej subpopulacji komórek pełni także inny powierzchniowy receptor wiążący TGF- β , neuropilina-1 (Nrp-1).

Regulacja dojrzewania komórek NKT17 związana jest również z wpływem innego czynnika transkrypcyjnego – ZBTB7B (tzw. Th-POK lub cKrox). Zaobserwowano, iż utrata ekspresji ZBTB7B wiąże się z utrzymaniem ogólnej liczby komórek iNKT, natomiast wiele z nich wykazuje ekspresję ROR- γ t i wytwarza IL-17A – cechy wyróżniające subpopulację NKT17. Można zatem wywnioskować, iż kierunek rozwoju komórek iNKT jest wrażliwy na obecność ZBTB7B, a powstanie NKT17 zależy od niskiej ekspresji ZBTB7B [45].

Niedawne doniesienia dotyczące roli cząsteczek Id2 oraz Id3 jako regulatorów procesu transkrypcji ukazują, że dla powstawania komórek NKT17 charakterystyczne jest jednoczesne obniżenie ich ekspresji [Rys.1]. Ponieważ cząsteczki te wpływają negatywnie na czynniki regulujące transkrypcję dla białka E, możliwe jest zaangażowanie białka E w promowanie powstawania subpopulacji NKT17 [34].

Dojrzałe komórki NKT17 opuszczają grasicę i wędrują na obwód, lokując się w szczególności w obwodowych węzłach chłonnych, skórze i płucach [30]. Podczas gdy komórki NKT1 w odpowiedzi na zakażenia wirusowe i IL-12 uwalnianą w zakażeniach bakteryjnych produkują IFN- γ , produkcja IL-17 przez komórki NKT17 jest prowokowana IL-1 β oraz IL-23 uwalnianych przy zakażeniach bakteryjnych, np. *Streptococcus pneumoniae*, czy *Staphylococcus aureus* [46]. IL-17 odpowiada za rekrutację neutrofilów i ich migrację do miejsca zakażenia, stąd NKT17 wzmacniają ramię wrodzonej, wczesnej odpowiedzi immunologicznej organizmu [30].

2.4. Komórki NKT10

Niegdyś panował pogląd, iż silna aktywacja komórek iNKT przez receptory TCR rozpoznające odpowiednie ligandy lipidowe, jak np. α -GalCer prowadzi do wprowadzenia tych komórek w stan przypominający anergię, przejawiający się brakiem odpowiedzi iNKT, brakiem ich proliferacji oraz utratą zdolności do produkcji IFN- γ po ponownej stymulacji [47]. Istnienie tzw. „anergicznych” iNKT jest ostatnio podważane. Sag i wsp. [48] wykazali, iż komórki iNKT poddane wcześniej działaniu α -GalCer szybciej się dzielą niż komórki niestymulowane. Nadal posiadają właściwości cytotoksyczne i odpowiadają na ponowną stymulację. Autorzy odkryli, iż komórki te mają właściwości zbliżające je do limfocytów T regulatorowych, odznaczając się ekspresją IL-10. Nazwali je więc komórkami NKT10 [48]. We wcześniejszych doniesieniach naukowych zaznaczano już zdolność komórek iNKT do produkcji tej cytokiny, jednak nie łączono jej z istnieniem odrębnej subpopulacji komórek o określonym fenotypie

i profilu cytokinowym. Komórki NKT10 wykazują ekspresję kilku markerów związanych z limfocytami T regulatorowymi, jak np. CD152 (CTLA4), CD279 (PD1) oraz CD304 (neuropilina). Stymulacja NKT10 odpowiednim antygenem nie prowadzi tak jak w przypadku innych subpopulacji iNKT do uwalniania znacznych ilości cytokin prozapalnych, lecz supresyjnej IL-10. W ten sposób NKT10 osłabiają odpowiedź immunologiczną przeciw nowotworom. Ponadto, hamują rozwój chorób autoimmunologicznych, co wykazano obserwując ich ochronny wpływ na rozwój mysiego modelu stwardnienia rozsianego (*experimental autoimmune encephalomyelitis*, EAE) [49].

Komórki NKT10 u myszy występują w grasicy, śledzionie, natomiast w ilości są obecne w tkance tłuszczowej, gdzie po aktywacji ich liczba sięga nawet 13% komórek iNKT. NKT10 są istotne dla utrzymania środowiska przeciwzapalnego w tkance tłuszczowej; podtrzymują ekspansję limfocytów Treg oraz makrofagów M2 o właściwościach przeciwzapalnych [50]. Występowanie komórek NKT10 potwierdzono również w komórkach PBMC krwi obwodowej u ludzi. Chociaż ich liczba jest niewielka (osiąga 0,5%), wskazuje na naturalną obecność komórek iNKT w warunkach *in vivo* w stanie spoczynku [48].

Proces dojrzewania komórek NKT10 nie został jeszcze dokładnie poznany. Niejasne jest pochodzenie komórek NKT10: czy ta subpopulacja powstaje z prekursorów już w grasicy, czy dopiero w wyniku różnicowania się istniejących subpopulacji NKT1, NKT2 i NKT17 [Rys.1]. Relacja pomiędzy komórkami NKT10 a NKT_{FH} również wymaga głębszego zbadania. Nieznane są także mechanizmy kierujące rozwojem i różnicowaniem komórek NKT10 [48]. Na podstawie badań przeprowadzonych na NKT10 obecnych w tkance tłuszczowej myszy zaobserwowano, że profil tych komórek reguluje ekspresja odpowiednich czynników transkrypcyjnych, obejmujących bardzo niską ekspresję PLZF oraz obecność E4BP4. Komórki te nie wykazują ekspresji czynnika FoxP3, stanowiąc odmienną subpopulację komórek obdarzonych właściwościami regulatorowymi [50].

2.5. Komórki NKT_{FH}

Folikularne limfocyty pomocnicze (T_{FH}) są związane z ośrodkiem rozmnażania grudek limfatycznych. Wykazują ekspresję ICOS, CXCR5, PD-1 oraz czynnika transkrypcyjnego Bcl-6. Zapewniają pomoc limfocytom B poprzez ekspresję ligandu CD40 (CD40L) oraz cytokin: IL-21, IL-4, IL-10 [51]. Jednakże, ostatnie doniesienia wskazują, iż nie jest to jedyna populacja limfocytów zaangażowana w regulację odpowiedzi folikularnych limfocytów B. Otrzymują one dodatkową pomoc ze strony komórek iNKT [52].

Wprawdzie pomocna rola jaką komórki iNKT pełnią w stronę limfocytów B podczas infekcji została zauważona już wcześniej [53], jednak wstępne doniesienia

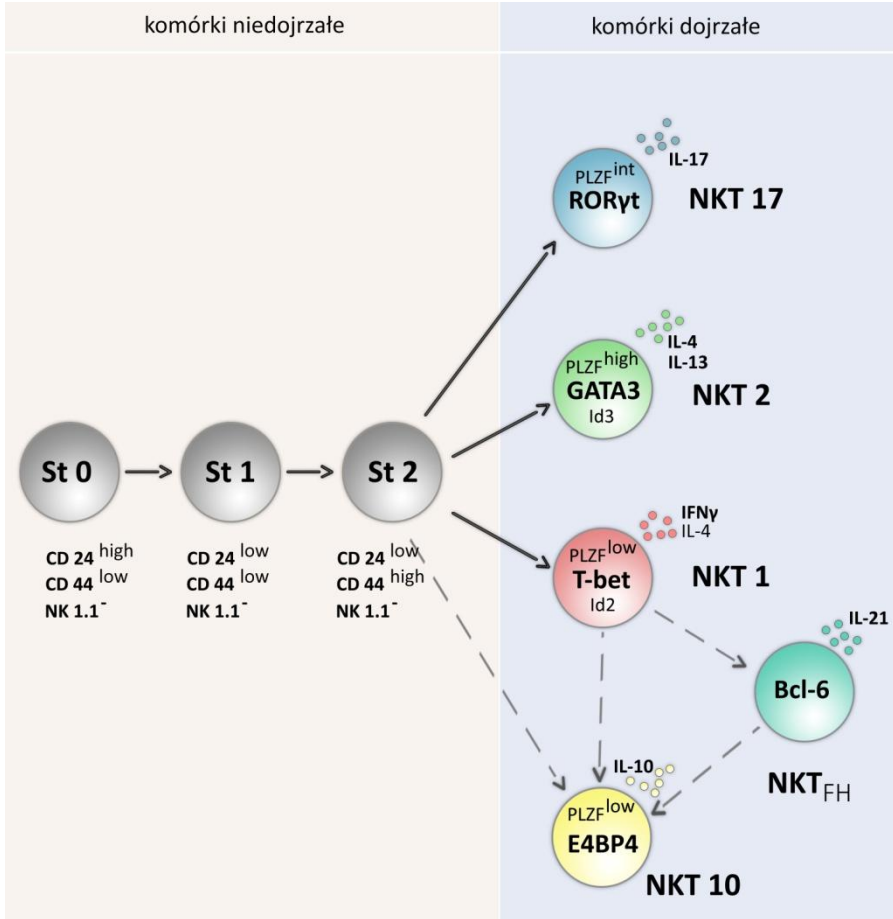
pochodzące z immunizacji myszy α -GalCer wskazują, iż interakcja limfocytów B z limfocytami iNKT prowadzi do wzrostu ekspresji czynnika transkrypcyjnego Bcl6, charakterystycznego dla limfocytów T_{FH} . Dochodzi do indukowania różnicowania się iNKT w unikalną subpopulację NKT_{FH} [54, 55]. Aktywowane komórki iNKT wykazują zwiększoną ekspresję PD-1 oraz CXCR5 (molekuły charakterystyczne dla T_{FH}), jak również produkują IL-21, niezbędną dla efektywnego formowania ośrodków rozmnażania grudek, proliferacji limfocytów B oraz uwalniania przeciwciał [54, 55]. Kwestią sporną jest czy pod wpływem NKT_{FH} limfocyty B różnicują się w komórki pamięci. Doświadczenia Chang i King nie potwierdziły takich właściwości tej subpopulacji. Natomiast w pracy opublikowanej w 2013 roku Bai i wsp. [56] potwierdzają, iż komórki NKT_{FH} nie tylko stanowią pierwszą linię obrony przy infekcji, ale i inicjują powstanie pamięci immunologicznej.

Z uwagi na zaangażowanie komórek NKT_{FH} w kształtowanie odpowiedzi humoralnej, istotne jest określenie okoliczności i mechanizmów prowadzących do wzrostu ilości tych komórek w wyniku odpowiedniej stymulacji antygenem. Zakładano, iż mogą one powstawać jako produkt proliferacji istniejących NKT_{FH} , lub w wyniku różnicowania komórek NKT w NKT_{FH} , ewentualnie obydwoma mechanizmami jednocześnie. Dotychczasowe wyniki sugerują, iż komórki NKT_{FH} stanowią wynik proliferacji i różnicowania się istniejących na obwodzie komórek NKT [57] [Rys.1].

3. Podsumowanie

Komórki iNKT stanowią bardzo zróżnicowaną grupę limfocytów. Odpowiadają na antygeny lipidowe i glikolipidowe oraz pośrednio, poprzez stymulujący wpływ cytokin, uwalniając różnorodne cytokiny w zależności od rodzaju aktywowanej subpopulacji komórek oraz wpływu mikrośrodowiska. Pobudzenie komórek NKT1 czy NKT2 wpływa na ich silne zaangażowanie w kształtowanie odpowiedzi immunologicznej w różnych jednostkach chorobowych, m.in. nowotworach czy autoagresji. Komórki NKT17 zlokalizowane głównie w skórze czy węzłach chłonnych, stanowią szczególnie typ iNKT, m.in. zwalczający różnego rodzaju patogeny. Z kolei odkrycie regulatorowych właściwości komórek iNKT umożliwiły wyodrębnienie subpopulacji NKT10, która uwalnia IL-10 w odpowiedzi na stymulację α -GalCer. Natomiast interakcja pomiędzy limfocytami B a NKT_{FH} okazała się istotna dla zrozumienia kształtowania odpowiedzi humoralnej. Niestety nadal nie rozumiane są losy kierujące powstawaniem subpopulacji NKT10 oraz NKT_{FH} . Niewątpliwie dalsze badania są niezbędne celem wyjaśnienia procesu dojrzewania i różnicowania się poszczególnych subpopulacji komórek iNKT. Zgłębienie wiedzy w tej materii oraz poznanie funkcjonalnych różnic w obrębie komórek iNKT, może pomóc zrozumieć konsekwencje wynikające z prób terapeutycznych z wykorzystaniem komórek iNKT.

Modulowanie ich aktywnością w celu uzyskania pożądanego ich efektywności, może być przydatne w udoskonaleniu szczepionek przeciwnowotworowych, zwalczaniu chorób infekcyjnych czy innych metodach terapeutycznych.



Rysunek 1. Schemat przedstawiający szlak rozwoju subpopulacji komórek iNKT w grasicy [opracowanie własne] na podstawie [22, 36]

Literatura

1. Rhost S., Löfbom L., Rynmark B. M., Pei B., Månsson J. E., Teneberg S., Blomqvist M., Cardell S. L., *Identification of novel glycolipid ligands activating a sulfatide-reactive, CD1d restricted, type II natural killer T lymphocyte*, European Journal of Immunology 42 (2012), s. 2851-2860
2. Gapin L., Godfrey D. I., Rossjohn J., *Natural killer T cell obsession with self-antigens*, Current Opinion in Immunology 25(2013), s.168-173
3. Terabe M., Berzofsky J. A., *The immunoregulatory role of type I and type II NKT cells in cancer and other diseases*, Cancer Immunology Immunotherapy 63(2014), s.199-213
4. Joyce S., *CD1d and natural T cells: how their properties jump-start the immune system*, Cellular and Molecular Life Sciences 58(2001), s. 442-469
5. Lee H., Hong C., Shin J., Oh S., Jung S., Park Y. K., Hong S., Lee G. R., Park S. H. *The presence of CD8+ invariant NKT cells in mice*, Experimental and molecular medicine 41(2009), s. 866-872
6. Bendelac A., Rivera M. N., Park S., Roark J. H., *Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function*, Annual Review of Immunology 15(1997), s. 535-562
7. Godfrey D. I., MacDonald H. R., Kronenberg M., Smyth M. J., Van Kaer L., *NKT cells: what's in a name?*, Nature Reviews Immunology 4(2004), s. 231-237
8. Gadola S. D., Dulphy N., Salio M., Cerundolo V., *Valpha24-JalphaC-independent, Cd1d-restricted recognition of alpha-galactosylceramide by human CD4(+) an CD8alpha(+) T lymphocytes*, Journal of Immunology 168(2002), s. 5514-5520
9. Porcelli S., Brenner M. B., Greenstein J. L., Balk S. P., Terhorst C., Bleicher P. A., *Recognition of cluster of differentiation 1 antigens by human CD4-CD8-cytolytic T lymphocytes*, Nature 341(1989), s. 447-450
10. Godfrey D. I., Kronenberg M., *Going both ways: Immune regulation via CD1d-dependent NKT cells*, The Journal of Clinical Investigation 114 (2004), s. 1379-1388
11. Matsuda J. L., Mallevey T., Scott-Browne J., Gapin L., *CD1d-restricted iNKT cells, the "Swiss-Army knife" of the immune system*, Current Opinion in Immunology 20(2008), s. 358-368
12. Terabe M., Berzofsky J. A., *NKT cells in immunoregulation of tumor immunity: a new immunoregulatory axis*, Trends in Immunology 28(2007), s. 491-496
13. Macho-Fernandez E., Brigl M., *The extended family of CD1d-restricted NKT cells: sifting through a mixed bag of TCRs, antigens, and functions*, Frontiers in Immunology 6(2015), 362
14. Kawano T., Cui J., Koezuka Y., Toura I., Kaneko Y., Motoki K., Ueno H., Nakagawa R., Sato H., Kondo E., Koseki H., Taniguchi M., *CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides*, Science 278(1997), s. 1626-1629
15. Favreau M., Vanderkerken K., Elewaut D., Venken K., Menu E., *Does an NKT-cell-based immunotherapeutic approach have a future in multiple myeloma?*, Oncotarget 7(2016), s. 23128-23140

16. Dellabona P., Padovan E., Casorati G., Brockhaus M., Lanzavecchia A., *An invariant V alpha 24-J alpha Q/V beta 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4-8- T cells*, Journal of Experimental Medicine 180(1994), s.1171-1176
17. Taniguchi M., Koseki H., Tokuhisa T., Masuda K., Sato H., Kondo E., Kawano T., Cui J., Perkes A., Koyasu S., Makino Y., *Essential requirement of an invariant V alpha 14 T cell antigen receptor expression in the development of natural killer T cells*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93(1996), s. 11025-11028
18. Cui J., Shin T., Kawano T., Sato H., Kondo E., Toura I., Kaneko Y., Koseki H., Kanno M., Taniguchi M., *Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors*, Science 278(1997), s.1623-1626
19. Mattner J., Debord K. L., Ismail N., Goff R. D., Cantu C., Zhou D., Saint-Mezard P., Wang V., Gao Y., Yin N., Hoebe K., Schneewind O., Walker D., *Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections*, Nature 434(2005), s.525-529
20. Anderson B. L., Teyton L., Bendelac A., Savage B. P., *Stimulation of Natural Killer T cells by Glycolipids*, Molecules 18(2013), s.15662-15688
21. Fais F., Tenca C., Cimino G., Coletti V., Zanardi S., Bagnara D., Saverino D., Zarcione D., De Rossi G., Ciccone E., Grossi C. E., *CD1d expression on B-precursor acute lymphoblastic leukemia subsets with poor prognosis*, Leukemia 19(2005), s. 551-556
22. Buechel H. M., Stradner M. H., D'Cruz L. M., *Stages versus subsets: Invariant Natural Killer T cell lineage differentiation*, Cytokine. 72(2015), s. 204-209
23. Brigl M., Bry L., Kent S.C., Gumperz J. E., Brenner M. B., *Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection*, Nature Immunology, 4(2003), s.1230-1237
24. Fox L., Hegde S., Gumperz J. E., *Natural killer T cells: innate lymphocytes positioned as a bridge between acute and chronic inflammation?*, Microbes and Infection 12(2010), s. 1125-1133
25. Motohashi S., Nakayama T., *Invariant natural killer T cell-based immunotherapy for cancer*, Immunotherapy 1(2009), s. 73-82
26. Wu L., Van Kaer L., *Natural killer T cells and autoimmune disease*, Current Molecular Medicine 9(2009), s. 4-14
27. Yu K. O., Im J. S., Molano A., Dutronc Y., Illarionov P. A., Forestier C., Fujiwara N., Arias I., Miyake S., Yamamura T., Chang J. T., Besra G. S., Porcelli S. A., *Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by using N-acyl variants of alpha-galactosylceramides*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102(2005), s. 3383-3388
28. Bai L., Constantinides M. G., Thomas S. Y., Reboulet R., Meng F., Koentgen F., Teyton L., Savage P. B., Bendelac A., *Distinct APCs explain the cytokine bias of alpha-galactosylceramide variants in vivo*, Journal of Immunology 188(2012), s. 3053-3061
29. Brennan P. J., Brigl M., Brenner M. B., *Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions*, Nature Reviews Immunology 13(2013), s. 101-117
30. Michel M. L., Keller A. C., Paget C., Fujio M., Trottein F., Savage P. B., Wong C. H., Schneider E., Dy M., Leite-de-Moraes M. C., *Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia*, Journal of Experimental Medicine 204(2007), s. 995-1001

31. Georgiev H., Ravens I., Benarafa C., Förster R., Bernhardt G., *Distinct gene expression patterns correlate with developmental and functional traits of iNKT subsets*, Nature Communications 7(2016), 13116
32. Townsend M. J., Weinmann A. S., Matsuda J. L., Salomon R., Farnham P. J., Biron C. A., Gapin L., Glimcher L. H., *T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Valpha14i NKT cells*, Immunity 20(2004), s. 477-494
33. Watarai H., Sekine-Kondo E., Shigeura T., Motomura Y., Yasuda T., Satoh R., Yoshida H., Kubo M., Kawamoto H., Koseki H., Taniguchi M., *Development and function of invariant natural killer T cells producing T(h)2- and T(h)17-cytokines*, PLoS Biology 10 (2012) : e1001255
34. D'Cruz L. M., Stradner M. H., Yang C. Y., Goldrath A. W., *E and Id proteins influence invariant NKT cell sublineage differentiation and proliferation*, Journal of Immunology, 192(2014) s. 2227-2236
35. Murre C., *Helix-loop-helix proteins and lymphocyte development*, Nature Immunology 6(2005), s. 1079-1086
36. Constantinides M. G., Bendelac A., *Transcriptional regulation of the NKT cell lineage*, Current Opinion in Immunology 25(2013), s. 161-167
37. Lee Y. J., Holzapfel K. L., Zhu J., Jameson S. C., Hogquist K. A., *Steady-state production of IL-4 modulates immunity in mouse strains and is determined by lineage diversity of iNKT cells*, Nature Immunology 14(2013), s. 1146-1154
38. Zheng W., Flavell R. A., *The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells*, Cell 89(1997), s. 587-596
39. Kim P. J., Pai S. Y., Brigl M., Besra G. S., Gumperz J., Ho I. C., *GATA-3 regulates the development and function of invariant NKT cells*, Journal of Immunology 177(2006), s. 6650-6659
40. Terashima A., Watarai H., Inoue S., Sekine E., Nakagawa R., Hase K., Iwamura C., Nakajima H., Nakayama T., Taniguchi M., *A novel subset of mouse NKT cells bearing the IL-17 receptor B responds to IL-25 and contributes to airway hyperreactivity*, Journal of Experimental Medicine 205(2008), s.2727-2733
41. Michel M. L., Mendes-da-Cruz D., Keller A. C., Lochnerb M., Schneidera E., Dya M., Eberlb G., Leite-de-Moraesa M. C., *Critical role of ROR-gammat in a new thymic pathway leading to IL-17-producing invariant NKT cell differentiation*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105(2008), s. 19845-19850
42. Egawa T., Eberl G., Taniuchi I., Benlagha K., Geissmann F., Hennighausen L., Bendelac A., Littman D. R., *Genetic evidence supporting selection of the Valpha14i NKT cell lineage from double-positive thymocyte precursors*, Immunity 22(2005), s. 705-716
43. Havenar-Daughton C., Li S., Benlagha K., Marie J. C., *Development and function of murine ROR γ t+ iNKT cells are under TGF- β signaling control*, Blood 119(2012), s. 3486-3494
44. Derynck R., Zhang Y.E., *Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling*, Nature 425(2003), s. 577-584
45. Enders A., Stankovic S., Teh C., Uldrich A. P., Yabas M., Juelich T., Altin J. A., Frankenreiter S., Bergmann H., Roots C. M., Kyparissoudis K., Goodnow C. C., *Godfrey D.I. ZBTB7B (Th-POK) regulates the development of IL-17-producing CD1d-restricted mouse NKT cells*, Journal of Immunology 189(2012), s. 5240-5249

46. Kinjo Y., Illarionov P., Vela J. L., Pei B., Girardi E., Li X., Li Y., Imamura M., Kaneko Y., Okawara A., Miyazaki Y., Gómez-Velasco A., Rogers P., Dahesh S., Uchiyama S., Khurana A., Kawahara K., Yesilkaya H., Andrew P.W., Wong C. H., Kawakami K., Nizet V., Besra G. S., Tsuji M., Zajonc D. M., Kronenberg M., *Invariant natural killer T cells recognize glycolipids from pathogenic Gram-positive bacteria*, *Nature Immunology* 12(2011), s. 966-974
47. Parekh V. V., Wilson M. T., Olivares-Villagómez D., Singh A. K., Wu L., Wang C. R., Joyce S., Van Kaer L., *Glycolipid antigen induces long-term natural killer T cell anergy in mice*, *Journal of Clinical Investigation* 115(2005), s. 2572-2583
48. Sag D., Krause P., Hedrick C. C., Kronenberg M., Wingender G., *IL-10-producing NKT10 cells are a distinct regulatory invariant NKT cell subset*, *Journal of Clinical Investigation* 124(2014), s. 3725-3740
49. Singh A. K., Wilson M. T., Hong S., Olivares-Villagómez D., Du C., Stanic A. K., Joyce S., Sriram S., Koezuka Y., Van Kaer L., *Natural killer T cell activation protects mice against experimental autoimmune encephalomyelitis*, *Journal of Experimental Medicine* 194(2001), s.1801-1811
50. Lynch L., Michelet X., Zhang S., Brennan P. J., Moseman A., Lester C., Besra G., Vomhof-Dekrey E. E., Tighe M., Koay H. F., Godfrey D. I., Leadbetter E. A., Sant'Angelo D. B., von Andrian U., Brenner M. B., *Regulatory iNKT cells lack expression of the transcription factor PLZF and control the homeostasis of T(reg) cells and macrophages in adipose tissue*, *Nature Immunology* 16(2015), s.85-95
51. Kitano M., Moriyama S., Ando Y., Hikida M., Mori Y., Kurosaki T., Okada T., *Bcl6 protein expression shapes pre-germinal center B cell dynamics and follicular helper T cell heterogeneity*, *Immunity* 34(2011), s. 961-972
52. Cerutti A., Puga I., Cols M., *New helping friends for B cells*, *European Journal of Immunology* 42(2012), s.1956-1968
53. Leadbetter E. A., Brigl M., Illarionov P., Cohen N., Luteran M. C., Pillai S., Besra G. S., Brenner M. B., *NKT cells provide lipid antigen-specific cognate help for B cells*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(2008), s. 8339-8344
54. Chang P. P., Barral P., Fitch J., Pratama A., Ma C. S., Kallies A., Hogan J. J., Cerundolo V., Tangye S. G., Bittman R., Nutt S. L., Brink R., Godfrey D. I., Batista F. D., Vinuesa C. G., *Identification of Bcl-6-dependent follicular helper NKT cells that provide cognate help for B cell responses*, *Nature Immunology* 13(2012), s. 35-43
55. King I. L., Fortier A., Tighe M., Dibble J., Watts G. F., Veerapen N., Leadbetter E. A., *Invariant natural killer T cells direct B cell responses to cognate lipid antigen in an IL-21-dependent manner*, *Nature Immunology* 3(2012), s. 44-50
56. Bai L., Deng S., Reboulet R., Mathew R., Teyton L., Savage P. B., Bendelac A., *Natural killer T (NKT)-B-cell interactions promote prolonged antibody responses and long-term memory to pneumococcal capsular polysaccharides*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(2013), s. 16097-16102
57. Rampuria P., Lang M. L., *CD1d-dependent expansion of NKT follicular helper cells in vivo and in vitro is a product of cellular proliferation and differentiation*, *International Immunology* 27(2015), s. 253-263

Nowe spojrzenie na biologię komórek iNKT – funkcjonalne różnice pomiędzy subpopulacjami

Komórki iNKT stanowią populację limfocytów rozwijającą się w grasicy. Dzięki umiejętności uwalniania dużych ilości cytokin, potrafią one kierować rozwojem odpowiedzi swoistej. Niedawno opisano istnienie nowych subpopulacji komórek iNKT o wyraźnie zarysowanych funkcjonalnych różnicach w związku z produkowanymi cytokinami. Według nowego modelu wyróżniamy komórki NKT1, NKT2 i NKT17, które w zakresie wydzielanych cytokin przypominają konwencjonalne limfocyty $CD4^+$ – Th1, Th2 i Th17. Wiele z nich zyskuje wyspecjalizowane właściwości efektorowe dopiero na obwodzie, a nie w grasicy jak w przypadku limfocytów T. Dowiedziono również istnienia subpopulacji limfocytów NKT10 oraz NKT_{FH} . W niniejszej pracy autorzy pragną przedstawić najnowsze doniesienia dotyczące zróżnicowania populacji komórek iNKT. Odkrycie istnienia funkcjonalnych różnic pomiędzy poszczególnymi subpopulacjami komórek iNKT rzuca nowe spojrzenie na biologię komórek iNKT. Prowokuje także działania w celu bardziej wnikliwego przyjrzenia się tej niewielkiej liczebnie populacji komórek, o jakże wielkim wpływie na odpowiedź immunologiczną.

Słowa kluczowe: Komórki iNKT, cytokiny, NKT1, NKT2, NKT17

New insight into the biology of iNKT cells – functional differences between subpopulations

iNKT cells comprise a population of T lymphocytes developing in the thymus. They can influence adaptive immune response by producing vast amounts of cytokines. Recently, new subsets of iNKT cells with distinctive functional differences regarding cytokine production have been described. A new model proposes the existence of NKT1, NKT2 and NKT17 that resemble the conventional T $CD4^+$ lymphocytes Th1, Th2, and Th17 in the cytokines they release. A number of them gain specialized effector properties already during thymic development, unlike T lymphocytes on the periphery. The existence of another iNKT subpopulations: NKT10 oraz NKT_{FH} has also been proven. In this paper, the authors would like to present the newest reports concerning the diversity of iNKT-cell population. The discovery of functional differences between various subpopulations of iNKT shed more light on the biology of iNKT cells. It also provokes the actions to scope more carefully this very small population of cells, but still with a very important impact on immune responses.

Keywords: iNKT cells, cytokines, NKT1, NKT2, NKT17

Zróznicowanie fenotypowe i funkcjonalne monocytów u chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową

1. Wprowadzenie

Monocyty to populacja jednojądrzastych leukocytów wywodząca się z multipotencjalnej hematopoetycznej komórki macierzystej szpiku kostnego, która pod wpływem odpowiednich czynników wzrostu np. GM-CSF, M-CSF oraz cytokin różnicuje się do postaci promonocytu. Ten podczas kolejnych etapów dojrzewania osiąga formę dojrzałego monocytu zdolnego do opuszczenia bariery krew-szypik i pełnienia swych funkcji w łożysku naczyniowym [1]. U zdrowego człowieka w warunkach fizjologicznych monocyty stanowią od 3% do 8% odsetka wszystkich krwinek białych (ang. *white blood cells*; WBC) krążących we krwi obwodowej. Ta populacja komórek już po kilku, kilkudziesięciu godzinach krążenia w naczyniach krwionośnych dociera do tkanek, gdzie może ulec przekształceniu w makrofagi, bądź komórki dendrytyczne pochodzenia mieloidalnego (mDC) [2]. Monocyty znajdujące się we krwi obwodowej odgrywają istotną rolę w wielu mechanizmach zarówno nieswoistej, jak i swoistej odpowiedzi immunologicznej m.in. wraz z komórkami dendrytycznymi i makrofagami uczestniczą w procesie prezentacji antygeny dzie wiczym limfocytom T, aby doprowadzić do ich aktywacji i proliferacji. Ponadto wykazują zdolności zarówno do fagocytozy jak również do zabijania wewnątrzkomórkowego [3]. Na przełomie ostatnich lat niewiele doniesień naukowych jednoznacznie opisuje funkcję monocytów w mechanizmach sprzyjających zahamowaniu bądź warunkujących rozwój nowotworu u osób ze zdiagnozowaną przewlekłą białaczką limfocytową (PBL). Przypuszcza się, że ta populacja komórek u osób chorych na PBL posiada zróżnicowane zdolności czynnościowe, które są uwarunkowane niejednorodną ekspresją antygenów powierzchniowych CD14 (receptor dla LPS,

¹ wioleta.kowalska91@gmail.com, Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej, II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

² malgorzatawaldowska@gmail.com, Katedra i Zakład immunologii Klinicznej, II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

³ michal.zarobkiewicz@gmail.com, Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej, II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁴ magdalena.paziewska193@gmail.com, Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej, II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

LPS-R) oraz CD16 (receptor dla fragmentu Fc immunoglobuliny klasy IgG, Fc γ RIII) [4, 5]. Na podstawie licznych badań zwrócono szczególną uwagę na zwiększoną bezwzględną liczbę monocytów (ang. *absolute monocyte count*; AMC) u tych chorych oraz określono, że w przypadku nowotworów limfoproliferacyjnych podwyższona monocytotyzacja może zostać uznana za istotny czynnik rokowniczy [6]. Aczkolwiek jedynie dokładne zróżnicowanie immunofenotypu tych komórek oraz prawidłowa ocena czynnościowa poszczególnych subpopulacji może pozwolić poznać i zrozumieć znaczenie monocytów w mikrośrodowisku komórki nowotworowej.

2. Wpływ monocytów na mikrośrodowisko komórki PBL

Monocyty są to komórki, które wykazują złożony efekt plejotropowy wobec pozostałych składowych odpowiedzi nieswoistej oraz swoistej organizmu. Poznanie mechanizmów warunkujących oddziaływanie monocytów z innymi elementami odpowiedzi immunologicznej, tudzież komórkami zmienionymi nowotworowo stanowi podłoże do zrozumienia i poznania znaczenia tych komórek w patogenezie m.in. PBL.

Uważa się, że wpływ monocytów na wydłużenie czasu przeżycia limfocyty PBL w warunkach *in vivo* nadal nie jest dokładnie wyjaśniony. Dane z literatury donoszą, że wywodzące się z monocytów komórki opiekuńcze (ang. *nurse-like cells*; NLC) poprzez interakcję za pośrednictwem receptora CXCR4 z komórkami białaczkowymi hamują indukcję procesu apoptozy wśród zmienionych nowotworowo limfocytów B [7]. Poza tym wiele doniesień podkreśla, że monocyty są źródłem licznych czynników wpływających na przeżycie limfocyty białaczkowego. Monocyty ze względu na zwiększoną ekspresję cytokin o właściwościach immunosupresyjnych np. IL-10, TGF- β oraz zmniejszoną syntezę cytokin prozapalnych np. IL-12, IFN- γ biorą udział w zahamowaniu odpowiedzi przeciwnowotworowej.

Pomiędzy komórkami PBL a monocytami zaobserwowano interakcję, w wyniku której następuje uwalnianie przez stymulowane monocyty rozpuszczalnej formy cząsteczki CD14 (ang. *soluble CD14*; sCD14) [8]. Udowodniono, że rozpuszczalna forma receptora dla LPS łączy się z cząsteczką CD180 znajdującą się na komórkach prezentujących antygen (APC), w tym również na białaczkowych limfocytach B (posiadających dodatkowo na swojej powierzchni antygen CD5 oraz łańcuchy lekkie λ lub κ) [9, 10]. Cząsteczka CD180 zaliczana jest do rodziny receptorów Toll-podobnych, a w wyniku jej połączenia z CD14 bądź sCD14 dochodzi do zahamowania procesu apoptozy komórek białaczkowych w PBL [11]. Oprócz tego zauważono, że monocyty które zostały zaktywowane przez limfocyty PBL wykazują większą zdolność do uwalniania chemokiny CCL2 [12] indukującej różnicowanie krążących we krwi monocytów w makrofagi związane z nowotworem TAM (ang. *Tumor Associated Macrophages*; TAM) [13]. Zarówno monocyty jak i uwalniania przez nie

chemokina CCL2 odgrywają istotną rolę w mikrośrodkowisku PBL, w szczególności ze względu na brak ekspresji tej chemokiny przez komórki białaczkowe [12, 14]. Schemat interakcji pomiędzy monocytami, a limfocytami PBL przedstawia Rysunek 1.

3. Subpopulacje monocytów

Najnowsze badania donoszą, że populacja monocytów krążących we krwi obwodowej nie stanowi puli komórek o jednolitym immunofenotypie. Różnice w obrębie ekspresji antygenów powierzchniowych tj. CD14 oraz CD16 stały się głównym aspektem decydującym o utworzeniu nowej nomenklatury opisującej zróźnicowanie pod względem fenotypowym wszystkich monocytów [5].

Prace nad określeniem nowej nomenklatury różnicującej populacje monocytów trwały już od 2008r. wówczas eksperci z *The International Union of Immunological Societies* (IUIS) wraz z innymi naukowcami należącymi do organizacji międzynarodowych, wnikliwie debatowali nad utworzeniem prawidłowego nazewnictwa poszczególnych subpopulacji tych agranulocytów uwarunkowanego zróźnicowanym stopniem ekspresji antygenów powierzchniowych CD14 oraz CD16 [5]. Warto podkreślić, że zdolność tych komórek do niejednorodnej ekspresji CD14 oraz receptora CD16 przyczyniła się do rozpoczęcia kolejnych badań pozwalających scharakteryzować możliwości funkcjonalne każdej z wyodrębnionych subpopulacji monocytów, co również miało duży wpływ na ugrupowanie tych komórek w trzy główne subpopulacje [5, 15].

Obowiązująca nomenklatura oparta na podstawie różnic fenotypowych i czynnościowych monocytów wyróżnia następujące podklasy:

- monocyty charakteryzujące się wysoką ekspresją cząsteczki CD14 przy jednoczesnym braku ekspresji receptora CD16 ($CD14^{++}CD16^{-}$) nazwano monocytami klasycznymi;
- kolejna subpopulacja odznacza się niską ekspresją cząsteczki CD16 oraz wysoką ekspresją CD14 ($CD14^{++}CD16^{+}$), a określono ją jako subpopulację pośrednią;
- z kolei monocyty posiadające wysoką ekspresję cząsteczki CD16, lecz obniżoną ekspresją CD14 otrzymała nazwę monocytów nieklasycznych ($CD14^{+}CD16^{++}$).

Subpopulację monocytów zróźnicowane ze względu na stopień ekspresji CD14 i CD16 przedstawiono na Rysunku 2.

Monocyty określane jako klasyczne stanowią największą subpopulację monocytów krążących w łożysku naczyniowym zdrowego człowieka. Uważa się, że ta subpopulacja komórek wyróżniająca się wysoką ekspresją cząsteczki CD14, aczkolwiek pozbawiona ekspresji receptora dla fragmentu Fc dla immunoglobulin klasy IgG stanowi nawet 90-95% [16].

Pozostały odsetek monocytów tworzą subpopulacje wykazujące na swojej powierzchni ekspresję receptora CD16 i do tych komórek zaliczono monocyty pośrednie ($CD14^{++}CD16^{+}$) oraz nieklasyczne ($CD14^{+}CD16^{++}$) [17].

Warto podkreślić, że podczas choroby nowotworowej bądź rozwijającego się procesu zapalnego dochodzi do dysproporcji pomiędzy odsetkiem monocytów klasycznych pozbawionych ekspresji CD16, a krążących monocytów CD16-pozytywnych. Przykładem jednostki chorobowej, w której zauważono istotny wzrost odsetka monocytów nieklasycznych w porównaniu z grupą kontrolną jest przewlekła białaczka limfocytowa [18]. Aczkolwiek podobny rozkład odsetkowy w obrębie poszczególnych subpopulacji monocytów zauważono również w innych chorobach, np. w sepsie, gruźlicy, astmie [19], czy chorobach o podłożu pasożytniczym, bądź wirusowym [20].

Badania ostatnich lat nie opisują w jednoznaczny sposób roli monocytów CD16-pozytywnych w generowaniu mechanizmów odpowiedzi immunologicznej. Przypuszcza się, że są to komórki, które pomimo tego, że stanowią niewielki odsetek monocytów w naszym organizmie wywierają znaczący wpływ na szereg procesów modyfikujących odpowiedź immunologiczną m.in. za pośrednictwem uwalnianych cytokin, bądź interakcji z APC. Wielu badaczy zaobserwowało, że w obrębie wszystkich subpopulacji monocytów występują różnice dotyczące m.in. stopnia ekspresji cząsteczki HLA-DR, CD86, CD1d, co pozwala określić zdolność tych komórek do prezentacji antygenów i kostymulacji dziewiczych limfocytów T.

Ponadto zauważono, że wpływ monocytów na rozwój odpowiedzi przeciw- bądź pro-nowotworowej jest związany z profilem uwalnianych cytokin oraz chemokin. Na podstawie obecnie dostępnych doniesień stwierdzono, że subpopulacja monocytów $CD14^{++}CD16^{+}$ (monocyty pośrednie) posiada właściwości przeciwzapalne, a stymulacja tej grupy komórek przez lipopolisacharyd (LPS) sprawia, że pobudzone monocyty pośrednie wydzielają w przeważającej ilości interleukinę 10 (IL-10) [21]. Ponadto, doniesienia naukowe opisujące subpopulacje monocytów pośrednich wskazują również, że komórki te posiadają zwiększoną zdolność do wewnątrzkomórkowej ekspresji TGF- β . Cytokina ta hamuje odpowiedź T-komórkową oraz stymuluje powstawanie limfocytów T regulatorowych (Treg). Oprócz tego, subpopulacja ta wyróżnia się znaczną ekspresją cząsteczki CD163, hamującej proliferację oraz aktywację limfocytów T. Dodatkowo, warto podkreślić, że receptor CD163 jest markerem typowym dla monocytów/makrofagów posiadających silne właściwości przeciwzapalne [22] co ewidentnie potwierdza zdolności immunosupresyjne i pro-nowotworowe tej grupy komórek [23].

Poza tym, uważa się, że monocyty pośrednie posiadają zdolności proangiogenne co powoduje, że komórki te nie tylko działają immunosupresyjnie, ale również wspomagają rozwój nowotworu, zwiększając przeżycie komórki nowotworowej.

W odróżnieniu od monocytów CD16-pozytywnych posiadających wysoką ekspresję cząsteczki CD14, monocyty nieklasyczne ($CD14^{+}CD16^{++}$) wykazują przede wszystkim aktywność prozapalną, wydzielając głównie cytokiny tj. TNF, IL-1 β , IL-12, stąd ich aktywacja przez LPS sprawia, że aktywują odpowiedź immunologiczną typu

komórkowego [24]. Zaobserwowano, że monocyty nieklasyczne odgrywają istotną rolę w procesach uruchomienia mechanizmów cytotoksycznych komórek NK, co ma swoje odzwierciedlenie w generowaniu odpowiedzi przeciwnowotworowej.

Gustafson i wsp. [25] zauważyli, że u osób chorych na PBL wśród monocytów obserwuje się zwiększony odsetek komórek z brakiem lub niską ekspresją HLA-DR (HLA-DR^{low}) w porównaniu z grupą kontrolną. Monocyty o fenotypie CD14+HLA-DR^{low/neg} wykazują zdolność do wydzielania znacznych ilości IL-10 i TGF- β , pobudzając proliferację limfocytów Treg [26] co sprawia, że stanowią one subpopulację komórek wykazujących właściwości sprzyjające zahamowaniu odpowiedzi przeciwnowotworowej [27].

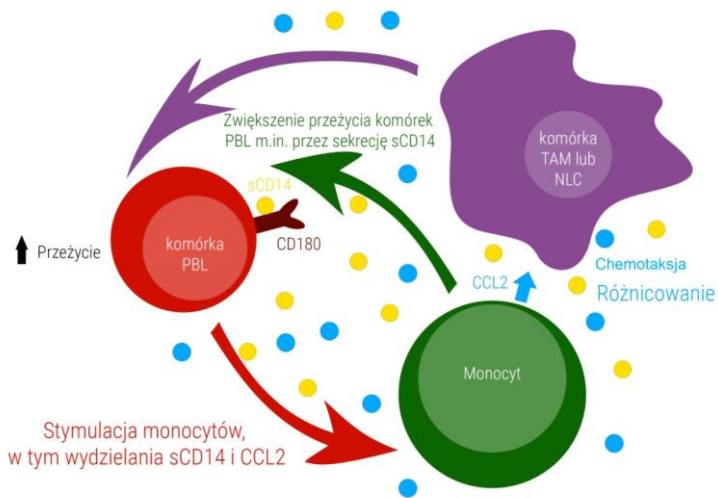
Warto również zauważyć, iż rozważa się czy poszczególne subpopulacje monocytów krążące we krwi obwodowej nie stanowią kolejnych etapów dojrzewania tych komórek w kierunku makrofagów. Na przykład zaobserwowano, że monocyty posiadające znaczącą ekspresję cząsteczki CD16 stanowią pulę dojrzałych monocytów, które po opuszczeniu łożyska naczyniowego docierają do tkanek zajętych nowotworem przekształcając się w specyficzną grupę makrofagów związanych z nowotworem TAM [28].

Niezbędne są dalsze badania naukowe nad subpopulacjami monocytów u chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową w celu lepszego zrozumienia roli tych komórek w patogenezie tej jednostki chorobowej. Na podstawie dotychczasowych wyników badań można wysunąć wnioski, że podwyższony odsetek monocytów CD16 pozytywnych może świadczyć o aktywności choroby oraz stopniu rozwoju odpowiedzi przeciw – bądź pro-nowotworowej.

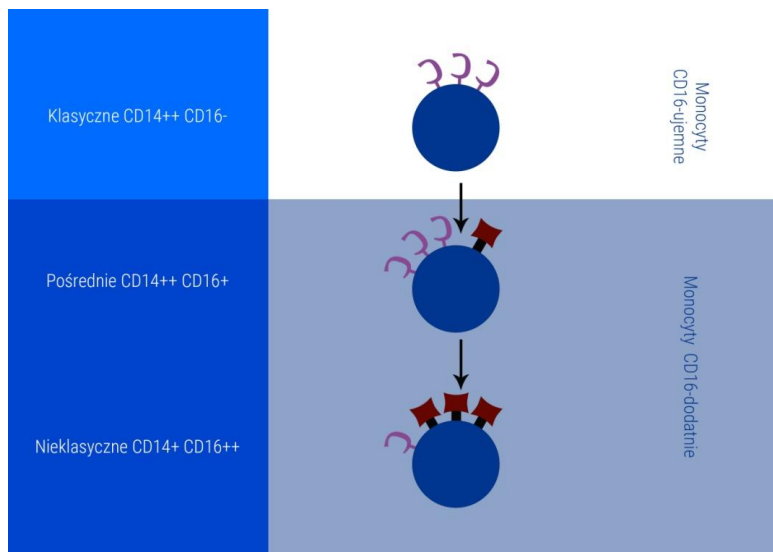
4. Podsumowanie

Monocyty u osób chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową (PBL) wykazują zróźnicowanie zarówno fenotypowe, jak również funkcjonalne. Zróźnicowanie fenotypowe i funkcjonalne monocytów sugeruje, że ta grupa komórek, może mieć istotny wpływ na mikrośrodowisko komórki nowotworowej oraz uczestniczy w kształtowaniu się odpowiedzi przeciw- lub pro-nowotworowej. Dalsze prace pozwolą dokładnie określić rolę tych komórek w patogenezie PBL. Niemniej jednak, to monocyty pośrednie (CD14⁺CD16⁺) wykazują wysoką ekspresję receptora 163 oraz posiadają zdolność do wydzielania znacznych ilości IL-10, co pozwala wywnioskować, że ta subpopulacja monocytów wykazuje właściwości immunosupresyjne hamując odpowiedź przeciwnowotworową. Z kolei monocyty nieklasyczne CD14⁺CD16⁺⁺ stanowią największy odsetek komórek pozbawionych ekspresji cząsteczki HLA-DR. Poza tym, wydzielają one przede wszystkim cytokiny prozapalne (IL-12, IL-1 β), co sprzyja rozwojowi procesów odpowiedzialnych za kształtowanie się odpowiedzi przeciwnowotworowej. Reasumując, monocyty u osób chorych na PBL wykazują duże zróźnicowanie zarówno fenotypowe, jak i funkcjonalne.

5. Rysunki



Rysunek 1. Schemat interakcji występujących pomiędzy komórkami PBL a monocytami. Opracowano na podstawie [12, 14]. Monocyty uwalniając do krwi obwodowej sCD14 oraz chemokiny, np. CCL2 mogą zwiększyć przeżywalność komórek PBL [12, 14]



Rysunek 2. Nazewnictwo subpopulacji monocytów obwodowych. Opracowanie własne na podstawie [5]

Podziękowania

Autorzy pracy pragną złożyć serdeczne podziękowania dla dr hab. n. med. Agnieszki Bojarskiej-Junak za poświęcenie czasu i korektę naszej pracy.

Literatura

1. Sawicki W., *Histologia*, Warszawa, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, (2009), s. 203
2. Skrzeczyńska-Moncznik J., Bzowska M., Loseke S., et al., *Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10*, Scandinavian Journal of Immunology 67 (2008), s.152-159
3. Ab Kadir, R., Zainal Ariffin S. H., Megat Abdul Wahab R. i wsp., *Characterization of mononucleated human peripheral blood cells.*, The Scientific World Journal. (2012), s. 1-8
4. Italiani, P., Boraschi, D., *From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation*, Frontiers in Immunology 5 (2014), s. 1-22
5. Ziegler-Heitbrock L., Ancuta P., Crowe S. i wsp., *Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood*, Blood. 116.16 (2010), s. 74-80
6. Herishanu Y, Kay S., Sarid N. i wsp., *Absolute monocyte count trichotomizes chronic lymphocytic leukemia into high risk patients with immune dysregulation, disease progression and poor survival*, Leukemia Research. 37.10, (2013), s. 1222-1228
7. Burger J. A., Tsukada N., Burger M i wsp., *Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1.*, Blood 96, (2000), s. 2655-2663
8. Seiffert, M., Schulz, A., Ohl, S. i wsp., *Soluble CD14 is a novel monocyte-derived survival factor for chronic lymphocytic leukemia cells, which is induced by CLL cells in vitro and present at abnormally high levels in vivo.*, Blood. 116.20, (2010), s. 4223-4230
9. Robak T., *Czynniki prognostyczne w przewlekłej białaczkę limfatycznej*, Acta Haematologica Polonica 34, (2003), s. 395-405
10. Ciesla B., *Hematology in practice*, Davis F. A, Company., (2007), s. 205-207
11. Porakishvili N., Memon A., Vispute K., *CD180 functions in activation, survival and cycling of B chronic lymphocytic leukaemia cells*, British Journal of Haematology 153.4 (2011), s. 486-498
12. Schulz A., Toedt G., Zenz T. i wsp., *Inflammatory cytokines and signaling pathways are associated with survival of primary chronic lymphocytic leukemia cells in vitro: a dominant role of CCL2.*, Haematologica. 2010.031377, (2010), s 408-416
13. Roca H., Varsos ZS., Sud S., i wsp. *CCL2 and interleukin-6 promote survival of human CD11b1 peripheral blood mononuclear cells and induce M2-type macrophage polarization*, The Journal of Biological Chemistry 284, 49, (2009), s. 34342-34354
14. Schulz A., Dürr C., Zenz T., Döhner H., i wsp., *Lenalidomide reduces survival of chronic lymphocytic leukemia cells in primary cocultures by altering the myeloid microenvironment*, Blood 121.13, (2013), s. 2503-2511
15. Mandl M., Schmitz S., Weber C., Hristov M., *Characterization of the CD14⁺⁺CD16⁺ Monocyte Population in Human Bone Marrow*, Plos One (2014). s. 1-9

16. Lee H. W., Choi H. J., Ha S. J., et al., *Recruitment of monocytes/macrophages in different tumor microenvironments*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1835 (2013), s. 170-179
17. Strauss-Ayali D., Conrad S. M., and Mosser D. M., *Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection*, *Journal of Leukocyte Biology* 82 (2007), s. 244-252
18. Liu Y. C., Zou X. B., Chai Y. F., Yao Y. M., *Macrophage Polarization in Inflammatory Diseases*, *International Journal of Biological Sciences*, 2014, s. 520-529
19. Łapuć I., Eljaszewicz A., Kłoczko J., Moniuszko M., *Rola monocytów w patogenezie przewlekłej białaczki limfocytowej*, *Acta Haematologica Polonica* 45 (2014), s. 340-346
20. Semnani R. T., Moore V., Bennuru S., i wsp., *Human Monocyte Subsets at Homeostasis and Their Perturbation in Numbers and Function in Filarial Infection*, *Infection and Immunity* 82.11, (2014), s. 4438-4446
21. Moniuszko M., Bodzenta-Lukaszyk A., Kowal K., i wsp., *Enhanced frequencies of CD14⁺CD16⁺, but not CD14⁺CD16⁺, peripheral blood monocytes in severe asthmatic patients*, *Clinical Immunology* 130 (2009), s. 338-346
22. Jedynek M., Bobik P., Siemiątkowski A., *Rola wybranych cytokin i protein, badanych w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych, w uszkodzeniu płuc*, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 68, (2014), s. 728-737
23. Högger P., Sorg C., *Soluble CD163 inhibits phorbol ester-induced lymphocyte proliferation*, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 288, (2001), s. 841-843
24. Moniuszko M., Liyanage N. P., Doster M. N., et al., *Glucocorticoid treatment at moderate doses of SIVmac251-infected Rhesus macaques decreases the frequency of circulating CD14⁺CD16⁺⁺ monocytes but does not alter the tissue virus reservoir.*, *AIDS Research and Human Retroviruses* (2014), s. 115-126
25. Gribben J. G., *How I treat CLL up front*, *Blood*. 115 (2010), s. 187-197
26. Gustafson M. P., Abraham R. S., Lin. Y. i wsp., *Association of an increased frequency of CD14⁺HLA-DR^{low/neg} monocytes with decreased time to progression in chronic lymphocytic leukemia*, *British Journal of Haematology* (2012), s. 1-5
27. Mazumdar R., Evans P., Culpin R., Bailey J., Allsup D., *The automated monocyte count is independently predictive of overall survival from diagnosis in chronic lymphocytic leukaemia and of survival following first-line chemotherapy*, *Leukemia Research* 37.6, (2013), s. 614-618
28. Maffei R., Bulgarelli J., Fiorcari S. i wsp., *The monocytic population in chronic lymphocytic leukemia shows altered composition and deregulation of genes involved in phagocytosis and inflammation*, *Haematologica* (2013), s. 1115-1123

Zróźnicowanie fenotypowe i funkcjonalne monocytów u chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową

Monocyty stanowią istotny element odpowiedzi immunologicznej oraz wykazują szerokie zróźnicowanie zarówno pod względem fenotypowym, jak również funkcjonalnym. Dotychczas znaczenie monocytów w chorobach nowotworowych nie zostało jednoznacznie określone. Badania ostatnich lat donoszą, iż monocyty, będące komórkami mikrośrodowiska limfocytu białaczkowego doprowadzają do wydłużenia czasu przeżycia komórki nowotworowej. Warto zwrócić szczególną uwagę, iż jednym z mechanizmów umożliwiających zahamowanie procesu apoptozy w komórce PBL jest zdolność swoistego połączenia się cząsteczki CD180 zlokalizowanej na limfocytach białaczkowych z antygenem CD14, bądź jego rozpuszczalną formą sCD14. Uważa się, że taka interakcja oraz szereg innych oddziaływań doprowadza do uwalniania czynników zarówno pro- jak i przeciwnowotworowych. Ze względu na ekspresję antygenów powierzchniowych CD14 (LPS) i CD16 (FcγRIII) sklasyfikowano trzy główne subpopulacje monocytów: klasyczne (CD14⁺⁺CD16⁻), pośrednie (CD14⁺⁺CD16⁺) oraz nieklasyczne (CD14⁺CD16⁺⁺). Przypuszcza się, że monocyty CD16-pozytywne stanowią populację monocytów, które mogą wykazywać istotną rolę w odpowiedzi pro- jak i przeciwnowotworowej. Zdolności funkcjonalne monocytów CD16-pozytywnych są związane zarówno ze zróźnicowaną ekspresją markerów powierzchniowych, jak również z profilem uwalnianych cytokin. Monocyty pośrednie stanowią subpopulację monocytów wykazującą największy odsetek monocytów CD163⁺ oraz wydzielającą w znaczących ilościach cytokiny przeciwzapalne IL-10 oraz TGF-β, co sprawia, że komórki te mogą wykazywać właściwości immunosupresyjne. Z kolei, subpopulacja monocytów nieklasycznych wyróżnia się brakiem ekspresji cząsteczki HLA-DR oraz zdolnością do wydzielania TNF, IL-12, IL-1β wspomagając odpowiedź przeciwnowotworową. Niewątpliwie mikrośrodowisko odgrywa istotną rolę w patogenezie PBL. Niemniej jednak nadal konieczne są dalsze badania umożliwiające dokładne scharakteryzowanie fenotypowe oraz funkcjonalne poszczególnej subpopulacji monocytów.

Słowa kluczowe: subpopulacje monocytów, sCD14, przewlekła białaczka limfocytowa

The phenotype and functional differentiation of monocytes in patients with chronic lymphocytic leukemia

Monocytes are cells with an important influence on the immune response. They show wide phenotypic and functional differentiation. Nowadays, the importance of monocytes in cancer has not been clearly defined. Recent studies report that monocytes, which are the cells of the leukemic cell microenvironment lead to an increase of tumor cells' survival. It is definitely worth paying attention to the fact that one of the mechanisms for inhibition of apoptosis in CLL cells is the ability of a specific molecule CD180 located on the leukemic cells to join to a CD14 antigen, or its soluble form sCD14. It is believed that this interaction together with a number of others, lead to the release of factors in both pro- and anti-tumor activities. Due to the expression of surface antigens CD14 (LPS) and CD16 (FcγRIII), monocytes have been classified into three major subpopulations: classical (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediate (CD14⁺⁺CD16⁺) and non-classical monocytes (CD14⁺CD16⁺⁺). It is believed that the CD16-positive monocytes may have an important role in the of pro- and antitumor response. The functional abilities of CD16 positive monocytes are associated both with the differential expression of surface markers and also with the cytokine release profile. The intermediate monocytes have the highest percentage of CD163⁺ monocytes and secrete significant quantities of anti-inflammatory cytokine IL-10 and TGF-β, through which they may have immunosuppressive properties. The nonclassical monocytes, distinguished by the lack of expression of the HLA-DR and the ability to secrete TNF, IL-12 and IL-1β supports the anti-tumor response. Microenvironment surely plays initial role in the pathogenesis of CLL, still further studies are needed for accurate characterization of phenotypic and functional particular subpopulation of monocytes.

Keywords: subpopulations of monocytes, sCD14, chronic lymphocytic leukemia

Stres oksydacyjny w przechowywanych składnikach krwi i po przetoczeniu koncentratu krwinek czerwonych w wybranych grupach biorców

1. Wprowadzenie

Stres oksydacyjny to zaburzenie równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej w kierunku procesów utleniania. W warunkach stresu oksydacyjnego białka, lipidy, cukry oraz kwasy nukleinowe ulegają uszkodzeniom, które mogą powodować zaburzenia w prawidłowym funkcjonowaniu komórek i tkanek organizmu [1÷4].

Reaktywne formy tlenu (RFT; *ang. Reactive Oxygen Species*, ROS) są to substancje chemiczne zazwyczaj zawierające w swym składzie atomy tlenu z niesparowanym elektronem. RFT powstają w wyniku jednoelektronowej lub dwuelektronowej redukcji cząsteczki tlenu. Do RFT zaliczane są, m.in. nadtlenek wodoru (H_2O_2), tlen singletowy (O_2^1), anionorodnik ponadtlenkowy (O_2^-), rodnik hydroksylowy ($\bullet OH$), rodnik wodoronadtlenkowy ($\bullet O_2H$) [2, 3]. Warty podkreślenia jest fakt, iż reaktywne formy tlenu wytwarzane są w komórkach podczas prawidłowo przebiegających procesów fizjologicznych – są naturalnymi produktami metabolicznymi. Ich niewielkie stężenie jest niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu. RFT w warunkach homeostazy pełnią funkcje mediatorów i regulatorów metabolizmu, biorą udział w procesach takich jak indukowanie apoptozy i różnicowanie komórek, aktywacja genów (np. onkogenu *c-fos*), regulacja syntezy prostanoidów, aktywacja białek odpowiedzialnych za podziały komórkowe czy przekazywanie sygnałów w obrębie komórki oraz między komórkami [1÷3].

Zachowanie równowagi pomiędzy wytwarzaniem RFT a ich usuwaniem przez system antyoksydacyjny jest niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Zadaniem przeciwutleniaczy jest neutralizowanie wolnych rodników. Mechanizm działania antyoksydantów polega na zdolności tych związków do przekształcania RFT w formy nieaktywne lub hamowania reakcji ich powstawania. Ze względu na sposób

¹ kamilaczubak@biol.uni.lodz.pl, Katedra Biochemii Ogólnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

² zbikow@biol.uni.lodz.pl, Katedra Biochemii Ogólnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

działania wyróżnia się dwa systemy antyoksydacyjne: nieenzymatyczny oraz enzymatyczny (tab. 1). Antyoksydanty mogą być pochodzenia endogennego (wytwarzane w organizmie) lub egzogennego (dostarczane do organizmu z pożywieniem). W obrębie przeciwutleniaczy endogennych wyróżniamy między innymi peroksydazę glutationową, dysmutazę ponadtlenkową, czy katalazę, a także glutation, kwas moczowy, niektóre białka osocza krwi, takie jak ceruloplazmina, ferrytyna, transferyna, albumina. Natomiast do grupy egzogennych antyoksydantów zaliczamy przede wszystkim witaminę C i E, karotenoidy (likopen, luteina, β -karoten) oraz flawonoidy [4, 6].

Tabela 1. Podział antyoksydantów ze względu na sposób działania wraz z przykładami

Antyoksydanty	nieenzymatyczne	glutation (GSH), witamina E, witamina C, albuminy, bilirubina, kwas moczowy, kreatynina, cysteina, karotenoidy, flawonoidy, koenzym Q (zredukowany)
	enzymatyczne	peroksydaza glutationowa (GSH-Px), reduktaza glutationowa (GSSGR), katalaza (CAT), dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), ceruloplazmina, białka hemowe, tioredoksyna (TRX), paraoksonaza (PON1)

Źródło: [2÷4, 6]

Zanieczyszczenie środowiska, promieniowanie jonizujące, nadmierna ekspozycja na działanie promieniowania UV, palenie tytoniu, stres, niewłaściwa dieta, nadużywanie alkoholu, przewlekłe stany zapalne są to egzogenne czynniki przyczyniające się do znacznego zwiększenia ilości RFT w organizmie. W obrębie czynników wewnątrzkomórkowych będących źródłem RFT wyróżniamy łańcuch oddechowy, reakcje enzymatyczne, utlenianie białek oddechowych, peroksyzomy, mikrosomalny łańcuch transportu elektronów i metabolizm nukleotydów purynowych [2÷4].

Parametry stresu oksydacyjnego określane są za pomocą specyficznych biomarkerów (tab. 2). Markerami peroksydacji lipidów są, m. in. dialdehyd malonowy (MDA, *ang. malondialdehyde*) oraz przeciwciała przeciw utlenionej formie LDL (lipoproteiny o niskiej gęstości, *ang. low-density lipoprotein*) oznaczane w surowicy (Ab-oxLDL, *ang. antibodies to oxidized low-density lipoprotein*). Modyfikacje białek spowodowane obecnością RFT określane są za pomocą oznaczania grup karbonylowych i tiolowych. Natomiast powszechnie stosowanym markerem uszkodzeń materiału genetycznego jest 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyna (8-OHdG). Podwyższone stężenie jonów żelaza jest markerem określającym stan zapalny spowodowany obecnością wolnych rodników [1, 2].

Tabela 2. Wybrane biomarkery stresu oksydacyjnego

<i>Biomarkery stresu oksydacyjnego</i>	
Uszkodzenie lipidów	MDA, Ab-oxLDL
Uszkodzenie białek	Grupy karbonylowe i tiolowe białek
Uszkodzenie DNA	8-OHdG
Stan zapalny z udziałem RFT	Podwyższone stężenie jonów żelaza w płynach ustrojowych

Źródło: [2]

2. Cel pracy

Stres oksydacyjny jest zjawiskiem niepożądanym w transfuzjologii, zachodzącym w składnikach krwi przechowywanych w centrach krwiodawstwa i krwiolecznictwa, jak również u biorców po przetoczeniu krwi. Przedmiotem prezentowanej pracy jest omówienie aktualnego stanu wiedzy na temat systemów przechowywania krwi i jej składników, zmian oksydacyjnych zachodzących podczas przechowywania składników krwi w centrach krwiodawstwa i krwiolecznictwa, a także przedstawienie nielicznych jeszcze dostępnych wyników badań dotyczących oceny parametrów stresu oksydacyjnego po przetoczeniu krwinek czerwonych w wybranych grupach biorców.

3. Systemy przechowywania krwi i jej składników

W 1915 roku po raz pierwszy udało się utrzymać przez okres czterech tygodni żywe krwinki czerwone królika poza organizmem. Rous i Turner przechowywali erytrocyty w temperaturze około 4°C, w opracowanej przez siebie mieszaninie cytrynianu sodu (antykoagulant) i glukozy (składnik odżywczy) [7÷9]. Zapewnienie sterylności przechowywanej w ten sposób mieszaniny nie było możliwe, ponieważ glukoza podczas sterylizacji ulegała karmelizacji [7, 9]. Z tego powodu uznano, iż bezpieczniejsze będzie przechowywanie krwi w samym cytrynianie sodu w związku z możliwością sterylizacji takiego płynu [8].

Pierwszy na świecie bank krwi powstał we Francji podczas I Wojny Światowej. Do magazynowania krwi Oswald Robertson użył roztworu opracowanego przez Rousa i Turnera [8÷10]. Standardowa procedura opierała się na pobraniu krwi pełnej do butelek szklanych zawierających sterylizowany 3,8% cytrynian sodu oraz przechowywanie na lodzie przez okres pięciu dni [8].

Tabela 3. Składniki płynów konserwujących oraz wzbogacających stosowanych do przechowywania krwinek czerwonych

	Płyny konserwujące (krew pełna)			Płyny wzbogacające (dodawane do KKCz)				
	ACD (Acid-Citrate-Dextrose)	CPD (Citrate-Phosphate-Dextrose)	CPDA-1 (Citrate-Phosphate-Dextrose-Adenine)	SAGM (Saline-Adenine-Glucose-Mannitol)	AS-1 (Additive Solution-1)	AS-5 (Additive Solution-5)	AS-3 (Additive Solution-3)	PAGGSM (Phosphate-Adenine-Glucose-Guanosine-Saline-Mannitol)
Glukoza	+	+	+	+			+	+
Kwas cytrynowy	+	+	+				+	
Cytrynian trójsodowy	+	+	+				+	
Dwuwodorofosforan sodu		+	+				+	+
Wodorofosforan sodu								+
Adenina			+	+			+	+
Chlorek sodu				+			+	+
Mannitol				+				+
Guanozyna								+
Antykoagulant				CPD			CP2D	CPD

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [10, 11, 13]

Na początku II Wojny Światowej DeGowin i Alsever wznowili badania nad połączeniem cytrynianu i glukozy w roztworze konserwującym [8]. Jednak dopiero Loutit i Mollison w 1943 roku wykazali, iż stabilność cukru w temperaturze powyżej 100°C można utrzymać poprzez obniżenie pH do 5, umożliwiając tym samym sterylizację.

zację przechowywanych płynów konserwujących [7]. Opracowanie sterylnych roztworów do przechowywania krwi umożliwiło funkcjonowanie banków krwi (tab. 3) [8].

Pierwszym płynem konserwującym stosowanym do przechowywania krwi pełnej był roztwór ACD (*ang. Acid-Citrate-Dextrose*, skład: kwas cytrynowy-cytrynian-glukoza). Roztwór ACD umożliwiał przechowywanie erytrocytów przez okres trzech tygodni przy utrzymaniu ich żywotności do 70%. Pomiar przeżywalności krwinek wykonuje się *in vivo* poprzez znakowanie komórek izotopem ^{51}Cr . Przeżywalność mierzono w przeciągu 24 godzin po przetoczeniu [7]. Stopniowo do płynu konserwującego dodawano nowe składniki w celu wydłużenia czasu przechowywania krwi pełnej oraz poprawy jakości składników krwi [7]. Pierwszym z nich był fosforan, który powoli jest uwalniany z przechowywanych erytrocytów [8]. Poprzez dodanie fosforanu sodu do roztworu ACD otrzymano płyn CPD (*ang. Citrate-Phosphate-Dextrose*), w którego skład wchodzi cytrynian, glukoza oraz fosforan [7]. Zastosowanie roztworu CPD umożliwia przechowywanie krwi przez 21 dni w warunkach chłodniczych [10, 11]. Badania przeprowadzone przez Nakao i wsp. nad wpływem zależnej od czasu utraty ATP na przeżywalność erytrocytów przyczyniły się do wprowadzenia adeniny do roztworu CPD. Wykazano, iż dodanie adeniny i/lub inozyny do przechowywanych erytrocytów powoduje przywrócenie odpowiedniego stężenia ATP oraz prawidłowego kształtu komórek [8]. Otrzymany w ten sposób w 1968 roku roztwór nazwano CPDA lub CPDA-1 (*ang. Citrate-Phosphate-Dextrose-Adenine*). Umożliwia on przechowywanie krwi pełnej przez okres pięciu tygodni (ok. 35 dni) w temperaturze $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ [7, 8, 10, 11].

Na jakość przechowywanych składników krwi ma również wpływ materiał z jakiego wykonane są pojemniki służące do przechowywania. Obecnie zestawy pojemników stosowanych do pobierania, preparatyki i przechowywania krwi muszą być sterylne, jednorazowe oraz apirogenne [11]. Pierwsze próby przechowywania izolowanych składników krwi podjęto w latach 60. XX wieku, kiedy wprowadzono specjalne worki, które zastąpiły szklane butelki [8, 12]. Worki wykonane są z polichlorku winylu (PVC, *ang. polyvinyl chloride*) z dodatkiem plastyfikatora jakim jest DEPH (ftalan di-2-etyloheksylu; *ang. di-2-ethylhexyl phthalate*). Zastosowanie takiego połączenia materiałów powoduje aż czterokrotne zmniejszenie hemolizy w przechowywanych krwinkach [7, 8, 10], dzięki czemu w workach mogą być one przechowywane dwa razy dłużej niż w szklanych czy innych pojemnikach [8]. Ze względu na wprowadzenie specjalnych worków do przechowywania poszczególnych składników krwi konieczne było opracowanie nowych płynów wzbogacających (m.in. dostosowanych do przechowywania krwinek czerwonych po usunięciu osocza) w celu otrzymania środowiska *in vitro* jak najbardziej zbliżonego do warunków *in vivo* [7].

Aktualnie powszechnie stosowanymi składnikami krwi są koncentraty krwinek czerwonych (KKCz), koncentraty krwinek płytkowych (KKP) oraz świeżo mrożone osocze (FFP) [11]. Krew pełną konserwowaną (KPK) oraz koncentraty granulocytarne

(KG) przetacza się bardzo rzadko [11]. W związku z możliwością przechowywania wyżej wymienionych składników krwi w ośrodkach krwiodawstwa i krwiolecznictwa ponad 90% tych produktów wykorzystywanych jest do leczenia pacjentów [8, 11].

3.1. Koncentrat krwinek czerwonych (KKCz)

W ośrodkach krwiodawstwa i krwiolecznictwa preparatyka krwi pełnej pobranej od dawcy w celu uzyskania koncentratu krwinek czerwonych przebiega w następujący sposób. Krew pełną z żyły łokciowej pobiera się na antykoagulant czyli płyn konserwujący ACD-A, CPD lub CPDA-1 zawarty w pojemniku macierzystym. Następnie przy użyciu metod takich jak wirowanie, filtracja adsorpcyjna lub sedymentacja rozdzielane są poszczególne składniki krwi. Frakcja erytrocytarna trafia do worka satelitarnego, który zawiera odpowiedni płyn wzbogacający (uzupełniający) [7, 8, 11]. Z jednej jednostki krwi pełnej po usunięciu większości osocza otrzymuje się KKCz o objętości 250-350 ml i hematokrycie 65-75% [11].

Pierwszym opracowanym roztworem wzbogacającym był SAG (*ang. Saline-Adenine-Glucose*), w skład którego wchodził chlorek sodu, adenina oraz glukoza. Na początku lat 80. XX wieku na podstawie badań przeprowadzonych przez Hogmana do podstawowego płynu wzbogacającego dodano mannitol, otrzymując tym samym roztwór SAGM (*ang. Saline-Adenine-Glucose-Mannitol*) [7÷9]. Mannitol, pochodna cukrowa, działa jako stabilizator błony komórkowej erytrocytów oraz pełni funkcje zmiatacza wolnych rodników (właściwości przeciwutleniające; antyoksydant) [7]. Badania przeprowadzone przez Hogmana wykazały, iż dodanie 30 mM roztworu mannitolu może zredukować hemolizę aż o 50%, co umożliwia wydłużenie czasu przechowywania krwinek o kolejny tydzień [8]. SAGM do dnia dzisiejszego jest standardowym płynem wzbogacającym stosowanym w Europie. Natomiast w Stanach Zjednoczonych wykorzystywane są roztwory AS-1 i AS-5 różniące się nieznacznie stężeniem poszczególnych składników (tab. 3). Roztwór AS-3 jest jedynym stosowanym w Kanadzie płynem uzupełniającym. Skład wyżej wymienionego płynu opiera się na SAG z dodatkiem cytrynianu trójsodowego i dwuwodorofosforanu sodu. Cytrynian chroni błonę erytrocytów, podobnie jak mannitol w SAGM oraz równoważy ciśnienie osmotyczne. Roztwory wzbogacające stosowane w Japonii (MAP) i Australii (Circle Pack) w swym składzie zbliżone są do AS-3, chociaż różnią się dodanym antykoagulantem. Płyn CP2D powstał w analogii do CPD z dodatkową ilością glukozy [8, 9].

Płyny uzupełniające umożliwiają przechowywanie KKCz przez okres sześciu tygodni (ok. 42 dni) w temperaturze 2-6°C, gwarantując hemolizę na poziomie 0,4% oraz przeżywalność komórek w zakresie 78-84%, w ciągu 24 godzin od momentu wyznakowania radioizotopem [7, 9, 10].

W warunkach doświadczalnych stosowane są także inne roztwory wzbogacające wydłużające czas przechowywania krwinek czerwonych. Jednym z nich jest opracowany przez Walkera i wsp. płyn uzupełniający PAGGSM (*ang. Phosphate-Adenine-Glucose-Guanosine-Saline-Mannitol*) wydłużający czas przechowywania do siedmiu tygodni, przy utrzymaniu żywotności krwinek do 74% [14].

W związku z niekompletną wiedzą na temat mechanizmów zjawisk zachodzących w krwinkach czerwonych podczas przechowywania w warunkach *in vitro* postęp w badaniach nad doskonaleniem roztworów wzbogacających był bardzo powolny [8].

3.2. Koncentrat krwinek płytkowych (KKP)

Krwinki płytkowe są przechowywane w roztworze uzupełniającym, przez 5-7 dni w temperaturze $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ [11]. Stosowane roztwory uzupełniające mają za zadanie dostarczyć płytkom krwi związki odżywcze, utrzymać optymalne pH środowiska oraz zabezpieczyć je przed samoistną aktywacją związaną z procedurą pobierania i preparatyki krwi pełnej [11]. Opracowane roztwory wzbogacające do przechowywania płytek krwi wpływają na różne etapy przemian metabolicznych tych komórek (rys. 1). Za izoosmotyczność roztworu odpowiada chlorek sodu. Z kolei octan sodu ma właściwości buforujące oraz zapobiega obniżeniu pH poprzez zmniejszenie ilości mleczanu. Fosforan sodu podobnie jak octan działa buforująco oraz dodatkowo stymuluje proces glikolizy – powoduje wzrost ilości ATP odpowiadającego za kształt komórek. Natomiast dodanie jonów K^+ lub Mg^{2+} ma na celu zapobieganie agregacji płytek krwi [11].



Rysunek 1. Związki chemiczne wchodzące w skład roztworów wzbogacających (uzupełniających) do przechowywania KKP. Opracowanie własne na podstawie [11]

3.3. Osocze świeżo mrożone (FFP)

Osocze świeżo mrożone (FFP) można otrzymywać metodą plazmaferezy lub poprzez odpowiednie odwirowanie krwi pełnej. Objętość tego składnika krwi to około 200 ml. Ważne jest, aby otrzymane osocze było zamrożone w stosunkowo krótkim czasie, tak aby została zachowana funkcjonalność znajdujących się w nim czynników układu krzepnięcia. W zależności od temperatury, w jakiej przechowywane jest FFP, czas przydatności do użycia tego składnika jest różny (tab. 4). Świeżo mrożone osocze stosowane jest w leczeniu zaburzeń układu krzepnięcia oraz w przebiegu zakrzepowej płamicy małopłytkowej [11].

Tabela 4. Temperatura przechowywania FFP a termin ważności

<i>Temperatura przechowywania</i>	<i>Termin ważności</i>
Od -18°C do -25°C	3 miesiące
Poniżej -25°C	36 miesięcy

Źródło: [11]

3.4. Koncentrat granulocytarny (KG)

Granulocyty zawieszone w osoczu otrzymane metodą aferezy (leukaferazy) z krwi pełnej jednego dawcy stanowią koncentrat granulocytarny (KG – zawartość co najmniej $1,2 \times 10^{10}$ granulocytów). Składniki tego typu zawierają dużo zanieczyszczeń w postaci krwinek czerwonych, krwinek białych oraz płytek krwi. Otrzymanie KG możliwe jest dzięki podaniu dawcy granulocytarnego czynnika wzrostu oraz sterydowych czynników stymulujących [11].

Rekomendowane jest przetoczenie KG natychmiast po otrzymaniu tego składnika krwi. Dopuszczalne jest przechowywanie KG (bez mieszania) przez 24 godziny od aferezy w temperaturze $22 \pm 2^\circ\text{C}$. W związku z tym, że granulocyty biorą udział w procesie fagocytozy bakterii KG może być podawany chorym z neutropenią lub cierpiącym na przewlekłą chorobę ziarniniakową. Przetoczenie KG niesie ze sobą wysokie ryzyko wystąpienia powikłań zarówno u dawców, jak i biorców, dlatego przed rozpoczęciem leczenia należy jednoznacznie określić cele transfuzji [11].

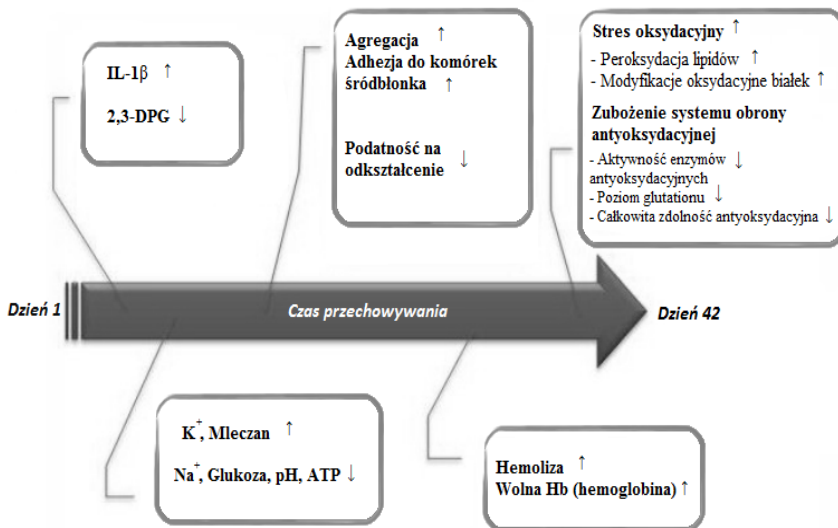
3.5. Krew pełna konserwowana (KPK)

Krew pełna konserwowana (KPK) jest to krew pobrana od dawcy w ilości około 450 ml ($\pm 10\%$) do pojemników zawierających odpowiednią ilość płynu konser-

wującego (najczęściej CPD, CPDA-1). Jeżeli z krwi pełnej będą otrzymywane poszczególne składniki pobiera się ją do pojemnika macierzystego, który jest elementem zestawu umożliwiającego frakcjonowanie krwi. KPK przechowywana jest w temperaturze $4 \pm 2^\circ\text{C}$. W zależności od zastosowanego antykoagulantu termin ważności może wynosić 21 dni (w przypadku płynu CPD) lub 35 dni (CPDA-1). Wskazania do przetaczania KPK są znacznie ograniczone. W głównej mierze krew pełna konserwowana jest materiałem biologicznym do frakcjonowania składników krwi [11].

4. Zmiany zachodzące w przechowywanych koncentratkach krwinek czerwonych

W przechowywanych krwinkach czerwonych zachodzą zmiany funkcjonalne, biomechaniczne oraz metaboliczne. Najlepiej opisanymi zmianami są wzmożona hemoliza, zmniejszona odkształcalność krwinek, spadek stężenia ATP oraz 2,3-DPG (2,3-bisfosfoglicerynianu), wyciek jonów K^+ , uwalnianie mikrocząstek błonowych oraz uszkodzenia oksydacyjne białek i lipidów (rys. 2). W wyniku zmian zachodzących w KKCz, postępujących wraz z czasem przechowywania, obserwowane jest znaczne skrócenie żywotności erytrocytów w organizmie biorcy po przetoczeniu [15÷16].



Rysunek 2. Zmiany zachodzące podczas przechowywania koncentratów krwinek czerwonych (KCCz) przeznaczonych do transfuzji.

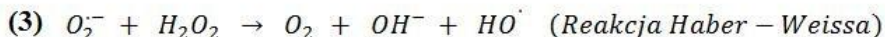
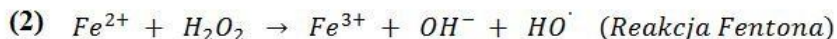
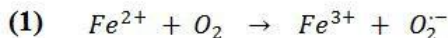
↑ – wzrost/zwiększenie, ↓ – spadek/zmniejszenie. Opracowanie własne na podstawie [17]

4.1. Źródła RFT w krwinkach czerwonych i stres oksydacyjny

W przechowywanych KKCz uszkodzeniom oksydacyjnym ulegają przede wszystkim białka cytoszkieletu oraz fosfolipidy błonowe krwinek czerwonych [18]. Peroksydacja lipidów oraz modyfikacje oksydacyjne białek błonowych erytrocytów skutkują zwiększonym wyciekiem jonów potasu, uwalnianiem hemoglobiny (Hb) oraz wewnątrzkomórkowych enzymów, tj. dehydrogenaza mleczanowa (LDH), ekspozycją fosfatydyloseryny na powierzchni błony oraz tworzeniem mikrocząstek erytrocytarnych [18÷20]. W celu zredukowania uszkodzeń oksydacyjnych zachodzących w krwinkach podczas ich przechowywania, do roztworów wzbogacających wskazane byłoby dodawanie przeciwutleniaczy. Innym sposobem ograniczenia stresu oksydacyjnego może być usuwanie substancji utleniających (tlenu) z przechowywanych KKCz [20].

Głównym źródłem produkcji RFT w krwinkach czerwonych jest hemoglobina. Hb bierze udział m.in. w reakcjach oksydoredukcyjnych, które są bezpośrednio związane z jej zdolnością do transportowania cząsteczkowego tlenu. Wielonienasycone kwasy tłuszczowe obecne w błonach krwinek czerwonych są potencjalnym źródłem rodników lipidowych. RFT w krwinkach czerwonych wytwarzane są w wyniku degradacji hemu na drodze enzymatycznej (inicjowanej przez oksygenazę hemową) i nieenzymatycznej (inicjatorem jest nadtlenek wodoru) [21].

Reakcja polegająca na wiązaniu tlenu z żelazem (Fe^{2+}) grupy hemowej cząsteczki hemoglobiny nie zawsze przebiega w sposób prawidłowy. Zdarza się, iż w wyniku autooksydacji hemoglobiny dochodzi do utworzenia anionorodnika ponadtlenkowego oraz methemoglobiny, zawierającej jon żelazowy (Fe^{3+}) i niezdolnej do wiązania tlenu (rys. 3). Uszkodzenia te mogą być szybko naprawiane dzięki funkcjonowaniu układu reduktazy NADH-cytochrom b₅ methemoglobina (układ, składający się z NADH, reduktazy methemoglobinowej i cytochromu b₅) oraz dysmutazy ponadtlenkowej, których ilość w świeżych erytrocytach zazwyczaj utrzymuje się na odpowiednio wysokim poziomie [7, 22, 23]. Jednak w dłużej przechowywanych erytrocytach zmniejsza się zarówno ilość wytwarzanego w procesie glikolizy NADH, jak i znacznie spada poziom glutationu. Oba te związki są niezbędne do redukcji methemoglobiny [7]. W takich warunkach obecność anionorodnika ponadtlenkowego, H₂O₂ oraz wolnego żelaza (Fe^{2+}) lub hemu, pełniących rolę katalizatora, umożliwia przebieg reakcji Fentona/Haber-Weissa w wyniku, której powstaje rodnik hydroksylowy z łatwością uszkadzający białka cytoszkieletu oraz fosfolipidy błonowe erytrocytów (rys. 3) [7, 19, 20].



Rysunek 3. Schemat ilustrujący powstawanie anionorodnika ponadtlenkowego oraz przebieg reakcji Fentona i Haber-Weissa w wyniku, której produkowany jest wysoce reaktywny rodnik hydroksylowy. Opracowanie własne na podstawie [17, 22, 25]

Przetaczanie dłużej przechowywanych KKCz, w których zachodzi zwiększony stres oksydacyjny niesie ze sobą wysokie ryzyko pojawienia się u pacjenta niepożądanych reakcji przetoczeniowych.

4.2. Zmiany metaboliczne

Dla erytrocytów jedynym źródłem energii jest glikoliza. W procesie tym dochodzi do rozkładu glukozy i syntezy ATP oraz produkcji kwasu mlekowego i protonów. Wzrost stężenia protonów powoduje zakwaszenie środowiska spowalniając proces glikolizy krwinek czerwonych poprzez hamowanie fosfofruktokinazy i heksokinazy [7, 26, 27]. Podstawowe zmiany metaboliczne wynikające z przechowywania KKCz obejmują spadek pH, akumulację zewnątrzkomórkowego potasu oraz zmniejszone stężenie ATP i 2,3-DPG (tab. 5).

W temperaturze 25°C proces glikolizy przebiega 10-krotnie szybciej niż w 3°C, żeby zmniejszyć tempo glikolizy KKCz są przechowywane w zakresie temperatur pomiędzy 2-6°C. W temperaturze około -0,5°C krwinki czerwone ulegają zamrożeniu, natomiast w temperaturze powyżej 6°C znacząco zwiększa się zużycie składników odżywczych, co skraca czas przechowywania tego składnika krwi [7, 26].

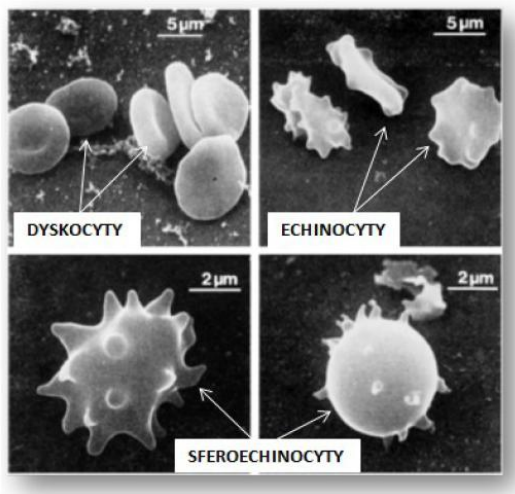
Erytrocyty wyizolowane z krwi pełnej (pH = 7,35) umieszczane są zazwyczaj w roztworze CPD o pH w zakresie 5,5-5,8. Otrzymana w ten sposób zawiesina komórek ostatecznie przyjmuje pH około 7,1. Nieznaczne odchylenia od tej wartości mogą być związane między innymi ze stężeniem hemoglobiny czy objętością krwi dawcy. W takim pH 2,3-difosfoglicerynian (2,3-DPG) łatwo ulega rozpadowi [7, 27].

W niskiej temperaturze występujące w błonie, ATP-zależne pompy sodowo-potasowe znacznie zmniejszają swoją aktywność. W konsekwencji wyciekający

z krwinek potas (K^+) nie może powrócić do wnętrza komórki, co skutkuje wzrostem jego stężenia pozakomórkowego w przechowywanych koncentratkach. Tempo wzrostu stężenia potasu w medium oscyluje w granicach około 1 mEq/dzień [7, 26]. Przetoczenie KKCz z wysokim stężeniem pozakomórkowego potasu może prowadzić do zaburzeń rytmu serca (arytmii) bądź nawet do nagłej śmierci biorcy [7, 26, 28]. Zmniejszenie toksyczności potasu dla pacjentów z grupy wysokiego ryzyka polega na przemyciu krwinek lub jedynie usunięciu supernatantu z KKCz [16, 28].

4.3. Zmiany kształtu komórek

Podczas przechowywania w bankach krwi prawidłowe, dojrzałe krwinki czerwone, przypominające gładkie, dwuwklęsłe dyski o średnicy około 8 μm , grubości około 2 μm oraz średniej objętości 90 fL, ulegają zmianom kształtu (rys. 4) [7, 10, 26]. Wskutek wyczerpania ATP erytrocyty przyjmują kształt echinocytów [16]. Echinocyty, a także dyskocyty i stomatocyty zaliczane są do grupy form fizjologicznych, które mogą przybierać krwinki czerwone [29].



Rysunek 4. Zmiany kształtu komórek krwinek czerwonych wynikające z przechowywania w warunkach *in vitro* [30] – zmodyfikowano

Zachodzące zmiany przede wszystkim związane są z pojawieniem się wypustek na powierzchni krwinek. Proces umożliwiający w znacznym stopniu przywrócenie prawidłowego kształtu erytrocytów nazywamy odmładzaniem (*ang. rejuvenation*). Polega on na umieszczeniu komórek w mieszaninie substancji odżywczych o neutralnym pH, a następnie ogrzaniu roztworu do temperatury około 37°C. Odmładzaniu towarzyszy

wzrost stężenia ATP oraz regeneracja 2,3-DPG [7, 26]. W sytuacji, gdy dochodzi do wyczerpania ogólnej puli dostępnych nukleotydów adeninowych, tj. AMP, ADP, ATP przechowywane w warunkach *in vitro* krwinki czerwone ulegają nieodwracalnemu przekształceniu w sferoechinocyty [16, 26]. Stres oksydacyjny zachodzący w przechowywanych KKCz zmniejsza elastyczność błony i odkształcalność krwinek czerwonych. Wykazano, że w przeciwieństwie do peroksydacji fosfolipidów błony, najprawdopodobniej nie mającej wpływu na odkształcalność krwinek, uszkodzenia oksydacyjne białek cytoszkieletu są odpowiedzialne za ten proces, jak również za nieodwracalne przekształcenie erytrocytów w sferoechinocyty [31]. Zmiany kształtu krwinek czerwonych podczas przechowywania są przyczyną zwiększonej lepkości i upośledzenia ich przepływu w systemach naczyń włosowatych, a także innych zmian reologicznych [7, 26].

Niektóre zmiany zachodzące w przechowywanych mają charakter całkowicie nieodwracalny. Procesem takim jest usuwanie uszkodzonych białek oraz utlenionych lipidów podczas uwalniania mikrocząstek błonowych [7, 26]. Krwinki białe (WBCs, *ang. White Blood Cells*) obecne w krwi ulegają rozpadowi uwalniając do roztworu enzymy, tj. lipazy, proteazy czy glikozydazy. Enzymy te usuwają z powierzchni erytrocytów cukry pełniące funkcje immunochronne, degradują białka oraz eliminują grupy alkilowe lipidów (dealkilacja). Proces leukoredukcji, czyli usuwania WBCs poprzez filtrację, jest jednym ze sposobów zmniejszania stopnia uszkodzeń krwinek czerwonych zachodzących podczas przechowywania koncentratów [7].

4.4. Mikrocząstki pochodzenia czerwonekrwinkowego

Powstawanie mikrocząstek (MP) jest integralną częścią fizjologicznego procesu dojrzewania i starzenia się komórek [32, 33]. Pierwsze doniesienie na temat uwalniania MP z ludzkich krwinek czerwonych (EMP, *ang. Erythrocyte-Derived MP*) pojawiło się w 1980 roku. Glikoforyna A jest specyficznym antygenem powierzchniowym służącym jako marker do wykrywania obecności EMP [34, 35]. Proces tworzenia mikrocząstek zachodzi podczas całego okresu życia erytrocytu, przy czym znacznie szybciej w jego drugiej połowie. Erytrocyt w ciągu 120 dni życia jest w stanie uwolnić około 230 mikrocząstek [36].

Procesy zachodzące podczas starzenia się erytrocytów w warunkach *in vitro* znacząco różnią się w porównaniu z procesami starzenia tych komórek zachodzącymi w organizmie [37]. Jednakże zaburzenia w asymetrycznym ułożeniu fosfolipidów błony erytrocytów i uwalnianie mikrocząstek zachodzi zarówno w żywym organizmie, jak i podczas przechowywania KKCz [34, 37]. Mikrocząstki usuwane są z krwiobiegu przez fagocyty jednojądrzaste, czyli komórki Kupffera (makrofagi) w wątrobie [36, 37]. Natomiast w przechowywanych koncentratkach krwinek czerwonych EMP nie są usuwane, i ich akumulacja wpływa na jakość i bezpieczeństwo stosowania tego

składnika krwi [37]. Analizę ilościową oraz jakościową mikrocząstek erytrocytarnych tworzących się podczas przechowywania KKCz przeprowadził Rubin i wsp. za pomocą cytometrii przepływowej oraz technik proteomicznych [38]. Po 50 dniach przechowywania KKCz w temperaturze 4°C zaobserwowano aż 20-krotny wzrost liczby EMP [38]. Obecność EMP w KKCz związana jest z ryzykiem produkcji alloprzeciwciał w organizmie biorcy po przetoczeniu, jednak mechanizm tego zjawiska nie został w pełni poznany. Na uwalnianych EMP zlokalizowane są antygeny grupowe krwi i prawdopodobnie zachowują one swoją immunogenność. W związku ze zdolnością do wiązania specyficznych przeciwciał mogą przyczyniać się do wywołania odpowiedzi immunologicznej *in vivo* [39].

Łatwość wchłaniania mikrocząstek przez inne komórki umożliwia przekazywanie informacji biologicznej w postaci RNA, bioaktywnych lipidów, cząsteczek szlaków sygnalizacyjnych czy receptorów błonowych. Mikrocząstki pochodzące z erytrocytów zaangażowane są w usuwanie kompleksu atakującego błonę (MAC, *ang. Membrane Attack Complex*), czyli białek układu dopełniacza C5-C9, a także methemoglobiny, IgG, neoantygeny białka pasma 3, niefunkcjonalnych białek oraz innych cząsteczek potencjalnie szkodliwych, zapobiegając tym samym przedwczesnej śmierci krwinek czerwonych [33, 36, 37].

Przetoczenie KKCz przechowywanych dłużej niż przez okres 28 dni może wiązać się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia zakrzepicy żył głębokich. W celu wyjaśnienia mechanizmów leżących u podstaw zwiększonej aktywacji układu krzepnięcia krwi badano mikrocząstki pod względem ich potencjalnej aktywności prokoagulacyjnej, a także analizowano czynniki prokoagulacyjne zdolne do inicjacji procesu krzepnięcia znajdujące się na EMP. Przeprowadzone przez Gao i wsp. eksperymenty dowiodły, iż tworzące się w przechowywanych KKCz mikrocząstki sprzyjają procesom prozakrzepowym poprzez ekspozycję fosfatydyloseryny (PS), w wyniku zaburzenia asymetrii błony plazmatycznej, jak i poprzez inicjowanie tworzenia trombiny, niezależnie od czynnika tkankowego (TF), a przez szlak zależny od czynnika krzepnięcia XI (FXI) [40].

Ze względu na wykazaną prokoagulacyjną aktywność EMP można sądzić, że przetoczenie „starszych” KKCz, które zawierają dużą liczbę EMP, może zwiększać ryzyko wystąpienia niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych. Z drugiej strony, w niektórych przypadkach wprowadzenie tzw. „stanu nadkrzepliwości” może zmniejszyć lub nawet zatrzymać krwawienie [37].

4.5. Zanieczyszczenie mikroorganizmami

Przechowywane KKCz mogą stać się medium stwarzającym dogodne warunki do rozwoju dla różnych gatunków bakterii. Zanieczyszczeniu mikroorganizmami pochodzącymi ze skóry bądź krwi dawcy ulega około 1 na 2 000 jednostek krwi. Natomiast 1 na 5 000 000 jednostek powoduje pojawienie się objawów zakażenia u biorcy. Proces przechowywania KKCz w temperaturze 2-6°C uniemożliwia przetrwanie większości mikroorganizmów. Jedynie bakterie z gatunków *Aeromonas*, *Yersinia*, *Vibrio* i *Serratia* wykazujące odporność na obniżoną temperaturę zachowują zdolność do powolnego wzrostu w takich warunkach [7, 26, 41].

5. Stres oksydacyjny po przetoczeniu krwinek czerwonych w wybranych grupach biorców

Przetaczanie koncentratów krwinek czerwonych jest powszechnie stosowane u pacjentów z wrodzoną lub nabytą niedokrwistością różnych typów. Przez wiele lat uważano, że przetaczanie krwi i/lub jej składników ma wyłącznie kliniczne korzyści. Jednakże, leczenie składnikami krwi związane jest z ryzykiem występowania różnych powikłań poprzetoczeniowych, niekiedy nawet kończących się zgonem. Przyczyny wielu, często złożonych, reakcji poprzetoczeniowych nie są do końca wyjaśnione. Uważa się, że jedną z przyczyn mogą być modyfikacje/uszkodzenia oksydacyjne białek i lipidów przechowywanych krwinek czerwonych oraz inne zmiany kumulujące się w KKCz podczas ich przechowywania. Zmiany te mogą prowadzić, m.in. do ostrego poprzetoczeniowego uszkodzenia płuc (TRALI, *ang. Transfusion-Related Acute Lung Injury*), immunomodulacji zależnej od transfuzji (TRIM, *ang. Transfusion-Related Immunomodulation*), zwiększonego ryzyka wystąpienia zakrzepicy poprzetoczeniowej, infekcji czy przerzutów nowotworowych w wyniku utraty ligandów pełniących funkcje immunochronne, tj. CD47 [7, 21]. Istotną kwestią jest zatem odpowiedź na pytanie czy przetoczenie dłużej przechowywanych KKCz (ponad dwa tygodnie) może indukować stres oksydacyjny *in vivo*. Stan wiedzy na ten temat jest jeszcze bardzo ubogi. Oceny wybranych parametrów stresu oksydacyjnego w osoczu krwi przed i po transfuzji dokonano w grupie wcześniaków [42-44], u pacjentów w stanie krytycznym z oddziałów intensywnej opieki medycznej (OIOM) [21] oraz u pacjentów po wielokrotnych transfuzjach.

Przetaczanie KKCz prawdopodobnie jest czynnikiem ryzyka rozwoju retinopatii (ROP, *ang. retinopathy of prematurity*) i przewlekłej choroby płuc (CLD, *ang. chronic lung disease*) u wcześniaków. Za rozwój ROP i CLD po przetoczeniu KKCz może odpowiadać wzrost ilości dostarczanego tlenu do siatkówki oka lub płuc, zwiększenie hematokrytu w organizmie biorców oraz obniżenie powinowactwa tlenu do hemoglobiny w przechowywanych krwinkach czerwonych. Kolejnym czynnikiem, który

może przyczyniać się do występowania wyżej wymienionych chorób to związane z transfuzją przeciążenie żelazem (przetaczane krwinki mają skrócony okres półtrwania, a żelazo które zawierają może wykazywać działanie prooksydacyjne). Przechowywane KKCz zawierają średnio 0,5 mg żelaza/ml, dlatego przetoczenie kilku jednostek tego składnika krwi może znacząco zwiększyć ilość żelaza w organizmie wcześniaków podczas pierwszych tygodni życia [42]. Hirano i wsp. wykazali, że u wcześniaków po przetoczeniu KKCz stężenie żelaza niezwiązanego z transferyną (NTBI) w osoczu istotnie wzrasta oraz częściowo występuje w formie prooksydacyjnej (jon żelazawy, Fe^{2+}) z powodu niskiej aktywności ferrokasydazy i redukcji jonu żelazowego (Fe^{3+}) do Fe^{2+} przez kwas askorbinowy [43]. Badania te jednak nie potwierdziły, że NTBI jest katalizatorem tworzenia reaktywnych form tlenu *in vivo*, który indukuje stres oksydacyjny. W dalszych badaniach, także w grupie wcześniaków, oznaczano stężenie NTBI w osoczu oraz poziom wybranych markerów stresu oksydacyjnego: całkowitą zawartość wodoronadtlenków (TH) i białkowych grup -SH oraz całkowity potencjał antyoksydacyjny osocza (TAC) 3 godziny przed i po transfuzji [42]. Wyniki badań wskazują, iż czynnikiem odpowiedzialnym za rozwój CLD i ROP po przetoczeniu KKCz u wcześniaków może być wtórne przeciążenie żelazem. Zwiększona ilość wolnego żelaza może katalizować reakcję Fentona, w której produkowany jest rodnik hydroksylowy, który z kolei może uszkadzać płuca i siatkówkę oka. Ochronę przed szkodliwym działaniem wolnego żelaza zapewnia ceruloplazmina (odpowiadająca za utlenianie jonów Fe^{2+} do Fe^{3+}) oraz transferyna (odpowiadająca za wiązanie Fe^{3+}). Przypuszcza się, iż u wcześniaków stężenia wyżej wymienionych białek w osoczu są niskie [42].

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów wykazano, iż zawartość NTBI w osoczu wcześniaków istotnie wzrasta po 3 godzinach od przetoczenia, ale nie jest skorelowana z istotnymi zmianami w poziomie badanych parametrów stresu oksydacyjnego [42]. Sugeruje to, że wzrost stężenia NTBI po przetoczeniu nie jest wystarczający, aby indukować stres oksydacyjny. Podsumowując, otrzymane wyniki wykazały, że przetoczenie KKCz nie zwiększa ryzyka wystąpienia stresu oksydacyjnego w tej grupie biorców [42].

Przetaczanie KKCz jest powszechnie stosowane u pacjentów przebywających na oddziałach OIOM, u których wystąpiła niedokrwistość. Prowadzone w ostatniej dekadzie liczne badania epidemiologiczne wykazały, że około 37% pacjentów otrzymuje KKCz (średnio 5 jednostek) podczas pobytu na oddziale OIOM. Ponadto, u pacjentów, którzy zostają na oddziale dłużej niż tydzień, wartość ta wzrasta do 73% [21]. Wykazano także, że zwiększony poziom stresu oksydacyjnego, szczególnie u pacjentów krytycznie chorych, związany jest z gorszym rokowaniem. Badania przeprowadzone przez Rosa i wsp. [21] w grupie chorych w stanie krytycznym, wykazały, iż przetoczenie KKCz związane jest ze wzrostem poziomu grup karbonylowych

białek i produktów peroksydacji lipidów reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS), obserwowanym 24 godziny po przetoczeniu. Jednocześnie odnotowano obniżenie poziomu interleukiny 6 (IL-6). Warty podkreślenia jest fakt, iż zaobserwowano istotną dodatnią korelację pomiędzy zwiększoną zawartością grup karbonylowych w białkach, a śmiertelnością pacjentów. Otrzymane wyniki sugerują, że przetoczenie KKCz w tej grupie biorców może mieć poważne skutki kliniczne [21].

Pomimo znacznej poprawy jakości przetaczanych składników krwi transfuzja nadal związana jest z potencjalnym ryzykiem wystąpienia poważnych powikłań poprzetoczeniowych. Ryzyko to znacznie zwiększa się u pacjentów poddawanych wielokrotnym transfuzjom. Obecnie wielokrotne przetoczenia KKCz wskazane są u pacjentów ze schorzeniami tj. talasemia, niedokrwistość aplastyczna, syndrom mielodysplastyczny oraz przewlekła białaczka szpikowa [45]. Wielokrotne transfuzje mogą prowadzić do wystąpienia m. in. przeciążenia żelazem (znacznie zwiększa śmiertelność w tej grupie chorych), zakażeń przenoszonych przez krew, alloimmunizacji oraz reakcji gorączkowych. Przeciążenie żelazem stanowi poważny problem u pacjentów z przewlekłą niedokrwistością wymagających długoterminowej terapii związanej z systematycznym przetaczaniem KKCz. Chroniczne przeciążenie organizmu żelazem wpływa na funkcjonowanie ważnych dla życia narządów, tj. serce czy wątroba. Reakcje utleniania i redukcji powodują m.in. modyfikacje cząsteczek sygnałowych odpowiadających za międzykomórkową i wewnątrzkomórkową komunikację. Celem jednego z przeprowadzonych niedawno badań była ocena wpływu wielokrotnych przetoczeń KKCz na stężenie dialdehydu malonowego (MDA), poziom witaminy E i ferrytyny w surowicy krwi oraz poziom zredukowanego glutationu w erytrocytach i oporność osmotyczną krwinek czerwonych u biorców z chorobami hematologicznymi [45]. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów zaobserwowano znacznie podwyższony poziom wybranych markerów stresu oksydacyjnego (MDA i ferrytyny) oraz zmniejszenie oporności osmotycznej krwinek w badanej grupie biorców. Pozostałe oznaczane parametry nie różniły się istotnie od grupy kontrolnej, którą stanowili dawcy krwi bez schorzeń hematologicznych, nie poddawani transfuzjom.

Transfuzja KKCz jest zabiegiem ratującym życie pacjentów z β -talasemią oraz anemią sierpowatą, jednakże jak wspomniano wcześniej bardzo często skutkuje poważnym przeciążeniem żelazem, szczególnie, że są to wielokrotni biorcy. Stan przeciążenia żelazem, związany ze wzrostem poziomu stresu oksydacyjnego, szczególnie peroksydacją lipidów może prowadzić do uszkodzenia wątroby oraz stanowi istotny problem u pacjentów wymagających przewlekłego leczenia tym składnikiem krwi [46, 47].

6. Podsumowanie

Przetaczanie koncentratów krwinek czerwonych jest zabiegiem często ratującym życie pacjentom, m. in. z chorobami nowotworowymi, z wrodzonymi i nabytymi chorobami hematologicznymi, czy też chorym z oddziałów intensywnej opieki medycznej, ale każda transfuzja wiąże się też z ryzykiem wystąpienia niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych. Progresywne zmiany zachodzące w KKCz podczas ich przechowywania w ośrodkach krwiodawstwa i krwiolecznictwa są dobrze opisane i udokumentowane, natomiast kliniczne konsekwencje przetaczania KKCz, szczególnie dłużej przechowywanych (z zaakceptowaną datą ważności do 42 dni), są mało poznane. W przechowywanych krwinkach czerwonych na skutek wzrostu stężenia reaktywnych form tlenu, przy jednoczesnym upośledzeniu systemu antyoksydacyjnego, dochodzi do stresu oksydacyjnego. Nasilenie stresu oksydacyjnego, jak również poziom żelaza niezwiązanego z transferryną rosną proporcjonalnie do czasu przechowywania KKCz, co stwarza pro-oksydacyjne środowisko. Obecnie, na podstawie przeprowadzonych badań trudno jest formułować jednoznaczne wnioski co do bezpieczeństwa i skuteczności, 42-dniowego czasu przechowywania KKCz. Okres ten jest konieczny dla zabezpieczenia potrzeb pacjentów. Niezbędne są dalsze badania, ukierunkowane na optymalizację składu płynów do przechowywania krwinek czerwonych oraz poszukiwanie markerów zmian w celu większej kontroli jakości KKCz. W świetle braku wystarczających dowodów na zmniejszenie korzyści i/lub zwiększone ryzyko reakcji poprzetoczeniowych u biorców, wynikających z transfuzji „starszych” krwinek czerwonych, obiecujący wydaje się, dopiero pojawiający się w literaturze, nurt badań oceny poziomu stresu oksydacyjnego we krwi biorców po przetoczeniu KKCz. Być może wyniki tego typu badań umożliwią wyłonienie szczególnych grup chorych, dla których wskazaniem byłoby podawanie „świeżych (< 14 dni przechowywania) KKCz.

Praca finansowana ze środków otrzymanych w ramach dotacji celowej dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich w 2016 r. (B1611000001146.02).

Literatura

1. Pawłowska M., Mila-Kierzenkowska C., Kwiatkowska A., Paprocki J., Sutkowy P., Woźniak A., *Ocena wybranych parametrów stresu oksydacyjnego u chorych na łuszczycę*, Diagnostyka Laboratoryjna. 52/2 (2016), s. 101-106
2. Łuszczewski A., Matyska-Piekarska E., Trefler J., Wawer I., Łacki J., Śliwińska-Stańczyk P., *Reaktywne formy tlenu – znaczenie w fizjologii i stanach patologii organizmu*, Reumatologia 45/5 (2007), s. 284-289
3. Zabłocka A., Janusz M., *Dwa oblicza wolnych rodników tlenowych*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej 62 (2008), s. 118-124
4. Zhang H., Tsao R., *Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects*, Current Opinion in Food Science 8 (2016), s. 33-42

5. Augustyniak A., Skrzydlewska E., *Zdolności antyoksydacyjne w starzejącym się organizmie*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej 58 (2004), s. 194-201
6. Yadav A., Kumari R., Yadav A., Mishra J. P., Srivatva S., Prabha S., *Antioxidants and its functions in human body – A Review*, Research in Environment and Life Sciences 9/11 (2016), s. 1328-1331
7. Hess J. R., *Red cell storage*, Journal of Proteomics 73 (2010), s. 368-373
8. Hess J. R. *An update on solutions for red cell storage*, Vox Sanguinis 91 (2006), s. 13-19
9. D'Amici G. M., Mirasole C., D'Alessandro A., Yoshida T., Dumont L. J., Zolla L., *Red blood cell storage in SAGM and AS3: a comparison through the membrane two-dimensional electrophoresis proteome*, Blood Transfusion 10/2 (2012), s. 46-54
10. Scott K. L., Lecak J., Acker J. P., *Biopreservation of Red Blood Cells: Past, Present, and Future*, Transfusion Medicine Reviews 19/2 (2005), s. 127-142
11. Łętowska M. (red.), *Preparatyka krwi i jej składników [w:] Medyczne zasady pobierania krwi, oddzielania jej składników i wydawania, obowiązujące w jednostkach organizacyjnych publicznej służby krwi: praca zbiorowa*, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa (2011), s. 147-265
12. Łętowska M., Rosiek A., *Stosowanie komórkowych składników krwi w onkologii*, Onkologia w Praktyce Klinicznej 1 (2006), s. 6-17
13. Antosik A., Żbikowska H. M., *Koncentraty krwinek czerwonych w transfuzjologii*, Kosmos 1/302 (2014), s. 13-23
14. Walker W. H., Netz M., Ganshirt K. H., *49 day storage of erythrocyte concentrates in blood bags with the PAGGS-mannitol*, Beitr Infusionsther 26 (1990), s. 55-59
15. Agarwal P., Ray V. L., Choudhury N., Chaudhary R. K., *Effect of pre-storage gamma irradiation on red blood cells*, Indian Journal of Medical Research 122 (2005), s. 385-387
16. van de Watering L., *Red cell storage and prognosis*, Vox Sanguinis 100 (2011), s. 36-45
17. Cohen B., Matot I., *Aged erythrocytes: a fine wine or sour grapes?*, British Journal of Anaesthesia 111 (2013), s. 62-70
18. Chaudhary R., Katharia R., *Oxidative injury as contributory factor for red cells storage lesion during twenty eight days of storage*, Blood Transfusion 10 (2012), s. 59-62
19. Burak Çimen M. Y., *Free radical metabolism in human erythrocytes*, Clinica Chimica Acta 390 (2008), s. 1-11
20. Yoshida T., Shevkopylas S. S., *Anaerobic storage of red blood cells*, Blood Transfusion 8 (2010), s. 220-236
21. Rosa S. D., Bristot M. L. U., Topanotti M. F. L., Tomasi C. D., Felisberto F., Vuolo F. S., Petronilho F., Pizzol F. D., Ritter C., *Effect of red blood cell transfusion on parameters of inflammation and oxidative stress in critically ill patients*, Revista Brasileira de Terapia Intensiva 23/1 (2011), s. 30-35
22. Zapora E., Jarocka I., *Hemoglobina – źródłem reaktywnych form tlenu*, Postępy Higieny i Medycy Doświadczalnej 67 (2013): 214-220
23. Rifkind J. M., Nagababu E., *Hemoglobin redox reactions and red blood cell aging*, Antioxidants & Redox Signaling 18 (2013), s. 2274-2283
24. Neal M. D., Raval J. S., Triulzi D. J., Simmons R. L., *Innate Immune Activation After Transfusion of Stored Red Blood Cells*, Transfusion Medicine Reviews 27 (2013), s. 113-118
25. Iwabuchi T., Yoshimoto C., Shigetomi H., Kobayashi H., *Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Endometriosis and Its Malignant Transformation*, Oxidative Medicine

- and Cellular Longevity (2015), s. 1-7, Article ID 848595;
<http://dx.doi.org/10.1155/2015/848595>
26. Hess J. R. *Red cell changes during storage*, Transfusion and Apheresis Science 43 (2010), s. 51-59
 27. Pavenski K., Saidenberg E., Lavoie M., Tokessy M., Branch D. R., *Red Blood Cell Storage Lesions and Related Transfusion Issues: A Canadian Blood Services Research and Development Symposium*, Transfusion Medicine Reviews 26/1 (2012), s. 68-84
 28. Blasi B., D'Alessandro A., Ramundo N., Zolla L., *Red blood cell storage and cell morphology*, Transfusion Medicine 22 (2012), s. 90-96
 29. van de Watering L. M. G., Brand A., *Effects of Storage of Red Cells*, Transfusion Medicine and Hemotherapy 35 (2008), s. 359-367
 30. Stasiuk M., Kijanka G., Kozubek A., *Zmiany kształtu erytrocytów i czynniki je wywołujące*, Postępy Biochemii 55/4 (2009), s. 425-433
 31. Mohanty J. G., Nagababu E., Rifkind J. M., *Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging*, Frontiers in Physiology 5/84 (2014), s. 1-6
 32. Lion N., Cretaz D., Rubin O., Tissot J. D., *Stored red blood cells: A changing universe waiting for its map(s)*, Journal of Proteomics 73 (2010), s. 374-385
 33. Maślanka K., *Fizjologiczna i patogenna aktywność mikrocząstek błon komórkowych*, Journal of Transfusion Medicine 3/1 (2010), s. 9-17
 34. Bosman G. J. C. G. M., Lasonder E., Groenen-Döpp Y. A. M., Willekens F. L. A., Werre J. M., *The proteome of erythrocyte-derived microparticles from plasma: new clues for erythrocyte aging and vesiculation*, Journal of Proteomics 76 (2012), s. 203-210
 35. Maślanka K., Michur H., Smoleńska-Sym G., *Mikrocząstki błon komórkowych*, Acta Haematologica Polonica 40 (2009), s. 481-491
 36. Simak J., Gelderman M. P., *Cell Membrane Microparticles in Blood and Blood Products: Potentially Pathogenic Agents and Diagnostic Markers*, Transfusion Medicine Reviews 20/1 (2006), s. 1-26
 37. Bosman G. J. C. G. M., Werre J. M., Willekens F. L. A., Novotný V. M. J., *Erythrocyte ageing in vivo and in vitro: structural aspects and implications for transfusion*, Transfusion Medicine 18 (2008), s. 335-347
 38. Rubin O., Cretaz D., Tissot J. D., Lion N., *Microparticles in stored red blood cells: submicron clotting bombs?*, Blood Transfusion 8 (2010), s. 31-38
 39. Rubin O., Cretaz D., Canellini G., Tissot J. D., Lion N., *Microparticles in stored red blood cells: an approach using flow cytometry and proteomic tools*, Vox Sanguinis 95 (2008), s. 288-297
 40. Canellini G., Rubin O., Delobel J., Cretaz D., Lion N., Tissot J. D., *Red blood cell microparticles and blood group antigens: an analysis by flow cytometry*, Blood Transfusion. 10/2 (2012), s. 39-45
 41. Gao Y., Lv L., Liu S., Ma G., Su Y., *Elevated levels of thrombin-generating microparticles in stored red blood cells*, Vox Sanguinis 105 (2013), s. 11-17
 42. Dani C., Martelli E., Bertini G., Pezzati M., Rossetti M., Buonocore G., Paffetti P., Rubaltelli F. F., *Effect of blood transfusions on oxidative stress in preterm infants*, Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition 89 (2004), s. F408-F411
 43. Hirano K., Morinobu T., Kim H., Hiroi M., Ban R., Ogawa S., Ogihara H., Tamai H., Ogihara T., *Blood transfusions increases radical promoting non-transferrin bound iron*

- in preterm infants*, Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition 84 (2001), s. F188-F193
44. Wardle S. P., Drury J., Garr R., Weindling A. M., *Effect of blood transfusion on lipid peroxidation in preterm infants*, Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition 86 (2002), s. F46-F48
45. Chattopadhyay R., De J., Bhowmick K., Chowdhury U., Chattopadhyay G., Chakraborty I., *Assessment of oxidative stress in recipients of chronic transfusion therapy*, Gomal Journal of Medical Sciences 11/1 (2013), s. 105-109
46. Walter P. B., Fung E. B., Killilea D. W., Jiang Q., Hudes M., Madden J., Porter J., Evans P., Vichinsky E., Harmatz P., *Oxidative stress and inflammation in iron-overloaded patients with β -thalassaemia or sickle cell disease*, British Journal of Haematology 135 (2006), s. 254-263
47. Sengsuk C., Tangvarasittichai O., Chantanaskulwong P., Pimanprom A., Wantaneeyawong S., Choowet A., Tangvarasittichai S., *Association of Iron Overload with Oxidative Stress, Hepatic Damage and Dyslipidemia in Transfusion-Dependent β -Thalassemia/HbE Patients*, Indian Journal of Clinical Biochemistry 29/3 (2014), s. 298-305

Stres oksydacyjny w przechowywanych składnikach krwi i po przetoczeniu koncentratu krwinek czerwonych w wybranych grupach biorców

Opracowane systemy przechowywania krwi i jej składników są niezbędne aby zapewnić dostępność tych składników pacjentom. Do najczęściej stosowanych w transfuzjologii składników krwi należą koncentraty krwinek czerwonych (KKCz), koncentraty krwinek płytkowych (KKP) oraz osocze świeżo mrożone (FFP). Podczas przechowywania KKCz w ośrodkach krwiodawstwa i krwiolecznictwa dochodzi do akumulacji zmian wynikających z czasu przechowywania, które mogą być przyczyną wystąpienia poważnych powikłań poprzetoczeniowych u biorcy. W przechowywanych krwinkach zachodzą zmiany metaboliczne, oksydacyjne i strukturalne. Metody leczenia z użyciem KKCz są powszechnie stosowane u wcześniaków, pacjentów na oddziałach intensywnej terapii oraz u pacjentów ze schorzeniami hematologicznymi, którzy wymagają wielokrotnych przetoczeń. Aktualny stan wiedzy dotyczący porównania parametrów stresu oksydacyjnego przed i po przetoczeniu KKCz w tych grupach pacjentów jest znikomy.

Słowa kluczowe: stres oksydacyjny, przetoczenie koncentratu krwinek czerwonych, reaktywne formy tlenu, transfuzjologia

Oxidative stress in stored blood components and after red blood cell unit transfusion in selected groups of recipients

The developed systems for storage of blood and its components are necessary to ensure the availability of these components to the patients. Red blood cell (RBC) components, platelet (PL) components and fresh frozen plasma (FFP) are among the most commonly used in transfusion medicine. During storage of the RBC units in blood banks an accumulation of the storage lesion occurs which can result in the unwanted transfusion-related complications to the recipient. As the red blood cells are stored, they undergo a series of metabolic, oxidative and structural changes. The RBC transfusion are widely used in premature infants, patients in intensive care units and patients with hematological diseases who require multiple transfusions. The current state of knowledge concerning the comparison of the parameters of oxidative stress before and after RBC transfusion in these patients is negligible.

Keywords: oxidative stress, red blood cell transfusion, reactive oxygen species, transfusion medicine

Angioarchitektonika guzów w oparciu o stosowane techniki mikrokorozyjne w obrazie SEM

1. Wstęp

Struktura guzów nowotworowych, czyli tkanek o zaistniałych zmianach morfo-patologicznych, stwarza specyficzne "mikrośrodowisko", które cechuje przede wszystkim obecność komórek nowotworowych, ale również naczyń krwionośnych i limfatycznych, fibroblastów, komórek układu odpornościowego oraz macierzy pozakomórkowej. Analizując rozwój guza we wczesnych etapach wzrostu substancje odżywcze oraz tlen są dostarczane do komórek nowotworowych w wyniku dyfuzji z otaczających zdrowych tkanek, natomiast w dalszych etapach, gdy wielkość guza jest na tyle duża, że zaczyna mu brakować tlenu i substancji odżywczych, dochodzi do utworzenia naczyń krwionośnych w rejonie zmienionej tkanki, czyli zachodzi proces neoangiogenezy. Naczynia nowotworowe są nieszczelne, kręte oraz posiadają wiele przewężeń i ślepych zakończeń. Nieprawidłowa budowa naczyń warunkuje spowolnienie przepływu oraz zaleganie krwi w naczyniach, a ponadto własne unaczynienie nowotworu warunkuje powstawaniu przerzutów nowotworowych, choć istnieją nowotwory o bardzo dużym unaczynieniu, ale nieposiadające zdolności tworzenia przerzutów np. mięśniaki macicy, które charakteryzuje wzrost miejscowy. W innym wariantcie mogą występować ogniska przerzutowe będące w stanie spoczynku nowotworu, natomiast kiedy dojdzie do pobudzenia angiogenezy, nowotwór staje się inwazyjny [1]. Celem pracy jest ocena przydatności stosowanych technik mikrokorozyjnych w aspekcie wizualizacji unaczynienia guzów nowotworowych przy wykorzystaniu skaningowej mikroskopii elektronowej.

2. Angiogeneza nowotworowa

Angiogeneza nowotworowa jest procesem polegającym na tworzeniu nowych naczyń krwionośnych i ma miejsce w przebiegu wielu nowotworów złośliwych. Początkowy rozwój komórek rakowych uzależniony jest od komórek sąsiednich, z których to czerpią substancje życiowe. Wzrost liczebności komórek nowotworowych,

¹ grzegorz.wrobel@ujk.edu.pl, Zakład Anatomii Prawidłowej i Funkcjonalnej, Instytut Nauk Medycznych, Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach

warunkuje potrzebę dodatkowego zapotrzebowania w substancje konieczne do dalszego rozwoju, w tej sytuacji tkanka nowotworowa indukuje fałszywe sygnały w stosunku do układu krwionośnego, w konsekwencji powstaje nowa sieć naczyń krwionośnych, jednocześnie zależna od tkanki nowotworowej. Angiogeneza nowotworowa odgrywa ważną rolę w procesach progresji i powstawania przerzutów [1].

Powstanie nowych naczyń krwionośnych może odbywać się na zasadzie waskulogenezy i angiogenezy. W przypadku pierwszej dotyczy to formowania naczyń krwionośnych z hemangioblastów, które powstają w wyspach krwionośnych woreczka żółtkowego zarodka. Skutkiem tego procesu jest wytworzenie podstawowego splotu naczyniowego. [2÷4]. Formowanie naczyń w dalszych etapach ich powstawania, następuje ze śródbłonna naczyń już istniejących i ma to związek z procesem angiogenezy. Przebieg procesu powstawania naczyń krwionośnych jest istotny w aspekcie embriogenezy, jak również odgrywa kluczową rolę w zjawiskach fizjologicznych i patofizjologicznych. [2, 4÷6]. Rozwój guza nowotworowego związany jest z procesem angiogenezy, która przyczynia się do jego wzrostu, a co ważniejsze w aspekcie klinicznym prowadzi do tworzenia przerzutów. Proces powstania nowych naczyń włosowatych w guzie nowotworowym nazwany został neoangiogenezą [5÷7].

W latach sześćdziesiątych XX wieku, badania nad procesem angiogenezy nowotworowej nabrały większego znaczenia, m. in. doktor Judah Folkman, jako pierwszy postawił hipotezę, że nowotwór złośliwy nie może się rozwinąć, jeśli nie zdoła wytworzyć odpowiednich linii zaopatrzeniowych, czyli sieci naczyń krwionośnych. Doświadczenie zawodowe Folkmana (chirurga) pozwalało znaleźć wiele dowodów potwierdzających jego hipotezę, ponieważ wszystkie guzy nowotworowe, które były przez niego operowane, cechowało obfite ukrwienie spowodowane obecnością delikatnych i poskręcanych naczyń krwionośnych. Wniosek Folkmana był jednoznaczny to kapilary dostarczają komórkom tlen i substancje odżywcze oraz usuwają zbędne produkty z procesów metabolicznych zachodzących w komórkach. Guz nowotworowy może przetrwać tylko wtedy, gdy zaopatrzony jest w liczne naczynia kapilarne. W warunkach fizjologicznych naczynia krwionośne powstają wtedy, gdy konieczne jest zaleczenie rany lub po menstruacji. Mechanizm „naturalnej” angiogenezy jest regulowany i pozostaje pod ścisłą kontrolą organizmu [6]. W przypadku komórek nowotworowych, to one posiadają zdolność do przejęcia kontroli na procesem angiogenezy, tak aby umożliwić wzrost guza nowotworowego. Folkman w oparciu o swoje badania sformułował następujące wnioski [5÷7]:

- mikroguzy, aby przejść w stadium nowotworu groźnego potrzebują utworzenia nowej sieci naczyń krwionośnych, które zapewnią mu w ten sposób substancje odżywcze;
- mikroguzy wytwarzają angiogennin, związek chemiczny, który zmusza naczynia krwionośne do zbliżenia się do guza i wytworzenia nowych odgałęzień;

- powstałe komórki rakowe, które rozprzestrzeniają się w całym ciele, tworząc przerzuty są groźne wtedy, gdy spowodują powstanie nowych naczyń krwionośnych;
- pierwotne guzy są źródłem przerzutów, aby wzmocnić swoją autonomię, produkują angiostatynę substancję, która hamuje rozwój nowych naczyń krwionośnych, w ten sposób doprowadzają do zmniejszenia wpływu odległych „kolonii” na organizm.

Jak wspomniano wyżej w przypadku tkanek nowotworowych proces angiogenezy wymyka się spod mechanizmów kontrolnych, a komórki guza nowotworowego w sposób ciągły uwalniają czynniki wzrostu, o charakterze angiogennym. Neowaskularyzacja zwiększa wzrost guza w wyniku perfuzji oraz działania parakrynnego, czyli wyprodukowaniu czynników wzrostu dla komórek nowotworowych w komórkach śródbłonna, natomiast sam proces neowaskularyzacji przebiega w następujących etapach [8÷9]:

- aktywacja komórek śródbłonna wewnątrz naczyń oraz rozszerzenie macierzystych naczyń;
- degradacja błony podstawnej i macierzy zewnątrzkomórkowej;
- migracja aktywowanych komórek śródbłonna z macierzystych naczyń w kierunku czynników stymulujących proces angiogenezy;
- proliferacja komórek śródbłonna;
- tworzenie światła i pętli nowych naczyń;
- formowanie błony podstawnej, włączenie pericytów i komórek mięśni gładkich (w przypadku niektórych naczyń).

W przypadku komórek śródbłonna, nowo powstałe pętle naczyniowe guza nowotworowego cechuje [10]:

- nieprawidłowy kształt;
- nieprawidłowy rozmiar;
- szerokie połączenia międzykomórkowe;
- nieregularność przebiegu naczyń;
- nieszczelną błonę podstawną.

W porównaniu doprawidłowych naczyń fizjologicznych, naczynia guza nowotworowego charakteryzuje niepełne zróżnicowanie tętniczo-żylnie i niecałkowite zróżnicowanie przestrzeni okołonaczyniowej, natomiast przepływ krwi jest czasowo i przestrzennie zmienny [11]. Proces neoangiogenezy regulują czynniki wytwarzane w komórkach guza i gospodarza, natomiast ich pochodzenie można podzielić na [4÷9]:

- endokryne (z krążenia);
- parakryne (z przyległego guza, podścieliska, komórek zapalnych czy macierzy pozakomórkowej);
- autokryne (z samych komórek śródbłonna).

Najczęściej wymieniane endogenne stymulatory i inhibitory angiogenezy przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Endogenne stymulatory i inhibitory angiogenezy

Endogenne stymulatory angiogenezy	Endogenne inhibitory angiogenezy
<ul style="list-style-type: none"> • grupa naczyniowo-śródłonkowego czynnika wzrostu (VEGF A, VEGF B, VEGF C, VEGF D, VEGF E); czynnik wzrostu łożyska; • grupa czynników wzrostu fibroblastów (FGF-1, FGF-2, FGF-3, FGF-4, FGF-5); <ul style="list-style-type: none"> • angiogenina; • angiopetyna-1 (Ang-1); • czynnik wzrostu hepatocytów; • transformujący czynnik wzrostu β (TGF-β); • insulinowy czynnik wzrostu (IGF); <ul style="list-style-type: none"> • czynnik tkankowy (TF); • płytkowy czynnik wzrostu (PDGF); • płytkowy czynnik wzrostu komórek śródłonka (PDECGF); <ul style="list-style-type: none"> • interleukina-8 (IL-8); <ul style="list-style-type: none"> • proliferyna; • prostaglandyna E (PG-E). 	<ul style="list-style-type: none"> • angiostatyna; • angiopoetyna-2 (Ang-2); <ul style="list-style-type: none"> • endostatyna; • restyna; • wazostatyna – inhibitor naczyniowo-śródłonkowego czynnika wzrostu (VEGF); • n-końcowy fragment czynnika płytkowego 4; • n-końcowy fragment prolaktyny; • proteina zależna od proliferyny (PRP); • fragment antytrombiny III; • rombospodyna-1 (TSP-1); • produkt trawienia osteopontyny. <ul style="list-style-type: none"> • interferon α/β.

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [8÷9,12÷14].

Głównym regulatorem angiogenezy i waskulogenezy, jest naczyniowo-śródłonkowy czynnik wzrostu (VEGF) – najsilniejszy i najbardziej swoisty czynnik wzrostu komórek śródłonka, nie wykazujący natomiast natomiast aktywności w stosunku do innych typów komórek [15÷16].

Wyniki licznych badań dowodzą o ekspresji VEGF w guzach nowotworowych takich narządów jak [17÷19]:

- płuca;
- piersi;
- żołądka;
- nerek;
- pęcherza moczowego;

- jajników;
- trzonu i szyjki macicy;
- w komórkach naczyń mięsaka;
- w komórkach glejaka wielopostaciowego.

W innych badaniach wykazano obecność związku pomiędzy stopniem unaczynienia nowotworu a złośliwością guza oraz ekspresją czynnika VEGF oraz podwyższonym jego stężeniu w surowicy u części chorych na raka (piersi, żołądka, płuca). Warto zaznaczyć, że pacjenci u których notowano wyższe stężenie VEGF w surowicy rokowali gorzej, w odniesieniu do pacjentów z niskim stężeniem [20, 21].

3. Uwidocznienie naczyń krwionośnych metodą korozyjną

W życiu codziennym termin „korozyja” jest z całą pewnością utożsamiany z procesami chemicznymi, jakim podlegają metale. Oczywiście konsekwencją tego jest powstawanie rdzy, jako kruchej, niejednolitej, brunatnej warstwy związków żelaza. Najogólniej ujmując „korozyja” to całokształt procesów niszczących dany materiał (tworzywo) doprowadzając w konsekwencji do jego rozpadu. Wyróżnia się wiele rodzajów korozyji np. atmosferyczna, chemiczna, biologiczna. Warto podkreślić, że pojęcie „korozyji” znalazło miejsce także w terminologii anatomicznej.

Pierwsze wzmianki o preparatach korozyjnych wykonywanych przez nastrzykiwanie i stopniowe wytrawianie były już na przełomie XV i XVI wieku. Za twórcę anatomicznych preparatów korozyjnych techniką nastrzykiwania uważa się holenderskiego przyrodnika i lekarza Jana Svammerdama żyjącego w latach 1637-1680, który zasłynął między innymi z odkrycia krwinek czerwonych w 1658, jajników – jako gruczołów rozrodczych oraz zastawek układu limfatycznego w 1664. Pierwsze preparaty korozyjne wykonane przez Svammerdama datuje się na rok 1672 a więc XVII wiek [22].

Stosowanie metody korozyjnej umożliwia dokładny opis anatomiczny unaczynienia wybranego narządu, biorąc oczywiście pod uwagę również ocenę stosunków przestrzennych w obrębie danej struktury anatomicznej. Wyniki badań w oparciu o metodę korozyjną, umożliwią przede wszystkim poznanie rozmieszczenia naczyń krwionośnych w ścianach narządów jamistych – ma to istotne znaczenie w kontekście badań czynnościowych i klinicznych [23].

Opis metody sprowadza się do względnie prostych czynności polegających na wypełnieniu (materiałem iniekcyjnym) naczyń krwionośnych, przewodów czy narządów jamistych, a następnie wytrawianiu tkanek miękkich i otrzymaniu odlewów badanych struktur.

Materiały używane do wypełniania można podzielić na kilka grup [23]:

- masy na bazie wosków lub kitów;
- łatwotopliwe stopy metali;

- masy nitrocelulozowe;
- tworzywa oparte na kauczuku;
- żywice syntetyczne.

Etapy postępowania w przypadku stosowania metody korozyjnej przedstawiają się następująco [23, 24]:

- właściwe przygotowanie narządu (tkanki), z którego będzie sporządzony preparat korozyjny;
- wybór materiału (masy wypełniającej) do nastrzyknięcia;
- właściwe nastrzyknięcie, czyli wypełnienie struktur, których odlew zamierza się uzyskać;
- utwardzenie masy wypełniającej;
- wytrawianie tkanek miękkich (korozyja);
- ostateczne wykończenie preparatu i analiza szczegółów budowy.

Zachowanie precyzyjności wobec wykonywanych czynności na każdym etapie uzyskiwania odlewów korozyjnych jest bardzo ważna. W przypadku pierwszych czynności w przygotowaniu narządu do nastrzyknięcia, trzeba dokładnie wypłukać przewody z zawartości np. krew z naczyń krwionośnych, do których będzie wprowadzana masa iniekcyjna.

Wybór masy wypełniającej, zależy od [24]:

- celu badania;
- możliwości wypełniania pożądaných struktur;
- techniki nastrzyknięcia;
- utwardzenia masy;
- sposobu oceny preparatu.

W przypadku stosowania mas opartych na kauczuku, lateksu, zalecana jest obserwacja w wodzie, wynika to z elastyczności i giętkości odlewu, który łatwo ulega odkształceniu. Do wytrawiania tkanek miękkich (korozyji) używa się, w odpowiednich stężeniach, zasady (ług potasowy) lub kwasu solnego albo specjalnych roztworów do korozyji [23, 24]. Wspomniane wyżej sposoby postępowania są obecnie powszechnie stosowane, w celu badania przebiegu i rozkładu gałęzi naczyń krwionośnych w aspekcie unaczynienia narządów. Z upływem czasu technika korozyjna ulegała pewnym modyfikacjom jak również zastosowaniu nowych (lepszých) rozwiązań. W szczególności wiąże się to z odpowiednim do oczekiwanych rezultatów, opracowaniem składu chemicznego materiału wypełniającego badane narządy. W XX wieku pojawiły się w użyciu nowe składniki mas iniekcyjnych, do których należy zaliczyć: metakrylan metylu, polichlorek winylu oraz żywice poliestrowe. Z uwagi na specyficzne właściwości fizyko-chemiczne tych substancji, możliwe było efektywne i dokładniejsze uwidocznienie oraz utrwalenie bardzo drobnych struktur anatomicznych

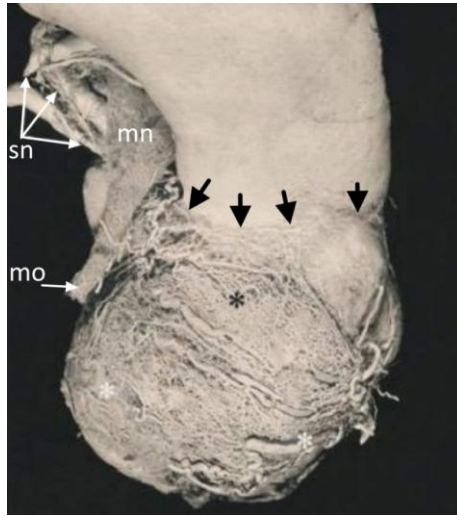
w układzie naczyniowym, drogach żółciowych czy drzewie oskrzelowym. Współcześnie do najbardziej popularnych substancji do nastrzykiwania, dostępnych pod nazwą fabryczną, należą [25÷27]:

- Mercox CL-2 R (żywica o niskiej lepkości);
- Technovit – MMA (metakrylan metylu);
- PU4ii (żywica, utwardzacz, pigment);
- Microfil (silikon);
- Vultex (lateks z wulkanizowany i stabilizowany utleniaczami);
- Geon (lateks naturalny);
- Cementex (lateks naturalny).

4. Angioarchitektonika guzów w obrazie SEM

Problematyka rozwoju unaczynienia oraz organizacji mikrokrążenia w obrębie tkanek nowotworowych, zwłaszcza guzów litych jest przedmiotem licznych badań. Mikrokrążenie w guzach ma istotne znaczenie dla metabolizmu oraz swoistego zachowania się tkanki nowotworowej. Gdy zachodzą procesy wzrostowe guza, równocześnie bardzo często pojawia się martwica w jego części centralnej. Wynika to z postępującej niewydolności angiogenetycznej oraz czynnościowej sieci naczyń guza oraz degeneracji naczyń w guzie. Jednoczesne występowanie obu tych procesów, charakterystycznych dla systemu naczyniowego guzów sprawia, że układ przestrzenny żywej tkanki guza nowotworowego odtwarza w zasadzie wzorzec przestrzenny czynnego łożyska naczyniowego. Nie budzi wątpliwości fakt, że w przypadku blokowania angiogenezy jest możliwe zahamowanie wzrostu nie tylko guza pierwotnego, lecz także przerzutów [28÷32].

Przygotowanie odlewu korozyjnego naczyń w aspekcie analizy unaczynienia w obrazie SEM, przebiega w etapach opisanych w rozdziale poprzednim, z tym jednak wyjątkiem, że dodatkowo stosuje się pokrycie odlewu metalem (złotem lub platyną i złotem), stwarza to możliwość dokonania dokładnej oceny organizacji sieci naczyniowej w różnych narządach, na poziomie mikronaczyń (Rys. 1).



Rysunek 1. Obraz spod mikroskopu skaningowego przedstawiający guz nowotworowy rozwijający się w dolnej części nerki człowieka. Rozległość zmiany nowotworowej uwarunkowana jest obecnością naczyń, pokrywających guza, szczególnie tych o małej średnicy. Czarne strzałki stanowią granicę między chorą a zdrową częścią narządu. Na fotografii zaznaczone zostały, również prawidłowe naczynia miedniczki nerkowej (mn) i moczowodu (mo) oraz duże naczynia szypuły nerkowej (sn) [33]

W badaniach doświadczalnych na zwierzętach poszukuje się rozwiązań w wielu kierunkach związanych z procesami angiogenezy nowotworowej, szczególnie w znalezieniu odpowiednich leków, które pozwoliłyby skutecznie zahamować rozwój nowotworu, a zarazem uniemożliwią wyodrębnienie się klonów komórek opornych na leczenie [34, 35].

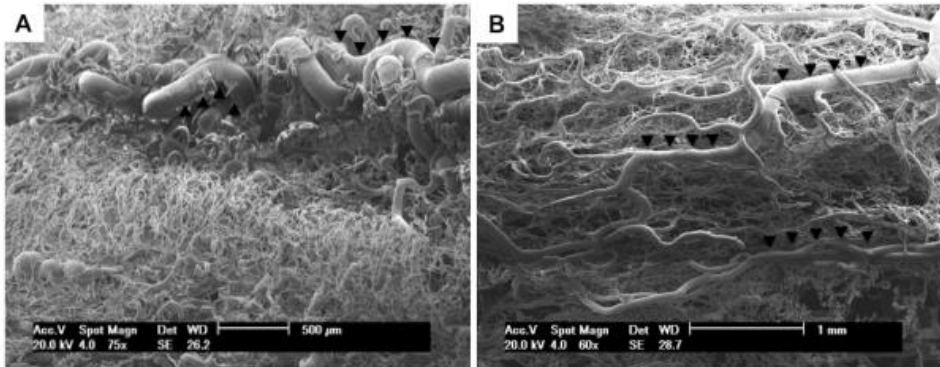
Model indukcji raka płaskonabłonkowego związkami chemicznymi 7,12-dimetylobenzantracenenem (DMBA) w torebce policzkowej z chomika syryjskiego (*Mesocricetus auratus*) stosuje się od ponad pięćdziesięciu lat w badaniach kancerogenezy (Rys. 2). Torebka policzkowa chomika jest doskonałym modelem do badań anatomicznych i funkcjonalnych zmian naczyniowych, które występują w błonie śluzowej podczas kancerogenezy chemicznej [34÷36].



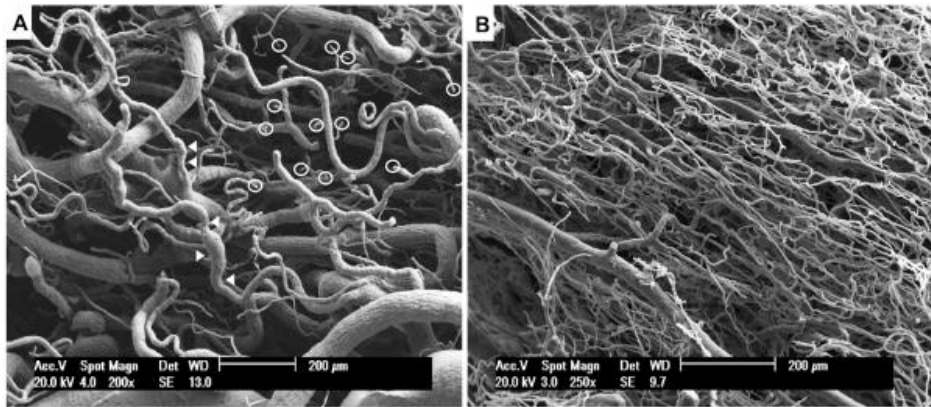
Rysunek 2. Wyreparowana torebka policzkowa z chomika syryjskiego (*Mesocricetus auratus*) [37]

Historia badań nad 7,12-dimetylobenzantracenenem ma swój początek, w 1775 roku, gdy Percival Pott stwierdził częstsze występowanie raka skóry moszny u kominarzy, zwracając uwagę na przyczynę w postaci wcierania sadzy [38]. Dopiero po 135 latach Yamagiwa i Ichikawa wywołali po raz pierwszy raka skóry u zwierząt smarując uszy królików sadzą, co 2-3 dni, przez ponad 12 miesięcy [39]. Pierwszym znanym karcynogenem chemicznym był dibenzoantracen, którego wyizolowano ze smoły pogazowej w 1930 roku. Następnie wyodrębniono lub zsyntetyzowano wiele innych policyklicznych węglowodorów aromatycznych o właściwościach rakotwórczych (prokarcynogenów). Do najbardziej znanych i silnie działających należy m.in.: 7,12-dimetylobenzantracen [40].

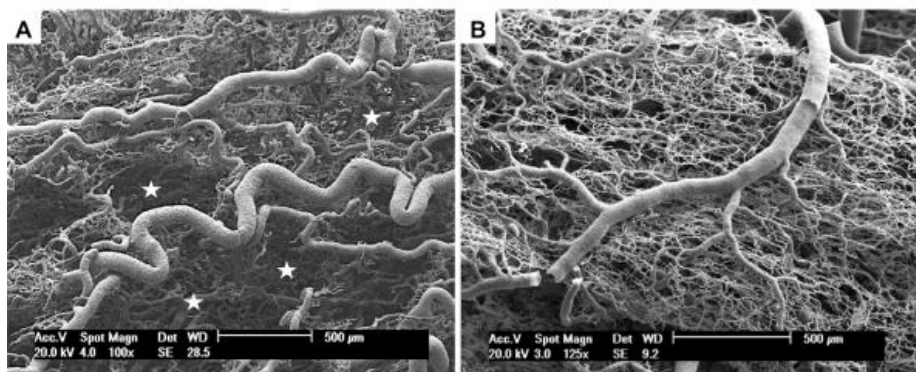
W badaniach Bampiego i współpracowników [36] poddano doświadczeniu sześć samców (*Mesocricetus auratus*), zwierzęta podzielono losowo na dwie grupy doświadczalne, z których każda składa się z trzech osobników. Wszystkim zwierzętom podawano DMBA w prawą torebkę policzkową przez okres 55 dni. U wszystkich osobników lewa torebka policzkowa stanowiła kontrolę ujemną. Po indukcji nowotworu trzy zwierzęta leczono bewacyzumabem dwa razy na tydzień przez 30 dni. Pozostałe zwierzęta nie były traktowane bewacyzumabem, a prawą torebkę uznawano, jako kontrolę. Głównym celem tych badań, była ocena angioarchitektoniki raka płaskonabłonkowego przy użyciu metody korozyjnej naczyń w obrazie SEM. Analiza w mikroskopie elektronowym wykazała istotne zmiany w układzie sieci naczyń krwionośnych (Rys. 3-5).



Rysunek 3. (A) Znaczna krętość naczyń krwionośnych stwierdzona w guzach kontrolnych – (czarne grotki); (B) Naczynia krwionośne (wskazane czarnymi grotkami) stały się bardziej wydłużone po zastosowaniu bewacyzumabemu [36]



Rysunek 4. (A) Zmiana kalibru naczyń krwionośnych (białe strzałki), duża liczba o ślepych zakończeniu (kółka) i kręty przebieg naczyń włosowatych. (B) Sieć naczyń guza leczonych bewacyzumabem, w których brak zmian (zmiany są rzadkością) [36]



Rysunek 5. Zmiany w strukturze rozmieszczenia sieci naczyń krwionośnych po stosowaniu bewacizumabemu. (A) niejednorodność sieci naczyń krwionośnych nowotworów niepoddanych leczeniu, gwiazdki wskazują strefy pozbawione naczyń; (B) wyraźna jednorodność sieci naczyń nowotworów guzów traktowanych bewacizumabem. [36]

5. Podsumowanie

W aspekcie złożonej problematyki zagadnienia, jak również w odniesieniu do wyników prac badawczych z zakresu unaczynienia powstałego na drodze neoangiogenezy, z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej skaningowej nasuwa się następujący wniosek: stosowanie metody korozyjnej w połączeniu z możliwościami mikroskopii elektronowej skaningowej do badań nad mikrounaczynieniem tkanek nowotworowych stanowi nieocenione źródło informacji nie tylko w aspekcie naukowym, ale również klinicznym i diagnostycznym.

Literatura

1. Rice J. J., Gerwins P., Kilarski W. W., *Mechanisms of Angiogenesis: Perspectives from Antiangiogenic Tumor Therapies*, *Current Angiogenesis* 1(2012), s.139-147
2. Battegay E. J., *Angiogenesis mechanistic insights, neovascular diseases*, *Mol Med* 73(1995), s. 333-346
3. Dvorak H. F., *VPF/VEGF and the angiogenic response*, *Semin Perinatol* 24(2000), s.75-78
4. Giordano F. J., *Angiogenesis: mechanisms, modulation, and targeted imaging*, *J Nucl Cardiol* 6(1999), s. 664-671
5. Folkman J., Shing Y., *Angiogenesis*, *J Biol Chem* 267(1992) s.10931-10934
6. Folkman J., *Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease*, *Nat Med* 1(1995), s. 27-31
7. Folkman J., *Clinical applications of research on angiogenesis*, *N Engl J Med* 333(1995), s. 1757-1762

8. Carmeliet P., Jain R. K., *Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis*, Nature 473/7347(2011), s. 298-307
9. Juczevska M., Chyczewska E., Naumnik W., Niklińska W., *Udział komórek tucznych w angiogenezie*, Postępy Biologii Komórki 27(3) (2000), s. 343-358
10. Denekamp J., *The tumor microcirculation as a target in cancer therapy: a clearer perspective*, Eur J Clin Invest 29(1999), s. 733-736
11. Hesselius P., Bergqvist M., Brattström D., Larsson A., Brodin O., Wagenius G., *VEGF measured in serum and its correlation to clinical parameters in patients with non-small cell lung cancer*, Lung Cancer 29(2000), s. 255
12. Fox S. B., Gasparini G., Harris A. L., *Angiogenesis: pathological, prognostic, and growth-factor pathways and their link to trial design and anticancer drugs*, Lancet Oncol (2001), s. 278-290
13. Kerbel R. S., *Tumor angiogenesis: past, present and the near future*, Carcinogenesis 21(2000), s. 505-515
14. Reynolds A. R., Hart I. R., Watson A. R., Welti J. C., Silva R. G., Robinson S. D., Da Violante G., Gourlaouen M., Salih M., Jones M. C., Jones D. T., Saunders G., Kostourou V., Perron-Sierra F., Norman J. C., Tucker G. C., Hodivala-Dilke K. M., *Stimulation of tumor growth and angiogenesis by low concentrations of RGD-mimetic integrin inhibitors*, Nat Med. 15(2009), s. 392-400
15. Dvorak H. F., *VPF/VEGF and the angiogenic response*, Semin Perinatol 24(2000), s.75-78
16. Veikkola T. Karkkainen M., Claesson-Welsh L., Alitalo K., *Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors*, Cancer Res 60(2000), s. 203-212
17. Liao M., Wang H., Lin Z., Feng J., Zhu D., *Vascular endothelial growth factor and other biological predictors related to the postoperative survival rate on non- small cell lung cancer*, Lung Cancer 33(2001), s. 125-132
18. Fontanini G., Faviana P., Lucchi M., Boldrini L., Mussi A., Camacci T., Mariani M. A., Angeletti C. A., Basolo F., Pingitore R. A, *High vascular count and overexpression of vascular endothelial growth factor are associated with unfavourable prognosis in operated small cell lung carcinoma*, Br J Cancer 86(2002), s. 558-563
19. Fox S. B., Gasparini G., Harris A. L., *Angiogenesis: pathological, prognostic, and growth-factor pathways and their link to trial design and anticancer drugs*, Lancet Oncol (2001) s. 278-290
20. Kaya A., Ciledag A., Gulbay B. E., Poyraz B. M., Celik G., Sen E., Savas H., Savas I., *The prognostic significance of vascular endothelial growth factor levels in sera of non-small cell lung cancer patients*, Respir Med. 98(2004), s. 632-636
21. Park S. H., Lee S. S., *The relationship between serum VEGF concentration and prognosis of lung cancer*, Korean J Intern Med. 18(2003), s. 207-211
22. Orly R., *Short history of vascular injections, with special reference to the heart vessels*, Journal of Plastination. 13(1)(1998), s. 7-11
23. Ślusarczyk K., Skrzelański S., Niżyński J., Kędzia A., Porc M., Beck-Ciszek B., Krzemiński T. F., *Uwidacznianie naczyń krwionośnych zmodyfikowaną metodą korozyjną*, Chirurgia Polska. 8(3)(2006), s.179-183

24. Djonov V., Burri P. H., *Corrosion cast analysis of blood vessels*, In: Augustin H. G., (red.) *Methods in endothelial cell biology*, Berlin, Heidelberg: Springer. (2004), s. 357-369
25. Giuvărășteanu I., *Scanning electron microscopy of vascular corrosion casts – standard method for studying microvessels*, Romanian Journal of Morphology and Embryology 48(3)(2007), s. 257-261
26. Ninomiya H., Inomata T., *Microvasculature of the mouse eye: scanning electron microscopy of vascular corrosion casts*, Journal of Experimental Animal Science 43(2006), s.149-159
27. Krucker T., Lang A., Meyer E. P., *New Polyurethane-based material for vascular corrosion casting with improved physical and imaging characteristics*, Microsc Res Tech 69(2006), s. 138-147
28. Miodoński A. J., Bugajski A., Litwin J. A., Piasecki Z., *Vascular architecture of human urinary bladder carcinoma: a SEM study of corrosion casts*, Virchows Arch. 433(1998), s. 145-151
29. Konerding M. A., Miodoński A. J., Lamatschwandtner A., *Microvascular corrosion casting in the study of tumor vascularity: a review*, Scanning Microsc 9(4)(1995), s. 1233-1243
30. Fukumura D., Duda D. G., Munn L. L., Jain R. K., *Tumor microvasculature and microenvironment: novel insights through intravital imaging in pre-clinical models*, Microcirculation 17(3)(2010), s. 206-225
31. Jain R. K., *Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy*, Science 307(5706)(2005), s. 58-62
32. Nagy J. A., Chang S. H., Shih S. C., Dvorak A. M., Dvorak H. F., *Heterogeneity of the tumor vasculature*, Semin Thromb Hemost 36(3)(2010), s. 321-331
33. Dulak J., *Zagłodzić raka*, Wiedza i Życie 6(1998), s. 36-40
34. Mognetti B., Di Carlo F., Berta G. N., *Animal models in oral cancer research*, Oral Oncol 42(5)(2006), s. 448-460
35. Kim S., *Animal models of cancer in the head and neck region*, Clin Exp Otorhinolaryngol 2(2)(2009), s. 55-60
36. Bampi V. F., Oliveira J. R., Encarnação Fiala Rechsteiner S. M., Tavares Rheingantz M. G., Minello L. F., Braga da Silva J. L., Oliveira de Oliveira L. B., *Scanning Electron Microscopy of vascular corrosion cast – a bench-to bedside approach in cancer research*, Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology (A. Méndez-Vilas, Ed.), 5920120, s. 239-244
37. http://www.kongyuensing.com/pic/20090227Everted_Cheek_Pouch_Tumour_Excised_Dwarf_Hamster_ToaPayohVets.jpg (dostęp 12.01.2017 r.)
38. <http://www.alpmedical.info/breast-cancer-2/noxious-theories.html> (dostęp 12.01.2017r.)
39. Fujiki H. Gist of Dr. Katsusaburo Yamagiwa's papers entitled "Experimental study on the pathogenesis of epithelial tumors" (I to VI reports). Cancer Sci. 105(2)(2014), s. 143-149. doi: 10.1111/cas.12333
40. Pawłowski A., Lea P. J., *Nevi and melanoma induced by chemical carcinogens in laboratory animals: similarities and differences with human lesions*, J Cutan Pathol. 10(2)(1983), s.81-110

Angioarchitektonika guzów w oparciu o stosowane techniki mikrokorozyjne w obrazie SEM

Problematyka rozwoju unaczynienia oraz organizacji mikrokrążenia w obrębie tkanek nowotworowych, zwłaszcza guzów litych jest przedmiotem licznych badań. Rozwój guza związany jest z procesem angiogenezy, która przyczynia się do jego wzrostu, a co ważniejsze w aspekcie klinicznym umożliwia tworzenie przerzutów. Celem pracy jest ocena przydatności stosowanych technik mikrokorozyjnych w aspekcie wizualizacji unaczynienia guzów nowotworowych przy wykorzystaniu skaningowej mikroskopii elektronowej. Analiza odlewu korozyjnego naczyń w aspekcie rozkładu przestrzennego unaczynienia w obrazie SEM, stwarza możliwość dokonania dokładnej oceny organizacji sieci naczyniowej w różnych narządach, na poziomie mikronaczyń. Naczynia nowotworowe są nieszczelne, kręte oraz posiadają wiele przewężeń i ślepych zakończeń. Stosowanie metody korozyjnej w połączeniu z możliwościami mikroskopii elektronowej skaningowej do badań nad mikrounaczynieniem tkanek nowotworowych stanowi nieocenione źródło informacji nie tylko w aspekcie naukowym, ale również klinicznym i diagnostycznym.

Słowa kluczowe: nowotwór, unaczynienie, mikroskopia elektronowa skaningowa (SEM)

Angioarchitectonic tumors, based on techniques used microcorrosion in the image by scanning electron microscopy

The issue of the development of vascular microcirculation and organizations within the cancerous tissue, especially solid tumors is the subject of numerous studies. The tumor associated with angiogenesis, which contributes to the growth, and more importantly allows the clinical aspect metastasis. The aim of the study was to evaluate the usefulness of techniques microcorrosion in terms of visualization of vascular tumors using electron microscopy. Analysis of cast corrosion vessels in terms of spatial distribution of vascularization in the SEM image, creates the possibility of an accurate assessment of the organization of the vascular network in various organs, at the level of the tumor microvessel Dishes are leaking, winding and have a lot of bottlenecks and dead-ends. The use of corrosive method, combined with the capabilities of scanning electron microscopy to study the microvasculature of tumor tissues is an invaluable source of information, not only in terms of scientific, but also clinical and diagnostic.

Keywords: cancer, vascularization, scanning electron microscopy (SEM)

Zwierzęce modele chorób neurodegeneracyjnych – choroba Alzheimerera

1. Wstęp

Zwierzęce modele chorób neurodegeneracyjnych odgrywają istotną rolę w badaniach nad poznaniem mechanizmów patogenezы wielu chorób i stanowią niezbędną przestrzeń badawczą dla testowania oraz tworzenia nowych opcji terapeutycznych. Współcześnie wykorzystywanie zwierząt w badaniach naukowych budzi wiele kontrowersji na tle etycznym. Należy jednak podkreślić znaczenie tych badań, bez których nie byłoby możliwe podjęcie kluczowych etapów w procesie leczenia wielu chorób, jak również nie byłoby postępu leczniczego w wielu dziedzinach. Doświadczenia na zwierzętach są istotnym elementem poznawania fizjologii ludzkiego organizmu oraz poszukiwania sposobów zapobiegania patologicznym zmianom.

Badania w oparciu o modele zwierzęce są wielokierunkowe, natomiast warto zwrócić szczególną uwagę na badania dotyczące wad rozwojowych u dzieci, mechanizmu powstawania nowotworów, czy też chorób neurodegeneracyjnych wieku starczego, takich jak choroby Parkinsona czy Alzheimerera. Obecnie nie ma takich rozwiązań, które umożliwiłyby całkowicie zastąpienie organizmów zwierzęcych w badaniach medycznych, ale w niektórych etapach badań ich udział można ograniczać, wykorzystując modele komputerowe albo specjalnie wyselekcjonowane grupy komórek, tzw. linie komórkowe używane przede wszystkim do testowania nowych leków, jak również w początkowych etapach badań dotyczących chorób genetycznych i nowotworowych. Badania na zwierzętach są podstawowym i najlepszym sposobem oceny wpływu różnych substancji chemicznych na organizm człowieka, pozwalają przewidzieć skutki ich oddziaływania, poznać przyczyny powstałej odpowiedzi i zachowania organizmu. Współcześnie obowiązujące prawo ogranicza do minimum cierpienia zwierząt, a prowadzenie doświadczeń z ich udziałem nie można podejmować bez zgody komisji etycznej.

Celem pracy jest próba oceny przydatności zwierząt doświadczalnych w modelowaniu procesów chorobowych o podłożu neurodegeneracyjnym na przykładzie choroby Alzheimerera, odnosząc się do aktualnego stanu wiedzy.

¹grzegorz.wrobel@ujk.edu.pl, Zakład Anatomii Prawidłowej i Funkcjonalnej, Instytut Nauk Medycznych, Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach

2. Aspekty prawne regulujące doświadczenia na zwierzętach

Nowa ustawa o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych, która weszła w życie 27 maja 2015 roku dostosowuje polskie przepisy prawne do dyrektywy 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. Z chwilą wejścia w życie tej ustawy, jednostki hodowlane i doświadczalne oraz dostawcy prowadzący działalność na podstawie uchylonej ustawy z 21 stycznia 2005 roku o doświadczeniach na zwierzętach stają się odpowiednio hodowcami, użytkownikami oraz dostawcami, wyszczególnionymi w rejestrze przez ministra nauki i szkolnictwa wyższego. W odniesieniu do dyrektywy unijnej, w której podkreślono przede wszystkim dążenie do poprawy dobrostanu zwierząt doświadczalnych poprzez podwyższanie minimalnych norm dla ochrony zwierząt w sposób zgodny z najnowszymi osiągnięciami naukowymi, najważniejsze staje się zminimalizowanie u zwierząt odczuwania bólu, cierpienie i dyskomfortu związanego z przeprowadzanymi badaniami. W obowiązującej ustawie, zwrócono uwagę na konieczność ciągłego odświeżania i uaktualniania wiedzy, w prowadzeniu doświadczeń poprzez wprowadzenie nowych wymagań obejmujących wykształcenie i niezbędne kwalifikacje osób związanych z obsługą doświadczeń na zwierzętach. W ustawie pojawił się również zapis, który obliuguje użytkowników do powołania w jednostce zespołu doradczego ds. dobrostanu zwierząt [1÷3].

W doświadczeniach wykorzystywane są tylko zwierzęta nabyte legalnie, czyli z hodowli prowadzonych stosownie do zasad zgodnych z obowiązującym prawem, których wykaz określa Krajowa Komisja Etyczna ds. Doświadczeń na Zwierzętach. Niedozwolone jest prowadzenie doświadczeń na zwierzętach, które powodują u nich ból i cierpienie, dlatego aby je ograniczyć stosuje się odpowiednie leki znieczulające i przeciwbólowe. W przypadku, gdy zwierzę nie wymaga wybudzenia po zakończeniu doświadczenia, powinno być ono uśmiercone przed jego wybudzeniem z narkozy, natomiast w momencie, gdy badania wymagają, aby zwierzę zostało wybudzone, konieczne jest ograniczenie jego dyskomfortu oraz bólu, po przez zapewnienie mu pełnej opieki pooperacyjnej [4].

W odniesieniu do osób uczestniczących w doświadczeniach na zwierzętach, należy zwrócić uwagę, że mogą je prowadzić tylko osoby o odpowiednich kwalifikacjach, czyli posiadają indywidualne, numerowane zezwolenia uzyskane od kierownika jednostki doświadczalnej i Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach [5].

Zaplanowanie badań stanowi pierwszy bardzo ważny etap w doświadczeniach na zwierzętach, następnie przedkłada się gotowy projekt i wniosek do Komisji Etycznej Badań na Zwierzętach. Zgodę na przeprowadzenie badań na zwierzętach wydaje Lokalna Komisja Etyczna ds. Doświadczeń na Zwierzętach, która działa na podstawie Ustawy o doświadczeniach na zwierzętach z dnia 21 stycznia 2005 roku i podlega Krajowej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach. Badania z wykorzystaniem zwierząt, prowadzone są w specjalnie przystosowanych do tego celu ośrodkach, stosownie do art. 16 ust. 1 wyżej wymienionej Ustawy, których wykaz aktualizuje Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego [2].

W badaniach doświadczalnych na zwierzętach (hodowanych w ściśle określonych warunkach atmosferycznych i odpowiednio karmionych) najczęściej używane są [5] :

- myszy;
- szczury;
- świnki morskie;
- chomiki;
- króliki;
- koty;
- psy.

W Polsce prowadzone są badania doświadczalne na zwierzętach, których wykaz dostępny jest na stronie Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Wykaz zwierząt laboratoryjnych hodowanych w Polsce, wykorzystywanych do badań z zakresu neurologii przedstawia tabela poniżej.

Tabela 1. Wykaz zwierząt laboratoryjnych hodowanych w Polsce, wykorzystywanych do badań neurologicznych

Szczep/ stado/rasa	Charakterystyka (przydatność do różnego rodzaju doświadczeń, uwarunkowania genetyczne)	Ośrodek
1	2	3
MYSZY – SZCZEPY WSOBNE		
C57Bl/10Tar	Badania nad chorobami neuro- degeneracyjnymi	Pracownia Zwierząt Laboratoryjnych, AM, Warszawa
MYSZY – SPECJALNE MODELE		
C57BL/6-Tg (Thy1;APP)	z prekursorem beta-amyloidu – model choroby Alzheimer	Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa
FVB-Tg (Thy1; APP LD2/B6)		
FVB-Tg (Thy1; PS1)	z genem preseniliny 1 – model choroby Alzheimer do terapii eksperymentalnych, samce agresywne	Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa
B6C3H-Tg (PrP-RW tau) ^{R406W}	z transgenem TAU pod mysim promotorem białka prionowego; model tauopatii występującej w chorobie Alzheimer	Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa

SZCZURY – SZCZEPY WSOBNE		
LEW/HanLod	Badania neurologiczne, transplantacyjne, immunologiczne, fizjologiczne, embriologiczne	Instytut – Centrum Zdrowia Matki Polki, Łódź
WAG/Amk	Badania podstawowe, badania funkcji neuronów kory; transdukcja sygnału od receptora opioidowego do kanałów jonowych	Pracownia Zwierząt Laboratoryjnych, AM, Warszawa
SZCZURY – STADA NIEKREWNIACZE		
Kr:SPRD	Badania farmakologiczne, neurologiczne, psychiatria	Uniwersytecki Szpital Dziecięcy, Kraków
Lod:WIST	Badania żywieniowe, toksykologiczne, farmakologiczne, neurologiczne	Instytut – Centrum Zdrowia Matki Polki, Łódź
Kr:WISTAR	Badania toksykologiczne, farmakodynamika, neurologia	Uniwersytecki Szpital Dziecięcy, Kraków
GERBILE		
Cmd:(MON)	Linia wrażliwa na ischemię, do eksperymentów neurochirurgicznych	Instytut – Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa
Cmd: BR		
KOTY		
kot europejski	Model neurofizjologiczny	Instytut Biologii Doświadczalnej PAN, Warszawa

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [6].

3. Choroba Alzheimera

Wieloletnie obserwacje związane ze zjawiskiem starzenia się społeczeństwa, skłaniają do ciągłej potrzeby monitorowania procesów z tym związanych. W Polsce w końcu 2014 roku osób powyżej 60 roku życia było 8,5 mln, to ponad 22 % całej populacji, natomiast biorąc pod uwagę prognozę Głównego Urzędu Statystycznego w 2050 roku, osób powyżej 60 roku życia ma być ponad 40 % [7].

W związku z powyższym problem odpowiedniej diagnostyki oraz terapii schorzeń wieku starczego nabiera ogromnej wagi. Choroba Alzheimera (AD – ang. *Alzheimer's disease*), która jest przykładem „otępienia starczego”, stanowi najczęstszą przyczynę demencji. W odniesieniu do populacji osób w wieku 60 lat częstość występowania

choroby Alzheimer szacuje się na poziomie 1%, natomiast w populacji osób w wieku 90 i więcej lat nawet do 50 % [8].

W ogólnym ujęciu choroba ta spowodowana jest przez utratę wielu typów komórek nerwowych w korze mózgowej, a sam proces może zacząć się około 35 roku życia człowieka, natomiast znaczące objawy występują najczęściej w momencie, gdy utrata neuronów osiąga wartości w przedziale od 60% do 75% zaniku komórek nerwowych mózgowia, które nie ma już możliwości wyrównania braków a tym samym przekracza próg wydolności mechanizmów poznawczych [9, 10].

Neurochemiczne przyczyny choroby Alzheimer, dotyczą śmierci komórek nerwowych na skutek formowania się nienormalnych agregatów białkowych, tworzących struktury włóknkowe (płatki neurofibrylarne) wypełniające neurony oraz blaszki starcze, umiejscowione na zewnątrz neuronów. Przyczyną otępień pojawiających się w chorobie Alzheimer jest w pierwszym etapie uszkodzenie neuronów cholinergicznym, najwcześniej atypowe białka pojawiają się w neuronach glutamatergicznych kory śródmózgowej, a następnie hipokampa i kory asocjacyjnej, czyli w strukturach odpowiedzialnych za pamięć i percepcję. W wyniku rozwoju choroby następuje wymieranie neuronów glutamatergicznych, cholinergicznym, później serotoninowych oraz noradrenergicznych, natomiast najoporniejsze są neurony gabergiczne. Jedną z najważniejszych przyczyn zaburzeń poznawczych, będących kluczowym objawem choroby Alzheimer, jest niewydolność przekazywania sygnałów w układzie cholinergicznym przodomózgowia, spowodowana utratą neuronów cholinergicznym. Wspomniany wyżej układ jest odpowiedzialny za procesy uwagi oraz przywoływania zmagazynowanych uprzednio śladów pamięciowych [11÷13].

Warto zwrócić uwagę na inne neurony silnie uszkodzane, używające, jako sygnału noradrenaliny i serotoniny, skutki tych uszkodzeń mogą warunkować zaburzenia psychiatryczne i zaburzenia zachowania takie jak [14]:

- urojenia;
- agresja słowna;
- agresja fizyczna;
- wrzaski;
- nieprzystojność;
- wulgarność itp.

Zmiany neurodegeneracyjne dotyczą przede wszystkim kory mózgowej i hipokampa, jak również ciała migdałowatego, układu cholinergicznym przodomózgowia oraz jąder pnia mózgu. W kwestii zaburzeń dotyczących pamięci ma to związek z uszkodzeniem hipokampa oraz kory skroniowej przysrodkowej. Zmiany neuropatologiczne w przypadku kory nowej warunkują dysfunkcje poznawcze, zaburzenia lękowe, zależne

głównie od ciała migdałowatego, natomiast uszkodzenie układu cholinergicznego przodomózgowia skutkuje pojawieniem się zaburzeń uwagi i uczenia [15÷17].

Choroba Alzheimer'a pojawia się spontanicznie, choć znane jest również podłoże genetyczne rodzinnej postaci tej choroby (*familiar Alzheimer's disease* – FAD), warunkują ją autosomalne mutacje dominujące w 3 genach: APP (amyloid precursor protein), preseniliny 1 (PS1) i preseniliny 2 (PS2). W podstawowym obrazie histopatologicznym obserwuje się zewnątrzkomórkowe blaszki starcze składające się z β -amyloidu ($A\beta$) oraz wewnątrzkomórkowe sploty neurofibrylarne (neurofibrillary tangles – NFT) [18÷21].

Istotną kwestią w patogenezie choroby Alzheimer'a jest nieprawidłowa budowa i funkcja białka tau odpowiadającego za stabilizację mikrotubul w neuronach. W tym przypadku dochodzi do hiperfosforylacji i polimeryzacji białka tau, a następnie utraty jego powinowactwa do mikrotubul, to z kolei prowadzi do destabilizacji cytoszkieletu [18÷19].

Hiperfosforylowane białko tau (*microtubule associated protein tau* – MAPT) ma tendencję do agregacji i tworzenia splotów neurofibrylarnych (NFT), obszary mózgu, w których w sposób znaczny obserwuje się nieprawidłową budowę i funkcję białka tau, to kora kojarzeniowa, śródwęchowa, hipokamp, zakręt przyhipokampowy oraz ciało migdałowate [21].

Proces patogeny choroby Alzheimer'a w początkowej fazie dotyczy nieprawidłowych przemian białka prekursora amyloidu β (APP – ang. *amyloid precursor protein*), z udziałem β - i γ -sekretaz dochodzi do jego fragmentacji na nierozpuszczalne formy β -amyloidu, który akumulowany jest najpierw wewnątrzkomórkowo, a potem zewnątrzkomórkowo w postaci blaszek starczych. Pojawienie się nierozpuszczalnych form β -amyloidu warunkuje hiperfosforylację białka tau, które wiąże się z mikrotubulami, dzięki czemu umożliwia im stabilizację. W warunkach prawidłowych białko tau występuje w mózgu, w postaci 6 izoform i związane jest z genem MAPT (17q21) (MAPT – ang. *microtubule-associated protein tau*). W przypadku, gdy dojdzie do mutacji MAPT powstaną białka tau łatwo podlegające fosforylacji oraz ulegnie ich powinowactwo do mikrotubul. W konsekwencji powstanie nieprawidłowej budowy oraz zmiana funkcjonalności białka tau prowadzi do zaburzeń w transporcie wewnątrzaksonalnym, natomiast białko tau (hiperfosforylowane) akumulowane jest w postaci określonej, jako zwyrodnienie neurofibrylarne prowadzące do obumierania neuronów. W odniesieniu do β -amyloidu, należy wspomnieć również o jego akumulacji w ścianach drobnych naczyń mózgowych w warstwie korowej, to może skutkować pojawieniem się ognisk mikrokrwawień rozmieszczonych w strukturach korowych [22].

Zmiany neurozwyrodnieniowe prowadzą do obumierania neuronów oraz zaniku połączeń międzyneuronalnych. Skutkują one spadkiem poziomu substancji przekaźnikowych, z których największe znaczenie dla układu pamięci ma obniżenie zawartości

acetylocholinę, natomiast określenie liczby oraz rozmieszczenie blaszek starczych oraz neuronów z cechami zwyrodnienia neurofibrylarnego jest podstawą do neuropatologicznej klasyfikacji rozpoznania choroby Alzheimera [22].

4. Laboratoryjny myszy model choroby Alzheimera

Badania przy użyciu zwierzęcych modeli choroby Alzheimera, umożliwiły ogromne postępy w poznaniu patogenezy tej choroby. Obecnie najczęściej stosowane są modele mysie, z uwagi na ich niewysoką cenę, stosunkowo krótki czas życia oraz możliwość obserwacji typowych objawów choroby Alzheimera, jak również duże możliwości modyfikacji genetycznych w tych organizmach [20, 21].

W odniesieniu do wykorzystania innych zwierząt, jako modelu choroby Alzheimera, zastosowanie technologii transgenicznych ma pewne ograniczenia, mimo to znane są szczurze modele tej choroby, a nawet bezkręgowców [23÷25].

Przydatność organizmów transgenicznych, jako modelu choroby Alzheimera, wyznaczają określone kryteria np. zmiany patologiczne powinny być uwarunkowane genetycznie, dodatkowo organizm transgeniczny powinna cechować możliwość do ekspresji fenotypowych cech choroby ludzkiej, w ujęciu fizjologicznym oraz behawioralnym [16, 20].

Wykorzystanie transgenicznych myszy, jako modelu choroby Alzheimera umożliwia dokładne zbadanie rozwoju choroby i równie ważna jest ich rola w pracach badawczych dotyczących nowych sposobów terapii. Identyfikacja genów, które odpowiadają za bezpośredni związek z rozwojem choroby pozwoliła na stworzenie modeli zwierzęcych z różnymi mutacjami a następnie badanie współzależności między określonym defektem genetycznym a jego objawem fenotypowym, na różnych poziomach (biochemicznym, morfologicznym, anatomicznym, behawioralnym) [16, 20, 21, 26].

Tabela poniżej przedstawia wybrane mysie modele choroby Alzheimera, przedstawiając zakres mutacji, zaburzenia obserwowane u myszy oraz obraz neuropatologiczny.

Tabela 2. Wybrane mysie modele choroby Alzheimera

<i>Model</i>	<i>Mutacja</i>	<i>Zaburzenia</i>	<i>Zmiany neurologiczne</i>
PDAPP	APP-Indiana (V717F), PDGFβ	uszkodzona pamięć przestrzenna referencyjna i robocza; zwiększony poziom lęku	płytki amyloidowe; atrofia hipokampa; dystroficzne neuryty; glejoza;
APP23	APP Swedish K670N i M671L), Thy-1	nieprawidłowe odruchy; drgawki; pamięć przestrzenna referencyjna; deficyty w teście pasywnego unikania	płytki amyloidowe; glejoza; dystroficzne neuryty, obniżenie gęstości synaptycznej; utrata neuronów w rejonie CA1 hipokampa
TAPP	APP Swedish (K670N, M671L), tau – PrP, P301L, PrP	zaburzenia ruchowe uniemożliwiły przeprowadzenie testów behawioralnych	płytki amyloidowe; nasilone wytwarzanie NFT; glejoza
Tg2576	APP Swedish (K670N i M671L), PrP	uszkodzona pamięć przestrzenna, referencyjna i robocza; zmniejszona alternacja w labiryncie T i Y zaburzenia lęku	płytki amyloidowe; dystroficzne neuryty; astroglejoza; mikroglejoza; zwiększony stres oksydacyjny
APP KO	brak genu APP; homologiczna rekombinacja	obniżona zdolność poruszania się; obniżona masa ciała; zwiększona podatność na indukcję drgawek	zaburzenia anatomii i plastyczności hipokampa; zmniejszona gęstość synaptyczna w CA1; glejoza
APP ⁶⁹⁵ Line C3-3 Symbo: App695	APP695 Swedish (K670N i M671L) mysy PrP	zaburzenia pamięci	depozyty Aβ w korze i hipokampie
JNPL3	tau – P301L, mysy PrP	postępujące z wiekiem zaburzenia motoryczne uniemożliwiły poddanie myszy testom behawioralnym	NFT w rdzeniu kręgowym; atrofia rdzenia kręgowego; astrocytoza w OUN
Tau P301L Line: pR5-182	izoforma tau 40; mutacja P301L	atrofia mięśniowa; osłabienie mięśni	akumulacja białka i tau; splątki neurofibrylarne w korze, pniu mózgu i rdzeniu kręgowym
Tau V337M	tau – V337M, PDGFβ	zwiększona aktywność w teście otwartego pola	NFT oraz degeneracja neuronów w obrębie hipokampa

Tau R406W	tau – R406W, αCaMk-II	zaburzenia w teście warunkowania lękowego	akumulacja białka tau szczególnie w obrębie hipokampa
J20	APP Swedish (K670N i M671L), Indiana (V717F),	uszkodzona pamięć przestrzenna i referencyjna	rozproszone złogi amyloidu β w zakręcie zębatym hipokampa i korze
PSAPP	APP Swedish (K670N i M671L), PS1 A246E	uszkodzona pamięć przestrzenna robocza i referencyjna; zaburzenia w teście kontekstowego warunkowania lękowego	płytki amyloidowe, dystroficzne neuryty
PS1 KO	brak genu PS1 lub PS2	zaburzenia funkcji poznawczych i przestrzennych	deformacja kośćca oraz mózgu, utrata neuronów; występowanie krwotoków mózgowych
Htau	V337M I R406W	nasilenie neuropatologii koreluje z wiekiem i zaburzeniami behawioralnymi; nie występują deficyty motoryczne	patologia tau we wczesnym wieku
AP(Tg2576)-VLW	APP Swedish (K670N, M671L), tau – G272V, P301L, R406W, PrP, myszy Thy-1	uszkodzona pamięć przestrzenna; zaburzenia uczenia się	wyższa u osobników żeńskich akumulacja amyloidu, utrata neuronów w układzie limbicznym, NFT w hipokampie

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [27]

Transgeniczne myszy (PDAPP) to najpopularniejszy obecnie model powstały, dzięki zastosowaniu promotora płytkowego czynnika wzrostowego, który aktywuje ludzki minigen APP, warunkując wystąpienie punktowej mutacji, polegającej na zastąpieniu jednej reszty waliny resztą fenyloalaniny. U człowieka, mutacja to powoduje rzadką, rodzinną formę choroby Alzheimerera, charakteryzującą się wczesnym wystąpieniem objawów, w modelu mysim w wyniku silnej ekspresji APP i odkładaniu się β-amyloidu, obserwuje się blaszki starcze, dość szybko pojawiają się zaburzenia poznawcze (zazwyczaj pogorszenie uczenia się). Model ten jest bardzo interesujący, ponieważ występuje tu odkładanie się β-amyloidu w sposób podobny do tego, który można zaobserwować w przebiegu choroby w ludzkim mózgu, aczkolwiek model ten

nie wykazuje innych charakterystycznych cech choroby Alzheimera, czyli tworzenie splątków neurofibrylarnych i masowej śmierci neuronów [28÷31]

Współczesna wiedza na temat mechanizmów prowadzących do zmian neurodegeneracyjnych nie jest jednak kompletna, a choroba Alzheimera z powodu braku skutecznego leczenia pozostaje chorobą nieuleczalną i śmiertelną [32].

5. Podsumowanie

Współcześnie wiele uwagi w literaturze światowej i polskiej, poświęca się badaniom nad poznaniem mechanizmów patogenezy wielu chorób neurodegeneracyjnym (szczególnie choroby Alzheimera) oraz znalezieniu odpowiednich zwierzęcych modeli tych chorób, stanowiąc tym samym niezbędną przestrzeń badawczą dla testowania oraz tworzenia nowych opcji terapeutycznych. W kontekście analizowanej tematyki oraz literatury odnoszącej się przydatności zwierząt doświadczalnych w modelowaniu procesów chorobowych o podłożu neurodegeneracyjnym, nasuwa się następujący wniosek: zwierzęcy model choroby Alzheimera, oparty na wykorzystaniu odpowiednich transgenicznych myszy stanowi dużą przestrzeń badawczą w poznaniu procesu patogenezy oraz możliwości terapeutycznych. Prowadzenie badań w tym kierunku jest w pełni słuszne i uzasadnione, a co więcej konieczne.

Literatura

1. Ustawa z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz.U. 2015, poz. 266)
2. Ustawa z dnia 21 stycznia 2005 r. o doświadczeniach na zwierzętach (Dz.U. 2005, nr 33, poz. 289, z późn. zm.)
3. Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych (Dz.Urz. UE L 276, z 20.10.2010, s. 33)
4. http://www.nauka.gov.pl/wzory-wnioskow-skladanych-do-lokalnych-komisji-etycznych/zalecenia-dotyczace-eutanazji-zwierzat-doswiadczalnych_15389.html (dostęp 25.01.2017)
5. Młeczko M., *Zwierzęta doświadczalne i laboratoryjne z pomocą człowiekowi*, Przegląd Hodowlany 6(2015), s. 17-20
6. <http://www.nauka.gov.pl/zwierzeta-laboratoryjne/wykaz-zwierzat-laboratoryjnych-hodowanych-w-polsce.html> (dostęp 25.01.2017)
7. <http://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/ludnosc/ludnosc/ludnosc-w-wieku-60-struktura-demograficzna-i-zdrowie,24,1.html> (dostęp 25.01.2017)
8. Gawęł M., Potulska-Chromik A., *Choroby neurodegeneracyjne: choroba Alzheimera i Parkinsona*, Postępy Nauk Medycznych 27/7(2015), s. 486-476
9. Brumback R. A, Leech R.W., *Alzheimer's disease. Pathophysiology and the hope for therapy*, J Oklahoma State Med Assoc 87(1994) s. 103-111

10. Bateman R., *Alzheimer's disease and other dementias: advances in 2014*, Lancet Neurol 14(2015), s. 4-6
11. Swaab D. F., Lucassen P. J., Salehi A., Scherder E. J., van Someren E. J., Verwer R. W. *Reduced neuronal activity and reactivation in Alzheimer's disease*, Prog Brain Res 117(1998), s. 343-377
12. Vetulani J. *Mechanizmy pamięci i perspektywy leczenia choroby Alzheimerera*, Neur. Neurochir Pol 34(2000), s.429-446
13. Keverne J., Ray M., *Neurochemistry of Alzheimer's disease*, Psychiatry 7(1)(2008), s. 6-8
14. Palmer A. M., *Pharmacotherapy for Alzheimer's disease. progress and prospects*, Trends Pharmacol Sci 23(2002), s. 426-433
15. Braak H., Braak E., *Pathology of Alzheimer's disease*, [w:] Neurodegenerative Diseases, D.B. Calne (red.) 35(1994), s. 585-613
16. Bryan K. J., Hyoung-gon L., Perry G., Smith M. A., Casadesus G., *Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease: Behavioral Testing and Considerations*, Methods of Behavior Analysis in Neuroscience. 2nd edition. red. Buccafusco J. J., Boca Raton (FL): CRC Press., 2009
17. Price D. L., Tanzi R. E., Borchelt D. R., Sisodia S. S., *Alzheimer's disease: genetic studies and transgenic models*, Annu. Rev. Genet. 32(1998), s. 461-493
18. Bartoszevska M., *Molecular mechanisms of Alzheimer's disease*, Postępy Biol. Kom. 35(2008) s. 333-350
19. Chapman P. F., Falinska A. M., Knevet S. G., Ramsay M. F., *Genes, models and Alzheimer's disease*, Trends Genet.17(2001),s. 254-261
20. Elder G. A., Gama Sosa M. A., De Gasperi R., *Transgenic mouse models of Alzheimer's disease*, Mt. Sinai J. Med. 77(2010), s. 69-81.
21. Eriksen J. L., Janus C. G., *Plaques, tangles, and memory loss in mouse models of neurodegeneration*, Behav. Genet. 37(2007), s. 79-100
22. Pesz K., Misiak B., Szaśiadek M. M., *Genetyczne podstawy zespołów otępiennych*, [w:] Leszek J (red.): *Choroby otępienne. Teoria i praktyka*, Continuo, Wrocław (2011), s. 45-48
23. Flood D. G., Lin Y. G., Lang D. M., Trusko S. P., Hirsch J. D., Savage M. J., Scott R. W., Howland D. S., *A transgenic rat model of Alzheimer's disease with extracellular A β deposition*, Neurobiol. Aging 30(2009), s. 1078-1090
24. Link C. D., *Invertebrate models of Alzheimer's disease*, Genes Brain Behav. 4(2005), s. 147-156
25. Wu Y., Luo Y., *Transgenic C. elegans as a model in Alzheimer's research*, Curr. Alzheimer Res. 2(2005)s. 37-45
26. Price D. L., Tanzi R. E., Borchelt D. R., Sisodia S. S., *Alzheimer's disease: genetic studies and transgenic models*, Annu. Rev. Genet. 32(1998), s. 461-493
27. Więdołcha M., Stańczykiewicz B., Jakubik M., Rymaszewska J., *Wybrane mysie modele oparte na mutacji genów APP, MAPT oraz presenilin wykorzystywane w badaniach nad patogenezą choroby Alzheimerera*, Postępy Hig Med Dosw. 66(2012), s. 415-430
28. Games D., Adams D., Alessandrini R., Barbour R., Borthette P., Blackwell C., Carr T., Clemens J., Donaldson T., Gillespie F., Guido T., Hagopian S., Johnson-Wood K., Khan

- K., Lee M., Leibowitz P., Lieberburg I., Little S., Masliah E., McConlogue L., Montoya-Zavala M., Mucke L., Paganini L., Penniman E., Power M., Schenk D., Seubert P., Snyder S., Soriano F., Tan H., Vitale J., Wadsworth S., Wolozin B., Zhao J., *Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F b-amyloid precursor protein*, Nature 373(1995), s. 523-527
29. Hock B. J., Lamb B. T., *Transgenic mouse models of Alzheimer's disease*, Trends Genet 17(2001), s. 7-12
30. Hock C., Heese K., Muller-Spahn F., Hulette C., Rosenberg C., Otten U., *Decreased trkA neurotrophin receptor expression in the parietal cortex of patients with Alzheimer's disease*, Neurosci Lett. 241(1998), s.151-154
31. Mufson E. J., Ma S.Y., Dills J., Cochran E. J., Leurgans S., Wu J., Bennett D. A., Jaffar S., Gilmor M. L., Levey A. I., Kordower J. H., *Loss of basal forebrain P75(NTR) immunoreactivity in subjects with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease.*, J Comp Neurol. 443(2002),s. 136-153
32. Jick H., Zornberg G. L., Jick S. S., Seshadri S., Drachman D. A., *Statins and the risk of dementia*, Lancet. 356(2000), s. 1627-1631

Zwierzęce modele chorób neurodegeneracyjnych – choroba Alzheimer

Zwierzęce modele chorób neurodegeneracyjnych odgrywają istotną rolę w badaniach nad poznaniem mechanizmów patogenezy wielu chorób i stanowią niezbędną przestrzeń badawczą dla testowania oraz tworzenia nowych opcji terapeutycznych. Doświadczenia na zwierzętach są istotnym elementem poznawania fizjologii ludzkiego organizmu oraz poszukiwania sposobów zapobiegania patologicznym zmianom. Badania przy użyciu zwierzęcych modeli choroby Alzheimer, umożliwiły ogromne postępy w poznaniu patogenezy tej choroby. Obecnie najczęściej stosowane są modele mysie, z uwagi na ich niewysoką cenę, stosunkowo krótki czas życia oraz możliwość obserwacji typowych objawów choroby Alzheimer, jak również duże możliwości modyfikacji genetycznych w tych organizmach. Zwierzęcy model choroby Alzheimer, oparty na wykorzystaniu odpowiednich transgenicznych myszy stanowi dużą przestrzeń badawczą w poznaniu procesu patogenezy oraz możliwości terapeutycznych. Prowadzenie badań w tym kierunku jest w pełni słuszne i uzasadnione, a co więcej konieczne.

Słowa kluczowe:choroba Alzheimer, model zwierzęcy, neurologia

Animal models of neurodegenerative diseases – Alzheimer's disease

Animal models of neurodegenerative diseases play an important role in research on understanding the mechanisms of the pathogenesis of many diseases and provide the necessary space research for testing and the creation of new treatment options. Animal experiments are an important part of learning about the physiology of the human body and to seek ways to prevent pathological changes. Studies using animal models of Alzheimer's disease, enabled great strides in understanding the pathogenesis of this disease. The most commonly used mouse models due to their good price, a relatively short life span and the ability to observe the typical symptoms of Alzheimer's disease, as well as the great possibilities of genetic modification in such organisms. Animal model of Alzheimer's disease, based on the use of appropriate transgenic mouse is a major research area in the knowledge process of pathogenesis and therapeutic possibilities. Research in this direction is fully legitimate and reasonable, and what is more necessary.

Keywords: Alzheimer's disease, animal model, neurology

Międzypokoleniowe przemiany rozwoju fizycznego dzieci i młodzieży – przegląd badań

1. Wstęp

Problematyka międzypokoleniowych przemian rozwoju biologicznego, zwanych również tendencją przemian, trendem sekularnym lub zmiennością czasową, posiada bogatą i długą tradycję w literaturze przedmiotu zarówno polskiej, jak i światowej [1]. Stanowi ona obiekt zainteresowania biologów, antropologów, epidemiologów oraz żywieniowców [2]. Pojęcie trend sekularny (łac. *seculum* – wiek, ang. – *centuries-long tendency* – kierunek stuletni) oznacza długookresowe, międzypokoleniowe zmiany cech morfologicznych, fizjologicznych lub motorycznych populacji żyjących na tym samym terenie. Składowymi tego zjawiska są: akceleracja rozwoju i dojrzewania biologicznego, zmiany kolejności niektórych etapów rozwojowych (np. kostnienia czy dentycji), jak również retardacja procesów inwolucji starczej [3÷7]. Występowanie trendu sekularnego jest efektem stałej i nieaddytywnej interakcji pomiędzy czynnikami genetycznymi i środowiskowymi [8÷10]. Na ogół kierunek tych zmian jest stały, chociaż okresowo może ulegać zmianom. W okresach wojen i kryzysów ekonomicznych obserwuje się negatywne trendy sekularne (decelerację rozwoju – zmniejszenie wymiarów ciała i opóźnienie dojrzewania płciowego). Natomiast akceleracja rozwoju – międzypokoleniowe przyspieszenie rozwoju biologicznego i dojrzewania jest traktowana jako miernik dobrych warunków życia [11].

Z uwagi na to, że w niektórych populacjach obserwuje się występowanie, odwrotnego niż zazwyczaj trendu sekularnego” oraz różnych kierunków przemian badanych cech, stosuje się termin zmiany sekularne. Przyczyną tych przemian są czynniki wpływające na rozwój osobniczy człowieka, które również mogą być częścią zmian mikroewolucyjnych [12]. Do nich należą czynniki środowiskowe o charakterze geograficzno-klimatycznym oraz społeczno-politycznym [3]. Wśród przyczyn zmian sekularnych wymienia się postęp cywilizacyjny, którego efektem jest poprawa ogólnego standardu życia, w tym: opieki zdrowotnej, sposobu żywienia, zmniejszenie obciążenia wysiłkiem fizycznym oraz ograniczenie zapadalności na choroby zakaźne wskutek masowych szczepień, wzrost poziomu wykształcenia społeczeństwa, uprzemysłowienia oraz urbanizacji [2, 6, 9, 13, 14]. Wymienione czynniki sprzyjają osiągnięciu maksymalnego, indywidualnego, genetycznie zaprogramowanego potencjału

¹ marta.now@onet.eu, Wydział Biologiczno-Rolniczy, Uniwersytet Rzeszowski

rozwojowego człowieka [9, 15÷17]. Aspektem negatywnym przyśpieszenia rozwoju fizycznego jest niezgodność z poziomem rozwoju psychicznego, co prowadzi do skrócenia okresu wydłużonego dzieciństwa, ale także do powstania problemów wychowawczych, prawnych czy społecznych [15, 18].

Zjawisko akceleracji rozwoju wysokości ciała po raz pierwszy zostało opisane w pierwszej połowie XIX w. we Francji przez A. Queteleta (1835), a później przez H. P. Bowditcha (1877) w USA. W 1912 r. F. Boas zaobserwował pozytywny trend sekularny w drugim pokoleniu imigrantów przybyłych do USA, natomiast G. T. Bowles (1932) wykazał, że zmiany sekularne nie występują wyłącznie w populacjach pochodzących z warstw o niskim statusie społeczno-ekonomicznym [19]. W okresie 1909-1935 F. Boas odnotował zwiększenie wielkości cech morfologicznych u studentów Columbia University oraz wykazał ich związek z poprawą warunków bytowych. Natomiast niemiecki lekarz E. Koch jako pierwszy zastosował termin akceleracja rozwoju. Wg niego przyczyną pozytywnych zmian w rozwoju cech morfologicznych u młodszych pokoleń jest działanie światła (tzw. heliogeniczna teoria akceleracji) [5].

W ciągu ostatniego stulecia badania nad zjawiskami zmian sekularnych cech somatometrycznych, szczególnie wysokości i masy ciała oraz tempa rozwoju, zostały dobrze udokumentowane przez badaczy w prawie wszystkich krajach uprzemysłowionych [20], natomiast w mniejszym stopniu przebadano wymiary głowy [21].

2. Cel pracy

Celem pracy było przedstawienie kilku aspektów badań nad zmiennością czasową rozwoju wybranych cech morfologicznych na podstawie przeglądu literatury polskiej oraz światowej.

3. Proporcje głowy

Badania cech cefalometrycznych są prowadzone przez specjalistów z takich dziedzin wiedzy jak: antropologia, medycyna czy kryminalistyka. Wyniki pomiarów są wykorzystywane w celach porównawczych (osób zdrowych z chorymi), do określania przynależności rasowej populacji, jak również do badania trendów sekularnych [22].

Analizy materiałów kostnych wykazały występowanie zjawiska długogłowienia (dolichocefalizacji) w okresie od środkowego do górnego paleolitu, a następnie krótkogłowienia (brachycefalizacji) w holocenie [12]. Krótkogłowienie jest wynikiem działania doboru naturalnego w drodze zróżnicowanej płodności i przeżywalności [23]. W niektórych azjatyckich populacjach brachycefalizacja nadal utrzymuje się, co zaobserwowali Kondo i in. [24] w trzech pokoleniach Japończyków przebadanych 40 i 20 lat temu oraz w 1999 r. Podobne dane otrzymał Kouchi [25] porównując populacje Japończyków i Koreańczyków, co związane jest również z ich przynależnością rasową

do typu Mongoloidów. Hossain i in. [26] u dorosłych Japończyków oraz Ilayperuma [27] u badanych ze Sri Lanki wykazali brachycefalizację oraz istotne różnice dymorficzne w zakresie wielkości wskaźnika głównego głowy. Podobnie Vojdani i in. [28] odnotowali, że krótkogłowość częściej występowała u irańskich dziewcząt, zaś nadkrótkogłowość – u chłopców. Większe średnie arytmetyczne tego wskaźnika u malajskich chłopców na tle rówieśnic stwierdzili Swamy i in. [29]. Zjawisko brachycefalizacji zaobserwowali Little i in. [30] u meksykańskich chłopców i dziewcząt w okresie 1968-2000, jak również Olapido i in. [31] u rdzennej ludności południowo-wschodniej Nigerii.

Wyniki badań przeprowadzonych w różnych krajach Europy wykazały zahamowanie tej tendencji, a nawet jej odwrócenie – debrachycefalizację (dolichocefalizację, długogłowienie). Powyższe zjawisko można wiązać z występowaniem trendu sekularnego wysokości ciała – korelacji długogłowości z dużą wysokością ciała. Taką zależność potwierdzają dane otrzymane dla studentów medycyny Uniwersytetu w Rijece – wraz ze wzrastaniem wysokości ciała w kolejnych dekadach XX w. malały wartości wskaźnika głównego głowy [32]. Wg Henneberga i in. [23] powyższe zjawisko jest zmianą o charakterze ekosensytywnym, bez związku ze zmianami w puli genowej. Natomiast inni autorzy [33, 34] uważają, że za proces wzrastania długości głowy oraz zmniejszania jej szerokości odpowiadają zarówno mechanizmy genetyczne, jak również czynniki środowiskowe, tj. większy udział białka w diecie, niższy poziom stresu, ocieplanie się klimatu czy wyższy status społeczno-ekonomiczny, a także zjawiska heterozji oraz działanie sił selekcyjnych i ewolucyjnych. W latach 1994-1995 proces długogłowienia odnotowali: Jaeger [35] oraz Zellner i in. [36] u chłopców i dziewcząt w Niemczech (Jena). Podobną tendencję – wydłużania się głowy i zmniejszania jej szerokości zaobserwowano u dzieci belgijskich (Bruksela) [37, 38], włoskich pochodzących z Sardynii [20] oraz u badanych z Republiki Czeskiej [39]. W ostatnich dekadach proces debrachycefalizacji odnotowano również w populacjach bałkańskich – w Chorwacji [32] oraz Serbii [22].

Analogiczne zmiany proporcji głowy wykazano również w polskich populacjach dzieci i młodzieży z: Żywca [40, 41], Północnych Kaszub [42], czy z Rzeszowa [21].

4. Wysokość ciała

Dane dotyczące zmian sekularnych wysokości ciała posiadają obszerną dokumentację w literaturze przedmiotu. Wysokość ciała jest jednym z najlepszych mierników akceleracji rozwoju, która ze względu na dużą podatność na wpływ modyfikatorów rozwoju stanowi dobry wskaźnik zróżnicowania środowiskowego [43]. W krajach rozwijających się, o zmieniających się warunkach społeczno-ekonomicznych odnotowywano pozytywne bądź negatywne trendy sekularne lub też ich brak [44]. Wyniki badań wykazały, że trendy sekularne rozwoju i dojrzewania biologicznego są

silnej wyrażone w słabiej rozwiniętych częściach populacji, tzn. żyjących na obszarach wiejskich lub pochodzących z niższych warstw socjoekonomicznych, w porównaniu z grupami o lepszych warunkach bytowych [8]. Akcelerację rozwoju wysokości zarejestrowano w I. połowie XIX w. do lat 60. ubiegłego stulecia w Europie, Japonii oraz USA. Od lat 60. do 90. XX w. w wielu krajach otrzymano zróżnicowane dane w tym zakresie [44].

W niektórych krajach europejskich pozytywne zmiany sekularne wymiarów ciała dzieci i młodzieży odnotowano w: Belgii (w latach 1830-1980) [45], Holandii (w okresie 1860-1990) [46], Niemczech (od połowy lat 1880-1990) [35, 47], Francji (pomiędzy 1880-1960) [48], Portugalii (w latach 1910-2000) [49] oraz w Polsce (w okresie 1810-1990) [50]. Pomiędzy 1883-1953 r. wysokość ciała chłopców i dziewcząt w Wielkiej Brytanii wzrosła o ok. 0,3 cm/dekadę w 6 r.ż., o 0,7 cm w wieku 9 lat oraz o 1,1 cm u 12-latków [51÷52]. Rezultaty badań przeprowadzonych w 1914, 1937 i 1954 r. w Nowej Południowej Walii (Australia) wykazały przyrosty wysokości ciała o wielkościach należących do zakresu od: 0,5-1,7 cm/dekadę u obu płci. Wielkość trendu wysokości ciała u 10-letnich dzieci z Toronto w roku: 1892, 1923, 1930 i 1939 wynosiła ok. 1,5 cm/dziesięciolecie z występowaniem niewielkich różnic dymorficznych [53]. Dane dla krajów południowoeuropejskich pokazały, że w okresie 1896-1990 wysokość ciała chłopców z Hiszpanii (Madryt) uległa zwiększeniu o 1-1,2 cm/dekadę [54, 55], zaś z Grecji (Ateny) w latach 1928-2001 przyrost wynosił 1,5 cm/dekadę [56].

Wyniki badań potwierdzają występowanie pozytywnych trendów sekularnych w okresie 1939-2000 u dzieci i młodzieży w wieku 7-18 lat z Chin. W ciągu 60 lat wysokość ciała u chłopców w 18 r.ż. wzrosła o 7,7 cm, zaś u dziewcząt o 4,7 cm, czyli odpowiednio: 1,75 oraz 1,07 cm/dekadę. Największe zmiany sekularne odnotowano u 13-letnich chłopców oraz 11-letnich dziewcząt [9]. W latach 1955-2010 całkowity przyrost wysokości ciała u chłopców w 17 r.ż. z Pekinu był równy 8,66 cm, natomiast u dziewcząt 5,96 cm. Wielkość trendu była większa w porównaniu z poprzednio cytowanym doniesieniem i wynosiła u obu płci odpowiednio: 2,45 i 2,03 cm/dziesięciolecie. Największe tempo akceleracji rozwoju wysokości ciała odnotowano w dekadzie 1975-1985, a zarejestrowane zmiany sekularne wynikają z poprawy warunków bytowych [57].

Zatem tendencja do wzrastania wysokości ciała rozpoczęła się w pierwszej połowie XIX w. i trwała przez większą część XX w., chociaż wykazywała zmienny kierunek w różnych krajach. W wielu z nich pozytywny trend sekularny został przerwany przez II wojnę światową, co ilustruje przykład dla dzieci japońskich w wybranych grupach wieku. W latach 1940-50 zaznaczyła się deceleracja rozwoju wysokości ciała, co w szczególności dotknęło badanych w fazie pubertalnej (dziewczęta w wieku 10-12 lat, zaś chłopców pomiędzy 12-14 r.ż.). W okresie powojennym odnotowano duże przyrosty tej cechy we wszystkich grupach wieku, lecz większe stwierdzono u młodzieży w okresie pokwitania aniżeli u młodszych dzieci oraz u starszej młodzieży [58, 59]. Poprawa warunków bytowych po zakończeniu wojny przyczyniła się do

powrotu wielkości wysokości ciała do poprzedniego poziomu, co potwierdzają również prace innych autorów [4, 5]. W okresie 1980-1990 u dzieci z Japonii zaobserwowano zwolnienie tempa zmian sekularnych, natomiast w latach 1990-2000 dalsze niewielkie przyrosty tej cechy [44].

Największe tempo akceleracji rozwoju wysokości ciała u dzieci holenderskich zarejestrowano w okresie 1860-1950, zaś mniejsze w latach 1950-1980. We wskazanym okresie 120 lat całkowity przyrost wysokości ciała w Holandii wyniósł – u dzieci ok. 20-30 cm, natomiast u młodzieży ok. 30 cm [46]. Natomiast różnica w wieku biologicznym pomiędzy chłopcami z Czech przebadanymi w 1895 i 1991 r. osiągającymi wysokość ciała 140 cm wynosiła 3 lata [60]. Tempo akceleracji rozwoju wykazuje zróżnicowanie w zależności od przynależności do grupy społeczno-ekonomicznej. Np. chłopcy z Portugalii pochodzący ze średniej i wyższej klasy byli wyżsi na tle rówieśników z niższej klasy społecznej zarówno w 1910, jak i w 2000 r. W ciągu 90 lat średnia wysokość ciała badanych w wieku 10-16 lat z wyższej i średniej klasy społecznej wzrosła o 14,3 cm, natomiast z niższej o 12,9 cm [49]. Zbliżone dane otrzymano dla chłopców poznańskich w wieku 6-12 lat. W okresie 113 lat (pomiędzy 1886 i 1999 r.) średni przyrost wysokości ciała był równy 14,5 cm – wahał się w zakresie od: 13,1 cm w 8 r.ż. do 17,1 cm u 12-latków [18].

Istotnych informacji na temat występowania trendów sekularnych podstawowych cech morfologicznych w perspektywie historycznej dostarczają dane z ksiąg poborowych. W okresie 100 lat (1880-1980) wielkości przyrostów wysokości ciała 19-letnich poborowych z krajów Europy Zachodniej były zróżnicowane – należały do zakresu od: 3,7 cm w Portugalii do 15,1 cm w Holandii [61]. W dekadzie 1980-1990 r. trend sekularny wysokości ciała u mężczyzn w wieku 19 lat w Europie Północnej (Holandii, Danii, Norwegii i Szwecji) osiągnął plateau, natomiast u poborowych ze Szwajcarii, Belgii, Włoch, Hiszpanii i Portugalii nadal obserwowano przyrosty [44]. Dane Mydlarskiego [1933 za: [6]], Bielickiego i in. [62] oraz Kołodziej i in. [2] wykazały, że okresie 74 lat (1927-2001) wysokość ciała polskich poborowych wzrosła o 10,7 cm. W latach 1965-2001 tempo rozwoju tej cechy malało w zakresie od: 2,4 do 0,8 cm/dekadę. W dekadzie 2001-2010 wysokość ciała 19-letnich mężczyzn wzrosła o 0,9 cm, zaś w okresie 1965-2010 o 7,8 cm. W XX w. w Polsce wysokość ciała mężczyzn wzrosła o ok. 16,5 cm, natomiast kobiet o ok. 16 cm [18].

Cennym polskim wkładem do antropologii fizycznej jest opracowanie metody oceny tendencji przemian w zależności od przynależności do grupy społeczno-ekonomicznej [1]. Poborowi pochodzący z rodzin o wyższym poziomie wykształcenia rodziców byli wyżsi aniżeli badani z rodzin o niższym wykształceniu rodziców. Ponadto studenci AM w Poznaniu przebadani w okresie 1965-1995 byli znacznie wyżsi na tle poborowych. Zatem studenci pochodzili z rodzin o wyższym poziomie wykształcenia i o wyższym statusie socjo-ekonomicznym w porównaniu z poborowymi. Podobną gradację zaobserwowano w odniesieniu do wielkości miejsca zamieszkania

– najwyżsi byli badani z dużych miast liczących ponad 500 tys. mieszkańców, zaś najniżsi ze środowiska wiejskiego [62].

Zróznicowanie tempa akceleracji rozwoju wysokości ciała w zależności od miejsca zamieszkania potwierdzają również wyniki badań tajskich mężczyzn i kobiet urodzonych w latach 1940-1990, którzy w wieku 10-12 lat wychowywali się w różnych środowiskach. Badani obu płci z miasta byli wyżsi na tle mieszkańców terenów wiejskich. Mężczyźni urodzeni w latach 1986-1990 byli średnio o 4 cm wyżsi, zaś kobiety o 3 cm na tle badanych tej samej płci pochodzących z roczników urodzenia 1940-1956. W okresie 1940-1990 średnia wysokość ciała wzrosła o 1 cm/dekadę, przy czym u mieszkańców miast była o 0,5 cm większa w porównaniu z badanymi z obszarów wiejskich. Powyższe zmiany sekularne są odbiciem poprawy standardu życia (jakości żywienia, opieki zdrowotnej) w okresie dzieciństwa u badanych z Tajlandii w II połowie XX w. [63].

W populacji dzieci i młodzieży z regionu bydgoskiego zmiany sekularne wysokości ciała pomiędzy 1935-1991 r. wykazywały okresowe zróznicowanie. W latach 1935-1946 odnotowano regres, w okresie 1952-1971 zmiany były największe, natomiast pomiędzy 1972-1979 zaobserwowano spowolnienie tego procesu. W okresie 1979-1991 zarejestrowano zahamowanie trendu sekularnego wysokości ciała [64]. Brak istotnego statystycznie przyrostu wysokości ciała u chłopców i dziewcząt z Bydgoszczy pomiędzy 1988-1998 odnotowali również Łukowicz i in. [3].

W okresie 1998-2008 przyrost wysokości ciała u chłopców i dziewcząt z powiatu białskiego wynosił średnio ok. 1,5 cm [65]. Proces wysokoroślenia wykazali również Jopkiewicz i in. [66] u dzieci i młodzieży kieleckiej przebadanej w tej samej dekadzie – średni przyrost u chłopców był równy 1,8 cm, zaś u dziewcząt 1,0 cm. Podobne zmiany wysokości ciała zaobserwowano u chłopców łódzkich w latach 1992-1994 [67] i 2002-2004 [68] – przyrost wynosił ok. 1 cm/dekadę, zaś u dziewcząt był mniejszy 0,4 cm/dziesięciolecie. Tendencję do zwiększania się wysokości ciała wykazali również Cymek i in. [69] u dzieci koszalińskich w 20-leciu 1978-1998 oraz w populacji wiejskiej na Pomorzu [70]. Mniejsze tempo akceleracji rozwoju tej cechy odnotowały Radochońska, Perenc [71] u dzieci i młodzieży z Rzeszowa w latach 1978/79-1993/94, natomiast większe w dekadzie 1993/94-2003/04. Dalszą akcelerację rozwoju wysokości oraz innych wymiarów ciała potwierdzają również wyniki badań przeprowadzonych u dzieci i młodzieży w innych krajach europejskich tj. Republika Czeska [72, 73], Estonia [16], Belgia [74], Grecja [75], Turcja [8, 76], Francja [77], czy Portugalia (Madera) [78].

Zahamowanie trendu z zaznaczającą się deceleracją rozwoju stwierdzono w niektórych regionach Polski [79, 80], czy np. w Japonii [81]. Dane wskazujące na zanikanie trendów sekularnych wysokości ciała zaobserwowali Resiak [82] u 6-letnich dzieci z Gdańska w okresie 1995-2004, jak również Kaczanowski [40] u dziewcząt z Żywca. Natomiast trend wysokoroślenia odnotowano u chłopców żywieckich. Zanikanie bądź zmniejszanie tendencji do wzrastania wysokości ciała pomiędzy

pokoleniami stwierdzono w ostatniej dekadzie XX w. w populacji dzieci poznańskich [79]. Pojawiające się sugestie o wygasaniu trendu lub wręcz o jego zatrzymaniu dotyczą zwłaszcza krajów wysoko cywilizowanych, zamożnych, nie tylko najwyższej sytuowanych warstw społecznych [83]. Na brak przyrostów dorosłej wysokości ciała w ostatnich dekadach wskazują dane dla mieszkańców północnej Europy, Niemczech i Włoch, lecz trend nadal występuje w Belgii, Hiszpanii i Portugalii [84÷86]. Zatem powyższe zjawisko zaznacza się w zróżnicowany sposób w wielu częściach świata. Wg niektórych autorów funkcjonalne optima wysokości ciała wynoszą dla mężczyzn 180 cm, dla kobiet 172 cm, a przekraczanie tych wartości narusza granice genetycznie uwarunkowanej ekosensytywności naszej populacji. Wg Henneberga [87] tak znaczny przyrost wysokości ciała dorosłych ludzi nie jest związany z dalszą ogólną poprawą warunków życia, lecz ze specyficznymi czynnikami generacyjnymi.

5. Masa ciała

Wyniki badań dotyczące trendu sekularnego masy ciała dla populacji europejskich są mniej licznie reprezentowane w literaturze przedmiotu; częściej przedstawiane są dane z zakresu tendencji przemian BMI. W wielu krajach, w tym w Polsce, odnotowano trend do wzrastania średnich wielkości masy ciała oraz BMI i zastąpił on wcześniej zaznaczającą się tendencję do smuklenia sylwetki dzieci i młodzieży [17]. Wskazane zjawisko jest efektem wzrostu odsetka osób z nadwagą i otyłością [5, 44]. Powyższe trendy wynikają z dwóch źródeł – zwiększenia rozmiarów ciała (wysokości) oraz ze zmian sylwetki – wzrostu otluszczenia [84].

Masa, obok wysokości ciała, jest drugim podstawowym wskaźnikiem rozwoju fizycznego dzieci i młodzieży. Wykazuje ona słabszą determinację genetyczną oraz wahania dobowe, sezonowe oraz związane z trybem życia, szczególnie z żywieniem i aktywnością fizyczną. Na jej wielkość mają wpływ: masa układu kostnego, mięśni, tkanki tłuszczowej i narządów wewnętrznych [88].

Dane z zakresu zmian sekularnych urodzeniowej masy ciała w USA w latach 1880-1959 wykazały, że u białych Amerykanów wystąpił niewielki przyrost wynoszący 0,05 kg zaś u Afro-Amerykanów 0,12 kg [89]. Większych przyrostów tej cechy nie odnotowano w latach 1911-1934 zarówno w Nowym Yorku, jak również w Paryżu, natomiast w Szwecji masa urodzeniowa wzrosła o 0,2 kg [53]. Podczas II wojny światowej w Japonii masa ciała zwiększyła się o taką samą wielkość (0,2 kg), jednak w okresie powojennym uległa ona zmniejszeniu [90]. Wyniki badań Meredith [89] wykazały, że przyrosty masy ciała u białych chłopców z USA pomiędzy 1880-1960 r. wahały się w zakresie od 0,02 kg w 1 r.ż. do 1,8 kg u 15-latków, zaś u Afro-Amerykanów – od 0,02 kg w 3 r.ż. do 1,7 kg w wieku 15 lat.

W latach 1911-1954 wielkości trendu sekularnego masy ciała u dzieci brytyjskich obu płci wynosiły: 0,2 kg w 5 r.ż., 0,8 kg u 9-latków i 1,6 kg w wieku 13 lat na dekadę [53]. Duże tempo akceleracji masy ciała odnotowano u chłopców holenderskiego

pochodzenia, którzy mieszkali w USA. Analiza porównawcza danych z okresów: 1931-1933 oraz 1957-1958 wykazała, że przyrosty tej cechy były równe: 0,7 kg w 7 r.ż., 2,1 kg u 11-latków oraz 4,3 kg w wieku 15 lat [91]. Jéniček i in. [92] nie stwierdzili dużych różnic masy ciała u 7-letnich dzieci przebadanych pomiędzy 1930-1970 r. w populacji brytyjskiej oraz anglo-kanadyjskiej. Natomiast szczególnie duże przyrosty odnotowano u dzieci francuskich oraz u chłopców z USA.

W ciągu 90 lat (1910-2000) różnica masy ciała u chłopców w wieku 10-16 r.ż. z Portugalii wynosiła 13,5 kg. Ponadto badani pochodzący z wyżej sytuowanych rodzin byli ciężsi na tle rówieśników z niższej grupy społecznej w obu kohortach: 1910 (o 4,9 kg) oraz w 2000 r. (o 4,6 kg). Trend sekularny masy ciała wynosił 1,5 kg/dekadę [49]. Akcelerację rozwoju tego parametru odnotowano również w okresie 1953-2005 we Francji u dzieci w wieku 3-11 lat, natomiast wielkość trendu była równa 0,8 kg/dziesięciolecie [77].

W okresie 80 lat (1920-2000) masa ciała 14-letnich chłopców z Poznania zwiększyła się o 11,4 kg, natomiast dziewcząt o 13,2 kg. Pozytywne zmiany sekularne tego parametru potwierdzają również dane dla dzieci i młodzieży z Łodzi przebadanych w latach 1940-1993 [93]. Palczewska i in. [94] w 20-leciu 1976/80-1996/99 wykazały występowanie akceleracji rozwoju masy ciała u dzieci warszawskich, z tendencją do smuklenia sylwetki ciała, zwłaszcza dziewcząt. Trend do wzrastania wielkości tego parametru w niektórych regionach Polski potwierdzają doniesienia różnych autorów: Górniak i in. [65] w powiecie białskim, Kolarzyk i in. [95] u dzieci z Krakowa, Jopkiewicz i in. [66] u badanych z Kielecczyny, czy Cymek i in. [70] w populacji z Pomorza. Odmienny kierunek zmian masy ciała zaobserwował Kaczanowski [40] na Żywiecczyźnie.

Pomiędzy 1951-2010 r. u młodzieży w wieku 15-19 lat z Chorwacji (Zagrzeb) odnotowano znaczne przyrosty średnich wartości masy ciała. W ciągu 60 lat powyższy parametr wzrósł u chłopców w zakresie od: 13,5 kg u 19-latków do 23,5 kg w 15 r.ż. W grupie dziewcząt wielkości przyrostów były mniejsze i należały do przedziału od: 4,7 kg w wieku 17 lat do 9,3 kg u 16-latek [96].

W dekadzie 1993-2003 stwierdzono akcelerację rozwoju omawianej cechy u dzieci z Turcji [8]. W powyższym okresie masa ciała chłopców wzrosła w zakresie od: 2,7 kg (15 r.ż.) do 6,3 kg (12 r.ż.). Wśród dziewcząt wielkości przyrostów wahały się w granicach od: 2,8 kg (8 r.ż.) do 6,5 kg (15 r.ż.). Wyniki badań zrealizowanych w latach 1955-2010 w Chinach (Pekin) potwierdzają występowanie akceleracji rozwoju masy ciała. We wskazanym okresie wielkość tej cechy u chłopców zwiększyła się o 14,76 kg, zaś u dziewcząt o 9,24 kg. Średni przyrost na dekadę wyniósł 2,68 kg u chłopców oraz 1,68 kg u dziewcząt [57].

6. Wskaźnik masy ciała (BMI)

Zgodnie z wynikami badań wskaźnik BMI wykazuje słabszą determinację genetyczną aniżeli wysokość ciała i w większym stopniu jest uzależniony od wpływu czynników zewnętrznych. Współczynnik odziedziczalności BMI wynosi ok. 30 %. BMI reaguje nawet na krótkookresowe zmiany czynników środowiskowych, tj. żywienie, aktywność ruchowa, czy choroby. Omawiany wskaźnik informuje o stanie zdrowia organizmu i wykazuje większą korelację z pomiarami otłuszczenia oraz z otyłością [6, 97].

Światowa epidemia nadwagi i otyłości u dzieci i młodzieży jest jednym z najważniejszych problemów zdrowotnych. U dorosłych osób powyższe zjawisko rozpoczęło się w latach 60. XX w., zaś u dzieci i młodzieży – 20 lat później. Otyłość pojawia się wskutek zaburzenia bilansu energetycznego (pobierania i wydatkowania energii), zatem jej występowanie jest uzależnione zarówno od diety, jak i od aktywności fizycznej [84]. Nadmierna masa ciała w okresach dzieciństwa i młodości predysponuje do wystąpienia otyłości w dorosłym wieku (*adiposity rebound*), jak również do chorób układu sercowo-naczyniowych i zespołu metabolicznego [98÷100]. Tempo otyłości gwałtownie wzrasta w wielu krajach rozwijających się, szczególnie w środowiskach miejskich, natomiast dane dla krajów rozwiniętych są niejednoznaczne. W ciągu ostatnich 30 lat liczba otyłych dzieci w USA zwiększyła się 2-krotnie, zaś nastolatków – 3-krotnie [101]. W kilku krajach wschodniej Europy wzrost odsetka otyłych dzieci został zahamowany, natomiast w niektórych wykazuje trend malejący [102, 103]. Dane dla tej części Europy z ostatniego dziesięciolecia wykazały wzrost częstości występowania otyłości [13, 104]

Wyniki badań z zakresu trendu sekularnego BMI dzieci i młodzieży w Europie są zróżnicowane [105÷106]. W populacji chłopców belgijskich w wieku 12-18 lat nie zaobserwowano zmian wielkości mediany BMI w okresie: 1969-1974 i 1990-1993, natomiast odnotowano wzrost wartości wskaźnika na poziomie 85. centyla (z 0,5 do 1,3 kg/m²) oraz 95. centyla (z 0,9 do 1,9 kg/m²). U dziewcząt z Belgii stwierdzono niewielkie zwiększenie wielkości mediany BMI w omawianym okresie, lecz większy przyrost miał miejsce na poziomie 85. centyla (z 1 do 2,2 kg/m²) oraz 95. centyla (z 1,1 do 2,7 kg/m²). Powyższe dane wskazują na wzrost częstości występowania nadwagi i otyłości wśród badanej młodzieży [106]. W dziesięcioleciu 1996-1998 oraz 2007-2008 wśród dzieci i młodzieży w wieku 11-18 lat z Portugalii (Madera) średnie wielkości BMI zwiększyły się o 1,5 kg/m² u chłopców oraz o 1,7 kg/m² u dziewcząt. Wzrost wskaźnika TST sugeruje przyrost centralnego (nie obwodowego) otłuszczenia ciała, co może predysponować do występowania chorób sercowo-naczyniowych [78].

Odsetek 5- i 6-letnich dzieci z północno-wschodniej Szkocji z nadwagą i otyłością, urodzonych w latach 1970-1977 uległ zmniejszeniu, natomiast badanych z okresu 1978-1998 wykazywał znaczny wzrost, chociaż nie liniowy. Procent dzieci pochodzących z roczników urodzenia 1998-2006 otyłych i z nadwagą uległ zmniejszeniu. W całej populacji częstość występowania otyłości wzrosła z 1,3 % dla urodzonych w 1976 r. do 6,9 % u badanych z rocznika 1998 oraz ponownie spadła do 5,7 % u dzieci z 2006 r. [107].

W populacji polskiej również zaobserwowano wzrost częstości występowania nadwagi i otyłości. Łuszczki i in. [100] u dzieci obu płci w wieku przedszkolnym (3-6 lat) z regionu rzeszowskiego przebadanych w 2008 oraz 2012 r. nie stwierdzili przyrostu średnich wielkości BMI. We wskazanym okresie odsetek chłopców z nadwagą zwiększył się z 9,9 % do 11,3 %, zaś wśród dziewcząt – z 9,1 % do 12,4 %. W grupie chłopców częstość występowania otyłości wzrosła z 8,5 % z 2008 r. do 11,1 % w 2012 r., natomiast u dziewcząt odpowiednio z: 7,2 % do 10,8 %. Wyniki ogólnopolskich badań dzieci i młodzieży w wieku 7-18 lat, przeprowadzonych w okresie 1966-2012 przez Gomułę i in. [14], wykazały znaczne różnice w zakresie średnich wartości BMI pomiędzy 1988-2012 r. W ciągu 24 lat duże przyrosty tego wskaźnika odnotowano u obu płci, z wyjątkiem 7-letnich dzieci oraz dziewcząt w wieku 14-18 r.ż. W latach 1966-2012 r. częstość występowania nadwagi wzrosła ponad 5-krotnie, zarówno w okresie dzieciństwa (z 3,67 % do 19,19 %) oraz prawie 7-krotnie w okresie młodzieńczym (z 2,66 % do 18,06 %). Odsetek otyłych dzieci zwiększył się 11,4-krotnie (z 0,49 % do 5,56 %) i był 13,3-krotnie (z 0,35 % do 4,67 %) oraz ponad 16-krotnie większy (z 0,30 % do 4,87 %) aniżeli w okresie wczesnej i późnej adolescencji. Otrzymane dane potwierdzają, że zmiany społeczno-ekonomiczne w znacznym stopniu wpłynęły na rozwój i zdrowie młodego pokolenia w post-socjalistycznej populacji. W okresie komunizmu niekorzystne warunki bytowe oddziaływały m.in. na opóźnienie wieku dojrzewania lub decelację BMI. Kapitalizm oraz poprawa statusu ekonomicznego zaznaczyły się w postaci akceleracji wieku dojrzewania oraz wzrostu średnich wielkości BMI.

Omawianą tendencję potwierdzają doniesienia dla dzieci z Japonii [108]. Frekwencja występowania otyłości w 1996 r. była ponad 2-krotnie większa aniżeli w 1970 r. Na wyspach Hokkaido i Okinawa procent otyłych dzieci w młodszym wieku szkolnym wynosił ok. 5 %, zaś u starszych uczniów wzrósł do ok. 10 %. Problem narastającej otyłości w badanej populacji autor wiąże z brakiem aktywności fizycznej oraz z niewłaściwymi zachowaniami żywieniowymi (nieregularnością posiłków, wzrostem spożycia tłuszczów). Dane otrzymane przez Lu i in. [57] dla dzieci i młodzieży z Chin (Pekin) w 20-leciu 1985-2005 także wykazały, że odsetek otyłych chłopców znacznie zwiększył się z 1,2 % do 14,5 %, natomiast dziewcząt – odpowiednio z 1,0 % do 7,3 %. Pomiedzy 2005-2010 r. częstość występowania otyłości uległa minimalnemu zmniejszeniu do: 14 % (chłopcy) oraz 7,1 % (dziewczeta).

Wzrost procenta nadwagi i otyłości w populacji dzieci z Oaxaca (Meksyk) w latach 1970-2000 zaobserwowali również Malina i in. [109]. W grupie dzieci miejskich częstość występowania łącznie nadwagi i otyłości wynosiła: 15 % dla chłopców oraz 17 % dla dziewcząt, zaś w populacji wiejskiej była znacząco niższa – odpowiednio: 7 % (chłopcy) 9 % (dziewczeta).

W 20-leciu 1991-2010 w populacji młodzieży obu płci z Chorwacji zaobserwowano wzrost wielkości BMI, lecz nie wszystkie różnice były istotne statystyczne. Rezultaty badań przeprowadzonych w 1997 r. (po wojnie na Bałkanach) wykazały zmniejszenie

wielkości mediany BMI, co szczególnie zaznaczyło się u nastolatków w 18 i 19 r.ż. Wobec tego niekorzystne czynniki bytowe i psychologiczne związane z chorwacką wojną o niepodległość pozostawiły ślady w postaci zmian rozwoju fizycznego młodzieży (spadek BMI, również masy ciała na początku skoku pokwitaniowego, lecz również obniżenie wielkości wysokości ciała i BMI u dzieci urodzonych w czasie wojny) [96].

7. Cechy somatyczne

Dane pochodzące z literatury wskazują również na zmiany sekularne proporcji budowy ciała, chociaż są one rzadziej uwzględniane w badaniach antropometrycznych. Wg różnych doniesień akceleracja rozwoju nie dotyczy wszystkich cech morfologicznych (pozagłowych) w takim samym stopniu [6].

W świetle wyników badań przeprowadzonych w okresie 1900-1915, pomiarów wysokości ciała poborowych, Zdjęcia Antropometryczne w latach 1955-1959 oraz badań studentów stwierdzono, że w XX w. w Polsce kończyny dolne u mężczyzn uległy wydłużeniu o 13,9 cm, zaś u kobiet o 13,4 cm, natomiast długość tułowia jedynie o 2,5 cm (mężczyźni) i o 3,1 cm (kobiety). We wskazanym okresie długość kończyn górnych zwiększyła się u obu płci o ok. 9 cm. Natomiast w zakresie szerokości barków wykazano większą progresję rozwojową w porównaniu do szerokości bioder. Na podstawie wielkości wskaźników proporcji zaobserwowano, że kończyny dolne uległy wydłużeniu w stosunku do wysokości ciała, natomiast tułów – skróceniu w relacji do wzrostu. Długość kończyn dolnych zwiększyła się proporcjonalnie do wysokości ciała i w większym stopniu aniżeli długość tułowia. Ponadto w populacji polskiej zarejestrowano przewagę wydłużania się kończyn dolnych w stosunku do długości tułowia. Na wydłużanie się kończyn dolnej w większym stopniu wpłynął przyrost długości podudzia aniżeli uda. Wzrastanie szerokości barków oraz bioder następowało względnie proporcjonalnie do zmian wysokości ciała, z pewną przewagą dynamiki szerokości barków [110].

Wyniki badań dzieci i młodzieży wykazały międzypokoleniowe wydłużanie się tułowia, co odnotowano np. u chłopców i dziewcząt w wieku 3-18 lat z Rzeszowa. W dekadzie 1993/94-2003/04 długość tułowia u chłopców wzrosła w zakresie od: 0,5 cm (15 i 16 r.ż.) do 3 cm (3 r.ż.), zaś u dziewcząt odpowiednio od: 0,9 cm (8 r.ż.) do 4,5 cm (3 r.ż.) [111].

W populacji dzieci miejskich oraz wiejskich z Meksyku przebadanych w 28-leciu 1972-2000 Malina i in. [109] odnotowali przyrost wysokości siedzeniowej ($Bs-v$). W okresie 1978-2000 u badanych z obszarów wiejskich Oaxaca (Meksyk) w wieku 6-29 lat również stwierdzono zwiększenie średniej wartości tej cechy, co szczególnie zaznaczyło się w grupie chłopców [112]. Powyższych doniesień nie potwierdzają dane otrzymane dla dzieci i młodzieży w wieku 7-15 lat z regionu kujawsko-pomorskiego.

W dekadzie 1988-1998 nie zaobserwowano istotnych i systematycznych różnic w zakresie wysokości siedzeniowej [3].

Rezultaty badań wskazują na szczególnie silną tendencję do wydłużania się kończyny dolnej. Powyższy trend odnotowały Radochońska, Perenc [111] w populacji dzieci i młodzieży z Rzeszowa, szczególnie w okresie 1993/94-2003/04. Wielkości różnic tego parametru u chłopców wahały się w granicach od: 1,2 cm (w 4 i 6 r.ż.) do 5,6 cm (u 10-latków), natomiast u dziewcząt należały do przedziału od: 0,1 cm (w 4 r.ż.) do 5,5 cm (u 8-latek). Podobne wyniki otrzymał Kaczanowski [40] u badanych w wieku 3,5-18,5 lat z Żywca. Analiza danych wykazała, że pomiędzy dziesięcioleciaми 1960-2000 proces wydłużania się kończyny dolnej u obu płci był istotny statystycznie w całym omawianym odcinku ontogenezy. Wzrastanie długości posiedzeniowej kończyny dolnej w okresie 1971-2010 potwierdziły również wyniki badań chłopców i dziewcząt w wieku 7,5-15,5 lat z Krakowa. Jednak wymiary bezwzględne kończyn dolnych w stosunku do reszty ciała uległy zmniejszeniu prawdopodobnie wskutek wcześniejszego pokwitania [97]. Tendencję do wydłużania się kończyny dolnej zaobserwowali także Malina i in. [109] u badanych z Meksyku w latach 1972-2000. Wyższe średnie wielkości tej cechy wykazano u dzieci miejskich, chociaż tempo akceleracji rozwoju długości kończyny dolnej było większe w serii wiejskiej. W 22-leciu 1978-2000 w populacji dzieci i młodzieży z obszarów wiejskich Oaxaca wielkości przyrostów omawianej cechy u chłopców należały do zakresu od: 2,25 cm (19-29 lat) do 3,86 cm (10-13 r.ż.), natomiast w grupie dziewcząt od: 0,70 cm (19-29 lat) do 3,88 cm (10-13 r.ż.) [112].

Trend do wydłużania się kończyny górnej na ogół jest słabszy w porównaniu z poprzednio omówionym parametrem. W dziesięcioleciu 1993/94-2003/04 w populacji dzieci i młodzieży rzeszowskiej długość kończyny górnej u chłopców wzrosła o wielkości należące do przedziału od: 0,7 cm (w 6 r.ż.) do 3,1 cm (u 18-latków), zaś u dziewcząt od: 0,1 cm (w 6 r.ż.) do 3,6 cm (u 11-latek) [111]. Tendencja do wzrastania tego parametru w dekadach 1980-2000 potwierdzają dane otrzymane przez Kaczanowskiego [40] dla badanych obu płci do ok. 15-16 r.ż. z Żywca.

Akcelerację rozwoju szerokości barków odnotowano u chłopców i dziewcząt w wieku 7,5-15,5 lat z Krakowa przebadanych w kohortach z: 1971, 1983 oraz 2010 r. [97]. Taką samą tendencję w dekadzie 1990-2000 zaobserwował Kaczanowski [40] u dzieci i młodzieży od 3,5-18,5 r.ż. z Żywca. Analogiczne dane otrzymali Łukowicz i in. [3] u badanych obu płci z regionu kujawsko-pomorskiego. W dziesięcioleciu 1988-1998 stwierdzono poszerzenie barków, z wyjątkiem 7-letnich chłopców. Natomiast decelerację wzrastania tego parametru w okresie 1993/94-2003/04 wykazały Radochońska, Perenc [111] u dzieci i młodzieży rzeszowskiej, jak również w 25-leciu 1980-2005 Godina [113] wśród abchaskich dziewcząt (z miasta Sukhum).

Podobny kierunek zmian sekularnych odnotowano w odniesieniu do wymiaru szerokościowego bioder. W wyżej wymienionych okresach zarówno w populacji krakowskiej [97], jak również żywieckiej [40] badań miednica uległa poszerzeniu.

Słabiej wyrażoną tendencję w zakresie rozwoju tej cechy zaobserwowały Radochońska, Perenc [111] w dekadzie 1993/94-2003/04. Natomiast decelerację pomiędzy 1980-2005 r. wykazała Godina [113] wśród dziewcząt w wieku 7-17 lat z Abhazji.

Rozwój wymiarów klatki piersiowej jest uzależniony od wpływu czynników bio-geograficznych (np. wysokości nad poziomem morza), czy społeczno-ekonomicznych. Cechy morfologiczne, tj. szerokość, głębokość lub obwód klatki piersiowej mogą mieć praktyczne znaczenie dla funkcjonowania organizmu, np. informują o stanie rozwoju układu oddechowego. Dane otrzymane dla dzieci i młodzieży z Krakowa w okresie 1938-2000 wskazują na ogół na akcelerację wzrastania szerokości klatki piersiowej (z wyjątkiem dziewcząt w wieku 16-18 lat), jak również jej głębokości w serii chłopców (z wyjątkiem badanych pomiędzy 3-5 r.ż.). U dziewcząt przyrosty cięciwy poprzecznej w ciągu 64 lat były niewielkie lub też zaznaczyła się deceleracja rozwoju (w 7 i 11 r.ż. oraz w wieku 13-18 lat). [114]. Wyniki badań populacji żywieckiej w dekadzie 1990-2000 również wskazują na tendencję do wzrastania zarówno szerokości, jak i głębokości klatki piersiowej, z wyjątkiem badanych obu płci w wieku 17,5-18,5 r.ż. Stopień zmian sekularnych był znacznie większy u chłopców na tle rówieśnic. Ponadto największe przyrosty tych cech morfologicznych u chłopców zaznaczyły się pomiędzy 12,5-15,5 r.ż., zaś u dziewcząt okresie 9,5-13,5 lat [40]. Analogiczną tendencję rozwojową odnotowali Łukowicz i in. [3] u dzieci i młodzieży z regionu kujawsko-pomorskiego. W dziesięcioleciu 1988-1998 stwierdzono przyrosty wielkości cięciwy poprzecznej klatki piersiowej, z wyjątkiem 7-letnich chłopców i w wieku 14-15 lat oraz dziewcząt pomiędzy 7-8 r.ż. W tym okresie w badanej populacji zaobserwowano również rozwój jej głębokości, z wyjątkiem chłopców w wieku 7-8 lat i w 14 r.ż, a także 6-letnich dziewcząt.

Doniesienia różnych autorów dotyczące zmian sekularnych obwodu klatki piersiowej są zróżnicowane. W populacji dzieci rzeszowskich u chłopców wskazany parametr uległ zwiększeniu pomiędzy 3-15 r.ż., natomiast w wieku 16-18 lat odnotowano decelerację. U dziewcząt w całym omawianym okresie 3-18 lat stwierdzono silną akcelerację rozwoju tej cechy [111]. W dekadzie 1990-2000 w grupie chłopców z Żywca w większości badanych grup wieku (4,5-6,5; 11,5-15,5 oraz 17,5-18,5) wykazano tendencję do zmniejszenia obwodu klatki piersiowej. Deceleracja rozwoju tego parametru zaznaczyła się również u dziewcząt żywieckich w wycinkach ontogenezy: 4,5-6,5; 9,5-10,5; 12,5-14,5 i 16,5-18,5 lat [40]. Negatywny trend sekularny tej cechy zaobserwowała również Godina [5] u chłopców i dziewcząt z Moskwy przebadanych w dekadach: 1970, 1980 i 1990.

Przedstawione zjawiska tendencji przemian wybranych cech morfologicznych wskazują na istotny wpływ zmieniających się czynników społeczno-ekonomicznych na przebieg procesów rozwojowych. Monitorowanie stanu rozwoju biologicznego dzieci i młodzieży pozwala na obserwację kierunku przemian w odstępach międzypokoleniowych, jak również na aktualizację norm rozwojowych służących do oceny poziomu fizycznego badanych.

Literatura

1. Mleczek E., Gradek J., Nieroda R., Zdebski J., *Długookresowe tendencje zmian związków między rozwojem umysłowym, fizycznym i motorycznym dzieci w wieku 4-14 lat z różnych miejscowości Małopolski*, Antropomotoryka 2013; 64: 11-33
2. Kołodziej H., Łopuszańska M., Lipowicz A., Szklarska A., Bielicki T., *Secular trends in body height and body mass in 19-year-old polish men based on six national surveys from 1965 to 2010*, Am. J. Phys. Anthropol. 2015; 27: 704-709
3. Łukowicz M., Krakowiak H., Weber-Zimmermann M., Zalewski P., Bożilów W., *Zmienność wybranych wymiarów liniowych tułowia u dzieci regionu kujawsko-pomorskiego w latach 1988-1998*, Med. Biol. Sci. 2007; 21 (4): 107-117
4. Webb E. A., Kuh D., Pająk A., Kubinova R., Malyutina S., Bobak M., *Estimation of secular trends in adult height, and childhood socioeconomic circumstances in three Eastern European populations*, Econ. Hum. Biol. 2008; 6: 228-236
5. Godina E. Z., *The secular trend: history and prospects*, Hum. Physiol. 2009; 35 (6): 770-776
6. Antoszewski B., Sitek A., *Secular trends in the anthropometry of adolescents and college students: polish perspective*, [in:] Preedy V.R. (ed.) Handbook of Anthropometry: Physical Measures of Human Form in Health and Disease. Springer Science & Business Media. 2012; LLC: 1319-1336
7. Begić A., Halilović J. H., Mešalić L., Halilović S. H., *Secular trend of anthropometric parameters of newborns in municipalities of Tuzla Canton*, Med. Glas. 2016; 13 (2): 125-135
8. Simsek F., Ulukol B., Baskan Gulnar S., *The secular trends in height and weight of Turkish school children during 1993-2003*, Child. Care. Health. Dev. 2005; 31 (4): 441-447
9. Zhen-Wang B., Cheng-Ye J., *Secular growth changes in body height and weight in children and adolescents in Shandong, China between 1939 and 2000*, Ann. Hum. Biol. 2005; 32 (5): 650-665
10. Zong X. N., Li H., Zong-Han Z., *Secular trends in height and weight for healthy Han children aged 0-7 years in China, 1975-2005*, Am. J. Hum. Biol. 2011; 23: 209-215
11. Malinowski A., *Trend sekularny i jego zakłócenia w XX w. i na początku XXI (na przykładzie danych z Poznania)*, [w:] Zagórski J., Skład M. (red.). *Uwarunkowania rozwoju dzieci i młodzieży wiejskiej*, Wyd. IMW, Lublin 2003; 24-38
12. Wolański N., *Przemiany międzypokoleniowe, mikroewolucja czy długotrwałe fluktuacje przystosowawcze – fakty i opinie*, Prz. Antrop. 1987; 53 (1-2): 181-191
13. Popławska H., Dmitruk A., Wilczewski A., *Changes in body adiposity in girls and boys from the rural areas of East Poland over a time span of 20 years*, Ann. Hum. Biol. 2006; 33 (1): 78-88
14. Gomuła A., Nowak-Szczepeńska N., Danel D.P., Kozieł S., *Overweight trends among Polish schoolchildren before and after the transition from communism to capitalism*, Econ. Hum. Biol. 2015; 19: 246-257
15. Ignasiak Z., Sławińska T., *Zmiany sekularne wybranych cech morfologicznych dzieci w wieku przedpokwitaniowym*, Prz. Antrop. 1988; 52 (1-2): 181-185
16. Lintsi M., Kaarma H., *Growth of Estonian seventeen-year-old boys during last two centuries*, Econ. Hum. Biol. 2006; 4: 89-103
17. Wojnarowska B., Oblacińska A., *Stan zdrowia dzieci i młodzieży w Polsce. Najważniejsze problemy zdrowotne*, Studia BAS. 2014; 2 (38): 41-64

18. Malinowski A., *Wzrost niedostosowań społecznych młodzieży w kontekście przemian międzypokoleniowych rozwoju biologicznego.*, Zeszyty Naukowe Wyższej Szkoły Pedagogiki i Administracji w Poznaniu, 2006; 2: 42-46
19. Smith B. H., Garn S. M., Hunter W. S., *Secular trends in face size.* Angle Orthod. 1986; 196-204
20. Sanna E., Palmas L., *Changes in body and head dimensions in urban Sardinian children (3-5 years) from 1986 to 2001.* Ann. Hum. Biol. 2003; 30 (3): 295-303
21. Radochońska A. Perenc., *Zmienność wybranych cech morfologicznych głowy w populacji dzieci i młodzieży rzeszowskiej w wieku od 3 do 18 lat w okresie 25-lecia.* Prz. Med. Uniw. Rzesz. 2008; 2: 142-155
22. Cvetković M., Najman S., Nikolić M., *Secular changes in cephalic index – a study of Serbian school children.* Genetika. 2014; 46 (2): 561-568
23. Henneberg M., Budnik A., Pezacka M., Puch A. E., *Mechanizm procesu brachycefalizacji: różnicowa wrażliwość na choroby inwazyjne wieku dziecięcego.* Doniesienie wstępne, Prz. Antrop. 1984; 50 (2): 325-333
24. Kondo S., Wakatsuki E., Shibagaki H., *A somatometric study of the head and face in Japanese adolescents.* Okajimas. Folia. Anat. Jpn. 1999; 76 (4): b179-185
25. Kouchi M., *Brachycephalization in Japan has ceased.* Am. J. Phys. Anthropol. 2000; 112 (3): 339-347
26. Hossain M. G., Lestrel P. E., Ohtsuki F., *Secular changes in dimensions of Japanese females over eight decades.* Anthropological science. 2004; 112: 213-218
27. Ilayperuma I., *Evaluation of cephalic indices: a clue for racial and sex diversity.* Int. J. Morphol. 2011; 29 (1): 112-117
28. Vojdani Z., Bahmanpour S., Momeni S., Vasaghi A., Yazdizadeh A., Karamifar A., Najafifar A., Setoodehmaram S., Mokhtar A., *Cephalometry in 14-18 years old girls and boys of Shiraz-Iran high school.* Int. J. Morphol. 2009; 27 (1): 101-104
29. Swamy K. B., Zubaidi A. L., Suwaibah A. B. H., Azmi H., Norizahar K., Husbani M. A. R., Rohayah H., *The craniofacial indices correlate with age, gender and environmental influences – a study in Malaysian school children.* World Applied Sciences Journal 2013; 27 (2): 250-256
30. Little B. B., Buschang P. H., Peña Reyes M. E., Kheng Tan S., Malina R. M., *Craniofacial dimensions in children in rural Oaxaca, southern Mexico: secular change, 1968-2000.* Am. J. Phys. Anthropol. 2006; 131 (1): 127-136
31. Olapido G. S., Olotu J. E., Suleiman Y., *Anthropometric studies of cephalic indices of the Ogonis in Nigeria.* Asian J. Med. Sci. 2009; 1 (2): 15-17
32. Buretić-Tomljanović A., Ristić S., Brajenović-Milić B., Ostojić S., Gombač E., Kapović M., *Secular change in body height and cephalic index of Croatian medical students (University of Rijeka).* Am. J. Phys. Anthropol. 2004; 123: 91-96
33. Loesch D. Z., Stokes K., Huggins R. M., *Secular trend in body height and weight of Australian children and adolescents.* Am. J. Phys. Anthropol. 2000; 111 (4): 545-556
34. Hossain M. G., Lestrel P. E., Ohtsuki F., *Secular changes in head dimensions of Japanese adult male students over eight decades.* Homo. 2005; 55(3): 239-250
35. Jaeger U., *Secular trend in Germany.*, [w:] *Secular growth changes in Europe*, E. B. Bodzsar, C. Susanne (eds.) Eötvös Lorand University Press, Budapest 1998; pp. 135-159

36. Zellner K., Jaeger U., K. Kromeyer-Hauschild K., *The phenomenon of debrachycephalization in Jena school children*, *Anthropol. Anz.* 1998; 56 (4): 301-312
37. Susanne C., Vercauteren M., Krasnicanova H., Jaeger V., Hauspie R., Bruzek J., *Évolution séculaire des dimensions céphaliques*, *Bulletinset Mémoires de la Société d' Anthropologie de Paris.* 1988; 5 (14/3): 151-162
38. Vercauteren M., Hauspie R.C., Susanne C., *1998 Biometry of Belgian boys and girls: change since Quetelet.* [w:] *Secular Growth Changes in Europe*, Bodzsar E. B., Susanne C. (eds.) Eötvös Lorand University Press, Budapest 1998; pp. 47-63
39. Paulova M., Blaha P., Vingerova V., Riedlova J., *Influence of positioning of infants on long-term changes of cephalic dimensions*, *Cent. Eur. J. Public. Health.* 2000; 8 (2): 83-87
40. Kacznowski K. (red.), *Dziecko żywieckie*, Wyd. Zakład Antropologii UJ, Kraków 2005
41. Haduch E., Szczepanek A., Niedźwiecka E., *Anthropological studies in the Żywiec region – changes in the head proportions*, *Anthropologie.* 2004; 42 (2): 121-128
42. Cymek L. Roźnowski J., Roźnowski F., *Zmiany wymiarów głowy dzieci z terenu północnej Kaszubszczyzny (Pomorze, Polska) w ciągu ostatnich 60 lat*, *Słupskie Prace Biologiczne.* 2009; 6: 33-55
43. Puch E. A., Jaworski J. M., *Zmiany sekularne wysokości ciała w przemysłowym regionie Polski*, *Prz. Antrop.* 1994; 57 (1-2): 23-32
44. Malina R. M., *Secular trends in growth, maturation and physical performance: A review*, *Anthropol. Rev.* 2004; 67: 3-31
45. Hauspie R. C., Vercauteren M., Susanne C., *Secular changes in growth and maturation: An update*, *Acta Paediatr.* 1997; Suppl. 423: 20-27
46. Burgmeijer R. J. F., van Wieringen J. C., *Secular changes of growth in the Netherlands*, [w:] *Secular Growth Changes in Europe*, E. B. Bodzsar, C. Susanne (eds.) Eötvös Lorand University Press, Budapest 1998; pp. 233-262
47. Lenz W., Ort B. W., *Das Wachstum von Hamburger Schülern in den Jahren 1877 und 1957*, *Medizinische.* 1959; 47, 2265-2271
48. Chamla M. C., *L'accroissement de la stature en France de 1880 à 1960 ; comparaison avec les pays d'Europe occidentale*, *Bulletins et Mémoires de la Société d'anthropologie de Paris Année.* 1964; 6 (2): 201-278
49. Cardoso H., Caninas M, *Secular trends in social class differences of height, weight and BMI of boys from two schools in Lisbon, Portugal (1910-2000)*, *Econ. Hum. Biol.* 2010; 8: 111-120
50. Hulanicka B., *Zmieniająca się wysokość ciała dzieci szkolnych w Polsce*, [w:] *Medycyna szkolna: Główne problemy i kierunki rozwiązań systemowych*, J. Szymborski (red.) Vol. III, Warszawa 2002; 47-55
51. Boyne A. W., Aitken F. G., Leitch I., *Secular change in height and weight of British children, including an analysis of measurements of English children in primary schools; 1911-1953*, *Nutr. Abs. Rev.* 1957; 27: 1-18
52. Clements E. M. B., *Changes in the mean stature and weight of British children over the past seventy years*, *Brit. Med. J.* 1953; 2: 897-911
53. Roche A. F. (red.), *Secular trends in human growth, maturation and development*, *Monographs of the Society for Research in Child Development.* 1979; 44 (3-4, Serial No. 179)

54. Marrodán M. D., González M. L., Pérez A., Moreno S., *El crecimiento como reflejo de los cambios socioambientales*, Observatorio Medioambiental. 1998 1: 93-104
55. Rosique J. C., Gordón P. M. R., Rebato E. O., González-Montero M. E., Callejo L. G., Moreno E. H., Serrano M. D. M., *Estudio auxológico de muestras contemporáneas e históricas de la población Madrileña: aplicación del modelo 1 de Preece-Baines*, An. Esp. Pediatr. 2001; 54: 68-80
56. Papadimitriou A., Chiotis D., Tsiftis G., Hatzisimeon M., Maniati M., Krikos X., Tzonou A., Dacou-Voutetakis C., *Secular growth changes in the Hellenic population in the twentieth century*, Hormones. 2002; 1: 245-250
57. Lu R., Zeng X., Duan J., Gao T., Huo D., Zhou T., Song Y., Deng Y., Guo X., *Secular growth trends among children in Beijing (1955-2010)*, Econ. Hum. Biol. 2016; 21: 210-220
58. Takaishi M., *Estimations for body height and body weight of Japanese children and youth at the end of the 20th century* [w:] *Auxology '94: Children and youth at the end of the 20th century*, O. Eiben (red.) Eötvös Lorand University Press, Budapest 1994, pp. 267-275
59. Takaishi M., *Growth standards for Japanese children – an overview with special reference to secular change in growth*, [w:] *Essays on auxology*. R. Hauspie, G. Lindgren, F. Falkner (red.) Castlemead Publications, Welwyn Garden City, Hertfordshire, U.K. 1995, pp. 302-311
60. Prokopec M., *Changes in human morphology during the 20th century (example from the Czech Republic)*, Pap. Anthropol. 2005; 14: 251-278
61. Chamla M. C., *L'evolution de la stature en Europe occidentale entre 1960 et 1980. Hypothese sur les facteurs responsables*, Compte Rendu Acad. Sci. Paris 1983; 296 (3): 217-220
62. Bielicki T., Szklarska A., Kozieł S., Uljaszek S. J., *Changing patterns of social variation in stature in Poland: effects of transition from a command economy to the free-market system?*, J. Biosoc. Sci. 2005; 37: 427-434
63. Jordan S., Lim L., Seubsman A., Bain C., Sleigh A., *Secular changes and predictors of adult height for 86 105 male and female members of the Thai Cohort Study born between 1940 and 1990*, J. Epidemiol. Community. Health. 2012; 66: 75-80
64. Nowicki G., *Secular changes of height and body mass of children and youth in the Bydgoszcz region*, Anthropol. Rev. 2000; 63: 119-126
65. Górniak K., Wilczewski A., Popławska H., Huk-Wieliczuk E., Dmitruk A., Lichota M., Hołub W., Czeczuk A., Kargulewicz B., *Zmiany w rozwoju biologicznym dziewcząt i chłopców wiejskich z powiatu bialskiego w okresie między 1998 a 2008 rokiem*, Wyd. AWF w Warszawie, ZWWF w Białej Podlaskiej, Biała Podlaska 2012
66. Jopkiewicz A., Przychodni A., Jopkiewicz A., Krzystanek K., *Pozytywne wskaźniki zdrowia dzieci i młodzieży kieleckiej*, Wyd. Instytut Technologii Eksploatacji – Państwowy Instytut Badawczy, Radom – Kielce 2011
67. Malinowski A., Chlebna-Sokół D. (red.), *Dziecko łódzkie. Metody badań i normy rozwoju biologicznego*, Wyd. Ankał, Łódź 1998
68. Żądzińska E. (red.), *Dziecko łódzkie 2004. Normy rozwoju biologicznego*, Wyd. UŁ, Łódź 2009
69. Cymek L. Rożnowski J., Rożnowski F., *Dzieci koszalińskie w świetle badań antropometrycznych z 1978, 1988, 1998*, [w:] Jopkiewicz A. (red.) *Auksologia a promocja zdrowia*, T. 3. Wyd. KTN, Kielce 2004; 161-168
70. Cymek L. Rożnowski J., Rożnowski F., *Badania trendów sekularnych w rozwoju fizycznym dzieci i młodzieży z Pomorza*, [w:] Jopkiewicz A. (red.) *Auksologia a promocja zdrowia*, T. 5. Wyd. KTN i ALMAMER, Kielce – Warszawa 2010; 15-26

71. Radochońska A. Perenc., *Trendy w rozwoju fizycznym dzieci i młodzieży z Rzeszowa w dwudziestopięcioleciu 1978–2004*, Prz. Med. Univ. Rzesz. 2009; 3: 239-250
72. Vingerová J., Brabec M., Bláha P., *Two centuries of growth among Czech children and youth*, Econ. Hum. Biol. 2006; 4: 237-252
73. Kopecký M., Pridalová M., *The secular trend in the somatic development and motor performance of 7-15-old-year girls*, Medicina Sportiva. 2008; 12 (3): 78-85
74. Roelants M., Hauspie R., Hoppenbrouwers K., *References for growth and pubertal development from birth to 21 years in Flanders, Belgium*, Ann. Hum. Biol. 2009; 36 (6): 680-694
75. Papadimitriou A., Konstantinidou M., Christopanou H., Xepapadaki P., Giannouli O., Nicolaidou P., *Secular trend in body height of schoolchildren in Northeast Attica, Greece*, J. Pediatr. Endocrinol. Metab. 2009; 22 (1): 13-17
76. Özer B., *Growth reference centiles and secular changes in Turkish children and adolescents*, Econ. Hum. Biol. 2007; 5: 280-301
77. Lalys L., Pineau J. C., Serre T., Bartoli C., Leonetti G., *Évolution séculaire des dimensions anthropométriques chez des enfants français âgés de trois à 11 ans, entre 1953 et 2005*, C. R. Biologies. 2012; 335: 129-134
78. Sousa B., Oliveira B. M. P. M., de Almeida M. D. V., *Growth trends in boys and girls (10-17 years-old) from autonomous region of Madeira, Portugal between 1996-1998 and 2007-2009*, Ann. Hum. Biol. 2012; 39(6): 526-529
79. Krawczyński M., Walkowiak J., Krzyżaniak A., *Secular changes in body height and weight in children and adolescents in Poznań, Poland, between 1880 and 2000*, Acta Paediatr. 2003; 92: 277-282
80. Sitek A., Szkudlarek A., Antoszewski B., *Secular changes in the physical development of students of the Medical University of Łódź*, Folia Morphol. (Warsz.). 2007; 66 (1): 62-68
81. Kurokawa N., Nakai K., Suzuki K., Shimada M., Kameo S., Nakatsuka H., Satoh H., *Trends of growth status among schoolchildren in Sendai, Japan, 1994-2003: leveling-off mean body height and weight*, Tohoku. J. Exp. Med. 2008; 216 (4): 372-375
82. Resiak M., *Tendencje przemian w poziomie rozwoju somatycznego i sprawności fizycznej w zależności od wielkości wskaźnika masy ciała (BMI) u 6-letnich dzieci w latach 1995-2004*, Wyd. AWFIS, Gdańsk 2007
83. Bielicki T., *Nierówności społeczne w Polsce w ocenie antropologa*, [w:] *Nierówności społeczne w Polsce w świetle mierników biologicznych*, Wyd. PAN, Wrocław – Warszawa – Kraków 1992; 5-20
84. Cole T. J., *The secular trend in human physical growth: a biological view*, Econ. Hum. Biol. 2003; 1: 161-168
85. Zellner K., Jaeger U. K., Kromeyer-Hauschild K., *Height, weight and BMI of schoolchildren in Jena, Germany – are the secular changes leveling off*, Econ. Hum. Biol. 2004; 2: 281-294
86. Danubio M., E., Sanna E., *Secular changes in human biological variables in Western Countries: an updated review and synthesis*, J. Anthropol. Sci. 2008. 86: 91-112
87. Henneberg M., *Secular trends in body height – indicator of general improvement in living conditions or of a change in specific factors?*, Perspectives in Human Growth, Development and Maturation. 2001; 159-167
88. Malinowski A., Strzałko J. (red.), *Antropologia*, PWN, Warszawa – Poznań 1989

89. Meredith H. V., *Change in the stature and body weight of North American boys during the last 80 years*, Adv. Child Dev. Behav. 1963; 1: 69-114
90. Kono M., Natori M., Baba K., *Chronological change of birth weight in Japan*, J. Pediatr. Practice 1962; 25: 10-12
91. Spurgeon J. H., Young N. D., Meredith H. V., *Body size and form of American-born boys of Dutch ancestry residing in Michigan*, Growth. 1959; 23: 55-71
92. Jéniček M., Demirjian A., Dubuc M. B., *Tendance séculaire de la croissance infantile au Canada: Etude comparative*, Courier of the International Children's Centre. 1972; 22: 125-136
93. Krawczyński M., *Wzrastanie, dojrzewanie i sprawność fizyczna dzieci i młodzieży w Polsce na przełomie XX i XXI wieku*, Endokrynol. Ped. 2003; 1 (2): 9-16
94. Palczewska L., Niedźwiecka Z., Szilagyi-Papowska L., Pawlik K., *Trend sekularny wzrastania dzieci i młodzieży warszawskiej w ciągu ostatnich 20 lat*, Med. Wieku Rozw. 2000; 4 (2): 161-176
95. Kolarzyk E., Helbin J., Kwiatkowski J., Lang-Młynarska D., Potocki A., Wojtowicz B., *Ocena wskaźników wagowo-wzrostowych dzieci krakowskich w wieku 6-14 lat*, Prob. Hig. Epidemiol. 2007; 88 (3): 336-342
96. Zajc Petranović M., Željka T., Smolej Narančić N., Škarić-Jurić T., Veček A., Miličić J., *A six decades long follow-up on body size in adolescents from Zagreb, Croatia (1951-2010)*, Econ. Hum. Biol. 2014; 13: 155-164
97. Kowal M., Cichocka B. A., Woronowicz A., Pilecki M. W., Sobiecki J., Kryst Ł., *Międzypokoleniowe zmiany w budowie ciała i akceleracja pokwitania u dzieci i młodzieży w wieku 7-15 lat z populacji wielkowiejskiej w świetle uwarunkowań psychosocjalnych*, Kowal M., Cichocka B. A. (red.) Wyd. AWF, Kraków 2011
98. Freedman D. S., *Clustering of coronary heart disease risk factors among obese children*, J. Pediatr. Endocrinol. Metab. 2002; 15: 1099-1108
99. Burke V., Beilin L. J., Simmer K., Oddy W. H., Blake K. V., Doherty D., Kendall G. E., Newnham J. P., Landau L. I., Stanley F. J., *Predictors of body mass index and associations with cardiovascular risk factors in Australian children: a prospective cohort study*, Int. J. Obes. 2005; 29 (1): 15-23
100. Łuszczki E., Dereń K., Baran J., Weres A., Mazur A., *Trend sekularny występowania nadwagi i otyłości wśród dzieci w przedszkolach regionu rzeszowskiego*, Endokrynol. Ped. 2015; 14/4 (53): 29-34
101. Ogden C. L., Carroll M. D., Kit B. K., Flegal K. M., *Prevalence of obesity and trends in body mass index among US children and adolescents, 1999-2010*, JAMA 2012; 307 (5): 483-490
102. Péneau S., Salanave B., Maillard-Teyssier L., Rolland-Cachera M. F., Vergnaud A. C., Méjean C., Czernichow S., Vol S., Tichet J., Castetbon K., Hercberg S., *Prevalence of overweight in 6- to 15- year-old children in central/western France from 1996 to 2006: trends toward stabilization*, Int. J. Obes. (Lond) 2009; 33 (4): 401-407
103. Aeberli I., Ammann R. S., Knabenhans M., Molinari L., Zimmermann M. B., *Decrease in the prevalence of paediatric adiposity in Switzerland from 2002 to 2007*, Public Health Nutrition. 2010; 13 (6): 806-811
104. Chrzanowska M., Kozioł S., Ulijaszek S. J., *Changes in BMI and the prevalence of overweight and obesity in children and adolescents in Cracow, Poland, 1971-2000*, Econ. Hum. Biol. 2007; 5 (3): 370-378

105. Sørensen T. I. A., Price R. A., *Secular trends in body mass index among Danish young men*, Int. J. Obes. 1990; 14: 411-419
106. Hulens M., Beunen G., Claessens A., Lefevre J., Thomis M., Philippaerts R., Borms J., Vrijens J., Lysens R., Vansant G., *Trends in BMI among Belgian children, adolescents and adults from 1969 to 1996*, Int. J. Obes. 2001; 25: 395-399
107. Smith S. M., Craig L. C. A., Raja A. E., McNeill G., Turner S. W., *Growing up before growing out: secular trends in height, weight and obesity in 5-6-year-old children born between 1970 and 2006*, Arch. Dis. Child. 2013; 98: 269-273
108. Murata M., *Secular trends in growth and changes in eating patterns of Japanese children*, Am. J. Clin. Nutr. 2000; 72 (suppl.): 1379S-1383S
109. Malina R. M., Peña Reyes M. E., Little B. B., *Secular change in the growth status of urban and rural schoolchildren aged 6-13 years in Oaxaca, southern Mexico*, Ann. Hum. Biol. 2008; 35 (5): 475-489
110. Malinowski A., *Trend sekularny i czasowa zmienność cech i standardów antropometrycznych Polaków w XX wieku*, [w:] Zagórski J., Popławska H., Skład M. (red.). *Uwarunkowania rozwoju dzieci i młodzieży wiejskiej*, Wyd. IMW, Lublin 2004; 707-715
111. Radochońska A. Perenc., *Zmiany proporcji budowy ciała dzieci i młodzieży rzeszowskiej w wieku od 3-18 lat dwudziestopięcioletni 1978-2004*, Prz. Med. Uniw. Rzesz. 2010; 1: 30-48
112. Malina R. M., Peña Reyes M. E., Kheng Tan S., Buschang P. H., Little B. B., Kozieł S., *Secular change in height, sitting height and leg length in rural Oaxaca, southern Mexico: 1968-2000*, Ann. Hum. Biol. 2004; 31 (6): 615-633
113. Godina E. Z., *Secular trends in some Russian populations*, Anthropol. Anz. 2011; 68 (4): 367-377
114. Kryst L., Woronkiewicz A., Kowal M., Sobiecki J., *Intergenerational changes in chest size and proportions in children and adolescents aged 3-18 from Kraków (Poland), within the last 70 years*, Am. J. Hum. Biol. 2016; DOI 10.1002/ajhb.22918

Międzypokoleniowe przemiany rozwoju fizycznego dzieci i młodzieży – przegląd badań

Problematyka przemian międzypokoleniowych rozwoju biologicznego, zwanych również tendencją przemian lub trendem sekularnym, stanowi przedmiot zainteresowania biologów, antropologów czy epidemiologów. Do składowych tego zjawiska należą: akceleracja rozwoju i dojrzewania biologicznego, zmiany kolejności niektórych etapów rozwojowych (np. kostnienia czy dentycji) oraz retardacja procesów inwolucji. Występowanie trendu sekularnego jest wynikiem stałej interakcji genotypu z oddziaływaniem czynników środowiska. W pracy przedstawiono kilka aspektów badań nad zmiennością czasową rozwoju różnych cech morfologicznych i dojrzewania na podstawie literatury polskiej oraz światowej. Istotnym wskaźnikiem zmian sekularnych w ciągu ostatniego stulecia była akceleracja rozwoju każdego następnego pokolenia, która przejawia się we wcześniejszym osiągnięciu kolejnych etapów rozwojowych, a jej efektem są: zwiększenie ostatecznych wielkości niektórych cech i zmiany proporcji ciała. Tendencją do osiągnięcia większej wysokości i masy ciała w okresie dzieciństwa i młodzieńczym oraz do obniżania wieku *menarche* obserwowano w Europie, USA czy Azji. W niektórych krajach rozwiniętych trend sekularny wysokości ciała zatrzymał się, zaś masa ciała wykazuje dalszy wzrost, co skutkuje występowaniem epidemii nadwagi i otyłości. Zwiększanie wymiarów ciała odnotowano w populacjach dzieci z różnych regionów Polski, chociaż wyniki niektórych badań również wskazują na zjawisko wygaszania trendów sekularnych. Akceleracja rozwoju nie dotyczy wszystkich cech w takim samym stopniu. Zaobserwowano trend do wydłużania się kończyny dolnej, bez zmian w zakresie długości tułowia i głębokości klatki piersiowej.

Natomiast stwierdzono tendencję do poszerzania barków i klatki piersiowej oraz do zmniejszania szerokości bioder. W wielu krajach europejskich wykazano trend do debrachycefalizacji (długogłowienia), podczas gdy w niektórych populacjach azjatyckich nadal utrzymuje się krótkogłowość. Za przyczyny tendencji przemian uważa się czynniki środowiskowe wynikające z rozwoju cywilizacji, a zatem wpływające na: poprawę standardu życia, jakości żywienia, opieki zdrowotnej, jak również na ograniczenie wystąpienia chorób zakaźnych i zmniejszenie obciążenia wysiłkiem fizycznym oraz wzrost poziomu uprzemysłowienia i urbanizacji.

Słowa kluczowe: trend sekularny, cechy morfologiczne

Intergenerational changes in the physical development of children and adolescents – a review of research

The issue of intergenerational changes of biological development, also known as the tendency of changes or secular trend, is the subject of interest to biologists, anthropologists and epidemiologists. The elements of this phenomenon include: the acceleration of the development and biological maturation, modifications in the sequence of certain developmental stages (i.e. ossifications and dentitions) and retardation of involution processes. The occurrence of the secular trend is the result of constant interaction of genotype with the influence of environmental factors. The paper presents several aspects of the research into the temporal variability of development of different morphological features and maturation on the basis of Polish and world literature. An important indicator of secular changes in the last century has been developmental acceleration in each of the next generation, which manifests itself in: an earlier achievement of successive stages of development, and its effect is an increase in the final value of some features and changes of body proportions. The tendency to achieve increased body height and weight during childhood and adolescence and lowered age at menarche was observed in Europe, USA and Asia. In some developed countries, the secular trend of body height stopped, and the body weight keeps increasing, which results in massive overweight and obesity. An increase in body measurements was recorded in children's populations from different Polish regions, although some studies also point to the phenomenon of extinction of secular trends. Acceleration of the development does not concern all the features to the same degree. There was observed a trend to an increase in the lower extremity, with the trunk length and the chest depth unaffected. Other findings included the tendency to broadening of the shoulders and chest and to narrowing the width of the hips. Many European countries show a trend to debrachycephalization (long head), while in some Asian populations brachycephalization prevails. The causes of the tendency changes are attributed to environmental factors arising from the development of civilization and thus affecting the improvement of living standard, nutrition quality, health care, as well as lower infectious disease incidence, reduced physical effort and increased level of industrialization and urbanization.

Keywords: secular trend, morphological features

Postawy zdrowotne kobiet makroregionu lubelskiego wobec profilaktyki raka piersi

1. Wstęp

Określenie poziomu wiedzy, a także poznanie postaw zdrowotnych kobiet względem profilaktyki raka piersi to niezwykle istotny element w podejmowaniu działań ukierunkowanych na umacnianie zdrowia kobiet. Profilaktyka umożliwia podjęcie jak najwcześniejszych działań w celu zapobiegania rozwojowi nowotworu oraz w znacznym stopniu gwarantuje zastosowanie prawidłowych technik diagnostycznych oraz metod leczenia raka piersi. Obecnie rak piersi jest dużym problemem społecznym i zdrowotnym. Jest on najczęstszą przyczyną zachorowalności oraz umieralności z powodu choroby nowotworowej spośród wszystkich nowotworów występujących u kobiet. Pomimo wielu prób zwiększania świadomości kobiet oraz edukacji zdrowotnej, odsetek zgonów jest wciąż duży. Kobiety bardzo często nie zdają sobie sprawy jak dużym problemem jest rak piersi, uważają, że ten problem ich nie dotyczy. Największą świadomość mają kobiety, u których w rodzinie wystąpił nowotwór i kobiety starsze. Pomimo szerokiego dostępu do różnych informacji wiedza na temat czynników zwiększających ryzyko zachorowania, objawów oraz badań w kierunku raka piersi jest znikoma.

2. Epidemiologia raka piersi w Polsce i na świecie

Nowotwór piersi jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym wśród kobiet na świecie, stanowi także drugą przyczynę zgonów z powodu choroby nowotworowej [1]. Wśród mężczyzn ten nowotwór występuje znacznie rzadziej, jego częstość wynosi poniżej 1% [2]. Porównując Polskę z innymi krajami należy zwrócić szczególną uwagę, że zachorowalność na nowotwór piersi jest na średnim poziomie. Na przestrzeni lat rejestrowanych jest w ciągu roku blisko 12 tysięcy nowych przypadków, a rocznie umiera około 5 tysięcy kobiet [3]. Współczynnik zachorowalności kobiet jest najwyższy wśród mieszkanek dużych miast. Związane jest

¹ Katedra Zdrowia Publicznego Wydział Nauk o Zdrowiu Uniwersytet Medyczny w Lublinie; anna.pacian@umlub.pl

² Katedra Zdrowia Publicznego Wydział Nauk o Zdrowiu Uniwersytet Medyczny w Lublinie

³ Absolwentka kierunku Zdrowie Publiczne Wydział Nauk o Zdrowiu Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁴ Studentka kierunku Zdrowie Publiczne Wydział Nauk o Zdrowiu Uniwersytet Medyczny w Lublinie

to z kumulacją wielu szkodliwych czynników ryzyka np. nieprawidłowego odżywiania, chronicznego stresu, palenia tytoniu oraz zanieczyszczenia środowiska naturalnego. Dieta, środowisko naturalne oraz zachowania społeczne mają ogromny związek z zachorowalnością na nowotwór piersi [4]. Kolejną z przyczyn rosnącej liczby zachorowań na raka piersi jest mały dostęp do badań genetycznych, dzięki którym możliwe jest badanie predyspozycji do zachorowania na określony nowotwór [5]. Przyczyn należy doszukiwać się także w zbyt późnym zgłaszaniu się kobiet na badania, co wpływa na późne rozpoznanie choroby nowotworowej. Współczynnik zachorowalności i umieralności z powodu nowotworów piersi wciąż wzrasta pomimo dużego postępu w działaniach z zakresu diagnostyki i leczenia. Obecnie najwyższy współczynnik zachorowalności odnotowuje się w Ameryce Północnej, w niektórych regionach Ameryki Południowej, dużej części Europy oraz w Australii. Z kolei najniższy współczynnik standaryzowany występuje we wschodniej części Afryki [6]. Pomimo poziomu aktualnej wiedzy, nowoczesnych technik diagnostycznych, skutecznych metod leczenia, rak piersi jest nadal ogromnym wyzwaniem i wciąż uchodzi za duży problem zarówno społeczny, jak i medyczny [7].

3. Czynniki ryzyka rozwoju raka piersi

Pomimo znacznego postępu medycyny, wciąż nie jest znana etiologia rozwoju raka piersi. Wiadomo jest, że do powstania nowotworu piersi przyczynia się wiele czynników zwiększających ryzyko zachorowania.[8]. Wśród czynników ryzyka wyróżnia się takie które można modyfikować (np. styl życia) oraz czynniki nie poddające się modyfikacji (np. czynniki genetyczne) [9].

Czynniki zwiększające ryzyko zachorowania na raka piersi to:

1. **Rak piersi w wywiadzie.** Przebyty w przeszłości rak piersi jest czynnikiem zwiększającym ryzyko wystąpienia raka w drugiej piersi, szczególnie wtedy, gdy rak piersi wystąpił przed okresem menopauzy [10].
2. **Płeć.** Rak piersi występuje znacznie częściej u kobiet niż u mężczyzn. Źródła podają, że mężczyźni 100 razy rzadziej zapadają na nowotwór piersi niż kobiety. Jednak w obu tych przypadkach postępowanie diagnostyczne oraz leczenie wygląda tak samo. Osoby, u których istnieje podejrzenie nowotworu poddawane są badaniu mammograficznemu, ultrasonograficznemu oraz biopsji [11].
3. **Wiek.** Im starsza osoba, tym ryzyko zachorowania na raka piersi jest większe. Współczynnik umieralności jest znacznie wyższy wśród kobiet w starszym wieku w porównaniu do kobiet młodych [12]. Obecnie obserwujemy zjawisko starzejącego się społeczeństwa, w związku z tym są liczniejsze przypadki osób chorych na raka piersi w wieku 70 lat i więcej [13]. Jednak największy odsetek

chorych stanowią kobiety po 50 roku życia (około 30% wszystkich zachorowań) [14].

4. **Czynnik genetyczny.** Zdecydowanie jest to najważniejszy czynnik zwiększający ryzyko wystąpienia choroby [15]. Kobiety, u których w rodzinie występował lub występuje rak piersi są w znacznym stopniu narażone na zachorowanie, szczególnie gdy chorują najbliżsi krewni tj. matka, siostra. Ryzyko zachorowania wzrasta wraz z liczbą osób chorujących w rodzinie, ale także gdy nowotwór rozwinął się przed okresem menopauzy lub u osoby bliskiej wystąpił rak jajnika. Jeżeli krewnym, chorującym na raka piersi jest mężczyzna, ryzyko także wzrasta [16]. Genetyczne uwarunkowanie dotyczy około 5-10% przypadków zachorowania na raka piersi. Geny odpowiedzialne za powstanie mutacji to gen BRCA1 (w obrębie chromosomu 17) i gen BRCA2 (w obrębie chromosomu 13). W obrębie tych genów najczęściej dochodzi do mutacji, które charakteryzują się różnym stopniem penetracji. Dwa te geny związane są także z ryzykiem rozwoju innych nowotworów. Gen BRCA1 odpowiedzialny jest za rozwój raka jajnika oraz prostaty, a gen BRCA2 dotyczy rozwoju raka piersi głównie wśród mężczyzn, raka prostaty, raka trzustki, czerniaka [17].
5. **Dieta.** Jak w każdej dziedzinie medycyny niewłaściwa dieta może przyczynić się do zwiększenia ryzyka zachorowania na daną chorobę. W przypadku raka piersi czynnikiem predysponującym do rozwoju choroby może być spożywanie zbyt dużych ilości tłuszczów co w konsekwencji prowadzi do otyłości [18]. Wśród kobiet, u których występuje otyłość i które są po okresie menopauzy występuje większe ryzyko rozwoju raka piersi. W takich przypadkach napotyka się na trudności w postępowaniu diagnostycznym, zwiększone jest ryzyko powikłań podczas leczenia, choroba częściej może nawracać, wzrasta ryzyko zgonów oraz zachorowań na nowotwór piersi w drugiej, zdrowej piersi [19]. Powszechnie przyjęto, że przy otyłości ryzyko zachorowania wzrasta aż trzykrotnie. Spowodowane jest to wysokim poziomem estrogenów u kobiet otyłych zlokalizowanych w tkance obwodowej. Otyłość przyczynia się także do wystąpienia wczesnej miesiączki oraz późnej menopauzy [20].
6. **Alkohol.** Spożywanie alkoholu nawet w małych ilościach, ale w sposób regularny tj. codziennie, zwiększa odsetek zachorowań już przed 30 roku życia.
7. **Niektóre łagodne zmiany piersi.** Dotyczy to przede wszystkim zmian z atypią i proliferacją. U osób z takimi zmianami obserwuje się czterokrotnie zwiększone ryzyko zachorowania na raka piersi. Od zdiagnozowania zmian nowotwór rozwija się w przeciągu 10 lat [21].
8. **Mała aktywność fizyczna.** Z tym czynnikiem ryzyka wiąże się siedzący tryb życia. W wyniku małej aktywności fizycznej następuje zwiększenie produkcji estrogenów. Stosując profilaktykę polegającą na podjęciu działań zwiększających

- ruch, hamuje się czynność jajników i spada produkcja hormonów przyczyniających się do powstania raka piersi [22].
9. **Doustne środki antykoncepcyjne.** Przeprowadzone wieloletnie badania naukowe prezentowane w literaturze wykazują, że wieloletnie stosowanie leków antykoncepcyjnych może przyczynić się do zwiększenia ryzyka rozwoju raka piersi, szczególnie w połączeniu z paleniem tytoniu.
 10. **Hormonalna terapia zastępcza.** Dotyczy głównie kobiet po menopauzie. Ryzyko jest tym większe im dłużej hormonalna terapia zastępcza jest stosowana. Badania naukowe prezentowane w literaturze informują, że ta terapia musi być stosowana minimalnie 10 lat aby kwalifikować ją jako czynnik ryzyka.
 11. **Aktywność hormonalna.** Związana jest liczbą cykli miesięczkowych w czasie życia. Na zwiększenie ryzyka wpływa przede wszystkim wczesne wystąpienie miesiączki (od 12 roku życia) oraz zanik miesiączkowania po 50 roku życia. U takich kobiet ryzyko zachorowania jest dwa razy większe niż u kobiet które rozwijają się w sposób prawidłowy.
 12. **Bezdzielnosć lub późne macierzyństwo.** Wśród kobiet, które nie zdecydowały się na dziecko lub zbyt późno zaszły w ciążę (po 30 roku życia) szacuje się, że ryzyko jest większe 2-5 razy. Wczesny poród (przed 18 rokiem życia) oraz liczne potomstwo korzystnie wpływa na zapobieganie wystąpienia raka piersi.
 13. **Poronienia.** W wyniku samoistnych i sztucznych poronień może dojść do zachorowania ponieważ progesteron nie chroni kobiety jak w przypadku ciąży pełnej[23].
 14. **Ekspozycja na promieniowanie UV.**
 15. **Inne zespoły chorobowe** np. Zespół Lyncha II, Li-Fraumeni, Peutza-Jeghersa, choroba Bowdenów [24].

4. Profilaktyka raka piersi

Nowotwór piersi stanowi główną przyczynę śmierci z powodu chorób nowotworowych. Jednak znaczny postęp medycyny pozwala na skuteczną walkę z tą chorobą. Obecnie coraz więcej podejmowanych jest działań z zakresu profilaktyki. Znaczny postęp w zakresie metod diagnostycznych i terapeutycznych w dużej mierze przyczynia się do wyleczenia kobiet chorujących na nowotwór piersi. Dzięki temu osoby dotknięte chorobą mają duże szanse na powrót do pełnego zdrowia [25]. Okazuje się, że bardzo ważne znaczenie ma profilaktyka polegająca na przekazaniu wiedzy osobom zdrowym dotyczącej czynników ryzyka, objawów, wczesnego rozpoznania oraz metod leczenia nowotworów piersi [26].

4.1. Profilaktyka pierwotna

Działania z zakresu tej profilaktyki mają za zadanie zwiększać wiedzę kobiet dotyczącą głównie czynników ryzyka, przyczyniających się do wzrostu liczby zachorowań na nowotwór piersi. Dzięki dobrej znajomości czynników wpływających negatywnie na zdrowie możliwa jest szybka reakcja na zmiany zachodzące w organizmie [27]. Modyfikacja lub całkowite wyeliminowanie pewnych zachowań zdrowotnych związanych przede wszystkim ze stylem życia wpływa bardzo korzystnie na zdrowie lub dalsze postępowanie diagnostyczne. Wszystkie te działania prowadzą do zwiększenia kontroli nad czynnikami szczególnie wśród kobiet, które znajdują się w grupie podwyższonego ryzyka zachorowania na raka piersi. Za przynależność do tej grupy odpowiadają takie czynniki jak: regularne spożywanie nawet niewielkich ilości alkoholu oraz produktów zawierających duże ilości tłuszczów nasyconych, nadwaga prowadząca do otyłości, brak aktywności fizycznej. Aby zapobiec rozwojowi raka należy zmienić dotychczasowy styl życia; unikać spożywania alkoholu, dietę wzbogacić w warzywa oraz owoce, a także zwiększyć aktywność ruchową [28]. Najogólniej profilaktykę pierwotną należy rozumieć jako działania zapobiegające zachorowalności i umieralności z powodu danej choroby. Aby wszelkie działania były skuteczne powinny być bardzo starannie przygotowane oraz w miarę możliwości szybko wprowadzone w życie.

4.2. Profilaktyka wtórna

Działania z zakresu tej profilaktyki obejmują wczesne wykrywanie zmian chorobowych. Profilaktyka wtórna jest skuteczna pod warunkiem, że do badania zgłaszają się osoby, u których nie występują zaawansowane objawy kliniczne choroby. Celem takich badań jest jak najwcześniejsze rozpoznanie schorzenia przebiegającego bezobjawowo [29]. W przypadku choroby nowotworowej bardzo ważnym czynnikiem rokującym jest czas. Postawienie wczesnej diagnozy ma ogromny wpływ na rokowanie oraz cały proces leczenia. U kobiet z bezobjawowym przebiegiem choroby dokonuje się często późne diagnozowanie nowotworu, a wczesna diagnoza stawiana jest kobietom, u których wcześniej wykryto zmiany chorobowe w obrębie piersi.

Działania profilaktyczne dotyczą:

- stosowania przez społeczeństwo zaleceń dotyczących zdrowego trybu życia oraz działań prozdrowotnych np. samokontrola piersi, uczestnictwo w badaniach profilaktycznych, zwracanie uwagi na niebezpieczne oznaki mogące świadczyć o rozwoju raka. Podstawowymi oznakami są przede wszystkim: wyciek płynu lub krwi z brodawek piersi, wyczuwalny guzek w piersi, zmiana w kształcie i wielkości brodawki piersi, owrzodzenia, zaburzenia trawienia oraz nieustępujący kaszel lub chrypka,

- stosowanie się do zaleceń wydawanych przez konkretne instytucje zajmujące się zdrowiem,
- poddawanie się rutynowym badaniom wykonywanym przez lekarzy oraz pielęgniarki
- udział w zorganizowanych badaniach skryningowych. Są to badania przesiewowe skierowane do określonej grupy osób bez objawów klinicznych. W badaniu tym wyodrębnia się osoby z testem nieprawidłowym (dodatnim) oraz testem prawidłowym (ujemnym). Osoby u których wynik wszedł dodatni są prawdopodobnie chore i są kierowane są na dalsze badania, a osoby z wynikiem ujemnym są najprawdopodobniej zdrowe. Muszą zostać spełnione określone warunki, aby możliwe było wykonanie badań skryningowych. Po pierwsze musi być prawdopodobieństwo zdiagnozowanie zmiany we wczesnej fazie, po drugie stosowany do badań test musi być wiarygodny, a po trzecie korzyści z leczenia wczesnych przypadków muszą być większe niż przypadków w zaawansowanej fazie choroby. Warunki do tych badań spełniają choroby nowotworowe takie jak np. rak piersi, rak szyjki macicy, rak gruczołu krokowego, rak jelita grubego oraz wiele innych chorób onkologicznych [30].

Pomimo wielu korzyści płynących z uczestnictwa w badaniach profilaktycznych, wciąż liczba kobiet zgłaszających chęć udziału w badaniach jest mała. Najczęściej wynika to z niedostatecznej wiedzy dotyczącej roli profilaktyki lub może wynikać z napotykanymi barier utrudniających udział w takich badaniach [31]. Dlatego też należy uświadamić społeczeństwo o roli badań profilaktycznych, ponieważ wczesne rozpoznanie choroby może w znacznym stopniu przyczynić się do całkowitego powrotu do zdrowia [32].

5. Metodologia badań

Głównym celem pracy była ocena postaw zdrowotnych kobiet makroregionu lubelskiego na temat profilaktyki raka piersi.

Metodę badawczą niniejszej pracy był sondaż diagnostyczny. Jako technikę badawczą zastosowano ankietowanie.

W celu zrealizowania badań stworzono i wykorzystano autorski kwestionariusz ankiety jako narzędzie badawcze pracy. Grupę docelową stanowiły kobiety w wieku 25-60 lat. Kwestionariusz ankiety był całkowicie anonimowy i zawierał 34 pytania. Pytania były zarówno jednokrotnego, jak i wielokrotnego wyboru o charakterze zamkniętym. Pierwsza część kwestionariusza ankiety zawierała metryczkę, która określała wiek, miejsce zamieszkania, stan cywilny, wykształcenie, rodzaj wykonywanej pracy oraz sytuację materialną. Dalsza część ankiety dotyczyła przede wszystkim oceny wiedzy na temat profilaktyki, czynników ryzyka oraz objawów raka piersi.

6. Wyniki badań

6.1. Charakterystyka badanej populacji

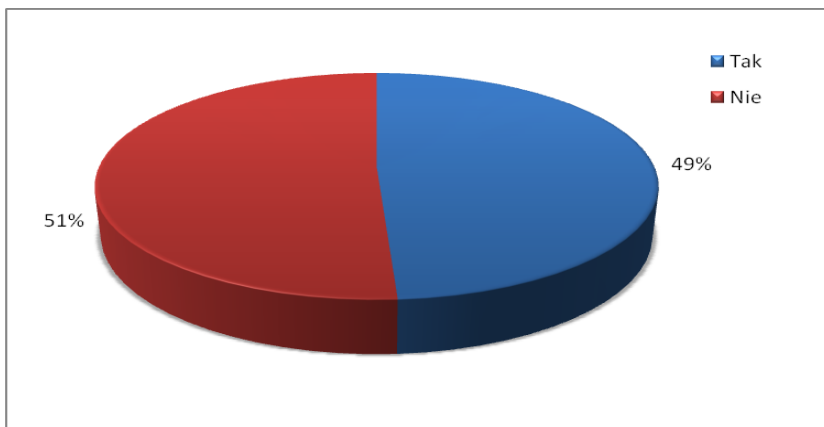
Badaniem objęto 100 kobiet, mieszkanek województwa lubelskiego wybranych w sposób losowych. Najwięcej kobiet było w grupie wiekowej 25-34 lat- 51%, w grupie 35-44 lat- 19%, natomiast w grupie 45-60 lat- 30%. Wśród wszystkich kobiet 53% mieszkało w małym mieście do 100 tys. mieszkańców, 24% na wsi, a 23% w dużym mieście ponad 100 tys. mieszkańców. Badając stan cywilny okazało się, że 48% to mężatki, 40% osób to panny, 9% to kobiety rozwiedzione i 3% to wdowy. 76% ankietowanych posiadało wykształcenie wyższe, 16% wykształcenie średnie, 7% zawodowe i 1% policealne.

Analiza wyników badań wykazała, że do podstawowych objawów raka piersi respondentki zaliczyły wyciek ropny z brodawki (72%), wklęśnięcie sutka, (52%) i pomarszczona skóra wokół brodawki (27%) tab.1.

Tabela 1. Znajomość podstawowych objawów raka piersi

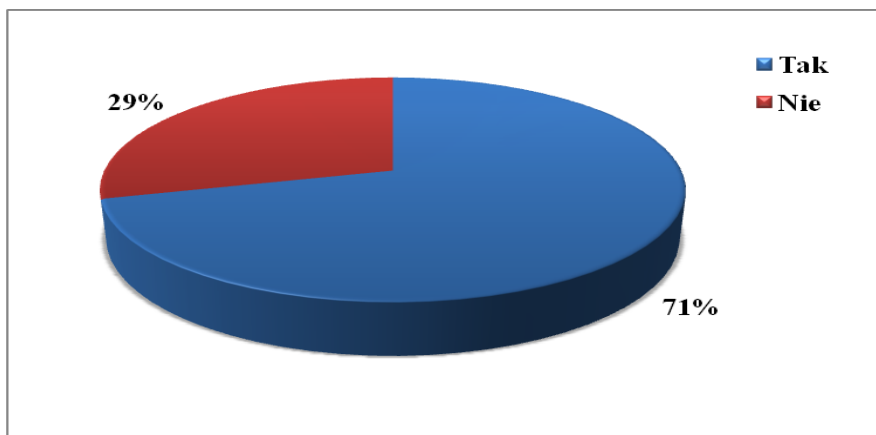
Najczęściej wybierana odpowiedź	Liczba udzielonych odpowiedzi	Procent (%) ankietowanych
Wklęśnięcie sutka	52	52%
Powiększenie się obu piersi	9	9%
Wyciek ropny z brodawki	72	72%
Zanik miesiączkowania	10	10%
Rozszerzenie żył na piersi	20	20%
Pomarszczona skóra wokół brodawek	27	27%
Częste wymioty	2	2%
Nowotwór piersi przebiega bezobjawowo	13	13%
** liczba nie sumuje się do 100%, ponieważ istnieje możliwość wyboru więcej niż jednej odpowiedzi		

Badania wykazały istotne zależności między wykształceniem ankietowanych, a wiedzą z zakresu czynników ryzyka zachorowania na raka piersi. Natomiast nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic dotyczących wiedzy respondentek i miejsca zamieszkania.



Rycina 1. Postawy zdrowotne kobiet względem badań profilaktycznych

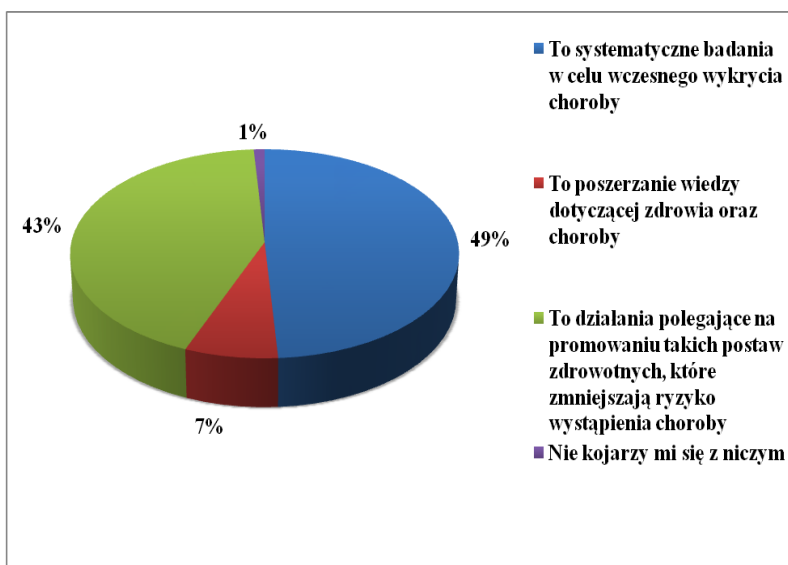
Odpowiedzi dotyczące korzystania przez kobiety z badań profilaktycznych były na równym poziomie. 49% kobiet korzysta z badań profilaktycznych. Niepokojący jest fakt, że ponad połowa ankietowanych kobiet (51%) nie wykonuje żadnych badań profilaktycznych (ryc.1).



Rycina 2. Umiejętność przeprowadzenia samobadania piersi

71% ankietowanych kobiet deklaruje, że zna poprawną technikę samobadania piersi, 29% nie potrafi przeprowadzić samobadania piersi (ryc.2). Na pytanie czy kobiety biorące udział w badaniu wykonują samobadanie piersi 57% respondentek odpowiedziało, że wykonuje, a 43% nie przeprowadza u siebie samobadania.

Zdaniem wieki kobiet najtrudniej było zdefiniować słowo profilaktyka. Najbardziej trafne okazały się definicje, że profilaktyka to systematyczne badanie w celu wczesnego wykrycia choroby oraz działania polegające na promowaniu takich postaw zdrowotnych, które zmniejszają ryzyko wystąpienia choroby. Tak odpowiadało odpowiednio 49% i 43% ankietowanych kobiet. 7% respondentek określiło profilaktykę jako poszerzanie wiedzy dotyczącej zdrowia i choroby. Tylko dla 1% kobiet, słowo profilaktyka nie kojarzyło się z niczym. (Ryc.3)



Ryc.3. Znajomość słowa profilaktyka

Źródłem wiedzy na temat profilaktyki raka piersi dla badanych kobiet był przede wszystkim Internet (56%) oraz telewizja (53%). Niewiele mniej bo 41% kobiet posiadało informacje z prasy. Zaskakujący okazał się fakt, że jedynie 34% respondentek dowiaduje się na temat raka piersi od pracowników ochrony zdrowia.

Wiedza dotycząca czynników zwiększających ryzyko zachorowania na raka piersi nie jest wystarczająco dobra. Jak pokazują niniejsze badania, jedynym czynnikiem ryzyka, który kobiety znały dobrze był czynnik genetyczny, takiej odpowiedzi udzieliły prawie wszystkie ankietowane-93%. Ponad połowa ankietowanych (53%) uznała, że ważnym czynnikiem jest niezdrowy tryb życia, a 49% kobiet zaznaczyło odpowiedź niezłośliwe zmiany w piersi. Na temat pozostałych czynników ryzyka

kobiety nie odpowiadały tak licznie. Jedynie 34% uważa, zastępczą terapię hormonalną jako czynnik ryzyka, 28% otyłość, 16% wczesne występowanie miesiączki, 12% późną menopauzę i 10% dietę bogatą w tłuszcze.

Większość ankietowanych знаła podstawowe badania profilaktyczne w kierunku wykrycia raka piersi. 74% kobiet wiedziało, że takim badaniem jest mammografia, 21% uważa USG za główne badanie, a 5% zaznaczyło ogólne badanie ginekologiczne.

Tylko połowa ankietowanych kobiet zadeklarowała, że poddaje się regularnym badaniom profilaktycznym. 35% respondentek miało wykonywane badanie mammograficzne, a 32% badanie ultrasonograficzne. Pozostałe 46% nie robiło żadnych badań.

7. Podsumowanie i wnioski

Ogólna wiedza kobiet na temat profilaktyki raka piersi jest na dobrym poziomie. Kobiety znają podstawowe badania profilaktyczne i wiedzą w jakim wieku należy je wykonywać, potrafią wskazać główne czynniki ryzyka oraz objawy raka piersi. Jednak mimo ogólnie dobrej wiedzy kobiet na temat profilaktyki raka piersi ciągle istnieje zapotrzebowanie na edukację zdrowotną o czym świadczą wzrastające wskaźniki zachorowalności i śmiertelności wśród coraz młodszych kobiet

Literatura:

1. Perek D. (red.): Harrison. *Onkologia*. Wydawnictwo Czelej. Lublin 2009, s. 368
2. Krzakowski M., Kawecki A., (red.): *Nowotwory złośliwe. Postępowanie wielodyscyplinarne*. Wydawnictwo Czelej. Lublin 2012, s. 97
3. Krzakowski M. (red.): *Onkologia Kliniczna*. Wydawnictwo Borgis. Warszawa 2006, s.1000
4. Sawaryn D., Krukar D.: *Wiedza młodych kobiet na temat czynników ryzyka i profilaktyki raka piersi*. Nowa Medycyna, 2010, nr 4, s.119
5. Tobor E., Caus-Wozniak I., Wac K.: *Znajomość czynników ryzyka raka gruczołu piersiowego w grupie studentów wyższych uczelni medycznych*. Ann.Acad.Med.Siles.,2006, 60(5), s. 376
6. Murawa D. [et al.]: *ABC raka piersi*. Wielkopolskie Centrum Onkologii, Poznań 2010
7. Pięta B., Grodecka-Gozdecka S.: *Analiza ilorazu szans zachorowania na nowotwory złośliwe gruczołu piersiowego kobiet*. Ginekologia Polska 2011, 82(10), s.756
8. Didkowska J., Wojciechowska U.: *Nowotwory piersi w Polsce i Europie- populacyjny punkt widzenia*. Nowotwory 2013, 63(2), s.112
9. Jokiel M., Bielska-Lasota M.: *Czynniki ryzyka raka piersi- możliwości profilaktyki pierwotnej*. Przegląd epidemiologiczny 2010, 64(3), s.436
10. Jeziorski A., Szawłowski A., Towpik E.: *Chirurgia onkologiczna*. Wydawnictwo PZWL. Warszawa 2009 s.815

11. Krzakowski M., Kawecki A., (red.): *Nowotwory złośliwe*. Postępowanie wielodyscyplinarne. Wydawnictwo Czelej. Lublin 2012, s. 97
12. Łacko A., Matkowski R.: *Leczenie chorych na raka piersi w podeszłym wieku*. Onkologia w praktyce klinicznej 2007, 3(1), s.16
13. Baum M.: *Rak piersi u starszych kobiet*. Nowotwory2010, 60(3), s. 203
14. Jobda B.: Rak piersi, przyczyny, wczesne wykrywanie. Pielęgniarka i Położna 2007, 49(10), s.13
15. Janssens J., Vandelo M.: *Rak piersi: bezpośrednie i pośrednie czynniki ryzyka związane z wiekiem i stylem życia*. Nowotwory 2009, 59(3), s.160
16. Jeziorski A., Szawłowski W., Towpik E. (red.): *Chirurgia onkologiczna*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Warszawa 2009, s. 815
17. Berek J., Novak E.: *Ginekologia*. Wydawnictwo Medipage. Warszawa 2008, s.1740
18. Antos E.: *Nowotwory piersi – czynniki ryzyka i metody wczesnego rozpoznania zmian w sutkach*. Pielęgniarka i Położna 2007, nr 9, s. 6
19. Grodecka-Gazdecka S.: *Związki otyłości z rakiem piersi*. Forum zaburzeń metabolicznych 2011, 2(4), s. 232
20. Jobda B.: *Rak piersi, przyczyny, wczesne wykrywanie*. Pielęgniarka i Położna 2007, 49(10), s.13
21. Kułakowski A., Skowrońska-Gardas A.: *Onkologia. podręcznik dla studentów medycyny*. Wydawnictwo PZWL. Warszawa 2003, s.107
22. Jokiel M., Bielska-Lasota M.: *Czynniki ryzyka raka piersi- możliwości profilaktyki pierwotnej*. Przegląd epidemiologiczny 2010, 64(3), s.437
23. Kozakiewicz B.(red.): *Onkologia kliniczna. Wybrane zagadnienia*. Wydawnictwo Borgis. Warszawa 2004, s.56-57
24. Opiłka M.N., Sieroń D., Sulewski A.: *LEPetytorium. Chirurgia*. Wydawnictwo Elsevier Urban&Partner. Wrocław 2010, s.40
25. Madetko R.: *Rehabilitacja po mastektomii*. Problemy pielęgniarstwa 2008, 16(4), s.398
26. Muszyńska A., Mastalerz-Migas A., Brona A.: *Stan wiedzy polskich kobiet na temat profilaktyki raka piersi*. Family Medicine & Primary Care Review 2006, 8(3), s.708
27. Wolska A., Wesołowska E., Skorupka M.: *Problem raka piersi*. Pielęgniarka i Położna 2007, 49(10), s.4
28. Tkaczuk-Włach J. Sobstyl M., Jakiel G.: *Rak piersi – znaczenie profilaktyki pierwotnej i wtórnej*. Przegląd Menopauzalny 2012, 11(4), s.343
29. Hoffman B. (red.): *Pielęgniarstwo Onkologiczne. Podręcznik dla studiów medycznych*. Wydawnictwo PZWL Warszawa 2011, s.65
30. Wolska A., Wesołowska E., Skorupka M.: *Problem raka piersi*. Pielęgniarka i Położna 2007, 49(10), s. 5
31. Florek M.: *Ocena dostępności do profilaktycznych badań piersi wśród mieszkanki wsi*. Medycyna Ogólna 2009, 15(1), s.116
32. Woźniak I.: *Wiedza o schorzeniach nowotworowych narządów kobiecych i postawy kobiet wobec badań profilaktycznych*. Problemy Pielęgniarstwa 2008, 16(1/2), s. 137

Postawy zdrowotne kobiet makroregionu lubelskiego wobec profilaktyki raka piersi

WSTĘP. Rak piersi jest najczęściej występującym nowotworem wśród kobiet na całym świecie oraz najczęstszą przyczyną umieralności. Co roku rak piersi rozpoznawany jest u 1,5 mln kobiet, z czego ok. 400 tysięcy umiera. Brak wiedzy na temat raka piersi a także nie wykonywanie badań profilaktycznych to najważniejsze czynniki rozwoju nowotworu.

CEL PRACY: Ocena postaw zdrowotnych kobiet makroregionu lubelskiego na temat profilaktyki raka piersi.

MATERIAŁ I METODY. Badaniem objęto 100 losowo wybranych kobiet w wieku od 25 do 60 roku życia. Do przeprowadzenia sondażu wykorzystano autorki kwestionariusz ankiety zawierający 34 pytania. Wyniki badań poddano analizie statystycznej.

WYNIKI. Źródłem wiedzy na temat profilaktyki raka piersi dla badanych kobiet był przede wszystkim Internet (56%) oraz telewizja (53%). Wiedza badanych na temat podstawowych czynników ryzyka była na dobrym poziomie. Większość badanych pytanych o objawy raka piersi wskazała na ropny wyciek z brodawki (72%), 52% zaznaczyło wklęsnięcie sutka, 27% za objaw uznała pomarszczoną skórę wokół brodawek, a 20% rozszerzenie żył na piersiach. Większość ankietowanych znała podstawowe badania profilaktyczne w kierunku wykrycia raka piersi, aż 74% kobiet wiedziało, że takim badaniem jest mammografia. Tylko połowa ankietowanych kobiet zadeklarowała, że poddaje się regularnym badaniom profilaktycznym. Znaczna większość badanych kobiet (71%) zna technikę samobadania piersi, jednak nie wszystkie kobiety przeprowadzają to badanie (57%).

WNIOSKI. Wiedza respondentek o profilaktyce raka piersi jest na dobrym poziomie. Wiedza dotycząca etiologii i metod profilaktyki jest wyższa u kobiet z wyższym wykształceniem.

Health attitudes of women in Lublin macroregion considering the prevention of breast cancer

INTRODUCTION. Breast cancer is the most common cancer among women worldwide and the most common reason of death. Every year breast cancer is diagnosed at 1,5 million women and about 400 thousand of them die. Lack of knowledge about breast cancer and prophylactic tests are main risk factors of cancer development.

OBJECTIVES. Assessment of the state of knowledge and attitude of women from lubelszczyzna of breast cancer prevention

MATERIAL AND METHOD. The study group included 100 randomly chosen women in the 25 to 60 age bracket. To execute the survey used a survey questionnaire containing 34 questions. Results were statistically analyzed.

RESULTS. The source of knowledge about breast cancer prevention for the surveyed women was the Internet (56%) and television (53%). Knowledge of women about main risk factors is on the good level. Most of women asked about breast cancer's symptoms indicated at least from a nipple (72%), sunken nipple (52%), wrinkled skin around nipple(27%) and 20% as a factor showed expanded veins on the breast. Most of women know prophylactic tests for breast cancer, 74% said that is called mammografia. Only half of the women taking part in my researches declared that they do regular check up. Most of them (71%) know how to do self breast check up, but only 57% of them do it regularly.

CONCLUSIONS. Knowledge of respondents about breast cancer prevention is at a good level. Women's knowledge about etiology and method of cervical cancer prevention between women with higher education is considerably higher than rest of women.

Aleksandra Greloch¹, Amanda Augustynik², Emil Rozenek³, Karolina Sochoń⁴,
Janusz Wojtkowski⁵

Postępowanie fizjoterapeutyczne w dystrofii mięśniowej typu Duchenne'a

1. Wprowadzenie

Dystrofia mięśniowa Duchenne'a (DMD) jest najczęściej występującą postępującą dystrofią o ciężkim przebiegu. Ze względu na brak leczenia przyczynowego, postępowanie lecznicze oparte jest na indywidualnie dobranej rehabilitacji, którą dostosowuje się do aktualnego stanu chorego. Cierpiący na dystrofię Duchenne'a wymagają kompleksowej rehabilitacji, która jest niezbędna dla poprawy jakości ich życia. Terapia ma na celu spowolnienie rozwoju choroby w czasie, aby zapewnić choremu jak najdłuższe funkcjonowanie w życiu codziennym. Fizjoterapia pomaga w utrzymaniu siły i elastyczności mięśni, opóźnia proces powstawania przykurczów stawowych i deformacjom kręgosłupa oraz osłabieniu wydolności układu oddechowego.

Celem pracy jest przybliżenie czytelnikowi jednostki chorobowej, problemów osoby chorej i przedstawienie metod rehabilitacyjnych oraz efektów z nimi związanych. W pracy autorzy wykorzystują aktualne dane i doniesienia korzystając z literatury naukowej o tematyce przeglądowej i badawczej.

¹ olag1994@interia.pl, Studenckie Koło Naukowe przy Klinice Rehabilitacji Dziecięcej z Ośrodkiem Wczesnej Pomocy Dzieciom Upośledzonym "Dać Szansę" Wydział Nauk o Zdrowiu Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

² amandam1994@wp.pl, Studenckie Koło Naukowe przy Klinice Rehabilitacji Dziecięcej z Ośrodkiem Wczesnej Pomocy Dzieciom Upośledzonym "Dać Szansę" Wydział Nauk o Zdrowiu Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

³ e.rozenek@o2.pl, Studenckie Koło Naukowe przy Klinice Rehabilitacji Dziecięcej z Ośrodkiem Wczesnej Pomocy Dzieciom Upośledzonym "Dać Szansę" Wydział Lekarski Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

⁴ karolina.sochon2@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe przy Klinice Rehabilitacji Dziecięcej z Ośrodkiem Wczesnej Pomocy Dzieciom Upośledzonym "Dać Szansę" Wydział Nauk o Zdrowiu Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

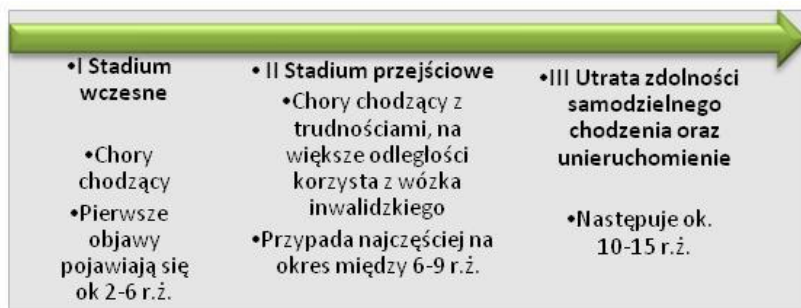
⁵ janusz.wojtkowski@op.pl Studenckie Koło Naukowe przy Klinice Rehabilitacji Dziecięcej z Ośrodkiem Wczesnej Pomocy Dzieciom Upośledzonym "Dać Szansę" Wydział Nauk o Zdrowiu Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

2. Etiopatogeneza

Dystrofia mięśniowa Duchenne'a to choroba genetyczna, dziedziczona recesywnie w sprzężeniu z chromosomem X, w związku z czym chorują dzieci płci męskiej. Szacuje się, że DMD pojawia się u 1 na 3500 urodzonych chłopców. Istnieją także przypadki pojawienia się choroby w wyniku mutacji genu dystrofiny. Dystrofina jest białkiem strukturalnym komórki mięśniowej, która stabilizuje ją w czasie skurczu i rozkurczu, a także odpowiada za właściwą przepuszczalność błony komórkowej. Jej niedobór powoduje znaczne zmniejszenie stabilności komórki, co uszkadza mięsień i wytwarza szereg zmian zapalnych prowadzących do dalszego uszkodzenia, martwicy i zwłóknienia. Zamiast mięśni u pacjentów z DMD stwierdza się obecność tkanki łącznej i tłuszczowej [1, 3, 17-19, 34]. Mimo że choroba dotyczy chłopców, u niektórych matek-nosicielek można stwierdzić dyskretne objawy miopatyczne.

3. Obraz kliniczny choroby

Sposób dziedziczenia dystrofii mięśniowej Duchenne'a powoduje, że chorują głównie chłopcy. W uogólnieniu przebieg choroby można przedstawić w III stadiach (Tab.1).



Tab. 1 Stadia dystrofii mięśniowej Duchenne'a

Pierwsze objawy choroby pojawiają się między 2 a 6 rokiem życia, czasem nawet już w 1 r.ż. [1÷3, 18, 35]. Możemy je zauważyć podczas obserwacji dziecka, które w porównaniu do rówieśników później zaczyna siadać, chodzić, częściej się przewraca. Większość z chorych samodzielnie porusza się dopiero w wieku 18 miesięcy [18]. Mirski i Crawford wykazali silnie dodatnią korelację między upośledzeniem funkcji poznawczych a opóźnieniem zdolności chodu. Autorzy zwracają uwagę, że często jest to pomijane w diagnozowaniu DMD. Wcześniejsze rozpoznanie tego powiązania mogłoby obniżyć wiek zdiagnozowania choroby wielu chłopców [11]. Przy próbie podniesienia

dziecka do góry chwytając pod pachami – wyslizguje się ono z rąk (tzw. objaw „luźnych barków”). Spowodowane jest to zajęciem przez chorobę mięśni obręczy barkowej. Chłopcy mają trudność z wstawaniem z pozycji leżącej i klęku, wykorzystują wtedy manewr Gowersa tj. „wspinania się po sobie” (Rysunek 1).



Rysunek 1 Objaw Gowersa [57]

Wchodzenie po schodach jest bardzo kłopotliwe, a wraz z postępem choroby staje się niemożliwe, tak samo jak podskakiwanie, bieganie oraz skakanie. Powodem są mocno osłabione mięśnie kończyn dolnych oraz obręczy biodrowej. Charakterystyczny jest chód kaczkowy spowodowany stopniowym zanikiem mięśnia pośladkowego średniego i przykurczy ścięgien Achillesa. Na skutek zajęcia przez chorobę mięśni brzucha i grzbietu widoczna jest „talia osy”. U chorych obserwuje się także „łydki gnoma” tj. rzekomy przerost łydek – pseudohipertrofia (Fotografia 1) [3].

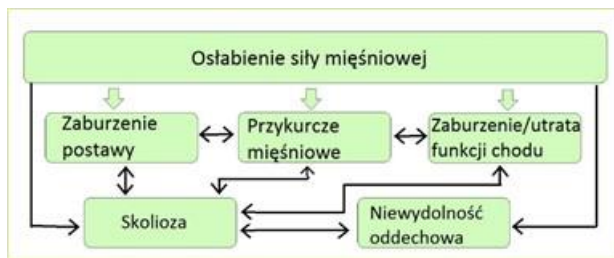


Fotografia 1 „Łydki Gnoma” [źródło własne]

Zmienia się cała postawa ciała z powodu przykurczy mięśniowych. Obserwuje się przodopochylenie miednicy, hiperlordozę odcinka lędźwiowego, chodzenie na palcach na szerokiej podstawie. Środek ciężkości ciała chorego przesuwają się przed stawy kolanowe, a za stawy biodrowe. Chłopcy wykorzystują "mechanizm Puttiego" przez zgięcie stopy w stawie skokowym górnym i przeprost w stawie kolanowym, dzięki któremu mogą zablokować staw biodrowy i kolanowy w wyproście, przy znacznie osłabionych mięśniach.

Wraz z upływem lat sprawność chłopców ulega pogorszeniu. Chłopcy z DMD są mniej aktywni fizycznie od zdrowych rówieśników. Z badań wynika, że częściej poruszają się do szkoły środkami komunikacji, uprawiają mniej sportu, spędzają więcej czasu przed telewizorem oraz prowadzą bardziej siedzący tryb życia [7]. Funkcje manualne są upośledzone ze względu na osłabienie siły mięśniowej kończyn górnych i obręczy barkowej, a wykorzystanie pomocy ortopedycznych wspomagających chód przy użyciu kończyn górnych staje się niemożliwe. Coraz częściej się potykają, a przemieszczanie na dłuższe odległości wymaga użycia wózka inwalidzkiego z powodu znacznego zmęczenia [27]. U 30-50% chorych obserwuje się opóźnienie rozwoju umysłowego. Niekiedy dochodzi do zaburzeń funkcjonowania jelit i pęcherza moczowego. Długotrwałe przebywanie pacjenta w jednej pozycji siedzącej wiąże się ze wzrostem ryzyka powstania skoliozy – obserwuje się ją u ok. 77% chłopców z DMD, zwykle po ukończeniu 11 roku życia. Werner i wsp. zaobserwowali tendencję do kierunku powstawania skoliozy w zależności od dominującej kończyny górnej. Przy dominacji prawej ręki – zauważono skoliozę prawostronną i odwrotnie [14]. Progres bocznego skrzywienia kręgosłupa można opóźnić poprzez stosowanie właściwego leczenia farmakologicznego (glikortykosteroidy), ale również stosowne zabiegi fizjoterapeutyczne – częsta zmiana pozycji, dobór właściwego sprzętu np. wózka dopasowanego do potrzeb chorego. Opóźnienie powstania skoliozy skutkuje obniżeniem poziomu odczuwanego bólu, dyskomfortu podczas pozycji siedzącej oraz zmniejsza powikłania oddechowe. Operację rozważa się, gdy skrzywienie wynosi 20-40° Cobba i zachowana jest odpowiednia rezerwa oddechowa (FVC > 30%). Zabieg operacyjny wykonywany przy wyższych wartościach kątowych niesie ze sobą większe ryzyko groźnych powikłań [3, 18, 34]. Nie wykazano, żeby zakładanie gorsetów ortopedycznych spowolniło progresję skoliozy. Zapewniają one jedynie kontrolę postawy i komfort pacjenta, u którego nie jest możliwe wykonanie operacji, bądź nie zgodził się na nią rodzina [29].

W badaniach Zamaniego i wsp. wykazano, że pomimo narastającej niepełnosprawności chorzy z DMD mają pozytywne podejście do życia – oceniając jego jakość jako satysfakcjonującą. Ankietę dotyczącą jakości życia chorych na DMD przeprowadzono także wśród rodziców chorych dzieci. Porównując je, zauważono, że rodzice chorych ocenili jakość życia ich pociech jako mniej satysfakcjonującą szczególnie w kategorii aktywności fizycznej, zdrowia oraz ogólnego samopoczucia i nastroju [26].



Rysunek 1 Schemat rozwoju zaburzeń narządu ruchu, których przyczyną jest osłabienie siły mięśniowej [50]

Postępujący przebieg choroby prowadzi do utraty zdolności lokomocji w wieku 10-15 lat. Chorzy nie są w stanie samodzielnie poruszać się na wózku inwalidzkim. Pomocnym rozwiązaniem jest wózek z napędem elektrycznym. W tym stadium choroby występuje całkowita zależność od osób trzecich w trakcie wykonywania podstawowych czynności życiowych (ADL – *Activities of daily living*) – jedzenie, toaleta, ubieranie się. Pacjenci odczuwają znaczny ból, zmęczenie opisywane przez nich jako przytłaczające uczucie, brak energii oraz wyczerpanie fizyczne [8, 10]. W badaniach Pangalila R. i wsp. wykazano, że ból odczuwa ok. 74% badanych, najczęściej zlokalizowany w okolicy pośladków, pleców oraz kończyn dolnych [17]. Pojawiają się także zaburzenia mowy oraz połykania, co u niektórych chorych prowadzi do depresji. W tym momencie ważna jest pomoc psychologa oraz wsparcie i opieka ze strony rodziny [1, 19].

Zmniejszona praca mięśni oddechowych, nieprawidłowa ruchomość klatki piersiowej, nawracające infekcje układu oddechowego oraz rozwijająca się kardiomiopatia rozstrzeniowa prowadzi do niewydolności krążeniowo-oddechowej. Upośledzenie układu oddechowego powoduje poranne bóle głowy oraz mdłości, zmęczenie, senność w trakcie dnia, chrapanie, utratę wagi oraz znaczne zmęczenie [2, 3, 12, 52]. Aby nie dopuścić do ostrej niewydolności stosuje się w warunkach domowych nieinwazyjną wentylację zastępczą (NIV). Dzięki niej zasypianie jest ułatwione, chory czuje się bezpiecznej podczas snu – jego komfort życia ulega poprawie [1, 2, 5, 18÷20, 35, 37]. Korzystanie z NIV wydłużyło średnią długość życia chłopców z DMD z 14,4 do 25 lat. Stwierdzono również, że równocześnie istniejąca kardiomiopatia skraca ten czas o ponad 2 lata [18]. Przeżywalność pacjentów z dystrofią jest zróżnicowana. Postęp choroby prowadzi do zgonu w 2-3 dekadzie życia, w większości przypadków w wyniku niewydolności krążeniowo-oddechowej. Z analizy przyczyn śmierci wśród 21 chorych na DMD przeprowadzonej przez Van Rutena i wsp. wynika, że najczęstszym powodem zgonu, średnio w wieku 24 lat, była niewydolność krążeniowo-oddechowa, jedynie 19% badanych zmarło w wieku nastoletnim na skutek ostrego zapalenia płuc, zatrzymania akcji serca, ostrej niewydolności oddechowej i niewydolności wielo-

narządowej. Autorzy podkreślają zrozumienie wpływu dystrofii mięśniowej Duchenne'a na cały organizm i odpowiedniego leczenia wszystkich nieprawidłowości, aby zminimalizować ryzyko przedwczesnej śmierci pacjentów [32]

4. Metody leczenia

Dystrofia mięśniowa Duchenne'a jest chorobą genetyczną, na którą do tej pory współczesna medycyna nie jest w stanie wynaleźć odpowiedniego leczenia. Nieustannie poszukuje się innowacyjnych metod leczniczych. Badania wykazały, że terapia komórkami macierzystymi nie przyniosła oczekiwanych efektów [18]. Wykorzystano także dosyć kontrowersyjną – moralnie i etycznie – metodę, jaką jest przeszczepienie mioblastów od ojca do mięśni chorego dziecka (min. w Azji i USA) [1]. Do tej pory nie można stwierdzić jednoznacznie o płynących z tej praktyki korzyściach. Wciąż prowadzi się badania na temat zastąpienia dystrofiny innym białkiem o bardzo podobnej budowie – utrofina. Eksperymenty wykonywane na myszach wykazały, że jest ona w stanie przejąć funkcję dystrofiny. Zwiększenie ekspresji genowej utrofiny może być wykorzystane w przyszłości w leczeniu chorych na DMD [3, 13, 35, 37]. W leczeniu farmakologicznym wykorzystuje się glikokortykosteroidy (najczęściej prednizolon i deflazakort) w celu opóźnienia objawów choroby i polepszenia stanu ogólnego pacjenta. Kilku badaczy udowodniło, że ta grupa leków opóźnia pogorszenie siły i funkcji mięśni, obniża ryzyko powstania skoliozy, umożliwia samodzielne jedzenie, samoobsługę oraz stabilizuje funkcje krążeniowo-oddechowe [2-4, 18, 35]. Autorzy wysunęli wniosek o skuteczności podawania leków, które wspomogły funkcje motoryczne, oddechowe oraz kardiologiczne, mimo obecności efektów ubocznych, ze względu na możliwość ich kontrolowania [6]. Wykazano, że stosowanie glikokortykosteroidów wydłuża okres samodzielnej lokomocji o 3-5 lat [18]. Obecnie zwraca się uwagę na wprowadzanie diet wysokobiałkowych oraz suplementację witamin B, które mają ułatwić metabolizm mięśni [1, 35].

5. Postępowanie fizjoterapeutyczne w DMD

Ze względu na brak leczenia przyczynowego dystrofii mięśniowej typu Duchenne'a, postępowanie lecznicze oparte jest na odpowiednio dobranej rehabilitacji. Do tej pory nie ma wytycznych odnośnie konkretnego postępowania w DMD. Indywidualnie określa się potrzeby chorego i przygotowuje się plan usprawniania, aby polepszyć jego fizyczny, społeczny oraz intelektualny status. Możliwe jest to dzięki badaniu pacjenta przed rozpoczęciem terapii i powtarzaniu go co najmniej co 2-3 miesiące. Wykonuje się ocenę postawy ciała, rozszerzalności klatki piersiowej, ukształtowania kręgosłupa, wszelkie testy funkcjonalne, określa się siłę mięśniową i zakres ruchomości stawów kończyn i kręgosłupa oraz wykonuje się badanie spirometryczne. Umożliwia to

odpowiednie zaplanowanie rehabilitacji biorąc pod uwagę aktualny stan pacjenta oraz pozwala obserwować zachodzące zmiany w funkcjonowaniu. Postępowanie fizjoterapeutyczne powinno zostać rozpoczęte nawet już przed zdiagnozowaniem choroby [15÷18, 45, 46]. Objawami, które mogą sugerować dystrofię mięśniową Duchenne'a są: skorelowane opóźnienie funkcji poznawczych i zdolności chodu, objaw „luźnych barków”, manewr Gowensa, osłabienie mięśni kończyn oraz obręczy biodrowej i barkowej. Dzięki wczesnej interwencji fizjoterapeutycznej opóźnia się powstawanie niebezpiecznych powikłań min: przykurczy mięśniowych, ograniczenia ruchomości klatki piersiowej czy obniżenia wydolności ogólnej pacjenta. Chłopcy z DMD powinni ćwiczyć co najmniej 2-3 razy w tygodniu w obecności fizjoterapeuty oraz kontynuować postępowanie usprawniające w warunkach domowych z pomocą rodziców.

5.1. Rehabilitacja w stadium wczesnym

W początkowym stadium choroby, kiedy dziecko jest jeszcze samodzielne, terapia ma na celu spowolnienie procesu chorobowego. U chorego obserwuje się znaczny spadek siły mięśniowej, która w wieku 6 lat zmniejsza się już nawet o połowę [16]. Postępujące osłabienie mięśni szyi i tułowia skutkuje strukturalnymi kompensacjami. Możliwość zgięcia szyi jest wymagana, aby umożliwić przejście do siadu z pozycji leżącej oraz wykonywać ruchy w pozycji stojącej. Gdy mięśnie karku są osłabione, ruchy nie mogą zostać wykonane w pełnym wzorcu w związku z czym chory kompensuje je, co ogranicza jego funkcjonalność. Z badań Bozgeyika i wsp. wynika, że utrzymanie odpowiedniej siły mięśni zginających kark, już we wczesnym etapie choroby, przekłada się na funkcjonalność danego pacjenta, poprzez zmniejszenie kompensacji i wysiłku w wykonywaniu czynności dnia codziennego. Chłopcy z większą siłą mięśniową zginaczy karku osiągnęli większy dystans w teście 6 minutowego chodu oraz lepszy wynik w skali oceniającej zdolność do poruszania się (*NSAA- North Star Ambulatory Assessment*) [33]. W tym okresie chory wykonują aktywności w miarę swoich możliwości, np. gry zespołowe ze swoimi rówieśnikami. Jednak postępująca choroba sprawia, że staje się to co raz trudniejsze – chorzy szybko odczuwają zmęczenie.

Celem działań fizjoterapeutycznych jest utrzymanie prawidłowego zakresu ruchomości w stawach, zapobieganie przykurczom stawowym i deformacjom kręgosłupa oraz spowolnienie procesu zmniejszania się wydolności wysiłkowej i oddechowej. Chłopców w tym stadium choroby zaleca się: ćwiczenia wzmacniające, aerobowe, oraz ćwiczenia metodą PNF. Z powodu pojawiania się przykurczy mięśniowo-stawowych, korzystne w tym okresie stają się ćwiczenia rozciągające jak i stosowanie ortez.

5.1.1. Ćwiczenia wzmacniające i aerobowe

Należy wzmacniać mięśnie poprzez ćwiczenia z niewielkim natężeniem, które wpływają korzystnie na ich wytrzymałość. Umożliwiają one jak najdłuższe zachowanie zdolności lokomocji oraz wyrównywanie istniejących asymetrii mięśniowych.



Fotografia 2: Trening na rowerze stacjonarnym [Źródło własne]

Intensywność i częstość wykonywania ćwiczeń musi być odpowiednio dobrana do możliwości pacjenta, aby w pełni wykorzystać jego siły, ale zarazem nie przeciążyć organizmu. Zbyt intensywne ćwiczenia z za dużym obciążeniem oraz zbyt często wykonywane mogą przyczynić się do szybszej degeneracji włókien mięśniowych. Powinny być kontynuowane do pierwszych objawów zmęczenia pracujących mięśni. Rozsądnie dobrany wysiłek fizyczny spowalnia ten proces, poprawiając komfort życia chorych.

W badaniach przeprowadzonych w Turcji porównywano wpływ dwóch rodzajów treningu kończyny górnej: aerobowego oraz wzmacniającego na funkcję układu oddechowego oraz jakość życia chorych na DMD. 24 chłopców zostało podzielonych na dwie grupy. Połowa z nich wykonywała 3 razy dziennie trening na ergonometrze dla kończyn górnych, a druga część ćwiczenia wzmacniające mięśnie klatki piersiowej, przez okres 8 tygodni. Wyniki badań jednoznacznie ukazują pozytywny wpływ ćwiczeń, ze względu na poprawienie wartości PEF (szczytowy przepływ wydechowy), wytrzymałości mięśni oraz jakości życia chorych [21, 22]. Z kolei Abresch i wsp. udowodnili, że średni aerobowy wysiłek może pomóc przywrócić utracone funkcje i zapewnić pozytywne korzyści zdrowotne tzn. zredukować wagę, poprawić funkcję układu krążeniowo-oddechowego oraz samopoczucie, a także zwiększyć masę kości.

Natomiast trening oporowy o małej intensywności pomaga utrzymać siłę mięśniową, a nawet niewiele ją poprawić [23]. Ważne są ćwiczenia, które stymulują zachowanie symetrii ciała podczas wykonywania czynności dnia codziennego, gdyż osłabieniu ulegają głównie mięśnie posturalne, odpowiadające za utrzymanie pionowej postawy ciała, działające przeciwko sile grawitacji. W programie usprawniania powinny znaleźć się ćwiczenia czynne wolne z elementami ćwiczeń koordynacyjnych i równoważnych, a także ćwiczenia manualne.



Fotografia 3,4,5,6: Ćwiczenia wzmacniające [Źródło własne]

Celem ćwiczeń jest wzmocnienie w szczególności mięśni obręczy biodrowej i barkowej, które w pierwszej kolejności ulegają osłabieniu. Na tym etapie zaleca się wykonywanie umiarkowanego wysiłku fizycznego np. jazdę na rowerze, Nordic Walking oraz pływanie. Ćwiczenia powinny być wykonywane indywidualnie z pacjentem, pod czujnym okiem terapeuty. Aby ćwiczenia były bardziej atrakcyjne dla chorego wykorzystuje się piłki, taśmy Thera-Band, zabawki, tory przeszkód oraz zajęcia muzyczno-taneczne [1, 18÷19, 46, 50].

5.1.2. Metoda PNF

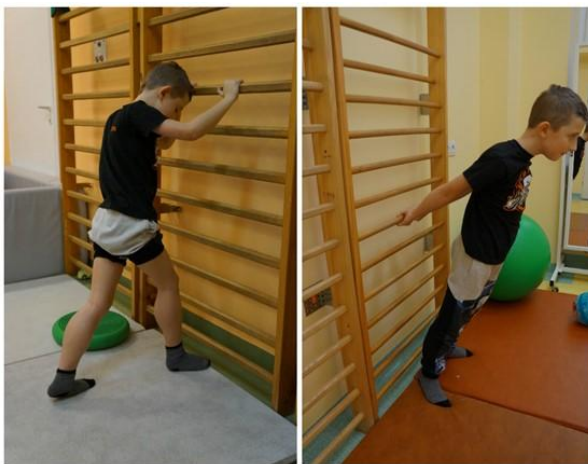
Bardzo ważne jest wykorzystywanie potencjału mięśniowego chorego poprzez kształtowanie właściwej postawy ciała oraz wykonywanie funkcji ruchowych w sposób zbliżony jak najbardziej do naturalnego. Umożliwia to neurofizjologiczna technika torowania nerwowo-mięśniowego PNF (ang. – *Proprioceptive Neuromuscular Facilitation*). Odpowiednio zastosowane wzorce dla łopatki (depresja tylna) oraz miednicy (elewacja przednia), wzorce dla kończyn w technice rytmicznego pobudzania ruchu, kombinacji skurczów izotonicznych oraz techniki stabilizacyjne wspomagają kształtowanie prawidłowej pozycji siedzącej i stojącej. W czasie ćwiczeń metodą PNF dochodzi do maksymalnego skurczu mięśnia, co skutkuje pojawieniem się zjawiska irradycji tj. przeniesienia pobudzenia na inne nieaktywne mięśnie odległych od pobudzanych, co zostało potwierdzone badaniami EMG. Dzięki nim możliwe jest właściwe wykorzystanie wzorców i zasad w tej metodzie, poprzez dostosowanie ich do możliwości funkcjonalnych rehabilitowanego dziecka. Bardzo ważne jest nauczenie ruchu poprzez zastosowanie ćwiczeń w sekwencji neurorozwojowej, co umożliwi wytworzenie i utrwalenie prawidłowych wzorców ruchowych [30]. Zagłoba A. tłumaczy skuteczność terapii poprzez: „odtworzenie określonego stereotypu ruchowego ukierunkowanego oporem manualnym ze szczególnym uwzględnieniem rotacji” [31]. Dzięki technice PNF poprawia się koordynacja mięśniowa, czucie oraz stymuluje się prawidłowe oddychanie [1].

5.2. Rehabilitacja w stadium przejściowym

W stadium przejściowym chorzy mają coraz większe trudności w samodzielnym poruszaniu się. Narasta osłabienie siły mięśniowej, a przykurcze stawowe są już zaawansowane. Chłopcy coraz częściej się potykają, a przemieszczanie na dłuższe odległości wymaga użycia wózka inwalidzkiego z powodu znacznego zmęczenia. Właśnie w tym okresie najczęściej stosuje się operacje wydłużenia ścięgien, aby chorzy mogli jak najdłużej samodzielnie się przemieszczać. Jednak, gdy nie jest to możliwe i nie przynosi oczekiwanych efektów, jedynym sposobem na poprawienie jakości życia pacjentów jest fizjoterapia. W stadium przejściowym ćwiczenia nie mogą być zbyt forsowne. Większość ćwiczeń prowadzona jest w odciążeniu (np. hydroterapia) lub są wspomagane. Zbyt intensywne ćwiczenia z za dużym obciążeniem oraz zbyt często wykonywane mogą przyczynić się do szybszej degeneracji włókien mięśniowych. Należy także pamiętać, że w okresie zaostrzenia choroby wysiłek fizyczny jest przeciwwskazany. Istotnym elementem terapii w tym okresie jest jak najdłuższe utrzymanie zdolności do samodzielnego poruszania się i ograniczenia czasu unieruchomienia. Rehabilitacja chorych w tym okresie zawiera: ćwiczenia rozciągające, ćwiczenia oddechowe, hydroterapię, naukę obsługiwaną wózka inwalidzkiego oraz stosowanie ortez.

5.2.1. Ćwiczenia rozciągające

W stadium przejściowym choroby główny nacisk położony jest na rozciąganie przykurczonych grup mięśniowych. Jest to bardzo ważny element, ponieważ przykurcze silniejszych grup mięśniowych generują dodatkowe obciążenie dla osłabionych antagonistów [29]. Przykurcze mięśniowe kończyn prowadzą do wzrastającej niepełnosprawności przez obniżanie sprawności ruchowej, ograniczenia mobilności, zmniejszenia się zakresu ruchomości oraz zwiększenie dolegliwości bólowych. Przykurcze powstają na skutek dysbalansu mięśniowego agonistów i antagonistów, statycznego ułożenia przez dłuższy okres czasu, zmniejszoną możliwość aktywnego poruszania kończyną w pełnym zakresie ruchomości. Przykurcze kończyn dolnych występują częściej niż kończyn górnych. W DMD przykurcze dotyczą najczęściej mięśni zginaczy podszwowych stopy, zginaczy kolana, zginaczy biodra, odwodzicieli kończyny dolnej, zginaczy łokcia oraz zginaczy nadgarstka. Przykurcze kończyn dolnych w części proksymalnej są rzadkie, jednak rozwijają się szybko, gdy pacjent przebywa większość czasu w pozycji siedzącej na wózku inwalidzkim. Związek między korzystaniem z wózka inwalidzkiego oraz powstawaniem przykurczy zginaczy biodra i kolana zostały zaobserwowane przez wielu autorów już na przełomie lat 50. Badania McDonalda i wsp. wykazały silną zależność między zwiększeniem się przykurczu zgięciowego w stawie skokowym, a rozpoczęciem poruszania się za pomocą wózka inwalidzkiego [25].



Fotografia 7,8 Ćwiczenia rozciągające [Źródło własne]

Dzięki rozluźnieniu przykurczonych mięśni możliwe jest utrzymanie jak najbardziej ekonomicznej postawy ciała. Przed zastosowaniem ćwiczeń rozciągających zaleca się rozgrzewkę danych grup mięśniowych w postaci czynnych ćwiczeń lub masażu. Stretching, redresje oraz techniki łącznotkankowe terapii manualnej stosuje się 1-2 razy dziennie po 40-60 min w zależności od ilości przykurczonych grup mięśniowych. Według Kostery-Pruszczyk pojedyncze rozciąganie powinno trwać co najmniej 10 s, a następnie wydłuża się ten czas nawet do 3 minut. Każde rozciąganie należy powtórzyć 2-5 razy [50]. Natomiast Skalsky twierdzi, że bierny stretching danej grupy mięśniowej powinien trwać 15 sekund i należy wykonać 10-15 powtórzeń [25].

Wykorzystuje się także technikę Poizometrycznego Rozluźniania Mięśni (PIR), w której możliwe jest ominięcie obronnego ruchu przed rozciąganiem dzięki uprzedniemu skurczowi mięśnia. Technika ta jest dosyć trudna, lecz przy odpowiednim instruktażu prowadzącego fizjoterapeuty staje się wyuczona oraz przynosi znamienne efekty. Ćwiczenia rozciągające w początkowym stadium choroby, w którym nie obserwuje się jeszcze dużych zaburzeń postawy ciała oraz chodu, są całkowicie bezpieczne dla pacjentów [1, 2, 19, 50].

5.2.2. Stosowanie zaopatrzenia ortopedycznego

Przykurcze stawów obwodowych kończyny dolnej i postępujące osłabienie siły mięśniowej są rozpoznawane jako główne przyczyny utraty zdolności samodzielnego poruszania się. Sylvia Hyde i wsp. z Instytutu Chorób Nerwowo-mięśniowych w Danii przytaczają badania o skuteczności biernych ćwiczeń rozciągających w połączeniu z zakładaniem ortezy AFO na czas snu na stopień przykurczu ścięgien Achillesa. Grupa chłopców korzystająca z ćwiczeń rozciągających oraz dodatkowo stosująca ortezy osiągnęła o 23% większe opóźnienie w rozwoju przykurczu Achillesa, porównując do chorych niekorzystających z zaopatrzenia ortopedycznego [36]. U chorych na dystrofię mięśniową Duchenne'a często wykorzystuje się zaopatrzenie ortopedyczne, w związku z istniejącymi przykurczami, które upośledzają zdolność samodzielnego poruszania się. Często zaleca się chorym stosowanie na noc ortez AFO (*Ankle Foot Orthosis*), aby podtrzymać efekt ćwiczeń rozciągających. Stabilizują one stawy skokowo-goleniowe w pozycji pośredniej lub sprzyjającej redresji [30, 39].

Wpływ noszenia ortez AFO na jakość chodu chorych zbadali de Souza i wsp. 20 chorych podzielono na 3 grupy badane: bez ortezy, orteza zakładana na dzień, orteza zakładana na noc na okres 7 miesięcy. Wśród badanych używających ortezy jednoznacznie zauważono pozytywny wpływ na kinematykę stawu skokowego oraz kinetyczne parametry chodu: wzrost zakresu ruchomości zgięcia grzbietowego stopy, oraz zmniejszenie zgięcia podszwowego stopy, w porównaniu do grupy badanych nieużywających ortezy. Wśród osób używających zaopatrzenia za dnia zaobserwowano także istotne i znaczące zmiany w zakresie kinematycznym i kinetycznym oraz

zmianę w zakresie zmniejszenia kąta zgięcia biodra i zgięcia grzbietowego stopy. Jednakże, pozytywne efekty używania ortezy nie zostały utrzymane, gdy pacjenci zdejmowali ją podczas chodu. Autorzy badania zalecają ich używanie zarówno w dzień jak i w nocy, jednak muszą zostać założone wcześniej i noszone często, aby uzyskać jak najdłuższą możliwość do samodzielnego chodu i zminimalizować typową kompensację spowodowaną przez chorobę [49]. Inni autorzy także zalecają zakładanie tych ortez w ciągu dnia u chłopców, którzy stale korzystają z wózka inwalidzkiego [2, 39, 51].

Chorem, którzy są w stanie zrobić tylko kilka kroków, rekomenduje się także ortezy KAFO (*Knee Ankle Foot Orthosis*). Są one indywidualnie dopasowane do kończyny chorego, aby zapobiegać przykurczom stawu skokowego oraz kolana. Z badań Kinaliego i wsp. jak i Wong B. wynika, że są skuteczne w wydłużaniu zdolności samodzielnego chodu, średnio o 18-24 miesiące [37]. Z kolei badania Taktak D. i wsp dowodzą o wydłużeniu tego okresu dzięki stosowaniu ortez KAFO, aż do 4 lat. Wśród badanych zauważono także poprawienie efektywności chodu o 10% i prędkości chodu o 8% [38].

5.2.3. Ćwiczenia posługiwania się wózkiem inwalidzkim

W II stadium przejściowym, chory ma problemy z lokomocją z powodu znacznego osłabienia mięśni. W związku z czym, aby pokonać większe odległości jest zmuszony korzystać z wózka inwalidzkiego. Okres ten przypada najczęściej między 6-9 rok życia dziecka. We wcześniejszym etapie należy zadbać o naukę obsługi wózka inwalidzkiego, dobranie odpowiednich wysokości i oparcia dostosowanych do postawy ciała pacjenta. Często naukę tego sposobu lokomocji uatrakcyjnia się poprzez zastosowanie elementów gier i zabaw, jednocześnie doskonaląc umiejętność pokonywania wszelkich barier architektonicznych. Chłopcy z dystrofią mięśniową Duchenne'a zwykle szybko akceptują używanie wózka inwalidzkiego [50]. Dzięki niemu mogą poruszać się na większe dystanse, świat staje się bardziej dostępny. Ważne jest przystosowanie mieszkania do poruszania się na wózku [35].

Analiza Pellegriniego i wsp. dotyczyła oceny powiązania siły mięśniowej kończyn górnych wśród chorych na DMD oraz ich zdolności prowadzenia wózka inwalidzkiego za pomocą joysticka. Autorzy badania określili moment, w którym pacjenci nie są w stanie używać wózka sterowanego joystickiem, aby w odpowiednim czasie zaproponować alternatywne systemy kontroli. Najwięcej badanych miało siłę mięśniową dłoni ok. 1.5N, która wystarczała, aby korzystać z wózka sterowanego joystickiem. Wraz ze zmniejszającą się siłą mięśniową ręki i siłą chwytu szczypcowego pacjenci korzystali z wózków inwalidzkich sterowanych za pomocą mini-joysticka oraz joysticka izometrycznego (Fotografia 9), którego obsługa wymaga zaledwie użycia siły miary 0.1N. Dzięki nowym urządzeniom umożliwiającym obsługę wózków możliwe jest przywrócenie chorym zdolności do poruszania się, co polepsza jakość życia tych pacjentów [41].



Fotografia 9. Możliwe mechanizmy sterowania wózka inwalidzkiego [41]

Chorym zaleca się także stosowanie pozycji ułożeniowych min. leżenia przodem z czołem opartym na splecionych dłoniach w ramach profilaktyki przykurczeniowej, ponieważ długotrwałe przebywanie w wymuszonej pozycji siedzącej na wózku inwalidzkim sprzyja powstawaniu przykurczy stawów biodrowych i kolanowych oraz bocznym skrzywieniom kręgosłupa. W związku z czym należy ograniczyć ten czas do minimum. [1÷3, 19, 41].

5.2.4. Ćwiczenia oddechowe

Postępujące osłabienie mięśni oddechowych, skolioza i deformacje klatki piersiowej upośledzają oddychanie oraz odkrztuszanie wydzieliny. Priorytetem więc stają się ćwiczenia oddechowe, które należy wykonywać codziennie, nawet kilkakrotnie. Zalegająca wydzielina jest powodem wielu infekcji układu oddechowego zagrażających życiu chorego. Stosuje się ćwiczenia oddychania torem piersiowym i przeponowym w różnych pozycjach ciała, sprężynowanie i rozprężanie klatki piersiowej, ćwiczenia w wodzie z nurkowaniem oraz naukę efektywnego odkrztuszania. Często stosuje się ćwiczenia oddechowe z wykorzystaniem różnych przedmiotów w formie zabawy np. dmuchanie piłeczki pingpongowej do celu, dmuchanie baniek mydlanych, zdmuchiwanie płomienia świecy. Naukę prawidłowego oddychania łączy się z elementami terapii ruchowej tj. ruch kończyn dolnych i górnych. Wykazano, że ćwiczenia oporowe wdechu i wydechu wzmacniają siłę mięśni oddechowych oraz ich wytrzymałość [23]. Koessler i wsp. udokumentowali poprawę wartości maksymalnego

ciśnienia wdechowego i 12 sekundową maksymalną dowolną wentylację, wśród 18 badanych z DMD po 2 letnim treningu mięśni oddechowych. W spirometrii wykazano także 25% wzrost nasilonej pojemności życiowej (FVC) od wartości oczekiwanych [24].



Fot. 10,11 Ćwiczenia oddechowe [Źródło własne]

Ważne jest nauczenie chłopców z DMD techniki prawidłowego odkrztuszania zalegającej wydzieliny, ponieważ znacznemu osłabieniu ulegają mięśnie tłoczni brzusznej oraz „mięsień kaszlu” – mięsień najszerszy grzbietu. Nauka powinna zostać rozpoczęta już w okresie prawidłowej wydolności oddechowej. Przy zmniejszonej pojemności życiowej płuc zaleca się także oklepywanie klatki piersiowej oraz układanie chorego w pozycjach drenażowych [4, 18, 19, 35, 46, 50]. Ćwiczenia oddechowe oraz logopedyczne wpływają na utrzymanie zdolności prawidłowej wymowy oraz samodzielnego połykania [1].

5.2.5. Hydroterapia

W usprawnianiu pacjentów z dystrofią mięśniową Duchenne’a często korzysta się z hydroterapii, podczas której ciało pacjenta jest całkowicie odciążone, co sprzyja rozluźnieniu mięśni i wykonywaniu ćwiczeń oddechowych [29÷42]. Dzięki wyporowi wody ciało chorego zostaje odciążone a ruchy są mniej męczące, wykonywane z ułatwieniem. Ciepła temperatura wody wywiera efekt przeciwmuskurowy, sprzyja rozluźnieniu mięśni i zmniejsza dolegliwości bólowe. Zwiększa także poziom endorfiny, odpowiedzialnej za uczucie przyjemności i dobre samopoczucie. Ćwiczenia w środowisku wodnym wpływają korzystnie na wydolność ogólną poprzez znaczne uaktywnienie układu krążeniowo-oddechowego [43]. Różna głębokość zanurzenia oraz szybkość wykonywanych ruchów umożliwia dawkowanie wysiłku zespołów mięśniowych. Ciśnienie hydrostatyczne umożliwia także oporowe ćwiczenia oddechowe (faza wdechu) oraz ułatwia fazę wydechu. Wzrasta ono o jedną atmosferę co 10 metrów.

Im głębiej zanurzony jest pacjent, tym bardziej wzrasta ciśnienie hydrostatyczne, co wpływa na zwiększenie objętości minutowej serca, ze względu na zwiększenie ilości krwi w centrum ciała. We wczesnym stadium choroby ćwiczenia w wodzie umożliwiają prowadzenie nauki chodzenia oraz wykonanie pełnego zakresu ruchów w przypadku słabszych grup mięśniowych. Chorzy, którzy utracili zdolność samodzielnego poruszania się w warunkach naturalnych, przy zanurzeniu ciała do poziomu barków są w stanie samodzielnie stać i chodzić [1]. Dzięki tym ćwiczeniom obserwuje się poprawę koordynacji ruchowej, zmniejszenie patologicznego wzmożonego napięcia mięśniowego oraz korzystny wpływ na psychikę pacjenta, który dotychczas unieruchomiony – jest w stanie poruszać kończynami.

Istnieje wiele metod hydroterapii min.: koncepcja Hallwick, Watsu, WaterDance, Aquatherics, Healing Dance. Szczególną metodą terapii w wodzie wykorzystywaną w usprawnianiu pacjentów z DMD jest metoda BRRM (*Bad Ragaz Ring Method*), opartą na koncepcji PNF. Celem terapii jest reedukacja mięśniowa, zmniejszenie napięcia mięśniowego, wzmocnienie osłabionych mięśni oraz przywrócenie w miarę możliwości naturalnych wzorców ruchowych kończyn górnych i dolnych. Ciało pacjenta jest całkowicie odciążone poprzez zastosowanie krążków unoszących się na wodzie, ułożone wokół głowy, miednicy, okresowo pod kończynami dolnymi, przez co pozycja pacjenta w leżeniu na plecach jest zabezpieczona [43]. Terapeuta kieruje ruchem pacjenta w poszczególnych wzorcach ruchowych, aby wzmocnić siłę i zakres ruchomości pacjenta. Fizjoterapeuta zanurzony jest w wodzie mniej więcej na poziom 8 kręgu piersiowego, stabilizując ciało chorego. Ruch może być wykonywany unilateralnie i bilateralnie, zarówno symetrycznie (obie strony ciała podążają w tym samym kierunku) jak i asymetrycznie (każda ze stron porusza się w kierunku przeciwnym). Terapeuta poleca choremu wykonać dany ruch, daje jemu jasne wskazówki. W miarę możliwości chorego, można zastosować niewielki opór. Hydroterapia jest często wykorzystywana w terapii przykurczów. Zapobiega późniejszemu przykurczom grupy antagonistów. Metoda BRRM może być zmodyfikowana: terapeuta biernie rozciąga przykurzoną grupę mięśniową, a pacjent jednocześnie napina rozciągniętą grupę antagonistów. Pacjenci powoli doskonałą recyprkalną inhibicję, tj. mogą świadomie rozluźnić grupę antagonistów [44].

Nelson i wsp. ocenili wpływ regularnego korzystania z hydroterapii na funkcje motoryczne, funkcje oddechowe oraz na jakość życia pacjenta chorego na DMD. Badany uczęszczał na zajęcia hydroterapii raz w tygodniu przez okres 1,5 miesiąca oraz wykonywał w domu indywidualnie dobrany zestaw ćwiczeń domowych zawierających ćwiczenia rozciągające oraz stosował ortezy. Dzięki tej terapii siła mięśniowa pacjenta uległa zwiększeniu, poprawiła się także jakość jego życia. Funkcje oddechowe pozostały bez zmian. Mimo, że dystrofia mięśniowa Duchenne'a jest chorobą postępującą, upośledzającą funkcje motoryczne, oddechowe, pogarszającą jakość życia

pacjenta, autorzy badań doszli do wniosku, że jakiegokolwiek działanie, które polepsza bądź utrzymuje na stałym poziomie ww. funkcje, należy ocenić je jako pozytywny efekt [40]. U chłopców ze znacznie osłabionymi mięśniami szyi i karku stosuje się specjalne pompowane koła, zakładane na szyję. Dzięki nim głowa chorego jest ciągle nad powierzchnią wody i nie odczuwa on lęku przez utonięciem [1, 18, 19, 35]. Rodzice dzieci korzystających z hydroterapii byli zadowoleni z efektów, zauważyli, że terapia w wodzie poprawia elastyczność ich mięśni oraz balans ciała. Twierdzą, że ten rodzaj terapii daje ich dzieciom większą pewność siebie oraz poczucie wolności [15].

5.3. Rehabilitacja w stadium unieruchomienia

Stadium unieruchomienia jest zaawansowanym okresem choroby. Chory uzależniony jest od wózka inwalidzkiego i większość czasu spędza w łóżku. Długi czas unieruchomienia wpływa negatywnie na układ kostno-stawowy, sprzyjając powstawaniu zniekształceń. Wraz z postępem choroby niezbędne jest zapewnienie stałej opieki pielęgniarzkiej, zastosowanie tlenoterapii oraz dostęp do respiratora.

W okresie utraty sprawności ruchowej, gdy pacjent nie jest w stanie już samodzielnie ćwiczyć, zalecane są bierne ćwiczenia usprawniające kończyn, wykonywane przez fizjoterapeutę oraz rodziców chorego. W tym okresie postępowanie fizjoterapeutyczne oparte jest głównie na rehabilitacji oddechowej, pionizowaniu pacjenta, ćwiczeniach biernych, profilaktyce przeciwoleżynowej oraz terapii OMT (*Orofacial Myofunctional Therapy*) [18, 26, 35, 50, 53, 54].

5.3.1. Pionizacja

W okresie unieruchomienia bardzo ważna jest bierna pionizacja pacjentów za pomocą stania w parapodium lub z użyciem pionizatora bądź stołu pionizacyjnego. Spowalnia narastanie przykurczów stawowych oraz wielopłaszczyznowego skrzywienia kręgosłupa. Wpływa także korzystnie na układ oddechowy, krążeniowy, kostno-stawowy, pokarmowy oraz poprawia nastrój psychiczny chorego, który cały czas jest zmuszony do leżenia w łóżku. Według Kostery-Pruszczuk A. u pacjentów, u których stosuje się codzienną pionizację, możliwe jest utrzymanie, a nawet niewielka poprawa parametrów oddechowych w spirometrii, w porównaniu do chorych z niej niekorzystających [50]. Zaleca się, aby pionizacja chorych odbywała się codziennie po 2 godziny w etapie utracenia zdolności samodzielnego poruszania się. Niestety zaawansowane przykurcze uniemożliwiają trzymanie kończyn dolnych w wyproście, dlatego pionizacja w parapodium staje się dla nich bolesna. Rozważa się wtedy wykonanie operacji wydłużenia ścięgien mięśni przykurczonych tj.: zginaczy stawu biodrowego, pasma biodrowo-piszczelowego i ścięgna Achillesa. Dzięki niej prowadzenie pionizacji staje się możliwe [1, 18, 26, 35, 50].

5.3.2. Terapia OMT

W stadium unieruchomienia obserwuje się u pacjentów trudności w jedzeniu, połykaniu (dysfagia). Jest to spowodowane osłabieniem i przykurczami mięśni twarzoczaszki odpowiedzialnych za funkcje żucia jak i hipertrofią języka. W polepszeniu czynności spożywania pokarmu jak i jakości snu, stosuje się terapię OMT (*Orofacial Myofunctional Therapy*), tzw. terapia orofacjalna (ustno-twarzowa). Badania wykazały, że wraz ze wzrostem wieku chorych dysfagia postępuje. Zajęte przez chorobę mięśnie powodują wady zgryzu, co uniemożliwia swobodne spożywanie pokarmu. Zastosowano ćwiczenia polegające na trzymaniu języka w ustach, oddychaniu tylko i wyłączenie przez nos oraz żuciu gumy. Efekty terapii były satysfakcjonujące [7]. Z kolei Van Dyck i wsp. badali wpływ terapii OMT na dysfunkcje języka. Zauważyli znaczącą poprawę w sile funkcji języka – jego zdolności do uniesienia oraz spożywanie pokarmów stałych [53].

Chłopcy chorzy na DMD cierpią również na bezdech senny, a w jego leczeniu także stosuje się terapię OMT. Ćwiczenia obejmują mięśnie odpowiadające za żucie, mięśnia okrężnego ust, policzkowe oraz mięśnie języka. Terapia przyniosła znamienne korzyści. Jednak podkreśla się konieczność prowadzenia dalszych badań [54].

5.3.3. Terapia przeciwoodleżynowa

Bardzo istotna jest profilaktyka przeciwoodleżynowa, ze względu na unieruchomienie pacjenta. Wszyscy autorzy podkreślają jak ważna jest odpowiednia pielęgnacja pacjenta w ostatnim stadium choroby. Polega na częstej zmianie pozycji chorego w łóżku, zastosowaniu specjalnych materacy, poduszek oraz odpowiedniej pielęgnacji ciała. Ułożenie chorego powinno być wygodne i zmieniane co 2-3 godziny. Pościel powinna być wykonana z naturalnych materiałów i ułożona tak, aby nie było jakichkolwiek zagięć i fałd, które drażniłyby skórę i mogłyby stanowić początek zmian odleżynowych. Rodzina chorego musi zaopatrzyć się w specjalne materace przeciwoodleżynowe zmiennościśnieniowe. Higiena skóry jest bardzo ważnym elementem w profilaktyce przeciwoodleżeniowej, obejmuje ona osuszanie wrażliwych miejsc, nieużywanie środków pielęgnacyjnych z zawartością alkoholu jak i zakładanie luźnych, bawełnianych ubrań. Wykorzystuje się pozycjonowanie kończyn w pozycjach wyprostnych przeciwdziałających zgięciu, Pozycja leżenia przodem jest najbardziej efektywną metodą, aby rozciągnąć przykurczone mięśnie zginaczy biodra [26]. Zaleca się masować ciało chorego stosując techniki głaskania, rozcierania i delikatnego oklepywania. Niezbędne są także ćwiczenia bierne w celu utrzymania i podtrzymania sprawności szkieletowych narządu ruchu tzn. więzadeł, mięśni, stawów oraz utrzymaniu odpowiednio ich długości, elastyczności i ruchomości. Ćwiczenia te zapobiegają także obrzękom zastoinowym oraz nie dopuszczają do powstania zrostu w stawie.

6. Rola rodziców w procesie usprawniania

Chorzy na dystrofię mięśniową Duchenne'a wymagają codziennej, odpowiednio prowadzonej rehabilitacji. Kontynuacja ćwiczeń w domu jest możliwa dzięki nauce rodziców chorych dzieci odpowiedniej pielęgnacji oraz instruktazu ćwiczeń, które mogą wykonywać samodzielnie. Rodzice muszą zrozumieć jak ważna jest codzienna rehabilitacja. Szczególną uwagę zwraca się na ćwiczenia rozciągające oraz oddechowe, które w największym stopniu spowalniają proces powstawania przykurczy stawów i klatki piersiowej. Dzięki nim sprawność ruchowa chłopców jest jak najdłużej utrzymywana. Edukuje się opiekunów chorych na DMD na temat pojawiającej się niewydolności oddechowej i jej następstwach. Muszą oni wiedzieć, jak odpowiednio ułożyć chorego do drenażu, jak wspomóc odkrztuszanie zalegającej wydzieliny oraz jak poprawnie wykonać oklepywanie klatki piersiowej [18, 19, 35]. Rodzice powinni także nauczyć się jak rozpoznać pierwsze objawy zmęczenia mięśni, dzięki czemu wykorzystuje się rezerwy chorego i poprawia jego ogólną wydolność. Zaleca się wizyty ambulatoryjne kontrolne u lekarza specjalisty rehabilitacji medycznej i fizjoterapeuty co 2-3 miesiące, aby sprawdzić efekty oraz technikę wykonywanych ćwiczeń. W Polsce istnieje kilka fundacji zrzeszających rodziców chorych dzieci na DMD: Parent Project Muscular Dystrophy, Polskie Towarzystwo Chorób Nerwowo-Mięśniowych oraz Fundacja Pomocy Chorym na Zanik Mięśni [18, 19]. Wymieniają się między sobą doświadczeniem, rozwiązują problemy, pomagają sobie wzajemnie jak i otrzymują wsparcie ze strony specjalistów z różnych dziedzin. Ustanowiono również Światowy Dzień Świadomości Dystrofii Duchenne'a na dzień 7 września [56].

7. Podsumowanie

Dystrofia mięśniowa typu Duchenne'a charakteryzuje się stosunkowo szybko narastającym osłabieniem mięśniowym. Ze względu na brak leczenia przyczynowego, postępowanie lecznicze oparte jest na indywidualnie dobranej rehabilitacji, którą dostosowuje się do aktualnego stanu chorego. Celem jest jak najdłuższe zachowanie sprawności ruchowej i wydolności ogólnej chorych. Jest to osiągalne dzięki interdyscyplinarnemu podejściu wielu specjalistów z zakresu neurologii, pulmonologii, kardiologii, ortopedii, rehabilitacji, dietetyki, psychologii, a także odpowiedniemu przygotowaniu rodziców do opieki i codziennych ćwiczeń z dzieckiem. Dzięki właściwemu postępowaniu i systematycznie prowadzonej rehabilitacji, możliwe jest osiągnięcie poprawy jakości życia tych pacjentów.

Literatura

1. Kijowski S., *Fizjoterapia jako alternatywa w postępującej dystrofii mięśniowej*, Przegląd Medyczny Uniwersytetu Rzeszowskiego i Narodowego Instytutu Leków w Warszawie, Rzeszów (2012), 3 s. 379-285
2. Guglieri M., Bushby K., *Recent developments in the management of Duchenne muscular dystrophy*, Therapeutic Advances in Neurological Disorders, 6;3 (2013), s. 147-160
3. Flanigan K., *Duchenne and Becker Muscular Dystrophies*, Neurologic Clinics 32 (2014), s. 671-688
4. Kochański A., *Dystrofia mięśniowa Duchenne'a – w poszukiwaniu terapii*, Przegląd Pediatriczny. 39;1 (2009), s. 50-56
5. Nardi J., Prigent H., Garnier B., Lebargy F., Quera-Salva M. A., Orlikowski D., Lofaso F., *Efficiency of invasive mechanical ventilation during sleep in Duchenne muscular dystrophy*, Sleep Medicine. 13 (2012), s. 1056-1065
6. Wong B., Rybalsky I., Shellenbarger K., Tian C., McMahon M., Rutter M., Sawnani H., Jefferies J., *Long-Term Outcome of Interdisciplinary Management of Patients with Duchenne Muscular Dystrophy Receiving Daily Glucocorticoid Treatment*, The Journal of Paediatrics. 30 (2016), s. 15-30
7. Heutinck L., Kampen N., Jansen M., de Groot I., *Physical activity in boys with DMD is lower and less demanding compared to healthy boys*, Neuromuscular Disorders. 25 (2015), s. 184-190
8. Angelini C., Tasca E., *Fatigue in muscular dystrophies*. Neuromuscular Disorders. 22 (2012), s. 214-220
9. Hsu J.D., Quinlivan R., *Scoliosis in Duchenne muscular dystrophy (DMD)*, Neuromuscular Disorders. 23 (2013),s. 611-617
10. Hunt A., Carter B., Abbott J., Parker A., de Goede C., Spinty S., *Pain experience, expression and coping in boys and young men with Duchenne muscular dystrophy – a pilot study using mixed methods*, European Journal of Paediatric Neurology. 20;4 (2016), s.630-638
11. Mirski K., Crawford T., *Motor and Cognitive Delay in Duchenne Muscular Dystrophy: Implication for Early Diagnosis*, The Journal of Paediatrics. 165;5 (2014), s.1008-10
12. Sawnani H., Thampratankul L., Szczesniak R., Fenchel M., Simakajornboon N., *Sleep Disordered Breathing in Young Boys with Duchenne Muscular Dystrophy*, The Journal of Paediatrics. 166;3 (2015), s. 640-5
13. Voisin V., De La Porte S., *Therapeutic Strategies for Duchenne and Becker Dystrophies*, International Review of Cytology. 240 (2004), s. 1-30
14. Werner B. C., Skalsky A. J., McDonald M., Han J. J., *Convexity of Scoliosis Related to Handedness in Identical Twin Boys With Duchenne's Muscular Dystrophy: A Case Report*, Archives of Physical Medicine and Rehabilitation. 89 (2008), s. 2021- 2024
15. De Valle K. L., Davidson Z. E., Kennedy R. A., Ryan M. M., Carroll K. M., *Physical activity and the use of the standard and complementary therapies in Duchenne and Becker muscular dystrophies*, Journal of Paediatric Rehabilitation Medicine: An Interdisciplinary Approach. 9 (2016), s. 55-63

16. Markert C. D., Case L. E., Carter G. T., Furlong P. A., Grange R. W., *Exercise and Duchenne Muscular Dystrophy: Where we have been and where we need to go*, Muscle & Nerve. 45;5 (2012), s. 746-51
17. Pangalila R., van den Bos G., Bartels B., Bergen M., Stam H., Roebroek M., *Prevalence of Fatigue, Pain and Affective Disorders in Adults With Duchenne Muscular Dystrophy and Their Associations With Quality of Life*, Archives of Physical Medicine and Rehabilitation., 96;7 (2015), s. 1242-7
18. Borawska-Dziadek E., Zimowski J., Ziora-Jakutowicz K., Ziora K., *Dystrofia mięśniowa typu Duchenne'a ze szczególnym uwzględnieniem zmian w układzie sercowo-naczyniowym oraz aspektów genetycznych*, Przegląd Pediatryczny 42;4 (2012), s. 200-207
19. Kijowski S., *Formy aktywności ruchowej osób z dystrofią mięśniową postępującą*, Rozprawy Naukowe Akademii Wychowania Fizycznego we Wrocławiu (2012), 39, s. 15-18
20. Mellies U., Ragette R., Schwake C., Boehm H., Voit T., Teschler H., *Long-term noninvasive ventilation in children and adolescents with neuromuscular disorders*, European Respiratory Journal. 22 (2003), s. 631-636
21. Alemdaroglu I., Karaduman A. A., Yilmaz O., Topaloglu H., *Effects of upper extremity exercise training on respiratory function and quality of life in children with Duchenne Muscular Dystrophy*, Neuromuscular Disorders. 23 (2013), s. 779-800
22. Alemdaroglu I., Karaduman A. A., Yilmaz O., Topaloglu H., *Effects of upper extremity exercise training on upper extremity endurance in patients with Duchenne Muscular Dystrophy*, Neuromuscular Disorders. 23 (2013), s.802-823
23. Abresch R. T., Carter G. T., Han J. J., McDonald C. M., *Exercise in Neuromuscular Diseases*, Physical Medicine & Rehabilitation Clinics of North America 23 (2012), s. 653-673
24. Koessler W., Wanke T., Winkler G., Nader Astrid, Toifl K., Kurz H., Zwick H., *2 Years' Experience With Inspiratory Muscle Training in Patients With Neuromuscular Disorders*, Chest 120;3 (2001), s.765-769
25. Skalsky A., McDonald C., *Prevention and Management of Limb Contractures in Neuromuscular Diseases*, Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America. 23 (2012), s. 675-687
26. Zamani G., Heidari M., Malamiri R., Ashrafi M., Mohammadi M., Badv R., Hosseini S., Salehi S., Shahrokhi A., Qorbani M., Fathi M., *The quality of life in boys with Duchenne muscular dystrophy*, Neuromuscular Disorders 26;7 (2016), s. 423-427
27. Fujiwara T., Tanabe A., Uchikawa K., Tsuji T., Tanuma A., Hase K., Liu M., *Activities of daily living (ADL) structure of patients with Duchenne muscular dystrophy, including adults*, The Keio Journal of Medicine, 9;2 (2009), s. 223-226
28. Matthews D. J., James K. A., Miller L. A., Pandya S., Campbell K. A., Cialfoni E., Matthews K. D., Miller T. M., Cunniff C., Meaney F. J., Druschel C. M., Romitti P. A., Fox D. J., *Use of corticosteroids in a population-based cohort of boys with duchenne and becker muscular dystrophy*, Journal of Child Neurology., 25;11 (2010), s.1319-24
29. Wong B. L., *Management of the Child With Weakness*, Seminars in Pediatric Neurology. 13;4 (2006), s.271-8

30. Świerczyńska A., Klusek R., Kaciński M., *Przesłanki neurofizjologiczne dla rehabilitacji neurologicznej dzieci*, Przegląd Lekarski 73;3 (2016), s. 183-186
31. Zagłoba-Kaszuba A., Huber J., *Zarys rozwoju metod rehabilitacyjnych ze szczególnym uwzględnieniem techniki proprioreceptywnego ułatwiania nerwowo-mięśniowego opartego na badaniach neurofizjologicznych*, Nowiny Lekarskie. 77;5 (2008), s. 385-391
32. Van Ruten H. J. A., Betteolo C. M., Cheetham T., Eagle M., Lochmuller H., Straub V., Bushby K., Guglieri M., *Why are some patients with Duchenne muscular dystrophy dying young: An analysis of causes of death in North East England*, Official Journal of the European Paediatric Neurology Society. 20 (2016), s. 904-909
33. Bozgeyik S., Alemdaroglu I., Bulut N., Yilmaz O., Karaduman A., *Neck flexor muscle strength and its relations with functional performance in Duchenne muscular dystrophy*, Official Journal of the European Paediatric Neurology Society. 1 (2016), s.6
34. Vill K., Schroeder S. A., Blaschek A., Müller-Felber W., *Six-minute walk test versus two-minute walk test in children with Duchenne muscular dystrophy: Is more time more information?*, European Journal of Paediatric Neurology 19;6 (2015), s. 640-6
35. Kułak W., Okurowska-Zawada B., Sienkiewicz D., Paszko-Patej G., *Współczesne metody rehabilitacji dzieci i młodzieży*, Uniwersytet medyczny w Białymstoku, Wydział Nauk o Zdrowiu, Białystok 2014
36. Hyde S., Floytrup I., Glent S., Kroksmark A., Salling B., Steffensen B., Werlauff U., Erlandsen M., *A randomized comparative study of two methods for controlling Tendo Achilles contracture in Duchenne muscular dystrophy*, Neuromuscular Disorders. 10 (2000), s.257-263
37. Kinali M., Manzur A., Muntni F., *Recent developments in the management of Duchenne muscular dystrophy* Paediatrics and Child Health. 18;1 (2007), s. 22-26
38. Taktak D. M., Bowker P., *Lightweight, Modular Knee-Ankle-Foot Orthosis for Duchenne Muscular Dystrophy: Design, Development and Evaluation*, Archives of Physical Medicine and Rehabilitation. 76 (1995), s. 1156-62
39. Glanzman A. M., Flickinger J. M., Dholskis K. H., Bonnemann C. G., Finkel R. S., *Serial Casting for the management of ankle contracture in Duchenne muscular dystrophy*, Pediatric Physical Therapy. 23;3 (2011), s. 275-9
40. Nelson L., Early D., Iannaccone S., *Effects of a regular aquatic therapy program on one individual with Duchenne Muscular Dystrophy (DMD): A case study*, Neuromuscular Disorders. 23 (2013), s. 738-852
41. Pellefrini N., Guillon B., Prigent H., Pellegrini M., Orlikovski D., Raphael J. C., Lofaso F., *Optimization of power wheelchair control for patients with severe Duchenne muscular dystrophy*, Neuromuscular Disorders. 14 (2004), s.297-300
42. Zhu Y., Romitti P. A., Conway K. M., Andrews J., Liu K., Meaney F. J., Street N., Puzhankara S., Druschel C. M., Matthews D. J., *Complementary and Alternative Medicine for Duchenne and Becker Muscular Dystrophies: Characteristics od Users and Caregivers*, Paediatric Neurology 51;1 (2014), s. 71-7
43. Miłkowski K., Chmiel E., Walicka-Cupryś K., *Podstawy terapii w wodzie: wybrane metody i koncepcje*, Rehabilitacja. (2015), s. 116-129.

44. Morris D. M., *Aquatic Rehabilitation for the Treatment of Neurological Disorders*, Journal of Back and Musculoskeletal Rehabilitation 1;4 (1994), s. 297-308
45. Ryniewicz B., *Diagnostyka i próby leczenia dystrofii mięśniowej Duchenne'a*, Neurologia i Neurochirurgia Polska 39;4 (2005), s. 639-669
46. Strugalska-Cynowska M. H., *Dystrofia mięśniowa typu Duchenne'a (DMD)*, Broszura Towarzystwa zwalczania chorób mięśni, Warszawa 2003
47. Bushby K., Bourke J., Bullock R., Eagle M., Gibson M., Quinby J., *The multidisciplinary management of Duchenne muscular dystrophy*, Current Pediatrics, 15;4 (2005), s. 292-30
48. Biggar W. D., *Dystrofia mięśniowa Duchenne'a*, Padiatria po Dypomie., 14;4 (2007), s. 48-52
49. De Souza M., Figueiredo M., Baptista C., Aldaves R., Mattiello-Sverzut A., *Beneficial effects of ankle-foot orthosis daytime use on the gait of Duchenne muscular dystrophy patients*, Clinical Biomechanics. 35 (2016), s. 102-110
50. Kostera-Pruszczyk i wsp., *Dystrofie mięśniowe*, PZWL Warszawa 2010
51. Bakker J., de Groot I., Beckerman H., *The effects of knee-ankle-foot orthoses in the treatment of Duchenne muscular dystrophy: review of literature*, Clinical Rehabilitation 14 (2000), s. 343-359
52. Tangsrud S., Petersen I., Lodrup K., *Lung function in children with Duchenne's Muscular Dystrophy*, Respiratory Medicine 95 (2001), s. 898-903
53. Van Dyck C., Dekeyser A., Vantricht E., Manders E., Goeleven A., Fieuids S., Wilems G., *The effect of orofacial myofunctional treatment in children with anterior open bite and tongue dysfunction: a pilot study*, European Journal of Orthodontics. 1 (2016), s. 227-234
54. Moeller J. L., Paskay L., Gelb M. L., *Myofunctional Therapy A novel Treatment of Pediatric Sleep-Disordered Breathing*, Sleep Medicine Clinics. 9;2 (2014), s. 235-243
55. Kinnett K., Dowling J., Mendell J. R., *The certified Duchenne Care Center Program*, Neuromuscular Disorders. 26 (2016), s. 853-859
56. <http://www.worldduchenneday.org/>
57. Zdjęcie: <https://pl.pinterest.com/erdmancrew37/muscular-dystrophy/>

Postępowanie fizjoterapeutyczne w dystrofii mięśniowej typu Duchenne'a

Dystrofia mięśniowa typu Duchenne'a jest najczęściej występującą dystrofią o ciężkim przebiegu. Choroba ta dotyczy niemal wyłącznie chłopców, ponieważ jest dziedziczona recesywnie w sprzężeniu z płcią. Ma charakter postępujący, skutkujący nieodwracalnym zanikiem tkanki mięśniowej. Choroba zaczyna się we wczesnym dzieciństwie. Chore dzieci zmagają się z wieloma problemami zdrowotnymi, począwszy od dużo mniejszej sprawności motorycznej w porównaniu do rówieśników, aż do narastającej niewydolności krążeniowej oraz oddechowej. Cierpiący na dystrofię Duchenne'a wymagają kompleksowej rehabilitacji, która jest niezbędna dla poprawy jakości ich życia. Terapia ma na celu spowolnienie rozwoju choroby w czasie, aby zapewnić choremu jak najdłuższe funkcjonowanie w życiu codziennym. Fizjoterapia pomaga w utrzymaniu siły i elastyczności mięśni, opóźnia proces powstawania przykurczów stawowych, zapobiega deformacjom kręgosłupa oraz infekcjom układu oddechowego. Dzięki systematycznemu treningowi i podtrzymywaniu sprawności funkcjonalnej, większość chorych może realizować się zawodowo i prywatnie. Zespół rehabilitacyjny prowadzi stałe, systematyczne leczenie usprawniające dostosowane do stadium choroby i stanu pacjenta. Ćwiczenia oraz formy aktywności ruchowej dobiera się indywidualnie. Mają one poprawiać i podtrzymywać kondycję pacjenta. W związku z progresywnym charakterem choroby w różnych

okresach jej rozwoju stosowane są różne formy aktywności. W początkowym okresie stosuje się ćwiczenia ogólnousprawniające, ćwiczenia oddechowe oraz lokomocyjne. Rozciąganie mięśni i przykurczy w stawach jest kluczowym elementem w rehabilitacji. Celem rozciągania jest zachowanie funkcji mięśni i utrzymanie komfortu życia. W miarę postępu choroby stosuje się ćwiczenia wspomagane lub prowadzone w odciążeniu. Usprawnianie w okresie utraty samodzielności ruchowej obejmuje ćwiczenia bierne, naukę posługiwania się wózkiem inwalidzkim oraz terapię przeciwoleżynową. Z powodzeniem w usprawnianiu pacjentów korzysta się metody specjalnej fizjoterapii jaką jest torowanie nerwowo-mięśniowe – PNF (ang. *Prorioceptive Neuromuscular Facilitation*).

Celem pracy jest przybliżenie jednostki chorobowej oraz postępowania fizjoterapeutycznego w każdym okresie choroby. Autorzy pracy przedstawiają klasyczne usprawnianie pacjentów oraz metody specjalnej fizjoterapii wykorzystywane u chorych na dystrofię mięśniową typu Duchenne'a poprzez analizę dostępnej literatury naukowej oraz wyników przeprowadzonych badań.

Słowa kluczowe: dystrofia mięśniowa Duchenne'a, rehabilitacja, fizjoterapia, leczenie.

Physiotherapy procedures in Duchenne muscular dystrophy

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is the most frequent type of the severe dystrophies. The illness can be found only in boys with very few exceptions as it is inherited recessively and connected with the patients' gender. DMD has a progressive nature and results in irreversible loss of the muscle tissue. The illness starts in early childhood. The ill children struggle with a number of health problems ranging from much smaller motor abilities compared to their peers, to increasing circulatory and respiratory failure. The suffering children require comprehensive rehabilitation which is essential to improve the quality of their lives. The therapy aims to slow down the development of the illness in order to prolong the patients' functionality in everyday lives. Physiotherapy helps to maintain the strength and flexibility of the muscles, slow the formation of joint contractures, and prevent from spine deformations and respiratory infections. Thanks to systematic trainings and maintaining physical functionality, the majority of the patients can realize their professional and private plans.

A rehabilitation team provides constant, systematic treatment which is adjusted to the stage of the illness and the patient's condition. The types of the exercises and various forms of physical activities are adapted to the individual needs. Their aim is to enhance and maintain the patient's condition. In accordance with the progressive nature of the disease, various types of exercises are applied correspondingly to the different stages of the illness. General rehabilitation gymnastics, as well as breathing and locomotive exercises should be applied in the initial stages of the illness. Stretching muscles and joint contractures is the key element in the rehabilitation. The stretching aims to maintain proper functionality of the muscles as well as quality of life. As the illness develops, the patients should be assisted in the exercises by the therapists or the exercises should be conducted in such a manner which limits strain on the joints and muscles. In the stages of the loss of psychical independence, passive exercises should be applied as well as anti-bedsore therapy. What is more, the patients should learn how to use a wheelchair. PNF (Prorioceptive Neuromuscular Facilitation), a specific method of physiotherapy, is considered as a therapy which yields positive effects.

The aim of the work is to characterize the morbid entity and physiotherapeutic procedure in every stage of the illness. The authors present both classic and special physiotherapeutic methods applied in DMD in the analysis of the available scientific literature and their research.

Key words: Duchenne muscular dystrophy, rehabilitation, physiotherapy, treatment.

Wybrane metody terapii osób ze spektrum autyzmu

1. Wprowadzenie

Jednym z podstawowych zadań terapii jest nauczenie osób dotkniętych autyzmem tego, jak odnajdywać się wśród ludzi zdrowych. Bardzo ważna jest również edukacja rodziców, opiekunów, a także zwiększenie świadomości społecznej. Autyzmu nie da się wyleczyć, jednak chorym można stworzyć warunki do godnego życia w społeczeństwie. Ważna jest rehabilitacja dziecka, jak również współpraca z rodziną i osobami z najbliższego otoczenia. Terapia ma charakter kompleksowy – powinna opierać się nie tylko na jednej metodzie, ale łączyć różne podejścia. Autyzmu nie leczy się przyczynowo, można jedynie łagodzić dolegliwości. Wybrane techniki przedstawionych niżej metod są indywidualnie dopasowywane do potrzeb każdego chorego i stale modyfikowane.

2. Definicja autyzmu

Autyzm dziecięcy jest całościowym zaburzeniem rozwoju, które ujawnia się przed ukończeniem 3. roku życia dziecka. Może przyjmować postać progresywną, w której od początku widoczne są nieprawidłowości w rozwoju (np. brak kontaktu wzrokowego, brak reakcji na próby porozumiewania się z dzieckiem). Z czasem dochodzi do progresu nieprawidłowości i są one rozpoznawane przez rodziców jako coraz bardziej niepokojące. Innym przebiegiem charakteryzuje się postać regresywna autyzmu,

¹ e.rozenek@o2.pl, Studenckie Koło Naukowe przy Klinice Rehabilitacji Dziecięcej z Ośrodkiem Wczesnej Pomocy Dzieciom Upośledzonym „Dać Szansę”, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

² amandam1994@wp.pl, Studenckie Koło Naukowe przy Klinice Rehabilitacji Dziecięcej z Ośrodkiem Wczesnej Pomocy Dzieciom Upośledzonym „Dać Szansę”, Wydział Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

³ olag1994@interia.pl, Studenckie Koło Naukowe przy Klinice Rehabilitacji Dziecięcej z Ośrodkiem Wczesnej Pomocy Dzieciom Upośledzonym „Dać Szansę”, Wydział Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

⁴ karolina.sochon2@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe przy Klinice Rehabilitacji Dziecięcej z Ośrodkiem Wczesnej Pomocy Dzieciom Upośledzonym „Dać Szansę”, Wydział Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

⁵ janusz.wojtkowski@op.pl, Studenckie Koło Naukowe przy Klinice Rehabilitacji Dziecięcej z Ośrodkiem Wczesnej Pomocy Dzieciom Upośledzonym „Dać Szansę”, Wydział Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

w której dziecko do pewnego momentu rozwija się prawidłowo, ale przed 36. miesiącem życia zaczyna prezentować ewidentne uwstecznienie w zakresie rozwoju mowy, kontaktów społecznych, zainteresowań i zachowania (regres rozwojowy) [1]. Autyzm atypowy natomiast, cechuje się wystąpieniem objawów charakterystycznych po ukończeniu trzeciego roku życia dziecka. Kolejną kwestią odróżniającą tę postać autyzmu od autyzmu dziecięcego, jest występowanie zaburzeń na co najmniej jednym z trzech obszarów psychopatologii. Są to: interakcje społeczne, komunikacja i nietypowe, powtarzalne zachowania. W postaci dziecięcej zaburzenia widoczne są na wszystkich trzech wymienionych obszarach. Zespół Aspergera wyróżnia się od pozostałych zaburzeń ze spektrum autyzmu szczególnie na dwóch polach: nie występuje opóźnienie rozwoju mowy, a iloraz inteligencji jest w normie lub powyżej normy [2, 3].

3. Epidemiologia

Według raportu Fundacji JiM “Dziecko z autyzmem. Dostęp do diagnozy, terapii i edukacji w Polsce” z 2016 stwierdza się, że w ostatnich latach liczba osób, u których diagnozuje się zaburzenia ze spektrum autyzmu rośnie w niezwykle szybkim tempie. Prognozuje się, że liczba nowo zdiagnozowanych osób będzie nadal rosła o ok. 15% w skali roku. Brak jest aktualnych danych pozwalających oszacować częstość występowania ASD dotyczących dzieci w Polsce, jednak na podstawie średniej wyciągniętej z poszczególnych krajów przyjmuje się, iż na sto dzieci, jedno z nich jest autystyczne [4]. Procentowy udział poszczególnych zaburzeń w ASD w USA prezentuje się następująco: 46% autyzm dziecięcy, 44% autyzm atypowy, 10% Zespół Aspergera [5].

4. Etiologia

Obecnie przyjmuje się, że ASD należą do zaburzeń neurorozwojowych, u podłoża których leżą czynniki biologiczne. Zaburzenia cechuje prawdopodobnie etiologia wieloczynnikowa, gdyż na ekspresję fenotypową przypuszczalnie wpływają uwarunkowania genetyczne, oraz czynniki środowiskowe [6]. Wyniki wykazały, że 1-3% dzieci chorych na autyzm cierpi na TS (stwardnienie guzowate) i podobny odsetek na zespół łamliwego chromosomu X [7, 8]. Kolejne publikacje zgodnie opisują rolę chromosomów 2, 7 i 16 oraz wskazują na udział anomalii cytogenetycznych dotyczących chromosomu 15 i 22 [9, 10]. Wiele badań przemawia za tym, że przyczyną autyzmu dziecięcego jest organiczne uszkodzenie OUN. Jak wykazują najnowsze badania, zmiany w obrębie OUN w autyzmie nie są umiejscowione w konkretnym rejonie mózgu, lecz obejmują różne jego struktury [11].

Niedobór glutationu, czego efektem są zaburzenia detoksykacyjne, skutkują kumulacją metali ciężkich w układzie nerwowym dziecka. Nadmiar szczawianów w organizmie, a także niedobór cholesterolu, witaminy D oraz wielu witamin i mikroelementów są również czynnikami predysponującymi do rozwoju autyzmu [1].

Wzmożone zażywanie przez matkę niektórych składników odżywczych i suplementów może zredukować ryzyko wystąpienia ASD, co zostało głównie udokumentowane na przykładzie suplementacji kwasu foliowego w okresie okołokoncepcyjnym. Ważne jest utrzymanie prawidłowego poziomu kwasu we krwi i nie przekraczanie normy. Istnieją badania sugerujące możliwy związek zbyt dużej suplementacji kwasu foliowego z autyzmem [12, 13].

Jednym z czynników sprzyjających występowaniu i/lub nasilaniu zaburzeń neurologicznych mogą być zmiany w obrębie układu pokarmowego. Część autorów wskazuje na upośledzone trawienie kazeiny i glutenu w świetle jelita i zwiększone wchłanianie do krwiobiegu niecałkowicie zhydrolizowanych peptydów, które mogą zaburzać rozwój centralnego układu nerwowego i/lub wpływać destrukcyjnie na jego funkcje u osób z objawami autyzmu. Aktywność biologiczna tych peptydów wynika ze strukturalnego podobieństwa do endogennych peptydów opioidowych [14, 15]. Stosunkowo niedawno przeprowadzono badania, które dowiodły posiadania mniej zróżnicowanej flory jelitowej przez dzieci autystyczne. Proponuje się, iż uszkodzenie mózgu może zachodzić poprzez oś jelitowo – wzgórzową [16]. U dzieci autystycznych obserwuje się także hipochlorhydrię soku żołądkowego, zaburzenia motoryki jelit oraz zmniejszenie aktywności disacharydaz, szczególnie laktazy, w soku jelitowym [17÷19]. Badanie przeprowadzone na ponad dwumilionowej populacji szwedzkich dzieci donosi o 50% odziedziczalności autyzmu (2014). Czynniki środowiskowe, mające największy udział w zwiększeniu prawdopodobieństwa rozwoju autyzmu, to czynniki środowiskowe niedzielone, takie jak: komplikacje okołoporodowe, infekcje matki w czasie ciąży, przyjmowanie leków przez matkę w czasie ciąży (czynniki paragenetyczne, czyli cechy matki wpływające pozagenowo na rozwój płodu). Rodzice dziecka autystycznego mogą spodziewać się 10,3-krotnego zwiększenia ryzyka urodzenia kolejnego dziecka u którego wystąpi autyzm, w porównaniu do ryzyka ogólnego [20].

5. Objawy

Jak już wspomniano – autyzm dziecięcy występuje pod dwoma postaciami: progresywną i regresywną. Niezależnie od nich, obraz kliniczny może objawiać się zaburzeniami polegającymi przykładowo na: jakościowych nieprawidłowościach w porozumiewaniu się, polegających na opóźnieniu lub braku mowy werbalnej z jednoczesnym brakiem kompensacji za pomocą gestów czy mimiki, stereotypowym

powtarzaniu słów lub całych zwrotów, jakościowych nieprawidłowościach w sferze interakcji społecznych (np. brak kontaktu wzrokowego), występowaniu nietypowych powtarzalnych zachowań, w tym manieryzmów ruchowych, wykonywaniu niefunkcjonalnych czynności i skupianiu się na niefunkcjonalnych cechach przedmiotów. Zmysły osób autystycznych mogą być zbyt wrażliwe bądź niedostatecznie uwrażliwione. Niedowrażliwość sensoryczna przejawia się stymulacjami: dźwiękowymi (pukanie, pokrzykiwanie), wzrokowymi (wpatrywanie się w migające światło), smakowymi (zjadanie rzeczy niejadalnych), węchowymi (obwąchiwanie ludzi i przedmiotów).

Nadwrażliwość sensoryczna będzie skutkować częstym unikaniem przez dziecko odbioru bodźców ze strefy nadwrażliwej. Często występują zaburzenia koordynacji ruchowej [1].

6. Jakość życia w rodzinie z dzieckiem autystycznym

Posiadanie niepełnosprawnego dziecka w rodzinie zawsze wiąże się z wieloma stresowymi sytuacjami. Jest to widoczne także w przypadku autyzmu, którego rozwój jest nieprzewidywalny i nietypowy [21]. Badania nad jakością życia dowodzą, że rodzice dzieci autystycznych doświadczają jeszcze większego napięcia i stresu, niż rodzice opiekujący się dziećmi urodzonymi np.: z zespołem Downa, czy mózgowym porażeniem dziecięcym [22, 23].

Wiąże się to z wieloma czynnikami obciążającymi rodzinę, w sytuacji gdy choroba dotykająca członka rodziny ma charakter przewlekły. Wymagana jest wówczas konieczność poświęcenia osobie chorej większej ilości czasu, siły i energii. Rodzice odczuwają osamotnienie, izolację społeczną oraz odrzucenie, a według badań połowa rodzin ma poważne trudności w kontaktach z przyjaciółmi i sąsiadami [24, 25]. Nie uczestniczą w spotkaniach towarzyskich, nie zapraszają do siebie gości. Sytuację tę powoduje stres, którego źródłem jest brak dobrego kontaktu i prawidłowych więzi z dzieckiem. Rodzice często nie wiedzą też gdzie i jakiej pomocy szukać oraz jak postępować z dzieckiem i jakich zaburzeń w jego rozwoju oczekiwać [24, 26-30]. Do prawidłowego rozwoju dziecka potrzeba wytworzenia więzi uczuciowej między matką a dzieckiem oraz najbliższymi [31]. Utrudniona lub całkowicie niewytworzona relacja sprawia, że dominującymi uczuciami wśród rodziców są: załamanie, smutek, lęk, poczucie winy [32].

Problemy sfery emocjonalnej i psychologicznej możemy dostrzegać w wielu relacjach zachodzących na płaszczyznach: rodzice-dziecko autystyczne, rodzice-zdrowe rodzeństwo-dziecko autystyczne, oraz w relacjach pomiędzy rodzicami [24]. To wszystko powoduje obniżenie jakości życia dziecka autystycznego i pozostałych członków [33].

Potwierdzenie powyższych stwierdzeń możemy znaleźć w przeprowadzonym badaniu E. Czenczek, E. Szeligi i Ł. Przygody, które dowodzi, że rodzice dzieci autystycznych posiadali niższe wskaźniki w sześciu zbadanych wymiarach jakości życia (zdrowie ogólne, zdrowie psychiczne, ograniczenia związane ze zdrowiem psychicznym, ograniczenia związane ze zdrowiem fizycznym, funkcjonowanie społeczne, energia i witalność) w porównaniu z rodzicami dzieci rozwijającymi się prawidłowo [34].

Integracja dziecka autystycznego z bliskimi, wymaga rozpoczęcia terapii w bardzo wczesnym okresie życia. Stanowi ona bazę dla późniejszych efektów. Im wcześniej dziecku uda się wiele osiągnąć, tym szybciej w przyszłości będzie mogło zacząć opanowywać złożone umiejętności. Bardzo ważnym elementem terapii, jest angażowanie rodziców do pracy z dzieckiem, przy równoczesnym wsparciu rodziców i dzieci [35, 36].

7. Metody rehabilitacyjne w terapii dziecka autystycznego

Dziecko z autyzmem lub innym pokrewnym całościowym zaburzeniem rozwoju, posiada swój indywidualny zakres problemów i dysfunkcji. Różny jest także ich stopień nasilenia, dlatego terapia musi być indywidualnie dobierana do pacjenta. Program powinien uwzględniać jego cechy osobowościowe oraz aktualne potrzeby i możliwości. Ważne jest, aby stosowane metody pracy nie wykluczały się, ale działały synergistycznie i uzupełniająco, co skutkować będzie skutecznym stymulowaniem rozwoju dziecka. Pozytywny efekt terapii możliwy jest do osiągnięcia także dzięki kompleksowości programu, który zawiera nie tylko metody usprawniania, ale zajęcia edukacyjne, zawodowe i opiekę socjalną. Obejmować powinien nie tylko dziecko, ale całą rodzinę. Oddziaływania medyczne likwidują bądź minimalizują przyczyny zaburzonego funkcjonowania OUN oraz poprawiają stan somatyczny pacjenta. Wsparcie psychologiczne pozwala na ocenę poziomu funkcjonowania dziecka w poszczególnych sferach, wytycza dalsze kierunki działań, oraz monitoruje postępy. Działania edukacyjne ukierunkowane są na modyfikację zachowań dziecka, która pozwoli na uzyskanie efektu współpracy z terapeutą, pozwoli doskonalić umiejętność wykonywania poleceń, oraz zminimalizuje próby agresji i autodestrukcji. Natomiast terapia wspomagana i rehabilitacja stymulują rozwój w poszczególnych sferach życia, obejmując wszystkie zmysły i ich integrację. Niezmiernie ważna jest integracja społeczna oraz kontakt z rówieśnikami i światem zewnętrznym [1]. Metody terapeutyczne reprezentują dwa kierunki. Pierwszym z nich są metody niedyrektywne, w których terapeuta powstrzymuje się od wpływania na poczynania pacjenta, od dawania mu rad i jakichkolwiek wskazówek. Drugim z kolei są metody dyrektywne, w których terapeuta kieruje pacjentem w celu wywołania w nim zgodnych z założeniami zmian [35].

7.1. Niedyrektywne formy terapii

Niedyrektywność definiujemy przede wszystkim jako powstrzymanie się od wydawania poleceń podczas prowadzonej terapii. Celem jaki chcemy osiągnąć u osoby autystycznej, jest przede wszystkim obniżanie lęku oraz uczenie zachowań adaptacyjnych niezbędnych do życia w środowisku. Nie jest to proste, cały proces jest długi, zawiera w sobie zarówno porażki jak i sukcesy, a nagrodą za poświęcenie w pracy z dzieckiem jest przełamanie jego izolacji oraz poprawa funkcjonowania w otoczeniu [35].

7.1.1. Terapia zabawowa

Do grupy terapii niedyrektywnych można zaliczyć Terapię Zabawową której twórcą jest Virginia Axline. Głównym zadaniem terapeuty jest stworzenie klimatu zajęć, który będzie wpływał optymalnie na rozwój dziecka. Virginia Axline uważała, że człowiek od urodzenia posiada indywidualne możliwości rozwoju i tendencję, która każe mu realizować te możliwości i zdolności. Jest to tzw. tendencja do samoaktualizacji. Jeżeli człowiek będzie działał zgodnie z nią, to jego rozwój społeczny przebiegać będzie w prawidłowym kierunku. Przy prowadzeniu terapii nie musimy używać odpowiednich pomieszczeń, a wszystkie zgromadzone w pomieszczeniu zabawki muszą być proste w konstrukcji i odpowiednio wytrzymałe. Jeśli mamy do dyspozycji lalki, to muszą one przedstawiać wszystkich członków rodziny: mamę, tatę, dziadków, oraz rodzeństwo. Terapia kieruje się ośmioma zasadami:

- należy ustanowić porozumienie między dzieckiem a terapeutą;
- zaakceptować dziecko ze wszystkim jego wadami i zaletami;
- atmosfera musi być swobodna;
- terapeuta w trakcie zajęć powinien starać się rozpoznawać uczucia dziecka i tak je odzwierciedlać, by dziecko je sobie uświadomiło;
- dziecku należy się szacunek;
- terapeuta nie kieruje czynnościami dziecka;
- terapia nie może być przyspieszana;
- warto zwracać uwagę na ograniczenia takie jak niszczenie zabawek czy atakowanie terapeuty i innych uczestników zabaw [35, 36].

7.1.2. Muzykoterapia

Kolejną metodę stanowi muzykoterapia. Jest dziedziną interdyscyplinarną, zawierającą w sobie elementy medycyny, pedagogiki i psychologii. Niesie ze sobą bogactwo estetyczne, znaczeniowe, dzięki czemu wykorzystuje się ją w neuropsychiatrii, w uzupełnieniu leczenia opóźnień rozwojowych, autyzmie wczesnodziecięcym, uszkodzeniach narządu zmysłu oraz mózgu, niepełnosprawności ruchowej, zaburzeń

zachowania, nerwicach. W przeciwieństwie do sztuk plastycznych nie jest statyczna. Dziecko odbiera ją receptorami słuchowymi, a także poprzez wyobraźnię, wzrok, węch, dotyk. Oddziałuje zarówno werbalne, jak i niewerbalne więc znalazła zastosowanie w pracy z dziećmi z trudnościami edukacyjnymi, słabo słyszającymi i widzącymi, z niepełnosprawnością ruchową, upośledzeniem umysłowym, a także z dziećmi ze spektrum autystycznym, ADHD i niedostosowanymi społecznie. Utwór muzyczny jest syntezą elementów, takich jak: rytm, metrum, melodia, harmonia, tempo, dynamika. Mają one znaczenie terapeutyczne w odniesieniu do motoryki, psychiki i zachowań społecznych odbiorców. Szybkie tempo pobudza dzieci apatyczne i bierne, zaś wolne utwory wykorzystywane są w celu uspokojenia dzieci aktywnych i agresywnych. Stosujemy zwykle muzykę klasyczną, relaksacyjną, rozrywkową oraz ruch przy muzyce [37]. W sposób szczególny muzykoterapia znalazła zastosowanie w terapii u dzieci z autyzmem [38]. Poprzez sesje muzykoterapeutyczne dziecko nabywa pryncypy i doskonali umiejętności w obszarze percepcji słuchowej i motorycznej, jak również komunikacji czy koncentracji. Sam rytm umożliwia wywołanie poczucia bezpieczeństwa, kontroli i opanowania. W terapii dziecka z autyzmem wykorzystuje się także grę na instrumentach. Pozwala ona uczyć naśladowania gry i sposobu wydobywania dźwięku oraz poprawia czynności motoryczne, powoduje wzrost kreatywności i aktywności [39]. Muzyka silnie oddziałuje na dzieci autystyczne. Dostrzec można to w ich pasji tworzenia, grania, w wyczulonym słyszeniu, dlatego wykorzystanie omówionych metod terapeutycznych prowadzi do poprawy i wzmocnienia u nich relacji interpersonalnych oraz umiejętności komunikacyjnych i językowych, a także koordynacji ruchowej i świadomości własnego ciała [37].



Rysunek 1. Muzykoterapia w autyzmie [47]

7.1.3. Metoda Dobrego Startu (MDS)

Inną formą terapii jest Metoda Dobrego Startu (MDS) opracowana we Francji przez Theę Bugnet, zaś polską modyfikacja zawdzięczamy Marcie Bogdanowicz. To metoda psychomotoryczna, która jednoczy w sobie działanie psychiki i motoryki. Służy usprawnianiu funkcji słuchowych, wzrokowych, ruchowych oraz powoduje zwiększenie ich integracji. Możliwy jest dzięki niej rozwój szybkości reakcji, kształcenie zdolności rozumienia i posługiwania się symbolami. Uczy również zaufania do siebie i innych [35, 40]. Metoda Dobrego Startu ma dwojaki zastosowanie: w rehabilitacji i profilaktyce. W profilaktyce skupia się na pracy z dziećmi o prawidłowym rozwoju psychomotorycznym i wspomaga go, zaś w rehabilitacji jej odbiorcami są dzieci, których rozwój jest zaburzony i tutaj pomaga usprawnić nieprawidłowo rozwijające się funkcje.

Program obejmuje:

- zajęcia wprowadzające – których celem jest przygotowanie dzieci do ćwiczeń właściwych, zdyscyplinowanie i skoncentrowanie;
- zajęcia właściwe – w skład których wchodzi: ćwiczenia ruchowe, usprawniające analizator kinestetyczno-ruchowy, ćwiczenia ruchowo-słuchowe kształcące analizator kinestetyczno-ruchowy i słuchowy oraz ćwiczenia – ruchowo-słuchowo-wzrokowe, kształcące analizator kinestetyczno-ruchowy, słuchowy i wzrokowy;
- zajęcia końcowe mają charakter ćwiczeń wokarno-rytmicznych, a zabawowa ich forma usprawnia jednocześnie motorykę i percepcję słuchową.

Podstawowym warunkiem podjęcia pracy tą metodą z dzieckiem autystycznym jest osiągnięcie przez nie takiego poziomu funkcjonowania emocjonalno-społecznego, który umożliwi mu nawiązanie kontaktu choćby z jedną osobą, dlatego grupa terapeutyczna musi być mała. Należy też zindywidualizować program ćwiczeń pod kątem potrzeb, możliwości i ograniczeń danego dziecka, kładąc nacisk na budowanie świadomości własnego ciała, poczucie tożsamości i kontaktów z jednym partnerem, a następnie z grupą [1, 35, 41].

7.1.4. Ruch rozwijający

W pracy z dzieckiem autystycznym wykorzystuje się również Developmental Movement (Ruch Rozwijający), który został opracowany przez Weronikę Sherborne. Głównym założeniem terapii jest posługiwanie się ruchem, definiowanym jako narzędzie wspomagające rozwój psychoruchowy dziecka. Do podstawowych zadań tej metody zaliczyć należy: kształtowanie poczucia tożsamości, rozwój umiejętności nawiązywania kontaktu, kształtowanie orientacji przestrzennej, usprawnianie ruchowe, kształtowanie koordynacji wzrokowo-ruchowej, rozwijanie pewności siebie i odwagi.

Autorka wyróżnia następujące grupy ćwiczeń, mające na celu wspomaganie rozwoju dziecka:

- ćwiczenia prowadzące do poznania własnego ciała (np. czołganie, wykonywanie różnorodnych ruchów podczas leżenia, siedzenia);
- ćwiczenia pomagające zdobyć pewność siebie i poczucie bezpieczeństwa w kontakcie (np. „tunel” – dziecko przechodzi pod tunelem, który tworzą inne osoby);
- ćwiczenia ułatwiające nawiązywanie kontaktu i współpracy z partnerem i grupą:
 - ćwiczenia „Z” w parach (przeciąganie, kołysanie się z partnerem w różnorodny sposób);
 - ćwiczenia „przeciwko” (np. „paczka” – dziecko zwija się w kłębek, a współćwiczący stara się rozwiązać paczkę);
 - ćwiczenia „razem” (obaj partnerzy są aktywni);
- ćwiczenia twórcze – rozwijanie aspektów ruchu proponowanych przez członków grupy.

Zajęcia powodują obniżenie lęku, stymulują rozwój społeczny, wywołują pozytywne reakcje na bliski kontakt z drugą osobą, wpływają na koncentrację i orientację własnego ciała, poprzez wzrost aktywności ruchowej dziecka [1, 35, 40].

Prowadząc terapię przy użyciu Metody Ruchu Rozwijającego, pamiętać należy o kilku ważnych czynnikach m.in.: wieku dziecka – należy zapoczątkować ją dość wcześnie pamiętając, by program został dostosowany indywidualnie do pacjenta, a w zajęcia zaangażować rodzinę z myślą o dalszym celu terapii dziecka autystycznego – umiejętności nawiązywania kontaktów społecznych. To idealna metoda stosowana jako fundament całego procesu rehabilitacyjno-terapeutycznego. Jest często rozpoczynana od terapii indywidualnej, umożliwia też poszerzenie pola aktywności społecznej do grupy. Stosowana wraz z innymi metodami wspiera je, szczególnie w wymiarze zajęć integracyjnych [42].



Rysunek 2. Terapia ruchem rozwijającym. [48]



Rysunek 3. Ruch rozwijający Weroniki Sherborne [49]

7.1.5. Program Aktywności Marianny i Christophera Knillów

Program Aktywności Marianny i Christophera Knillów jest również metodą stosowaną w terapii dziecka autystycznego. Bazuje na pracy z ciałem, przez tzw. pierwotny kanał komunikacyjny, dzięki któremu możliwe jest nawiązanie kontaktu interpersonalnego i stworzenie więzi emocjonalnych z drugą osobą. Opieramy się tutaj głównie na zmysle dotyku, który towarzyszy człowiekowi już w okresie prenatalnym. Podstawą wszelkich kontaktów i związków między ludźmi jest doświadczenie kontaktu fizycznego. Metoda powstała pierwotnie by pomóc pokonać trudności w komunikacji z osobami niepełnosprawnymi, a swoje zastosowanie znalazła też w pracy z dzieckiem autystycznym. Składa się z dwóch głównych części: „Dotyk i Komunikacja” oraz „Program Aktywności – Świadomość Ciała, Kontakt i Komunikacja”. Powyższe pogramy opierają się na wykonywaniu ściśle określonych ćwiczeń, przy jednoczesnym słuchaniu odpowiednio skomponowanej muzyki.

Pierwsza część – Dotyk i Komunikacja – bazuje na celach bliższych. Ma za zadanie wykształcić świadomość własnego ciała oraz nauczyć odbierania bodźców zmysłowych z otoczenia. Wskazane jest, aby wcześniej dowiedzieć się o preferencjach dotykowych dziecka autystycznego. Zamiast delikatnego dotyku, może lepiej tolerować mocny ucisk. Metoda powinna być stosowana w cyklu zajęć, systematycznie, 2-3 razy w tygodniu, aby dla dziecka nie stało się monotonne słuchanie tej samej muzyki. Etap powinien trwać do momentu, gdy dziecko zacznie nawiązywać kontakt z terapeutą oraz pojawią się pierwsze oznaki rozumienia przez nie własnego ciała.



Rysunek 4. Program Aktywności Marianny i Christophera Knillów [50]

„Program Aktywności” zaczyna być realizowany jako kontynuacja poznawania własnego ciała i komunikowania się z otoczeniem. Niezbędna staje się obecność tutaj co najmniej dwóch osób: matki, siedzącej za plecami dziecka i przytulającej je do siebie, oraz siedzącego naprzeciwko niej terapeuty, którego zadaniem jest określonych ćwiczeń w trakcie zajęć. Stosując Programy Aktywności, możliwe cele które chcemy osiągnąć u dziecka to przede wszystkim rozwój jego na kontakty społeczne i poznanie własnego ciała [1, 35].

7.1.6. Metoda Integracji Sensorycznej

Do innej interesującej metody usprawniania dziecka autystycznego należy Metoda Integracji Sensorycznej (SI), zaproponowana po raz pierwszy przez S. Jean Ayres. Integracja sensoryczna określa procesy odbioru wrażeń zmysłowych docierających do naszego ciała i integrowanych w układzie nerwowym. Według autorki integracja sensoryczna jest procesem, przy pomocy którego nasz mózg otrzymuje informacje ze wszystkich zmysłów, rozpoznaje je, segreguje, interpretuje oraz integruje ze sobą. Na tej podstawie tworzy odpowiednią do sytuacji reakcję tzw. reakcję adaptacyjną. Terapia wygląda jak zabawa, ale poprzez nią układ nerwowy i mózg uczą się oraz integrują wrażenia zmysłowe, nabywają doświadczenia w ich celowym wykorzystaniu. Używany tutaj sprzętu różnego rodzaju: huśtawek, hamaków, platform równoważnych, dużych piłek, wałków itp. W czasie terapii dziecko uczy się konkretnych umiejętności oraz usprawnia systemy sensoryczne [1, 35].



Rysunek 5. Elementy terapii w oparciu o integrację sensoryczną [51]

Celem jest przede wszystkim oddziaływanie na zaburzone sfery, a nie edukacja dziecka. Dziecko pozostaje "samo swoim terapeutą" i wybierające to, co mu sprawia przyjemność lub czego w danej chwili potrzebuje. W tej metodzie to terapeuta jest narzędziem w rękach dziecka, który wcześniej sam na sobie wszystkiego musi doświadczyć, by móc następnie siłę i rodzaj bodźca wykorzystać na dziecku, pamiętając o tym, że tylko przyjemne bodźce zostaną zintegrowane przez układ nerwowy. Techniki stosowane w tej terapii hamują lub pobudzają nadwrażliwość lub niedowrażliwość dziecka. Cecha wspólną tych technik jest wyrobienie tolerancji u dziecka na bodźce pochodzące z zewnątrz i kontrolowania ich przez terapeuta, a nie samo dziecko [43].



Rysunek 6. Integracja sensoryczna – przykład ćwiczeń [52]

7.1.7. Metoda Felice Affolter

Znaną formą w terapii autyzmu jest także Metoda Felice Affolter. Bazuje na zmysle dotyku. Skupia się na rozwiązywaniu problemów dnia codziennego, na wyzwaniu celowego i skutecznego działania dłoni oraz poznawania własnego ich działania. Instruktor kładzie swoje ręce na zewnątrz dłoni pacjenta i lekko ukierunkowuje ich działanie, wyczuwając, czy i kiedy pacjent jest gotowy do przyzwolenia, by poddać się kierowaniu. Nigdy nie wyręcza pacjenta, to on sam musi przeżywać wysiłek jako swój własny, poznając siebie jako jego sprawcę. Dzieci autystyczne cierpią na nadwrażliwość wielu receptorów – ich dłonie też są nadwrażliwe, co skutkuje częstą ucieczką od dotykania przedmiotów. Praca tą metodą stopniowo przewycięża lęk i hartuje wnętrza dłoni. Większą część zajęć obejmuje kontakt dłoni z różnego rodzaju materia, silnie oddziałującą na zmysły i emocje, budzącą skojarzenia, mającą swój własny kształt, kolor, ciężar, zapach, smak. Poprzez działanie dłoni umożliwia się pacjentowi myślenie o jego własnym działaniu, co w efekcie końcowym daje integrację działania z mową, koordynację wzroku i działania ręki, czyli integracja dotyku z doznaniem innego zmysłu [35]. Jest też jednym ze sposobów nawiązania z dzieckiem kontaktu, umożliwia odbiór informacji napływających do własnego ciała i przyswojenie zasad ruchu, a w przypadku dzieci autystycznych przynosi ogromne efekty [44].

7.2. Dyrektywne formy terapii

Dyrektywność, to kształtowanie zachowań adaptacyjnych lub redukcja zachowań niepożądanych poprzez odpowiednie manipulowanie pacjentem. Celem jest nauczenie dziecka zachowań adaptacyjnych, które potrzebne są do osiągnięcia przez dziecko jak najwyższej samodzielności [35].

7.2.1. Program TEACCH

Program TEACCH (*Treatment and Education of Autistic and Related Communication Handicapped Children*), czyli program Terapii i Edukacji Dzieci Autystycznych oraz Dzieci z Zaburzeniami w Komunikacji, należy do jednej z metod dyrektywnych pracy z dzieckiem autystycznym. Został opracowany przez E. Schoplera i współpracowników w Północnej Karolinie (USA). Obejmuje on większość aspektów pomocy rodzinom, w których żyje dziecko autystyczne. Skupia się przede wszystkim na osobie z autyzmem i opracowuje dla niej programy, który uwzględni jej umiejętności, zainteresowania i potrzeby. W pełni koncentruje się na danej osobie, bazuje na jej dotychczasowych umiejętnościach i zainteresowaniach, przyjmuje odpowiednie zmiany pojmując całą istotę autyzmu. Terapia obejmuje nie tylko dziecko ale i rodziców, opracowuje indywidualnie programy, prowadzi konsultacje, szkolenia, radzi i tworzy grupy wsparcia. Koncepcje TEACCH, to przede wszystkim: polepszenie możliwości adaptacyjnych, wdrożenie roli rodziców jako współterapeutów, indywidualizacja terapii, nauczanie i podnoszenie umiejętności, uniwersalny model szkolenia [35, 45].

7.2.2. Terapia wymuszonego kontaktu

Dość ciekawą i wartą zwrócenia uwagi formą pracy z dzieckiem autystycznym jest również metoda wymuszonego kontaktu. Terapia wymuszonego kontaktu, inaczej holding, opracowana została przez Martę Welch. Zakłada ona, że autyzm spowodowany jest przez lęk – efekt braku wytworzonej więzi między matką i niemowlęciem, która zaburza równowagę emocjonalną, czego skutkiem jest wycofanie się z kontaktów społecznych. Według autorki jedynym sposobem na jej odbudowanie jest kontakt fizyczny. Polega on na stałym kontakcie matki z dzieckiem w czasie sesji, przytulaniu, utrzymywania kontaktu wzrokowego. Nie jest to proste w przypadku dziecka autystycznego, dlatego zajęcia składają się z trzech etapów:

- konfrontacji, gdzie przedstawiamy dziecku chęć matki do kontaktu z nim;
- odrzucenia, w którym dziecko protestuje przeciwko kontaktowi, czasami z wybuchami agresji, krzykiem, płaczem;
- rozwiązania, gdzie dziecko ulega, osiąga rozluźnienie, relaksuje się, dzięki czemu możliwe jest pozytywne skojarzenie kontaktu z matką z uczuciem odprężenia, spokoju.

Metoda Holdingu budzi wiele kontrowersji. Wartość jej bywa kwestionowana, a krytycy zwracają uwagę na nieetyczne zmuszanie dzieci do kontaktu wbrew ich sprzeciwowi [35, 40, 46].

8. Wnioski

- autyzm jest nieuleczalnym zaburzeniem neurorozwojowym;
- etiologia autyzmu jest wieloczynnikowa. Wyniki najnowszych badań wskazują na konieczność dokładniejszego przyjrzenia się wpływom czynników środowiskowych;
- deficyty społeczno-komunikacyjne, uporczywe zainteresowania a także powtarzalne zachowania, to cechy charakterystyczne autyzmu;
- jakość życia w rodzinie z dzieckiem autystycznym jest ciężka, dotyczy to zarówno chorego jak i jego bliskich;
- osoba chora na autyzm napotyka wiele problemów w sferze społecznej oraz emocjonalnej, a jedynym warunkiem efektywnego życia jest podjęcie wczesnej terapii;
- istnieje wiele metod pracy z dzieckiem autystycznym, bazujących na integracji chorego ze swoim ciałem oraz otoczeniem, a dobór ich zależy od efektu, który chcemy osiągnąć w danym okresie leczenia;
- wyróżniamy metody dyrektywne i niedyrektywne, a ich dobór zależy od stanu pacjenta i tego co chcemy w danym etapie osiągnąć. Ważne jest dobieranie dla pacjenta nie wykluczających się wzajemnie indywidualnych programów, które działają kompleksowo.

Literatura

1. Rozetti-Szymańska A, *Autyzm*, [w:] *Fizjoterapia w pediatrii*, Kuliński W., Zeman K., Orlik T. (red.), Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2012 s. 165-173
2. *Klasyfikacja ICD – 10 wersja 2016*, dostępne on-line: <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2016/en#/F84.0> (10.12.2016r.)
3. Williams D. L., Goldstein G, Kojkowski N., Minshew N. J., *Do individuals with high functioning autism have the IQ profile associated with nonverbal learning disability?*, Res Autism Spectr Disord. 2(2) 2008, s. 353-361
4. Szymańska P., *Dziecko z autyzmem. Dostęp do diagnozy, terapii i edukacji w Polsce, Raport Fundacji JiM*, 2016
5. Christensen D. L., Baio J., Van Naarden Braun K., Bilder D., Charles J., Constantino J. N., Daniels J., Durkin M. S., Fitzgerald R. T., Kurzius-Spencer M., Lee L-C., Pettygrove S., Robinson C., Schulz E., Wells C., Wingate M. S., Zahorodny W., Yeargin-Allsopp M., *Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012*, Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2012 Surveillance Summaries., (65/3)2016 s. 1-23
6. K. Yates, A. Le Couteur, *Diagnosing autism*, Paediatrics and Child Health, (19) 2009, s. 55-59, Tłum. lek. Elżbiety Szczęsny *Diagnostyka autyzmu*, Medycyna Praktyczna – Pediatria (3) 2009
7. C. Plauche Johnson, S. M. Myers, *Council on Children with Disabilities: Identification and evaluation of children with autism spectrum disorders*, Pediatrics (120) 2007, s. 1183-1215
8. Rutter M., *Aetiology of autism: findings and questions*, J. Intellect Disabil. Res., (49) 2005, s. 231-238
9. Caronna E. B., Milunsky J. M., Tager Flusberg H. *Autism spectrum disorders: clinical and research frontiers*, Arch. Dis. Child., (93) 2008, s. 518-523
10. Cass H., Sekaran D., Baird G., *Medical investigation of children with autistic spectrum disorders*, Child. Care Health Dev., (32) 2006, s. 521-533
11. Paya Gonzalez B., Fuentes Menchaca N., *Neurobiology of autism: neuropathology and neuroimaging studies*, Actas Esp. Psiquiatr. (35) 2007, s. 271-276
12. Lyall K., Schmidt R. J, Hertz-Picciotto I., *Maternal lifestyle and environmental risk factors for autism spectrum disorders*, International Journal of Epidemiology (43/2) 2014, s. 443-464
13. Beard C. M, Panser L. A, Katusic S. K, *Is excess folic acid supplementation a risk factor for autism?*, Med Hypotheses. 77(1) 2011, s. 15-17
14. Sadowska J., Cierebiej M., *Ocena sposobu żywienia i stanu odżywienia dzieci z autyzmem. Badania wstępne*, Pediatria Współczesna. Gastroenterologia, Hepatologia i Żywnienie Dziecka (13/3) 2011, s. 155-160
15. Reichelt K. L., Knivsberg A. M., *The possibility and probability of a gut- -to -brain connection in autism*, Ann. Clin. Psychiatry, (21) 2009, s. 205-211
16. Kang D. W., Gyoon Park J., Esra Ilhan Z., Wallstrom G., LaBaer J., Adams J. B., Krajmalnik-Brown R., *Reduced Incidence of Prevotella and Other Fermenters in Intestinal*

- Microflora of Autistic Children*, Dostępne online:
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0068322> (10.12.2016r.)
17. Wasilewska J., Jarocka-Cyrta E., Kaczmarski M., *Patogeneza zaburzeń przewodu pokarmowego u dzieci z autyzmem*, Pol. Merk. Lek., (27) 2009, s. 40-43
 18. Hjiej H., Doyen C., Couprie C., *Substitutive and dietetic approaches in childhood autistic disorder: interests and limits*, Encephale, (34) 2008, s. 496 -503
 19. Korczowski B., *Problemy gastroenterologiczne u dzieci z zaburzeniami autystycznymi*, Pediatr. Pol. (4) 2002, s. 329 -332
 20. Sandin S., Lichtenstein P., Kuja-Halkola R., *The Familial Risk of Autism*, JAMA., 311(17) 2014 s.1770-1777
 21. Patyk K., *Rodzice dzieci autystycznych wobec sytuacji trudnych*, Problemy Opiekuńczo-Wychowawcze 2009, s. 34-42
 22. Pisula E., *Male dziecko z autyzmem*, Gdańskie Wyd. Psychologiczne 2005, s. 13-23
 23. Johnson N, Frenn M, Feetham S, Simpson P., *Autism spectrum disorder: parenting stress, family functioning and health- related quality of life*, Fam Syst Health, (29) 2011, s. 232-252
 24. Banasiak A., *Psychospołeczny wymiar jakości życia rodzin dzieci z autyzmem*, Prace naukowe Akademii im Jana Długosza w Częstochowie. Seria: Psychologia, (15) 2008, s. 5-12
 25. Peeters T., *Wpływ autyzmu na życie rodzinne*, Dziecko Autystyczne, (2) 1996, s. 35-36
 26. Dunn M. E., Burbine T., Bowers C. A. i Dunn S. T., *Moderators of stress in parents of children with autism*, Community Mental Health Journal, (37) 2001, s. 39-51
 27. Grodzka, M., *Wpływ interakcji rodzic – dziecko na efekty terapii dzieci autystycznych*, Nowiny Psychologiczne, (3) 1988, s. 73-77
 28. Marcysiak I., *Lęk i obciążenie stresem matek wychowujących dzieci niepełnosprawne*, Psychologia Wychowawcza, (3) 1999, s. 260-263
 29. Weiss, M. J., *Hardiness and social support as predictors of stress in mothers of typical children, children with autism, and children with mental retardation*, Autism (1)6 2002, s. 115-130
 30. Wroniszewski M., *Ocalić siebie. Światło i cień*, Pismo Chrześcijańskiego stowarzyszenia osób niepełnosprawnych, ich rodzin i przyjaciół, (1-2) 1993, s. 20-21
 31. Sadowska L, Szpich E, Wójtowicz D, Mazur A., *Odpowiedzialność rodzicielska w procesie rozwoju dziecka niepełnosprawnego*, Przegl. Med. Univ. Rzesz., (1) 2006, s. 11-21
 32. Ostrych J., *Przywiązanie i przekraczanie*, Uniwersytet Warmińsko- Mazurski w Olsztynie, 2006 s. 13-31
 33. Ghanizeadeh A., *Helping families for caring children with autism spectrum disorders*, Archives of Iranian Medicine, (5) 2009 s. 478-482
 34. Czenczek E., Szeliga E., Przygoda Ł., *Jakość życia rodziców dzieci autystycznych*, Przegląd Medyczny Uniwersytetu Rzeszowskiego i Narodowego Instytutu Leków w Warszawie Rzeszów (4) 2012, s. 446-454
 35. Szeler K, *Wybrane metody terapii osób dotkniętych autyzmem w świetle literatury*, Paedagogia Christiana 2 Włocławek (20) 2007, s. 113-127
 36. Borsuk B., *Niedyrektywna terapia zabawowa. Koncepcja V. M. Axline*, Psychologia Wychowawcza (5) 1979, s. 674-682

37. Majzner R., *Rola muzykoterapii w pracy z dzieckiem ze specjalnymi potrzebami edukacyjnymi*, Konteksty Pedagogiczne (1) 2013 s. 105-112
38. Maciarz A., Biadasiewicz M., *Dziecko autystyczne z zespołem Aspergera*, Kraków 2000, s. 9-11
39. Wheeler L. B., Shultis L. C., Polen W. D., *Clinical Training Guide for the Student Music Therapist*, Barcelona 2005, s. 81
40. Sochocka L., Lisek T., Zwierzyńska A., *Wybrane metody leczenia autyzmu*, Ośrodek terapii dziennej w Kup Piel. Zdr. Publ. (1, 2) 2011 s. 155-161
41. Bogdanowicz M., *Dostosowanie metody dobrego startu do potrzeb dzieci autystycznych – efektywność tej metody*, [w:] *Autyzm kontrowersje i wyzwania*, Dykcik W. (red), Poznań 1994, s. 155-156
42. Błeszyński J., *Wykorzystanie metody Ruchu Rozwijającego w terapii dziecka z głębokimi deficytami rozwojowymi- autystycznego*, [w:] Błeszyński J. (red), *Terapie wspomagające rozwój osób z autyzmem*, Kraków: Oficyna Wydawnicza „Impuls” s. 127- 150
43. Bobkowicz-Lewartowska L., *Autyzm dziecięcy, zagadnienia diagnozy i terapii*, Kraków 2005, s. 98-99
44. Wegnerowska E., *Metoda Felicie Affolter* [w:] Błeszyński J. (red.) *Terapie wspomagające rozwój osób z autyzmem*, Kraków 2005, s. 165 -169
45. Mesibov G. B., *Czym jest TEACCH?*, *Autyzm* (3) 2004, s. 12-15
46. Danielewicz D., Pisula E., *Terapia i edukacja osób z autyzmem*, [w:] Danielewicz D., Pisula E. (red.) *Terapia i edukacja osób z autyzmem. Wybrane zagadnienia*, Warszawa 2003, s. 16-17
47. Zdjęcie: Projekt badawczy z Uniwersytetem Śląskim. Dostępne online: <http://spectrumliberi.org/potrzebujesz-pomocy/news/> (10.12.2016r.)
48. Zdjęcie: Terapia Weroniki Sherborne. Dostępne online: <http://archiwalna.jim.org/fundacja/aktualnosci.php?akt=263> (10.12.2016r.)
49. Zdjęcie: Terapia Ruchem rozwijającym. Dostępne online: <http://archiwalna.jim.org/fundacja/aktualnosci.php?akt=263> (10.12.2016r.)
50. Zdjęcie: Metoda Knill. Dostępne online: <https://polskiautyzm.pl/metoda-knill/> (10.12.2016r.)
51. Zdjęcie; Michał Awin, fundacja Jaś i Małgosia, Dostępne online: <http://wiadomosci.gazeta.pl/wiadomosci/51,114873,8981797.html?i=2> (10.12.2016r.)
52. Zdjęcie; Michał Awin, fundacja Jaś i Małgosia, Dostępne online: <http://wiadomosci.gazeta.pl/wiadomosci/51,114873,8981797.html?i=0> (10.12.2016r.)

Wybrane metody terapii osób ze spektrum autyzmu

W dzisiejszym społeczeństwie dość często spotykamy się z problemem autyzmu u dzieci. Osoby te cechuje zaburzenie rozwoju, którego skutkiem są trudności z odnajdywaniem się wśród ludzi zdrowych. Istotną rolę odgrywa nauczenie społeczeństwa jak należy żyć z chorymi, oraz zapewnienie osobie chorej jak najlepszych warunków życia. Leczenie ma charakter kompleksowy – opiera się na wielu metodach terapii i łączy różne podejścia. Ważną rolę odgrywa terapia i współpraca z rodziną chorego dziecka. Nie leczymy przyczyny choroby, ale redukujemy jej objawy. Dobieramy i stale modyfikujemy techniki poszczególnych metod tak, by dostosowywać je indywidualnie do potrzeb dziecka. Wcześniej podjęta terapia pozwala choremu na lepszy start w przyszłość. Celem pracy jest przedstawienie jednostki chorobowej i ukazanie jakości życia w rodzinie z dzieckiem autystycznym. Zaprezentowane zostaną najważniejsze metody terapii takie jak: Terapia Zabawowa, Muzykoterapia, Metoda Dobrego Startu, Ruch Rozwijający – Metoda Weroniki Sherborne, Program Aktywności Marianny i Christophera Knillów, Metoda Integracji Sensorycznej, Metoda Felice Affolter, Program Terapii i Edukacji Dzieci Autystycznych oraz Dzieci z Zaburzeniami w Komunikacji – TEACCH czy Terapia wymuszonego kontaktu – holding stosowane bardzo często w procesie leczenia. Autorzy pracy wskazują główne cele i założenia wymienionych metod terapeutycznych oraz przedstawiają ich zastosowanie w pracy z dzieckiem autystycznym analizując dostępną literaturę naukową i wyniki przeprowadzonych badań naukowych.

Słowa kluczowe: autyzm, rehabilitacja, terapia

Selected methods for the treatment of people with autism spectrum disorders

In today's society we encounter the problem of autism in children quite often. These people are characterized by developmental disorder, which results in difficulty to live with healthy people. Important is to teach the public how to live with the autistic person, and to provide the best possible living conditions for them. Treatment is complex – it's based on a number of various therapies and combines different approaches. The important role is played by therapy and cooperation with the family of the autistic child. We do not treat the cause of the disease, but reduce the symptoms. We must select and constantly modify techniques of each methods so as to adapt them to the individual needs of the child. Early therapy enables the patient to a better start in the future. To present the disease entity and to show the quality of life in a family with an autistic child The main objective of this article is to present the disease entity and to show the quality of life in a family with an autistic child. It will present the most important methods of treatment such as The Playful Therapy, The Music Therapy, Method of Good Start, Developmental Movement – The Weronica's Sherborne Method, Marianne and Christopher Knill's Activity Program, Method of Sensory Integration, Felice's Affolter Method, Therapeutic Program and Education Autistic Children and Children with Disorders in Communications – TEACCH, Therapy or forced contact – "holding" which are very often used in the treatment process. The authors indicate the main goals and objectives of listed therapeutic methods and present their use in the working with an autistic child by analyzing the available scientific literature and the results of scientific research.

Keywords: autism, rehabilitation, therapy

Metody zooterapii stosowane w autyzmie

1. Wprowadzenie

W obecnych czasach coraz częściej słyszymy o problemie autyzmu wśród dzieci. Czym tak naprawdę jest? Jaka jest etiologia? Kto jest narażony na zachorowanie? Jakie są objawy charakterystyczne? Jak wygląda proces terapeutyczny? Jaki wpływ wywołują zwierzęta na organizm człowieka? – na te i inne pytania odpowie poniższa praca.

W pierwszej części autorzy przybliżą czytelnikowi jednostkę chorobową od strony lekarskiej, obejmując jej definicję. Przedstawią dane epidemiologiczne, etiologię oraz główne symptomy. W drugiej skupią się na opisie terapii ze szczególnym zwróceniem uwagi na zooterapię, czyli animaloterapię. Zostaną przedstawione jej zalety, wpływ na organizm, a także wskazania i przeciwwskazania do jej stosowania.

2. Definicja autyzmu

Autyzm dziecięcy jest zaburzeniem rozwoju układu nerwowego, z uwidacznianiem nieprawidłowości w różnych warunkach niezależnie od otoczenia (zaburzenie całościowe). Ujawnia się on przed 3. rokiem życia, jako nieprawidłowy lub upośledzony rozwój dziecka. Cechują go charakterystyczne dysfunkcje w obszarach psychopatologii. U osoby cierpiącej na autyzm obecne są: problemy w relacjach społecznych, dostrze-

¹ amandam1994@wp.pl, Studenckie Koło Naukowe przy Klinice Rehabilitacji Dziecięcej z Ośrodkiem Wczesnej Pomocy Dzieciom Upośledzonym „Dać Szansę”, Wydział Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

² e.rozenek@o2.pl, Studenckie Koło Naukowe przy Klinice Rehabilitacji Dziecięcej z Ośrodkiem Wczesnej Pomocy Dzieciom Upośledzonym „Dać Szansę”, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

³ olag1994@interia.pl, Studenckie Koło Naukowe przy Klinice Rehabilitacji Dziecięcej z Ośrodkiem Wczesnej Pomocy Dzieciom Upośledzonym „Dać Szansę”, Wydział Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

⁴ karolina.sochon2@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe przy Klinice Rehabilitacji Dziecięcej z Ośrodkiem Wczesnej Pomocy Dzieciom Upośledzonym „Dać Szansę”, Wydział Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

⁵ janusz.wojtkowski@op.pl, Studenckie Koło Naukowe przy Klinice Rehabilitacji Dziecięcej z Ośrodkiem Wczesnej Pomocy Dzieciom Upośledzonym „Dać Szansę”, Wydział Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

galne deficyty w komunikacji zarówno werbalnej jak i niewerbalnej, a także powtarzające się, stereotypowe wzorce zachowań.

Podgrupą całościowych zaburzenia rozwojowych (PDD) jest spektrum chorób autystycznych, (ASD) które obejmuje: autyzm, Zespół Aspergera, autyzm atypowy [1÷5].

3. Epidemiologia

Analiza danych statystycznych ukazuje tendencję wzrostową chorobowości w ubiegłych latach, odnoszącej się do różnych postaci autyzmu [6, 7, 9]. Istotne jest również to, że zaburzenia pojawiają się 3-4-krotnie częściej wśród chłopców, a także rośnie przewaga płci męskiej w grupie z autyzmem wysokofunkcjonującym (IQ>90) [3, 8, 10]. Szacuje się, że na autyzm w USA cierpi 1/68 dzieci [11]. Autyzm może pojawić się na wszystkich poziomach IQ, jednak zauważa się znaczne upośledzenie umysłowe u $\frac{3}{4}$ pacjentów [5, 12]. Co ciekawe, u co dziesiątej osoby z ASD pojawia się zespół Sawanta, a osoby autystyczne stanowią połowę populacji Sawantów [13].

4. Etiologia

Etiologia nieprawidłowości w funkcjonowaniu OUN, które dają obraz kliniczny autyzmu dziecięcego, nadal nie jest jednoznacznie zdefiniowana. Prawdopodobny wydaje się fakt, że u poszczególnych dzieci przyczyny wadliwego działania układu nerwowego mogą być różne. Wśród teorii etiologicznych dotyczących powstawania całościowych zaburzeń rozwoju wymienia się genetyczne uwarunkowane uszkodzenie organiczne tkanki mózgowej, wrodzone zaburzenia metaboliczne oraz czynniki środowiskowe [14, 15]. Biorąc pod uwagę badania obejmujące bliźnięta (1995 rok) oraz rozpowszechnienie autyzmu w populacji ogólnej stwierdzono, że odziedziczalność skłonności do autyzmu klasycznego wynosi około 90%, a ryzyko powtórzenia się zaburzenia u rodzeństwa – 6%. [16]. Najnowsze badania donoszą o odziedziczalności autyzmu na poziomie 50% [17]. Możliwy wydaje się wpływ genów poprzez mechanizm epigenetyczny – zostały zidentyfikowane liczne geny podatności [10]. W ostatnich latach pojawiły się również spekulacje na temat powiązania glifosatu (aktywny składnik nieselektywnych herbicydów) z autyzmem, jako że glifosat obecny w roślinach może wchłaniać się z przewodu pokarmowego i wykazuje zdolność do akumulacji w tkankach. Ekspozycja ssaków na glifosat może inicjować stres oksydacyjny w mózgu [18÷20]. Według pewnych teorii, przyczynami autyzmu u niektórych dzieci mogą być takie czynniki, jak właśnie zaburzenia równowagi oksydacyjno-redukcyjnej (stres oksydacyjny) prowadzącej do niszczenia komórek nerwowych [21, 22]. Stosowanie terapii antyoksydantami w leczeniu tego złożonego neurologicznego zaburzenia wydaje się być celowe. Podawanie środków przeciwutleniających, tj.: witamina C, cynk, olej rybny (bogaty w niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe), melatonina czy witamina

B6 w połączeniu z magnezem, przynosi poprawę behawioralną u części dzieci dotkniętych autyzmem [22, 23]. Jako przyczynę autyzmu wymienia się również wadliwe funkcjonowanie układu odpornościowego, które z jednej strony prowadzić może do nadwrażliwości na niektóre składniki pokarmowe, co z kolei powoduje uszkodzenie kosmków jelitowych i doprowadza do powstania zespołu złego wchłaniania, z drugiej strony zaś – do zjawiska autoimmunizacji w stosunku do białek mieliny, co może skutkować nieprawidłowościami w przekazywaniu sygnałów nerwowych [14].

5. Symptomy

O szczególnym charakterze autyzmu decyduje połączenie problemów w rozwoju społecznym, zdolności komunikowania się oraz pojawienie się charakterystycznych wzorców zachowań i zainteresowań. Żaden pojedynczy symptom nie wystarcza do sformułowania diagnozy. Obecnie, aby zdiagnozować autystyczne spektrum zaburzeń, lekarz opiera się na kryteriach diagnostycznych DSM-V, natomiast w celu diagnozy całościowego zaburzenia rozwoju, lekarz postępuje według wytycznych ICD-10. Do charakterystycznych objawów należą: redukcja dzielenia zainteresowań i emocji, trudności w nawiązywaniu kontaktów społecznych, deficyty w zakresie komunikacji werbalnej i niewerbalnej, powtarzalna mowa, gesty, rytuały ruchowe. Obecne są uporczywe przywiązania do różnych przedmiotów i silne zainteresowanie się ich niefunkcjonalnymi cechami. Może występować zaburzenie rozwoju mowy i upośledzenie intelektualne. Współchorobowość ASD obejmuje także ADHD, zaburzenia lękowe, epizody depresji, inne zaburzenia psychiczne [5, 24].

Symptomy, które często możemy zauważyć u dziecka z autyzmem to: problemy z koncentracją uwagi, nadpobudliwość psychoruchowa, nadwrażliwość lub niedowrażliwość sensoryczna. Charakterystyczne są również problemy koordynacji wzrokowo-ruchowej, zaburzenia w sferze identyfikacji schematu własnego ciała, zaburzeniami równowagi. Wszystko to sprawia, że ogólne funkcjonowanie autystycznego dziecka jest mocno zaburzone, wymaga intensywnej terapii i rehabilitacji we wszystkich wyżej wymienionych strefach [14].

6. Terapia dziecka z autyzmem

Najważniejszym celem procesu terapeutycznego – edukacyjnego dziecka z autyzmem jest kształtowanie u niego jak największej ilości zachowań adaptacyjnych. Pozwalają one na rozwinięcie niezależności, umożliwiającej efektywne funkcjonowanie w środowisku [25]. Im wcześniej zapadnie decyzja o terapii, tym szanse na szybsze osiągnięcie złożonych umiejętności w przyszłości rosną. We wczesnym okresie rozwoju człowieka jego układ nerwowy jest bardzo plastyczny, dzięki czemu możliwa jest skuteczna poprawa zaburzonych funkcji, a także skompensowanie deficytów

[26÷28]. Wybierając typ terapii, w przypadku autyzmu należy wziąć pod uwagę występowanie dodatkowych, szczegółowych zaburzeń w sferze zachowania oraz w funkcjach społecznych i komunikacyjnych [29]. Ważne jest również uwzględnienie preferencji dziecka, jego zainteresowań i ulubionych form aktywności. Terapeuta musi być otwarty – starać się podążać za pacjentem, okazując przy tym należyty mu szacunek i akceptując jego indywidualność. Każdy program musi posiadać wyraźną strukturę – powinien zawierać w sobie metody, które umożliwią wszechstronny rozwój dziecka. Prowadzenie terapii należy odbywać w naturalnym środowisku, z naciskiem na rozwijanie zdolności komunikowania – uzględniając werbalne jak również pozawerbalne formy porozumiewania się. Swoje zadanie spełniają też: aktywizacja społeczna członków rodziny oraz wdrożenie do integracji dziecka z rówieśnikami [26, 27].

Obecnie, wielostronne działanie niemożliwe do zastąpienia przez jakąkolwiek inną metodę rehabilitacji, wykazuje terapia z udziałem zwierząt – zooterapia (animaloterapia). Najczęściej stosowane w procesie rehabilitacji zwierzęta, to: konie (hipoterapia), psy (dogoterapia, kynoterapia), koty (felinoterapia) i delfiny (delfinoterapia) [30]. Historia zooterapii sięga roku 1964, kiedy to amerykański psychiatra dziecięcy Boris Levinson, pierwszy raz w procesie leczniczym posłużył się psem. Zooterapię określił zwrotem „terapia z udziałem zwierząt”, zaś psa „współterapeutą”. Prowadzone w latach 70. XX wieku w USA i Europie Zachodniej obserwacje kliniczne wykazały pozytywny wpływ psów i koni na organizm człowieka w sferze fizycznej i psychicznej. Znalazły one potwierdzenie w badaniach naukowych – np. w 1982 r. w USA prowadzono 75 programów wykorzystywania zwierząt w celach terapeutycznych, a na uczelniach aż 44 projekty badawcze [31]. W Polsce terapię z udziałem zwierząt zapoczątkowała hipoterapia, która oficjalnie została wprowadzona jako metoda rehabilitacji w roku 1988 r., natomiast dogoterapia funkcjonuje od 1996 r. [32, 33]. Felinoterapia, najmłodsza metoda w Polsce, stosowana jest od ok. 2004 r., zaś w USA już w latach 70. XX wieku miało miejsce terapeutyczne zastosowanie delfinów [34÷36].

Zooterapia jest rodzajem terapii kontaktowej, polegającej na interakcji pacjenta ze zwierzęciem. Wpływa na wszystkie sfery życia: od fizycznej, psychicznej, po motywacyjną i edukacyjną, dlatego odbiorcami takich sesji terapeutycznych mogą być osoby dotknięte autyzmem lub zespołem Aspergera [30, 37÷38].

Podczas zajęć wykorzystywane są różne formy pracy. Mają one na celu zachęcić dziecko do aktywnego udziału w terapii oraz do zdobywania doświadczeń wraz z innymi uczestnikami zajęć. Spośród metod, można wyróżnić takie jak: aktywizujące, kompensacyjne, usprawniające, korygujące, stymulujące bądź wspierające rozwój dziecka [39].

Badania dowodzą, że zajęcia ze zwierzętami odgrywają ważną rolę w terapii dzieci autystycznych. Kontakt z koniem, obejmujący nie tylko jazdę, ale czyszczenie, karmienie czy głaskanie oraz przytulanie się do dużych, puszystych i łagodnych psów

lub kotów znacząco poprawiają stan emocjonalny dzieci. Pod wpływem zajęć następuje przełamanie bariery pomiędzy zamkniętym światem dziecka autystycznego, a światem zewnętrznym. To właśnie zwierzęta pomagają pacjentom „otworzyć się”, dzięki czemu możliwa jest poprawa ich interakcji z terapeutami i rodziną. Dodatkowo dzieci uczą się wyrażać swoje uczucia, a pierwsze wypowiedziane pod wpływem terapii przez nich słowa lub zdania zawierają imię ukochanego zwierzęcia. Jak podaje Alia al Hussein, pierwsze, pełne zdanie które usłyszano z ust autystycznego chłopca poddawanego hipoterapii brzmiało: „Kocham konika!” [40]. Literatura podaje także przypadek, kiedy do wniknięcia w szczelnie zamknięty „wewnętrzny świat” dziecka z autyzmem dopomógł kot [34].

6.1. Dogoterapia

Dogoterapia to metoda terapii kontaktowej, bazująca na kontakcie człowieka z psem, którą stosuje się głównie w przypadku osób niepełnosprawnych fizycznie, intelektualnie, emocjonalnie i społecznie. W procesie usprawniania wykorzystywane są specjalnie wyselekcjonowane i wyszkolone psy, a nad jej przebiegiem czuwa zespół specjalistów, takich jak: psycholog, pedagog, fizjoterapeuta, przewodnik psa, dogoterapeuta. Rolą psa jest bycie „narzędziem” terapeutycznym oraz motywatorem, a nie terapeutą. Podział terapii kontaktowej z udziałem psów (dogoterapii) został zaproponowany przez amerykańskie towarzystwo Delta Society i przedstawia się on następująco:

- AAA (*Animal Assisted Activity*) – Zabawa z udziałem psów, którą cechuje duża spontaniczność i pozytywny ładunek emocjonalny – co warunkuje wysoką satysfakcję dzieci. Zajęcia odbywają się w grupie, a prowadzi je wykwalifikowana osoba – animator;
- AAT (*Animal Assisted Therapy*) – Terapia z udziałem psów, której częścią jest AAE (*Animal Assisted Education*) – Edukacja z udziałem psów;
 - AAT – Terapia prowadzona w formie rehabilitacji kontaktowej z udziałem psa, gdzie cel zajęć jest sprecyzowany konkretnie. Osoba prowadząca posiada wykształcenie kierunkowe, np. z zakresu fizjoterapii, psychologii czy pedagogiki, a zajęcia są dokumentowane i weryfikowane;
 - AAE – Forma wspomagająca edukację dzieci, które wykazują szczególne potrzeby w tym zakresie. Cel oraz plan są konkretne i pokrywają się z tym, który dziecko realizuje w szkole. Dobrym przykładem są psy, które wspomagające naukę czytania (*The Reading Education Assistance Dogs*) [41, 42].

Terapia prowadzona jest przede wszystkim po to, aby: wpłynąć na motorykę dziecka zarówno dużą, jak i małą, osiągnąć zadowalający poziom równowagi, zwiększyć percepcję ogólną, zredukować poziom lęku i wyobcowania, poprawić

interakcję pacjenta w grupie, w relacji z terapeutą oraz pozostałymi uczestnikami, a także usprawnić procesy myślenia i wzbogacić słownictwo [43].

Pies jest doskonałym motywatorem, który stymuluje pacjenta do ćwiczeń. Bazując na formie terapii AAT możliwe jest osiągnięcie czterech podstawowych celów: psychicznych, edukacyjnych, fizycznych i motywacyjnych, ściśle powiązanych z czterema sferami życia. Cele psychiczne w ramach terapii realizujemy poprzez m.in. doskonalenie komunikacji werbalnej, koncentracji uwagi, zdolności relaksacyjnych i ograniczenie poczucia osamotnienia. Z kolei cele edukacyjne wyrażane są przez zwiększenie słownictwa, poprawę pamięci, zaznajomienie się z pojęciami: kolor, kształt, wielkość. Pracując nad celami fizycznymi skupiamy się przede wszystkim na poprawie motoryki i koordynacji oraz równowagi, a cele motywacyjne osiągamy dzięki poprawie kontaktu z rówieśnikami, czy zwiększeniu ochoty do ćwiczeń.

Dogoterapia ma też swoje przeciwwskazania, takie jak: alergia na sierść, otwarta rana, podatność na infekcje, a także paniczny strach przed psem. Zajęcia obejmujące osoby z autyzmem powinny trwać około 45 min. z krótkimi przerwami dla pacjenta. Podczas zajęć terapeuta wspólnie z dzieckiem starają się osiągnąć wyznaczone wcześniej cele. Gdy pacjent ma problem z wykonaniem zadania powinien liczyć na pomoc prowadzącego zajęcia, jednakże terapeuta musi pamiętać, że czas reakcji dziecka autystycznego jest dłuższy niż u zdrowych osób, dlatego nim pośpieszy z pomocą powinien dać mu jeszcze odrobinę więcej czasu na wykonanie ćwiczenia. Zadania dobierane są tak, by osiągać wymienione wyżej cele, np. poprawa motoryki małej możliwa jest dzięki czynnościom takim jak: karmienie psa łyżką, zmiana smyczy, nalewanie wody z butelki. Poprawa sprawności ruchowej obejmuje ćwiczenia polegające na: przynoszeniu miski z wodą, rzucaniu smakołyków w kierunku psa, kopaniu gumowej piłki w kierunku zwierzaka, a także przechodzenie nad i pod psem, co dodatkowo wpływa na poprawę umiejętności pokonywania przeszkód. Zwiększenie zdolności koncentracji uwagi możliwe jest dzięki obserwacji zachowań psa, oglądaniu jego części ciała czy słuchaniu bicia serca, natomiast karmienie, czesanie zwierzaka, lub sprzątanie po zajęciach warunkują poprawę zdolności samoobsługi. Nazywanie części ciała psa, wydawanie mu komend, nazywanie przedmiotów, segregowanie ich i łączenie w pary korzystnie wpływa na rozwój mowy i pomaga kształtować zdolności do klasyfikowania przedmiotów [44].

Wyznaczając grupę do terapii bierzemy po uwagę psychiczną oraz fizyczną charakterystykę osób w niej uczestniczących. Nie bez znaczenia jest także odpowiednie przygotowanie prowadzącego terapię. Człowiek i pies powinni tworzyć zgrany zespół, zaś przewodnik psa musi być kompetentny. Powinien cechować się: aktywnością, entuzjazmem, odpornością psychiczną, empatią i obiektywizmem, oraz posiadać silną osobowość, a do tego być ciepłym i dobrym człowiekiem. Ważne są również jego umiejętności interpersonalne, które decydują o sposobie zachowania się wobec innych.

Otwartość, zaufanie, akceptacja i skuteczne komunikowanie się – to również cechy które powinna posiadać taka osoba. Dobry terapeuta każde zajęcia będzie prowadził tak, by zaciekawić dziecko zwierzęciem, a chęć wspólnej zabawy przełoży na rezultaty fizyczne, społeczne i psychologiczne [45].

Niezmiernie ważny jest dobór psa. Najlepiej by był brany z hodowli, rasowy, z metryką i rodowodem. Rasa pozwoli nam przewidzieć jego zachowania. Jeśli pies nie ma rodowodu, a posiada cechy i predyspozycje, które kwalifikują go do dogoterapii może zostać dopuszczony do niej po półrocznym szkoleniu i zdaniu egzaminu na Psa Terapeutycznego. Najczęściej wykorzystywane są psy ras takich jak: golden retriever, labrador retriever, nowofundland, alaskan malamute, siberian husky, berneński pies pasterski, owczarek szkocki, border colli i bokser [46]. Przy doborze zwracamy także szczególną uwagę na cechy charakteru. Najważniejsze z nich to: spokój i posłuszeństwo, względnie ogromna inteligencja i łatwość uczenia się, a także uległość, odporność na stres, cierpliwość i tolerancja. Pies nie powinien przejawiać agresji, dominacji, symptomów lęku i nadpobudliwości. Równie ważny jest jego wygląd, szczególnie wielkość, a nawet umaszczenie. Musi być zdrowy, z zaświadczeniem weterynaryjnym, systematycznie odrobaczany i szczepiony, sierść powinna być czysta i wyczesana, a paznokcie przycinane. Zapewni to bezpieczeństwo oraz poprawi komfort psychiczny pacjenta [45].



Rysunek 1. Pies rasy labrador retriever [opracowanie własne]

6.2. Felinoterapia

Tak jak każda forma zooterapii – felinoterapia, polega na kontakcie fizycznym i psychicznym człowieka ze zwierzęciem, który w tym przypadku jest kotem. Jej cele to przede wszystkim: zniesienie zahamowań, ułatwienie komunikacji oraz poprawa zdolności wyrażania uczuć i emocji. Znajduje zastosowanie m.in. w terapii dzieci niepełnosprawnych umysłowo i ruchowo oraz osób starszych. Sprawdza się w przypadku takich chorób jak: autyzm, zespół Aspergera, nadpobudliwość, ADHD,

zespół Downa, zaburzenia zachowania i emocji, zaburzenia lękowe, nieśmiałość i zahamowania społecznie, depresja, choroba Alzheimera oraz wiele innych chorób psychicznych, a także w uszkodzeniach słuchu, wzroku, dystrofiach mięśniowych, artretyzmie itp. Badania potwierdzają korzystny wpływ kontaktu z kotem na dzieci autystyczne. Kot pozwala choremu na otwarcie się ze swojego „izolowanego świata” na innych ludzi i otoczenie. Dziecko uspokaja się, rozluźnia i otwiera. Na dodatek uczy radzić sobie z lękiem i stresem, zdobywając przy tym ufność do świata. Kot jest pewnego rodzaju łącznikiem, stwarzając nić kontaktu pomiędzy chorym, a drugą osobą, w tym przypadku między dzieckiem, a terapeutą. Od tej pory możliwe jest zbudowanie mostu między zamkniętym i niedostępnym światem dziecka, a otwartym i dostępnym światem rodzica. Zwierzak pomaga też okazywać uczucia. Fizyczny kontakt z nim poprzez głaskanie, drapanie lub przytulanie stymuluje nasz organizm do wytwarzania endorfin tzw. hormonów szczęścia. Dodatkowo pozytywny wpływ na stan psychiczny i fizyczny ma tzw. jonizacja. Dodatni – kot „zdejmuje” z pacjenta ładunki ujemne. Mruczenie w postaci emisji infradźwięków w częstotliwościach 25-125 Hz wspomaga regenerację kości, ścięgien, więzadeł i mięśni oraz przynosi ulgę w bólu, łagodzi stres i stymuluje zmysły w przypadku zaburzeń psychicznych lub nerwowych. Felinoterapia przynosi wiele korzyści: od odprężenia, przez pobudzenie układu odpornościowego, po wsparcie w walce z wieloma zaburzeniami psychicznymi i fizycznymi [34].

Terapia ta znajduje zastosowanie u osób, które odczuwają lęk przed psami lub są uczulone na ich sierść. Tak samo, jak w przypadku dogoterapii – kot „terapeuta” powinien posiadać pewne cechy. Przede wszystkim nie może się bać nowych miejsc, ani obcych osób. Powinien być spokojny, ufny i cierpliwy. Jego głównym zadaniem jest odwracanie uwagi ludzi od trudów choroby [39]. Musi zdrowy, zaszczepiony, wolny od wszelakich pasożytów, a także być czysty i mieć obcięte pazurki. Przygotowanie kociaka składa się z kilku etapów. W pierwszym dokonujemy selekcji – wybieramy zwierzęta o łagodnym, zrównoważonym usposobieniu, towarzyskim i chętnym do zabawy. Jest to możliwe poprzez obserwację rodziców, ponieważ agresja jest tutaj cechą dziedzicznie uwarunkowaną, dlatego niezmiernie ważne jest właściwe kojarzenie kota i kotki. Drugi etap przygotowuje kota pod względem psychicznym – ten proces nazywamy socjalizacją zwierzaka. Trwa on od 1. do 9. tygodnia życia i jest bardzo ważny, bo wykształcone i wypracowane w nim odruchy oraz nawyki pozostają na całe życie. Wymaga to wiele pracy i poświęcenia. Wychowanie kociąt jest trudne i pracochonne, bo oprócz doglądania ich codziennych potrzeb, należy przyzwyczaić je do kontaktu fizycznego z człowiekiem. Dlatego też maluchy są noszone, przytulane, głaskane i masowane przez większą część dnia. Trzecim etapem jest zabawa z kotami i oswojanie ich z dźwiękami i innymi elementami życia. I tutaj ważną rolę odgrywa kontakt zwierzaka z dziećmi. Pozwala to kociakom od małego przyzwyczajać się do

dziecięcego krzyku, płaczu, śmiechu czy dźwięku zabawek. Nad wszystkim kontrolę sprawują opiekunowie, którzy pilnują, aby dzieci nie krzywdziły maluchów i do niczego ich nie zmuszały. Do prawidłowego rozwoju kociaki muszą mieć także zapewniony spokój i czas na kontakt z matką. Dodatkowo uczy się je zachowania czystości, korzystania z kuwety, drapak, jedzenia suchego i mokrego pokarmu, a także otrzymują pierwsze szczepienia i są odrobaczane [34]. W terapii używa się przede wszystkim kotów z miękkim, puszystym futrem. Najczęściej spotykaną rasą w terapii dzieci jest Ragdoll – skrzyżowanie kota burmskiego z kotem perskim. Jego natura jest specyficzna, pod wpływem dotyku rozluźnia on swoje mięśnie, wiotczeje i zamienia się w pluszową zabawkę [47].



Rysunek 2. Kot o długiej sierści wykorzystywany do terapii, krzyżówka Ragdolla z pospolitym dachowcem
[opracowanie własne]

6.3. Delfinoterapia

Delfinoterapia (*Dolphin Assisted Therapy* – DAT) jest połączeniem dwóch form terapii – aquaterapii i animaloterapii, podczas której pacjent znajduje się w bliskim kontakcie z delfinem. Badania nad tą metodą z udziałem dzieci cierpiących na choroby psychiczne i fizyczne rozpoczęły się w latach 70. dzięki amerykańskim naukowcom i neuropsychiatrom z Uniwersytetu w Miami. Za twórcę delfinoterapii uznano psychologa Dawida Nathansona. Niestety, obecnie nie jest ona dostępną w Polsce formą leczenia, a chorzy muszą udawać się do i tak nielicznych ośrodków zagranicznych [48÷49].

Zajęcia wyglądają specyficznie. Pacjenci znajdują się w zbiorniku wodnym razem z delfinem – pływają i bawią się z nim wykonując przy tym dostosowane do indywidualnych potrzeb i możliwości ćwiczenia. Przyjmują one charakter zabawy, a nie przymusu, dzięki czemu dziecko nieświadomie uprawia efektywną gimnastykę ruchową, dającą najlepsze efekty. Ponad to zamienia ono salę do ćwiczeń, kojarzoną

z ciężkimi, często nudnymi ćwiczeniami, na basen, a zamiast fizjoterapeuty pojawia się delfin, który jest zawsze chętny do zabawy. Dodatkowo, co potwierdzają badania pacjent wystawiony jest na działanie emitowanych przez delfiny sygnałów echolokacji i wiązek ultradźwięków, które przenikając ludzkie tkanki, oddziałują na układ neurobiologiczny, hormonalny i pobudzają funkcje intelektualne. Dowiedziono, że fale ultradźwiękowe stymulują mózgi pacjentów, wpływając na rozwój mowy [30, 36, 49, 51]. Kontakt z delfinami zwiększa także u człowieka wydzielanie endorfin, które zmniejszają odczucie bólu, głodu, ułatwiają oddychanie, wpływają na termoregulację oraz wydzielanie hormonów. Dzięki temu możliwy jest wpływ na funkcjonowanie i aktywizację osób z zaburzeniami rozwoju. Środowisko w którym odbywana jest terapia pozwala na połączenie ze sobą różnych elementów innych form wsparcia, np. hydroterapii. Zajęcia w środowisku wodnym sprzyjają odprężaniu, relaksują i ułatwiają rehabilitację ruchową – kinezyterapię. Twórca metody potwierdza, że wywiera ona znaczący wpływ w terapii dzieci z autyzmem, mózgowym porażeniem dziecięcym lub zespołem Downa [39, 49].

6.4. Hipoterapia

Hipoterapia to najbardziej znana forma terapii, która wykorzystuje dobroczynne, lecznicze działanie koni. Wpływa pozytywnie na sferę ruchową, emocjonalną, psychiczną i społeczną. Sukces gwarantuje przede wszystkim: odpowiednio przygotowany koń, wykwalifikowany terapeuta i jego współpraca z różnymi specjalistami. Dodatkowo, oprócz działania leczniczego hipoterapia jest formą rekreacji, umożliwiającą kontakt z przyrodą [51].

Sekretem tej metody jest wspomniane wyżej działanie wielopłaszczyznowe, tj. wpływ na sferę: ruchową sensoryczną, psychiczną i społeczną. Głównymi celami, które chcemy osiągnąć podczas ćwiczeń to: kodowanie w mózgu prawidłowego wzorca ruchu miednicy podczas chodu, normalizacja napięcia mięśniowego, doskonalenie równowagi, koordynacji i orientacji w przestrzeni, stymulacja i normalizacja czucia powierzchniowego. Dodatkowo, w przypadku hipoterapii zauważamy wydzielanie u chorych adrenaliny, stymulującej układ wegetatywny, co warunkuje wzrost aktywności ruchowej, koncentracji i poprawia samopoczucie [51÷54].

Hipoterapia jest formą gimnastyki leczniczej bazującej na mechanizmach neurofizjologicznych, tzn. obejmuje psychosomatycznie leczoną jednostkę chorobową. Znalazła zastosowanie w rehabilitacji dzieci z: mózgowym porażeniem dziecięcym (MPD), autyzmem, chorobą Perthesa, amputacją kończyn dolnych, stwardnieniem rozsianym (SM), niedowładem połowicznym, bólami odkręgosłupowymi i wszelkimi innymi wadami postawy.

Terapia przybiera 4 podstawowe formy:

- terapia ruchem konia – w której pacjent nie wykonuje żadnych ćwiczeń, a siedząc na grzbiecie poddawany jest jedynie rytmicznemu ruchowi konia;
- fizjoterapia na koniu – gdzie dodatkowo oprócz terapii ruchem konia pacjent wykonuje ćwiczenia pod nadzorem fizjoterapeuty;
- terapia kontaktem z koniem – polega na kontakcie emocjonalnym ze zwierzęciem polegającym na opiece nad nim;
- forma psychopedagogicznej jazdy konnej i woltyżerki – odbywa się na koniu lub przy koniu i są to działania podejmowane po to, by usprawnić pacjenta intelektualnie, poznawczo, emocjonalnie i fizycznie.



Rysunek 3. Terapia kontaktem z koniem [opracowanie własne]

W przypadku rehabilitacji dzieci z autyzmem najczęściej stosujemy psychopedagogiczną jazdę konną. Drugą formą jest terapia kontaktem z koniem, co wpływa na poprawę komunikacji osoby chorej ze światem zewnętrznym. U dzieci z zaburzeniami motorycznymi zastosowanie znajduje też fizjoterapia na koniu [38, 52]. Podczas zajęć wykorzystuje się dwa modele: funkcjonalny i neurofizjologiczny.

- Model funkcjonalny – którego głównym celem jest wykonywanie ćwiczeń, na drugim planie zachowanie prawidłowej postawy jeźdźcy, wykorzystywany jest on u dzieci starszych, powyżej 5 roku życia;
- Model neurofizjologiczny – w którym ważniejszą rolę spełnia prawidłowa pozycja pacjenta, czyli wykonywanie swobodnych ruchów barków i miednicy, które naśladują chód fizjologiczny. Znajduje ona zastosowanie u dzieci w wieku przedszkolnym [51].



Rysunek 4. Elementy ćwiczeń na koniu – fizjoterapia na koniu [opracowanie własne]

Jak dobrać konia do terapii? Musi on spełniać odpowiednie kryteria, zawierające zarówno jego budowę fizyczną jak i sferę psychiczną. Koń to zwierzę stadne, a jego podstawowym, fizjologicznym krokiem jest stęp, co różni go od galopu, który jest zachowaniem obronnym. Jedyną bronią koni to ucieczka, dlatego na co dzień posługują się one trzema chodami: stępem, kłusem (chodem pośrednim) i galopem. Za pomocą nich potrafią też przekazać swoje emocje, dlatego przy doborze konia do zajęć ważny jest jego charakter. Pozwoli to zminimalizować prawdopodobieństwo niechcianych sytuacji np. wspomnianej wyżej ucieczki. Pożądane są cechy takie jak: spokojny, łagodny temperament, przyjacielskie, ufne podejście do ludzi oraz cierpliwość i tolerancja na nagłe, niespodziewane bodźce wzrokowe, słuchowe czy dotykowe. Koń musi być pozbawiony nałogów i narowów, a jego temperament nie powinien być gwałtowny, ani otepiały [51, 55]. Koń musi mieć odpowiednią energię i być chętnym do wykonywania ciągłych ćwiczeń z pacjentem polegających na częstych zmianach pozycji, punktów obciążenia czy długości i szybkości kroku. Większość koni hipoterapeutycznych używanych jest prawie zawsze w stępie, dlatego krok konia musi być regularny, elastyczny, a najlepiej by jego częstotliwość i długość odpowiadała przeciętnym parametrom kroku osoby dorosłej [52, 56]. Badania wykazują, że w zakresie poprawy funkcji fizycznych duże znaczenie ma koń o wroście 130-140 cm w kłębie, wykonujący w stępie ok. 110 kroków na minutę. Wymogi te spełniają następujące rasy hodowane w Polsce: koniki polskie, hucuły i fiordy [30, 57]. Jak już wspomniano powyżej, koń przeznaczony do hipoterapii powinien posiadać również odpowiednią budowę ciała. Pożądane jest przede wszystkim to, aby: oczy konia wzbudzały zaufanie, kłęb był optymalnie szeroki i niewysoki co zapewni skuteczną asekurację, tułów przystosowany do warunków anatomicznych jeźdźca, zad na tyle ruchomy, by wykonywał ruchy balansowania ciężaru, a kroki miękkie i sprężyste. Ważną kwestię spełnia także wiek konia – powinien być dojrzały, zarówno fizycznie, jak i psychicznie. W Polsce stosuje się głównie konie rasy huculskiej, a także koniki polskie, śląskie, fiordzkie, haflingery, oraz potomstwa różnych krzyżówek kucy lub koni małych [51, 58÷60].



Rysunek 5. Koń rasy konik polski – jedna z ras koni wykorzystywanych do hipoterapii [opracowanie własne]

Aby zakwalifikować pacjenta do terapii należy sprawdzić uprzednio jego stan zdrowia, czego dokonuje lekarz. Istnieje wiele przeciwwskazań, które podzielić można na bezwzględne i względne:

- bezwzględnymi będą przede wszystkim: uczulenie na sierść, pot lub zapach konia, niewygojone rany, lęk przed koniem, odklejenie siatkówki oka, wzmożone ciśnienie śródgałkowe, pogorszenie stanu zdrowia, zwichnięcie stawów biodrowych, okres zaostrzeń chorób, podwyższona temperatura, ostre choroby infekcyjne;
- względne przeciwwskazania obejmują: padaczkę, upośledzenie umysłowe w stopniu głębokim, zaburzenia mineralizacji kości, utrwalone deformacje i zniekształcenia, przykurcze, ograniczenia zakresu ruchu układu kostnow stawowego, schorzenia okulistyczne [38, 51, 54, 58, 61].

Hipoterapia ma wiele zalet. Pobudza u pacjentów wszystkie zmysły, oddziałuje pozytywnie zarówno na sferę cielesną, jak i emocjonalną. To doskonały przykład terapii naturalnej i współpracy człowieka ze zwierzęciem. Opieka nad koniem, dotykanie go i obserwacja sprawia wiele radości. Dzięki temu możliwa jest nauka odpowiedzialności za innych, podniesienie poczucie własnej wartości, zniesienie poczucia lęku [52].

6.5. Onoterapia

Onoterapia, jest formą terapii kontaktowej przy pomocy osła. Zwierzę, tak jak w każdej metodzie zooterapii nie jest samo w sobie terapeutą, lecz współpracując z człowiekiem stanowi ważny element procesu terapeutycznego pozwalający nawiązać relację między pacjentem, a światem zewnętrznym. Onoterapia nie zastąpi terapii właściwej, lecz jest uzupełnieniem innych metod rehabilitacji [62]. Jest idealna dla dzieci niepełnosprawnych fizycznie i intelektualnie. Kontakt z osłem wpływa pozytywnie na osoby z zaburzeniami psychicznymi, mającymi problem z socjalizacją

czy zaburzeniami osobowości [63]. Wzrost i wygląd to cechy, które sprawiają, że osioł znalazł zastosowanie jako zwierzę terapeutyczne. Znacznie niższy w porównaniu do konia nie budzi lęku, dlatego jest najlepszym towarzyszem terapii u osób, które nigdy nie miały kontaktu z dużymi zwierzętami. Badania wykazały, że dzieci, osoby starsze, ludzie z trudnościami w poruszaniu się, zazwyczaj wolą kontakt z osłami, niż z końmi czy psami, ponieważ czują się przy nich bezpieczniej [62]. Dzięki rozbudowanym gabarytom zwierzę to doskonale nadaje się do pracy z dziećmi – może wozić osoby do 50 kg. Charakter osłów jest lepszy niż koni – są stateczniejsze i mniej płochliwe. Słabiej i bardzo niechętnie przechodzą do klusa, oraz bez obciążenia do galopu. Stęp osłów ma dłuższy krok w porównaniu do koni, a równocześnie ich grzbiet jest węższy, co znacznie ułatwia jazdę na nich małym dzieciom. Osioł to zwierzę z natury ciekawskie, dlatego podczas terapii jest aktywny. Dodatkową cechą charakteru jest cierpliwość, spokojne i opanowane ruchy, co wzbudza dodatkowo zaufanie pacjenta [62]. Podobnie jak hipoterapia same przejażdżki na osłim grzbiecie nie stanowią jedynej formy onoterapii. Równie ważny jest kontakt ze zwierzęciem poprzez czyszczenie i głaskanie, a w zależności od przypadku może stanowić jej główną formę [62]. Oczekujemy efektów takich jak: poprawa sprawności fizycznej, umiejętności komunikacyjnych i zdolności poznawczych, oraz spodziewamy się pozytywnego wpływu na relacje dziecka z rówieśnikami i osobami dorosłymi. Regularne obcowanie przy boku osła sprzyja wyciszeniu i poprawie koncentracji uwagi [65, 66].

6.6. Rybki akwariowe

Najnowsze doniesienia przedstawiają zastosowanie w terapii autyzmu rybek akwariowych. Oglądanie czy dotykanie ich wpływa uspokajająco, przez co obniża się ciśnienie i zwalnia tętno. Dowody prezentują amerykańskie badania prowadzone na Uniwersytecie Pensylwańskim. Działanie antystresowe wywierają czerwone rybki. Według prof. Couly, ordynatora oddziału stomatologicznego szpitala dziecięcego Necker w Paryżu, zainstalowanie na oddziale ekranów video ukazujący czerwone rybki, zmniejszyło strach i obawy małych pacjentów [39].

6.7. Alpakoterpia

Nowoczesną metodą terapii dzieci autystycznych z porażeniem mózgowym i z problemami emocjonalnymi oraz ruchowymi, jest alpakoterapia. Zwierzęta te przypominają żywe, pluszowe maskotki, dlatego kontakt z nimi jest przyjemnością dla dzieci. Nim zwierzęta zostaną dopuszczone do terapii, trzeba je odpowiednio przygotować. Z racji tego, że alpaki nie lubią być dotykane, szkolenie wymaga długiego i odpowiedniego treningu oraz dobrej znajomości zachowania zwierząt i cierpliwości wobec nich. Ich pełne empatii spojrzenie działa uspokajająco, a także odstresowująco [39, 67].

7. Wnioski

1. Autyzm dotyka coraz większej liczby osób, przy czym kilkakrotnie częściej chłopców niż dziewczęta.
2. Na występowanie autyzmu mają wpływ czynniki genetyczne i środowiskowe;
3. Dziecko autystyczne posiada wielorakie deficyty w sferze psychicznej, a także zaburzenia w płaszczyźnie fizycznej.
4. Ważna jest wczesna terapia, która daje szansę na lepsze dostosowanie chorego do życia w społeczeństwie.
5. Jedną z form terapii jest zooterapia. Wyróżniamy kilka jej rodzajów: z użyciem psów, kotów, delfinów i koni. Istnieją również doniesienia o użyciu w terapii osłów, alpak czy rybek akwariowych.
6. Terapie kontaktowe ze zwierzęciem przynoszą oczekiwane efekty w sferze psychicznej dziecka, jak również w sferze fizycznej.

Literatura

1. Yates K., Le Couteur A., *Diagnosing autism*, Paediatrics and Child Health., (19) 2009, s. 55-59. tłumaczenie Szczesny E. *Diagnostyka autyzmu*, Medycyna Praktyczna – Pediatría., (3) 2009, dostępne on-line: www.mp.pl (10.12.2016 r.)
2. Waś A., Sobaniec P., Kiryluk B., Sendrowski K., Otapowicz D., *Czy to autyzm? Trudności w diagnozie*, Neurologia dziecięca., (20/41) 2011, s. 105-110
3. Pisula E., *Kliniczna charakterystyka autyzmu*. [w:] *Autyzm. Od badań mózgu do praktyki psychologicznej*, Gdańskie Wydawnictwo Psychologiczne., Sopot 2012, s. 27-55
4. Chrościńska-Krawczyk M., Jasiński M., *Autyzm dziecięcy – współczesne spojrzenie*, Neurologia dziecięca., (38/19) 2010, s. 75-78
5. American Psychiatric Association, *Diagnostic and statistical manual of mental disorders, DSM-5*, Edition 5, 2013
6. Pisula E., *Male dziecko z autyzmem*, Gdańskie Wydawnictwo Psychologiczne., Gdańsk 2005
7. Bryson S. E., *Brief report: Epidemiology of autism*, Journal of autism and Developmental Disorders., (26) 1996, s. 65-167
8. Baird G., Simonoff E., Pickles A., *Prevalence of disorders of the autism spectrum in the population cohort of children in South Thames*, The Special Needs and Autism Project (SNAP). Lancet, (368) 2006, s. 210-215
9. Pietras T., Witusik A., Gałęcki P., *Autyzm – epidemiologia, diagnoza i terapia*, Continuo, Wrocław, 2010
10. Plauche Johnson C., Myers S.,M., *Council on Children with Disabilities: Identification and evaluation of children with autism spectrum disorders*, Pediatrics., (120) 2007 s. 1183-1215
11. Christensen D. L., Baio J., Van Naarden Braun K., Bilder D., Charles J., Constantino J. N., Daniels J., Durkin M. S., Fitzgerald R. T., Kurzius-Spencer M., Lee L. C., Pettygrove S., Robinson C., Schulz E., Wells C., Wingate M. S., Zahorodny W., Yeargin-Allsopp M., *Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United*

- States, 2012, Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2012 Surveillance Summaries., (65/3)2016 s. 1-23
12. Gillberg C., Wahlstrom J., *Chromosome abnormalities in infantile autism and other childhood psychoses: a population study of 66 cases*, Dev Med Child I. Rapin Autism. N Engl J Med., (337) 1997, s. 97-104
 13. Howlin P., Goode S., Hutton J., Rutter M., *Savant skills in autism: psychometric approaches and parental reports. Philosophical Transaction of the Royal Society*, B. 364 (1522) 2009 The Royal Society s. 1359-1367
 14. Rozetti – Szymańska A., *Autyzm*, [w:] *Fizjoterapia w pediatrii*, Kuliński W., Zeman K., Orlik T. (red) Wydawnictwo Lekarskie PZWL., Warszawa 2012, s. 165-173
 15. Pisula E., *Przyczyny autyzmu*, [w:] *Autyzm. Od badań mózgu do praktyki psychologicznej*, Gdańskie Wydawnictwo Psychologiczne., Sopot 2012 s. 57-82
 16. Rutter M., *Aetiology of autism: findings and questions*, J. Intellect Disabil. Res., (49) 2005, s. 231-238
 17. Sandin S., Lichtenstein P., Kuja-Halkola R., *The Familial Risk of Autism*, JAMA., 311(17) 2014 s.1770-1777
 18. Swanson N. L., Leu A., Abrahamson J., Wallet B., *Genetically engineered crops, glyphosate and the deterioration of health in the United States of America*, Journal of Organic Systems., 9(2) 2014, s. 6-37
 19. Krüger M., Schledorn P., Schrödl H. W., Lutz W., Shehata A., *Detection of glyphosate residues in animals and humans*, J Environ Anal Toxicol., 2(4) 2014, s. 1-5
 20. Beecham J. E., Seneff S., *The possible link between Autism and Glyphosate Acting as Glycine Mimetic – a review of evidence from the literature with analysis*, J Molec Genet Med. 9(4) 2015, s. 1-16
 21. Kałużna-Czaplińska J., Grys W., Szymańska A., Rynkowski J., *Rola stresu oksydacyjnego w autyzmie*, Nowa Pediatria (4) 2008, s. 67-70
 22. Chauhan A, Chauhan V., *Oxidative stress in autism*, Pathophysiology. (13) 2006 s. 171-81
 23. Finegold S. M., *Therapy and epidemiology of autism-clostridial spores as key elements*, Med. Hypotheses (70) 2008 s. 508-511
 24. Doshi-Velez F., Ge Y., Kohane I., *Comorbidity Clusters in Autism Spectrum Disorders: An Electronic Health Record Time-Series Analysis*, Pediatrics. 133(1) 2014, s. 54-63
 25. Danielewicz D., Pisula E., *Terapia i edukacja osób z autyzmem*, [w:] Danielewicz D., Pisula E. (red.) *Terapia i edukacja osób z autyzmem*. Wybrane zagadnienia. Warszawa 2003, s. 17
 26. Szeler K. *Wybrane metody terapii osób dotkniętych autyzmem w świetle literatury*, Paedagogia Christiana., 2 (20) 2007, Włocławek s. 113-127
 27. Gałkowski T., Pisula E., *Psychologiczne i genetyczne komponenty charakteryzujące autystyczne spektrum zaburzeń*, Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych. Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika Tom 52, 2-3 (259-260) 2003 s. 217-226
 28. Pisula E., *Efektywność działań terapeutycznych podejmowanych wobec dzieci z autyzmem*, [w:] *Wybrane metody terapii i rehabilitacji osób z autyzmem*, Pisula E., Danielewicz D. (red) Oficyna Wydawnicza "Impuls" Kraków 2005, s. 13-27
 29. Błęszyński J., *Uwarunkowania efektywnego oddziaływania terapeutycznego w pracy z osobami autystycznymi*, [w:] Błęszyński J. (red.) *Terapie wspomagające rozwój osób z autyzmem*, Kraków 2005, s. 13-15

30. Chmiel K., Kubińska Z., Derewiecki T., *Terapie z udziałem zwierząt w rehabilitacji różnych form niepełnosprawności*, Problemy Higieny i Epidemiologii, (591-595) 2014, s. 591-595
31. Fine A. H., *Handbook on Animal-Assisted Therapy*, Elsevier, USA (3) 2010 s. 588-592
32. Kubacka J. *Dogoterapia*, Wych Przedszk (2) 2008, s. 55-56
33. Strumińska A. (red), *Psychopedagogiczne aspekty hipoterapii dzieci i młodzieży niepełnosprawnych intelektualnie*, PWRiL, Warszawa 2007, s. 297-301
34. Czerkiewicz A. „*Jak kot stał się lekiem na całe zło*, Kocie Sprawy, (12) 2012, s. 110-113
35. Kamyk-Wawryszuk A., *Dogoterapia jako forma wspierająca rehabilitację dziecka z mózgowym porażeniem dziecięcym*, Wych na Co Dzień (6) 2007 s. 20-21
36. Grabczan D., *Terapia kontaktowa z udziałem zwierząt*, Dostęp online:
<http://czydelfinoterapia.pl/artykuly/terapia-kontaktowa-z-udzialem-zwierzat/> (10.12.2016r.)
37. Olechnowicz H., *Hipoterapia i nie tylko*, Rewalidacja (2) 2006, s. 82-89
38. Przewłoka K., *Wykorzystanie hipoterapii w terapii dzieci z autyzmem*, [w:] *Wybrane formy terapii i rehabilitacji osób z autyzmem*, Danielewicz D, Pisula E (red). Impuls, Kraków 2005 s. 195- 205
39. Franczyk A., Krajewska K., Skorupa J., *Klika słów o animaloterapii*, [w:] *Baw się poprzez animaloterapię. Przykłady gotowych sytuacji edukacyjnych z udziałem zwierząt*, Oficyna Wydawnicza “Impuls”, Kraków 2012, s. 9-22
40. Al Hussein A., *Stosunek ludzi do koni we współczesnym świecie*, Arabcy Mag (1) 2012, s.12-23
41. Nawrocka J., *Dogoterapia jako metoda wspomagania rehabilitacji dziecka z zaburzeniami rozwoju*, [w:] Samborski W., Gajewska E. *Dziecko niepełnosprawne. Narzędzia diagnostyczne i terapeutyczne*, Poznań 2010, s. 125-134
42. Nawrocka-Rohnka J., *Dogoterapia jako metoda wspomagania rehabilitacji dziecka z zaburzeniami rozwoju*, Nowiny Lekarskie (4/79) 2010 s. 304-310
43. Broszkiewicz P., *Kynoterapia jako uzupełnienie procesu rehabilitacji osób z deficytami rozwojowymi*, Fizjoterapia (18, 2) 2010, s. 81-91
44. Otto J, *Dogoterapia w terapii autyzmu*, [w:] *Wybrane formy terapii i rehabilitacji osób z autyzmem*, Pisula E., Danielewicz D. (red) Oficyna Wydawnicza “Impuls”, Kraków 2005, s. 181-194
45. Gręda A., *Dogoterapia jako metoda pracy z dziećmi niepełnosprawnymi w Polsce*, [w:] *Wybrane zagadnienia z pediatrii i opieki nad dzieckiem niepełnosprawnym*, Kędra E. (red.) Wyższa Szkoła Medyczna w Legnicy, Legnica 2011, s. 89-97
46. Krupiński J., Pagacz M., *Dogoterapia*, Światło i Cienie (3), 2003 s. 47
47. Budzińska-Wrzesień E., Wrzesień R., Jarmuł-Pietraszczyk J., Świtacz A., *Terapeutyczna rola zwierząt w życiu człowieka na przykładzie dogo- i felinoterapii*, ECOL CHEM ENG A. 19(11) 2012 s. 1375-1381
48. Nathanson D. E., *Rusing Atlantic Bottlenose Dolphins to Increase Cognition of Mentalny Retarded Children*, Clinical and Abnormal Psychology 1(6) 1989, s. 233-242
49. Buchnat M., Rzepka M., *Delfinoterapia w usprawnianiu dzieci z zaburzeniami w rozwoju – dylematy i kontrowersje*, Interdyscyplinarne Konteksty Pedagogiki Specjalnej (1) 2013 s. 73-85
50. Bekasiewicz N. (red), *Czy zwierzęta potrafią leczyć?*, Przyjaciel – Fundacja Pomocy Osobom Niepełnosprawnym, Warszawa 2008, s. 198-207

51. Strojek K., Kawka M., Radzimińska A., Piekorz Z., Kaźmierczak U., Zukow W., *Zastosowanie hipoterapii w postępowaniu usprawniającym*, Journal of Education, Health and Sport. 6(11) 2016, s. 24-34
52. Bednarczyk M., *Hipoterapia jako forma rehabilitacji i wsparcia włączania społecznego osób niepełnosprawnych*, Student niepełnosprawny. Szkice i rozprawy. Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach Wydział Przyrodniczy (15/8) 2015, s. 207-217
53. Rozmarynowicz A., Szark-Eckardt M., Mrozkowiak M., Zukow W., *Rola hipoterapii w poprawie stanu fizycznego i psychicznego osób niepełnosprawnych*, J Health Sciences. 3(12) 2013, s. 203-214
54. Sobuś M., Łagan S., *Hipoterapia jako naturalna forma rehabilitacji*, Aktualne Problemy Biomechaniki. (4) 2010, s. 173-178
55. Sawaryn D., *Właściwości konia i mechanizm oddziaływania terapeutycznego*, Fizjoterapia (16/1) 2008, s. 104-111
56. Szymczak M., *Wpływ zajęć hipoterapeutycznych na rozwój dzieci z mózgowym porażeniem dziecięcym*, Pielęgniarstwo Polskie 4(34) 2009, s. 282-283
57. Chmiel K., *Porównanie przydatności różnych ras koni do użytkowania w hipoterapii*, Prz Hipoterapeutyczny 2(10) 2009, s. 9-11
58. Raczkowska A., *Koń – wspinały terapeuta*, Koń Polski (7) 2009, s. 4-5
59. Stefaniak M., Śleboda C., *Na koniu do sprawności – zdrowotne walory hipoterapii*, Wychowanie Fizyczne i Zdrowotne. (7) 2008 s.13-18
60. Shurtleff T. L., Engsberg J. R., *Changes in Trunk and Head Stability in Children with Cerebral Palsy after Hippotherapy: A Pilot Study*, Physical & Occupational Therapy In Pediatrics, 30(2) 2010, s. 150-163
61. Debusse D., Gibb C., Chandler C., *Effects of hippotherapy on people with cerebral palsy from the users perspective: a qualitative study*, Physiotherapy Theory & Practice. 25(3) 2009, s. 174-92
62. Valentini S. Pstrong tłum. Pstrong A., Słupska K., *Onoterapia*, Dostęp online: <http://psho.pl/onoterapia/> (10.12.2016r.)
63. Palmowska K., *Onoterapia*, Dostęp online: www.onoterapia.pl (10.12.2016r.)
64. Dziurka D., Długosz B., *Sposoby użytkowania osłów*, Wiadomości Zootechniczne, R. LIV, (3) 2016 s.77-87
65. Raszevska M., *Onoterapia – przyjemne z pożytecznym*, Przegląd Edukacyjny, (5) 2010, s. 4-5
66. Wilk M., *Zalety i szanse wykorzystania animaloterapii w resocjalizacji młodzieży niedostosowanej społecznie*, Lubelski rocznik pedagogiczny (23) 2014, s. 201-219
67. Pipała A., *Alpaki w rehabilitacji niepełnosprawnych dzieci*, Nauka w Polsce, Dostęp online: <http://www.pomagamydzieciom.info/34140,1.dhtml> (10.12.2016 r.)

Metody zooterapii stosowane w autyzmie

W dzisiejszych czasach coraz częściej słyszymy o jednostce chorobowej jaką jest autyzm. Jest on zaburzeniem rozwoju układu nerwowego, który ujawnia się przed 3 rokiem życia, jako nieprawidłowy lub upośledzony rozwój dziecka. U osoby cierpiącej na autyzm, zauważamy: problemy w relacjach społecznych, dostrzegalne deficyty w komunikacji – zarówno werbalnej jak i niewerbalnej, a także powtarzające się, stereotypowe wzorce zachowań. Dziecko przejawia problemy związane z koncentracją uwagi, nadpobudliwością psychoruchową, oraz nadwrażliwością sensoryczną. Podstawowym celem procesu terapeutycznego – edukacyjnego jest kształtowanie u dziecka jak największej ilości zachowań adaptacyjnych, które rozwiną jego niezależność i umożliwią mu efektywne funkcjonowanie w środowisku. W terapii powinny być stosowane rozmaite metody, umożliwiające wszechstronne wsparcie rozwoju dziecka. Wielostronne działanie, niemożliwe do zastąpienia przez jakąkolwiek inną metodę rehabilitacji wykazuje terapia z udziałem zwierząt – animaloterapia. Najpowszechniej używane w działalności rehabilitacyjnej, zwierzęta to: konie (hipoterapia), psy (dogoterapia, kynoterapia), koty (felinoterapia), delfiny (delfinoterapia) Istnieją również doniesienia o terapii przy udziale: osłów: (onoterapia), alpaka (alpakoterapia) czy rybek akwariowych. Interakcje zwierząt z pacjentami ukazują wieloraki charakter – od oddziaływania fizycznego, psychicznego, po motywacyjne i edukacyjne. Podczas animaloterapii, nauczyciel wykorzystuje różnorodne metody i formy pracy, które zachęcają dziecko do zdobywania doświadczeń wraz z innymi uczestnikami zajęć. Autorzy pracy wskazują różne formy terapii ze zwierzętami przedstawiając ich główne cele w terapii z dzieckiem autystycznym, ich zalety, wpływ na organizm oraz ukazują wskazania i przeciwwskazania. Słowa kluczowe: autyzm, rehabilitacja, terapia, zooterapia

Animal therapy used in autism

Nowadays, we hear more and more often about the disease entity called autism. It is a developmental disorder of the nervous system, which manifests itself before the age of 3, as abnormal or impaired development of the child. In a person suffering from autism, we can observe: difficulties in social relations, deficits in communication – both verbal and nonverbal communication, and repetitive, stereotyped patterns of behavior. The child has difficulty concentrating, attention deficit hyperactivity disorder, and sensory hypersensitivity. The primary objective of therapeutic – education is the development of child's adaptive behavior that will develop his/her independence and enable his/her efficient functioning in the environment. The therapy should be used in a variety of methods, enabling comprehensive support for the development of the child. Animal therapy seems to be the only multilateral and irreplaceable by any other method of rehabilitation. The most commonly used animals in rehabilitation activities include: horses (hippotherapy), dogs (dog therapy, Kynotherapy), cats (therapy cat), dolphins (dolphin therapy) There are also reports of therapy with the participation of: donkeys (donkey therapy), alpaca (alpaca therapy) or aquarium fish. Animal interaction with patients shows multiple dimensions – from the impact of the physical, mental, and motivational to educational. During animal therapy, the teacher uses a variety of methods and forms of work that encourage the child to gain experience with other participants in the class. The authors suggest various forms of therapy with animals presenting their main targets for the treatment of the autistic child, the benefits, the impact on the body, and shows the indications and contraindications. Keywords: autism, rehabilitation, therapy, animal therapy

Możliwości zastosowania inżynierii odwrotnej w medycynie

1. Wstęp

W artykule zostały zaprezentowane możliwości zastosowania inżynierii odwrotnej [1, 2] oraz sztucznej inteligencji [3] we współczesnej medycynie. Powyższe rozważania ukazano w postaci analizy wyboru najkorzystniejszego sposobu leczenia występujących obecnie najczęściej schorzeń kręgosłupa na odcinkach lędźwiowo-krzyżowych.

Jedną z rozważanych metod przy tego typu schorzeniach jest zastosowanie implantu odzwierciedlającego zniszczony lub zwyrodniały krążek kręgosłupa, natomiast inną metodą obecnie szeroko stosowaną w medycynie jest stabilizacja kręgosłupa – spondylodeza [15], polegająca na bezpośrednim zespoleniu sąsiednich kręgów przy pomocy specjalistycznych implantów. Czynności powyższe wykonywane są, aby nastąpił wzrostu kosztowny utrzymujący poprzez swoją konstrukcję stabilizującą prawidłowe położenie kręgów.

Interdyscyplinarne podejście do powyższego problemu umożliwia zasugerowanie najskuteczniejszego i najmniej inwazyjnego rozwiązania w aspekcie medycznym w postaci bezpośredniego wsparcia samego procesu leczenia. Powyższy proces polegał by zarówno na pozyskaniu określonych danych, po czym na ich podstawie zaprojektowaniu i wytworzeniu implantu odzwierciedlającego uszkodzony krążek poprzez zastosowanie metod szybkiego prototypowania i wytwarzania krążka [4] oraz na podjęciu właściwej decyzji odnośnie specyfiki rozpatrywanego przypadku pacjenta wymagającego leczenia ambulatoryjnego na oddziale ortopedycznym.

Pozyskiwanie niezbędnych danych ambulatoryjnych odbywa się bezpośrednio na podstawie szczegółowej analizy historii schorzenia pacjenta oraz wykorzystaniu metod obrazowania medycznego (*medical imaging*) [5] przedstawiających w formie obrazów zachodzące w organizmie człowieka zmiany fizjologiczne i patologiczne. Dzięki tej technice możliwe jest zobrazowanie wnętrza organizmu ludzkiego bez konieczności przeprowadzenia inwazyjnych dla pacjenta operacji chirurgicznych oraz następuje zwiększenie skuteczności diagnostyki medycznej.

Analizując ostatnie półwiecze można zaobserwować prężny rozwój nowszych i dokładniejszych technik obrazowania medycznego, które dzięki swym niezastąpionym

¹ ewelina.kozlowska16@wp.pl, Wydział Mechaniczny, Politechnika Lubelska

² j.zubrzycki@pollub.pl, Wydział Mechaniczny, Politechnika Lubelska

właściwościom pozwalają wykonywać badania zwiększające efektywność procesu diagnostyki medycznej, wspomagające przygotowanie i symulację zabiegów operacyjnych.

Współcześnie głównie stosowanymi metodami obrazowania medycznego są badania wykonywane przy pomocy tomografii komputerowej CT oraz rezonansu magnetycznego MRI. W prezentowanej pracy przybliżony zostanie proces trójwymiarowego modelowania krążka kręgosłupa znajdującego się w części lędźwiowo-krzyżowej kręgosłupa. Powyższy proces bezpośrednio będzie opierał się na wynikach z badania tomografem komputerowym oraz rezonansem magnetycznym bez użycia kontrastu. W późniejszym etapie uzyskane wyniki zostaną wykorzystane do projektowania implantu odzwierciedlającego zdegenerowany krążek muszący zostać zastąpiony w celu usunięcia u pacjenta schorzenia w jak najmniej inwazyjny sposób, lub jego jaknajskuteczniejszą korekcję. W ostatecznym etapie prezentowanej pracy ukazany zostanie proces stworzenia systemu doradczego (ekspertowego) bazującego zarówno na danych klinicznych zawartych w historii choroby pacjentów jak i na bezpośrednich wynikach badań z tomografii komputerowej oraz rezonansu magnetycznego.

2. Inżynieria odwrotna

Prężny rozwój nowych metod, do których głównie zalicza się współrzędnościowe techniki pomiarowe, projektowanie wspomagane komputerowo CAD [6] obiektów o złożonych geometriach oraz nowoczesne techniki szybkiego projektowania i wytwarzania (RP, ang. *rapid prototyping*) wpłynęły bezpośrednio na powstanie innowacyjnych metod i technologii wytwórczych. Powyższe technologie we wcześniejszych czasach uznawane były za nierealne ze względu na aspekty użytkowe i ekonomiczne oraz wytwórcze.

Jedną z takich innowacyjnych technologii wytwórczych jest inżynieria odwrotna (RE, ang. *reverse engineering*) [7] zwana również mianem inżynieria wsteczna, podczas której tworzenie modelu komputerowego następuje na podstawie istniejącego przedmiotu poprzez zastosowanie skanerów 3D.

Inżynieria odwrotna jest niezwykle użytecznym narzędziem wytwórczym mogącym zostać zastosowanym w przypadku odtworzenia przedmiotów bądź urządzeń już istniejących, lecz nieposiadających dokumentacji konstrukcyjnej lub technologicznej oraz w przypadku braku obydwu tych dokumentacji. W technologii inżynierii odwrotnej w porównaniu z tradycyjnym procesem projektowania najpierw następuje bezpośrednia styczność z obiektem rzeczywistym, a następnie przy użyciu skanerów 3D oraz specjalistycznego oprogramowania przeznaczonego do obróbki uzyskanych ze skanowania danych następuje wygenerowanie komputerowego modelu wirtualnego.

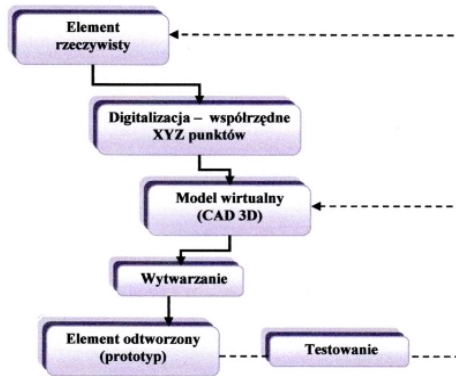
Jednocześnie inżynieria odwrotna jest dziedziną nauki odpowiedzialną za tworzenie i rozwój metod umożliwiających bezpośrednio wprowadzenie obiektu rzeczywistego w rzeczywistość wirtualną oraz obejmuje w swym zakresie obszary związane bezpośrednio z akwizycją danych przy pomocy technik skanowania przestrzennego i specjalistyczne urządzenia pomiarowe, rekonstrukcją geometrii mierzonych obiektów, a także przetwarzaniem danych do postaci akceptowanej przez systemy CAD.

Jednak najważniejszą cechą spośród cech wspomnianych wcześniej jest uznanie terminu inżynieria odwrotna za element będący bezpośrednim członem wejściowym do systemów CAD jednocześnie przyspieszającym proces projektowania, testowania i przygotowania produkcji.

Termin inżynierii odwrotnej w ujęciu jako człon całego łańcucha produkcji maszyn, urządzeń, narzędzi oraz obiektów medycznych wykonywanych w procesach inżynierii produkcji, znajduje się bezpośrednio w strukturze CAD/CAM w postaci skanerów 3D. W powyższej strukturze elementem wejściowym staje się obiekt rzeczywisty (fizyczny), który w opisywanym przypadku jest pacjentem sklasyfikowanym w grupie wiekowej o zakresie 20-68 lat oraz w grupie schorzeniowo–urazowej posiadający kręgoszyk oraz dyskopatię kręgosłupa na odcinku lędźwiowo–krzyżowym na wysokości kręgow od L2 do L5. Kolejnym członem łańcucha w strukturze CAD/CAM jest inżynieria odwrotna występująca w postaci skanerów 3D, do których zaliczany zostaje zarówno tomograf komputerowy [8] jak i rezonans magnetyczny [9]. W kolejnym kroku dane pozyskiwane z procesu skanowania zostają zaimportowane do specjalistycznych programów wyposażonych w narzędzia do obróbki oraz zapisu w formatach kompatybilnych z programami CAD/CAM, umożliwiającymi przeprowadzenie bezpośredniej obróbki danych wygenerowanych we wspomnianych wcześniej programach do tego typu prac przeznaczonych. Wygenerowane dane powstają poprzez stworzenie na podstawie zdjęć pochodzących z badania komputerowego CT i rezonansu magnetycznego MRI tak zwanych chmur punktów opisujących tworzony model wirtualny. W powyższy sposób wygenerowany model wirtualny importowany jest do formatu STL, który jest kompatybilny z programami CAD/CAM służącymi do tworzenia i obróbki modeli 2 i 3D (modeli bryłowych i powierzchniowych).

W programach CAD/CAM z pliku STL wygenerowany zostaje model 3D (model bryłowy) będący w początkowym etapie jedynie zbiorem punktów odzwierciedlających odtwarzany model rzeczywisty, obarczony jest on jednak błędem kompresji. Zaprojektowany w ten sposób model zostaje poddany analizie numerycznej MES w celu sprawdzenia i przeanalizowania jego cech i właściwości konstrukcyjnych oraz wytrzymałościowych mających kluczowe znaczenie w całym procesie projektowania i wytwarzania. Przeprowadzone analizy MES opisują oraz ukazują newralgiczne punkty modelu oraz sposoby jego zachowania się gdy poddawany zostaje działaniu założonych wcześniej czynników. Do założonych czynników zaliczane zostają

obciążenia statyczne i obciążenia dynamiczne, ciśnienie oraz wpływ temperatury. W rozpatrywanym przypadku istotne jest odpowiednie dobranie odpowiedniego materiału konstrukcyjnego. Stworzony model staje się bezpośrednim wirtualnym odwzorowaniem pierwotnego modelu fizycznego, lecz jest on lepiej opisany i opracowany, ze względów technicznych. Przyczyną takiej sytuacji jest fakt, że poprzez jego odtworzenie w powyższych etapach struktury CAD/CAM został wyposażony w poszukiwane dane, do który zaliczane zostają zarówno dokumentacja konstrukcyjna jak i technologiczna (rysunek 1).



Rys. 1 Inżynieria odwrotna w strukturze CAD/CAM/CAE

W inżynierii odwrotnej występuje metodyka odtwarzania obiektów przestrzennych przebiega w czterech etapach, z których kluczowymi elementami jest digitalizacja obiektu i tworzenie jego modelu geometrycznego. Początkowym etapem jest proces digitalizacji [10] obiektu rzeczywistego, którym jest odcinek łądźwiowo – krzyżowy kręgosłupa pacjenta, polegający na zmianie informacji pozyskanych z obiektów realnych na postać cyfrową. Proces powyższy umożliwia w ten sposób przetwarzanie tych informacji w urządzeniach elektronicznych opartych o architekturę zero – jedynkową, a także na zgromadzeniu danych na nośnikach specjalnie do tego typu czynności przeznaczonych. Obecnie najczęściej proces digitalizacji realizowany jest z wykorzystaniem współrzędnościowych maszyn pomiarowych, skanerów optycznych lub laserowych.

W rozpatrywanym przypadku celem pierwszego etapu było uzyskanie chmur punktów, możliwie dokładnie odwzorowujących kształt i wymiary przedmiotu odtwarzanego (odcinek łądźwiowo–krzyżowy kręgosłupa pacjenta), poprzez wykonanie badania komputerowego przy pomocy tomografu komputerowego (CT) i rezonansu magnetycznego (MRI).

Drugim etapem metodyki odtwarzania obiektów przestrzennych jest proces tworzenia geometrycznego modelu odzwierciedlającego model rzeczywisty (fizyczny). Budowa modelu geometrycznego obiektu koncentruje się w głównej mierze na obróbce chmur punktów pomiarowych oraz ich przetwarzaniu w powierzchniowe modele geometryczne odtwarzanych obiektów. Rozpatrując przypadek wykorzystania w procesie inżynierii odwrotnej technik szybkiego prototypowania można na podstawie utworzonego modelu geometrycznego wykonać materialną kopię odtwarzanego obiektu.

W trzecim etapie odtworzony zostaje obiekt przestrzenny poprzez wykonanie pomiarów kontrolnych szczegółowych lub ograniczających się jedynie do najważniejszych wymiarów odtwarzanego przedmiotu. Uzyskane wyniki pomiarów odpowiednio opracowane i posegregowane porównywane są z modelem geometrycznym obiektu rzeczywistego.

Ostatnim, czwartym etapem metodyki odtwarzania obiektów przestrzennych jest bezpośrednie odtworzenie obiektu pomiarowego poprzez wytworzenie jego materialnej części, na przykład przy pomocy drukarki 3D.

3. Tomografia komputerowa

Obecnie powszechnie stosowaną w medycynie zaawansowaną technologicznie metodą obrazowania jest tomografia komputerowa (CT, ang. *computed tomography*) wykorzystująca, tak jak rentgenodiagnostyka konwencjonalna promieniowanie X stosowane w celu uwidocznienia badanych tkanek i narządów. Jakość uzyskiwanego obrazu jest bezpośrednio powiązana z możliwościami wygenerowania jak największej ilości najcieńszych warstw w jak najkrótszym okresie czasu, poprzez zastosowanie ciągłej rotacji lampy z równoczesnym stałym przesuwem stołu wzdłuż długiej osi pacjenta. W spiralnej tomografii komputerowej istnieje możliwość zaplanowania badania w taki sposób, aby kolejne warstwy częściowo nakładały się na siebie. Taki sposób wykonania badania umożliwia wygenerowanie trójwymiarowej prezentacji obrazu, charakteryzującego się bardzo dobrą rozdzielczością objętościową.

Urządzenie używane do wykonywania tomografii komputerowej nazywa się tomografem, natomiast uzyskany z badania obraz – tomografem. Metoda ta jest szeroko wykorzystywana zarówno w medycynie jak i technice. Tomografia komputerowa odgrywa zasadniczą rolę w diagnostyce obrazowej oraz stanowi poważną konkurencję dla rezonansu magnetycznego i ultrasonografii. Dzięki dokładności wykonania badania przez tomograf powyższa metoda staje się obiektywna i powtarzalna oraz bardzo dobrze odzwierciedlająca anatomię i topografię narządów, a także patologię z makro-dokładnością. W tomografii komputerowej przedmiotem badania na częściej są: mózg, narządy jamy brzusznej (wątroba, trzustka, śledziona, układ naczyniowy, przewód

pokarmowy), przestrzeń zaotrzewnowa, układ kostny o złożonej budowie (kość skroniowa, twarzoczaszka, kręgosłup, miednica) oraz klatka piersiowa (płuca, opłucna, śródpiersie). Silny rozwój osiągnięć technicznych umożliwił wtórną obróbkę uzyskanego z badania obrazu polegającą między innymi na tworzeniu rekonstrukcji płaszczyznowych i trójwymiarowych oraz umożliwia przeprowadzenie badań profilaktycznych w celu wczesnego rozpoznawania ciężkich w leczeniu np. nowotworów jelita grubego (endoskopia wirtualna) i niemych klinicznie guzków płucnych czy oceny zaawansowania miażdżycy tętnic wieńcowych.

4. Obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego

Rezonans magnetyczny (MRI, ang. *magnetic resonance*) jest jedną z podstawowych technik diagnostyki obrazowej stosowanych obok tomografii komputerowej w medycynie oraz w badaniach naukowych. Technika obrazowania rezonansu magnetycznego jest nieinwazyjną metodą pozyskiwania obrazów wnętrza obiektów rzeczywistych (fizycznych).

Obrazowanie przy pomocy rezonansu magnetycznego opiera się bezpośrednio na zjawisku jądrowego rezonansu magnetycznego. Powyższe zjawisko może wystąpić w próbce zawierającej jądra o różnym od zera spinie oraz umieszczonej w silnym stałym polu magnetycznym. W kolejnym etapie zjawiska próbka ulega częściowej polaryzacji, która opisywana jest przy pomocy wektora magnetyzacji. W przypadku, gdy tak spolaryzowana próbka zostanie poddana działaniu innego pola magnetycznego rotującego w płaszczyźnie prostopadłej do pola głównego, dla pewnej dokładnie określonej częstości tej rotacji zauważyć można powstanie oddziaływania między polem a magnetyzacją próbki. Bezpośrednim efektem powyższego oddziaływania jest obrót magnetyzacji próbki wokół rotującego wektora indukcji magnetycznej, co w efekcie pozwala wyprowadzić magnetyzację z położenia równowagi, w którym początkowo się znajduje [11].

Wyprowadzona z położenia równowagi magnetyzacja występuje bezpośrednio wokół kierunku pola głównego. Zanikający sygnał nazywany często sygnałem swobodnej precesji posiada częstość rezonansową, która opisana jest przy pomocy zależności pomiędzy częstością rezonansową będącą proporcjonalną do pola, w jakim znajduje się próbka.

W przypadku, gdy różne części próbki znajdują się w różnych polach, zachodzi zjawisko wielu częstości, a najczęściej z ciągłym jej widmem. Jeżeli znana jest mapa pola, w którym w danym momencie znajduje się próbka, wtedy istnieje możliwość odcodowania informacji przestrzennej, zaś zebrane widma mogą zostać zamienione na obraz próbki. Modulowanie pola głównego i jednoczesny pomiar sygnału rezonansu magnetycznego są podstawą metody obrazowania MRI.

Proces odkodowania obrazu nazywany jest mianem rekonstrukcji. W technice obrazowania przy pomocy rezonansu magnetycznego jądrem rezonansowym najczęściej jest proton, będący jądrem atomu wodoru mającym spin połówkowy i występujący powszechnie w obiektach biologicznych w cząsteczkach wody.

5. Sztuczna inteligencja

Ostatni okres czasu wskazuje na gwałtowny rozwój metod sztucznej inteligencji (AI, ang. *artificial intelligence*) [12] z jednoczesnym wzmożonym wzrostem ich wykorzystania w wielu dziedzinach bioinżynierii, medycyny, motoryzacji i przemysłu.

Analizując założony przypadek wykorzystania sztucznej inteligencji w środowisku medycznym zaobserwować można prowadzenie intensywnych prac badawczych nad systemami identyfikacji i monitorowania objawów chorobowych, przebiegu samego leczenia oraz programami doradczymi (ekspertowymi), które mają na celu usprawnienie podejmowania decyzji przez lekarza odnośnie wystąpienia możliwego schorzenia, rokowań zdrowotnych danego pacjenta oraz sposobu jego leczenia i przeprowadzania rehabilitacji.

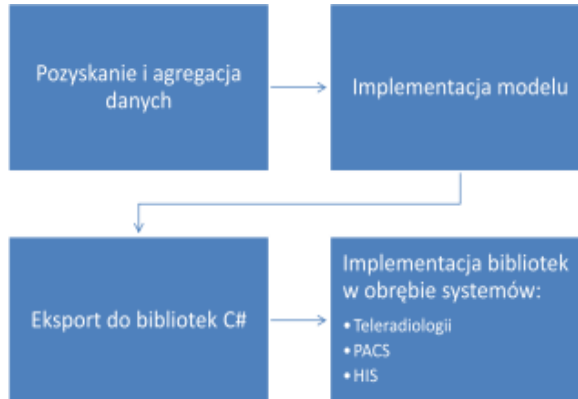
Stworzony system ekspertowy z sztucznych sieci neuronowych (ASN, ang. *artificial neural network*) [13] bazuje bezpośrednio na bazie danych zbudowanej na podstawie informacji wynikających bezpośrednio z historii chorób sklasyfikowanej grupy pacjentów, u których zachodzi podejrzenie wystąpienia określonego schorzenia, pacjentów u których owe schorzenie jest już potwierdzone oraz trzeciej grupy pacjentów u których mimo występowania podobieństwa objawów chorobowych inne badania wykluczyły analizowane schorzenie. Do danych pozyskanych bezpośrednio z historii chorób pacjentów zalicza się zarówno podstawowe badania takie jak: morfologia krwi, badanie moczu i kału, OB., badania EEG, EKG oraz badania aktywności tarczycy, jak i badania specjalistyczne wymagające specjalistycznych, złożonych urządzeń umieszczonych w specjalnie zaprojektowanych i przeznaczonych do ich funkcjonowania pomieszczeń. Jednak niezbędnym elementem powyższych badań specjalistycznych są wykwalifikowani w tym kierunku pracownicy, którzy nadzorują oraz przeprowadzają dane badania. Do powyższych badań zalicza się badanie RTG, badanie komputerowe przy pomocy tomografu komputerowego oraz badanie przy pomocy rezonansu magnetycznego.

Zbudowany system doradczy będący jednocześnie sztucznym modelem neuronowym posiada charakter adaptacyjny. Powyższa cecha charakteryzuje się możliwością opisu danych zależności zmieniających się w czasie. W momencie pojawienia się nowych danych może zostać przeprowadzony proces douczania sieci, umożliwiając jednocześnie zawarcie w tworzonym modelu informacji wynikających bezpośrednio z najnowszych obserwacji objawów choroby, jej przebiegu oraz skutków leczenia.

Proces uczenia sztucznej sieci neuronowej jest uczeniem maszynowym, tak zwaną subdyscypliną w dziedzinie sztucznej inteligencji.

Automatyczny system stworzony na bazie historii chorób określonej grupy pacjentów samoczynnie potrafi się doskonalić przy pomocy zgromadzonego doświadczenia, którym jest zbiór zgromadzonych danych oraz nabywania na tej podstawie nowej wiedzy. Każde dodatkowe dane dodawane do systemu ekspertowego działają pobudzająco na sztuczną sieć neuronową, która automatycznie wznawia proces uczenia się.

Stworzony system doradczy staje się specjalistycznym oprogramowaniem automatyzującym proces pozyskiwania, analizy danych w celu ulepszenia i rozwoju własnego systemu. Dzięki zastosowaniu sztucznych sieci neuronowych otwierają się nowe możliwości wykorzystania systemu doradczego. Do takich możliwości zaliczamy: szczegółową analizę i użytkowanie olbrzymich baz danych, łatwość dostosowywania się systemu do środowiska w którym pracuje, szybkość poszukiwania i analizy zależności w dużych i złożonych bazach danych oraz przeprowadzanie analiz, badań, a także opracowywanie bardzo złożonych problemów. Jednak jedną z najważniejszych cech systemu ekspertowego jest jego aplikacyjność, która umożliwia jego szybkie dostosowywanie się do warunków pracy i stawianych przednim zadań (rysunek 2).



Rys.2 Aplikacyjność sztucznych sieci neuronowych

6. Komputerowe wspomaganie obrazowej diagnostyki medycznej

W obecnym czasie diagnoza wspomagana komputerowo, w skrócie CAD (ang. *computer aided diagnosis*) znajduje szerokie zastosowanie w praktyce klinicznej oraz jest bezpośrednią metodą komputerowej analizy obrazu. Dostępne oprogramowanie komputerowe zostało wykorzystane jako narzędzie wspomagające proces wykrywania

i oceny zmian patologicznych. Diagnoza wspomagana komputerowo bardzo szybko znalazła zastosowanie w wielu technikach obrazowania do których zalicza się: mammografię, radiografię, tomografię komputerową, rezonans magnetyczny czy ultrasonografię. Jednocześnie dzięki swoim możliwościom użytkowym stała się głównym obiektem badań naukowych w radiologii klinicznej, np. w wykrywaniu schorzeń i urazów kręgosłupa na wszystkich jego odcinkach. Koncepcja CAD opiera się bezpośrednio na równości ról lekarza i komputera, natomiast istnieje również odmienne do CAD koncepcja ACD (ang. *automated computer diagnosis*) [14]. Największą różnicą występującą pomiędzy koncepcją CAD i ACD jest sposób wykorzystania oprogramowania komputerowego do diagnostyki. W pierwszej z powyższych koncepcji (CAD) radiolog używa oprogramowania jako drugiej opinii, jednak ostateczna decyzja należy do radiologa. W przypadku, gdy radiolog nie jest pewien swojej decyzji może zgodzić się lub odrzucić diagnozę postawioną przez komputer. W sytuacji, gdy lekarz nie jest pewny rozpoznania, wówczas zastosowanie koncepcji CAD wspomaga jednoznacznie rozstrzygnąć wątpliwości oraz zasugerować właściwą diagnozę.

Natomiast w koncepcji ACD najważniejsze jest stosowanie wysokiej jakości sprzętu, gdyż stopień detekcji zmian wykrywanych przez algorytm ACD musi być identyczny jak umiejętności radiologa. W technologii ACD w przypadku niepewności co do trafności postawionej diagnozy, radiolog musi przeprowadzić ponowną weryfikację wyniku. Biorąc pod uwagę implementację ACD wymaga wysokiej czułości i specyficzności oprogramowania, co stwarza trudności programistom. Kolejną różnicą występującą pomiędzy powyższymi technologiami jest poziom wyników. W schemacie ACD uzależniony jest od możliwości komputera, natomiast w metodzie CAD uzależniony jest od umiejętności i wiedzy radiologa. CAD przejawia humanizację medycyny, a nieodczłowieczoną automatyzację jak w przypadku ACD.

Nadrzędnym celem komputerowego wspomaganie diagnostyki obrazowej jest podkreślenie unikatowości człowieka oraz stworzenie narzędzi wzmacniających ludzkie zdolności, a także maksymalne ich wykorzystanie w celu rozwiązania kluczowych problemów interpretacji obrazów. W obecnym czasie kierunki badań nad algorytmami CAD, ułatwiającymi detekcję zmian i umożliwiającymi diagnostykę różnicową, skupiają się głównie nad unowocześnieniem samych technik obrazowania i algorytmów detekcji zmian, poprzez wdrożenie technologii CAD do systemu PACS, a także stworzeniem zbiorów obrazów patologii o podobnym charakterze.

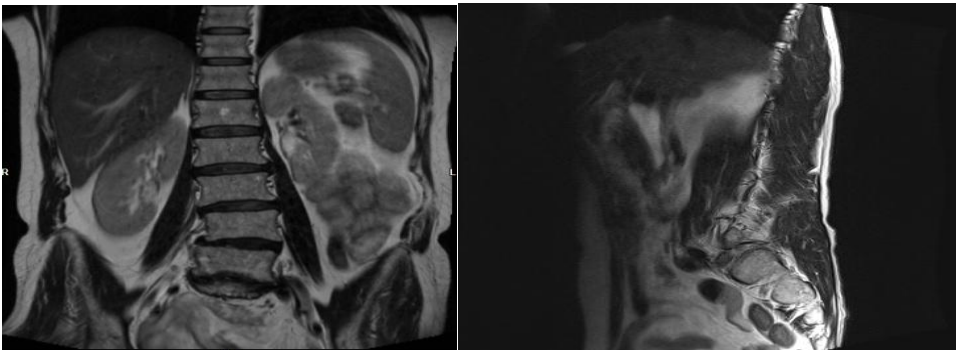
Obecnie systemy CAD znajdują szerokie zastosowanie w diagnostyce obrazowej jako współpracujące z radiologiem jako narzędzie pomocnicze. CAD wykorzystywana jest zarówno przy odmiennych technikach obrazowania jak również wspomaga diagnozowanie chorób poszczególnych układów i narządów. Oprogramowanie CAD jest stosowane do diagnostyki następujących narządów i układów [14]:

- klatka piersiowa;
- jelito grube;
- mózg;
- wątroba;
- układ pokarmowy;
- układ mięśniowo-szkieletowy;
- układ sercowo-naczyniowy.

Ciągły postęp technologiczny oraz nieustanne doskonalenie oprogramowania komputerowego, a także wprowadzenie obrazowania cyfrowego umożliwiają zastosowanie CAD w prawie wszystkich metodach diagnostycznych takich jak: rezonans magnetyczny, tomografia komputerowa czy medycyna nuklearna. Natomiast sam sposób użytkowania CAD uzależniony jest bezpośrednio od preferencji opisującego lekarza. Radiolog może wstępnie oglądać obraz samodzielnie, zaś analizę komputerową zastosować dopiero przed postawieniem ostatecznej diagnozy. Jednak takie postępowanie posiada negatywną stronę, którą jest duża ilość czasu poświęcona na przeprowadzenie badania. W takim przypadku korzystniejsze jest najpierw przeprowadzenie wstępnej analizy obrazu przez komputer, a następnie poddanie wtórnej ocenie automatycznych wyników lekarzowi. Jednak w tym przypadku niepokój budzi ryzyko opuszczenia niektórych istotnych zmian, które nie zostały wychwycone przez komputer.

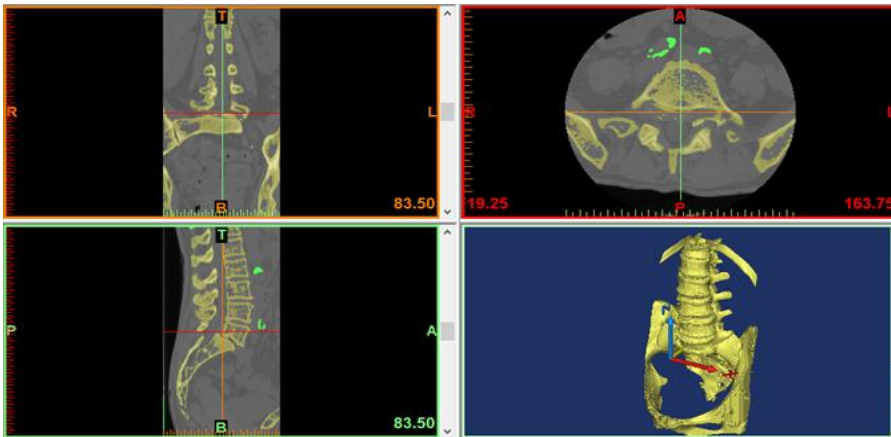
7. Modelowanie 3D odcinka lędźwiowo-krzyżowego na wysokości L2-L5

Model 3D odcinka kręgosłupa wygenerowany zostanie ze zdjęć uzyskanych podczas badania tomograficznego (rysunek 3).

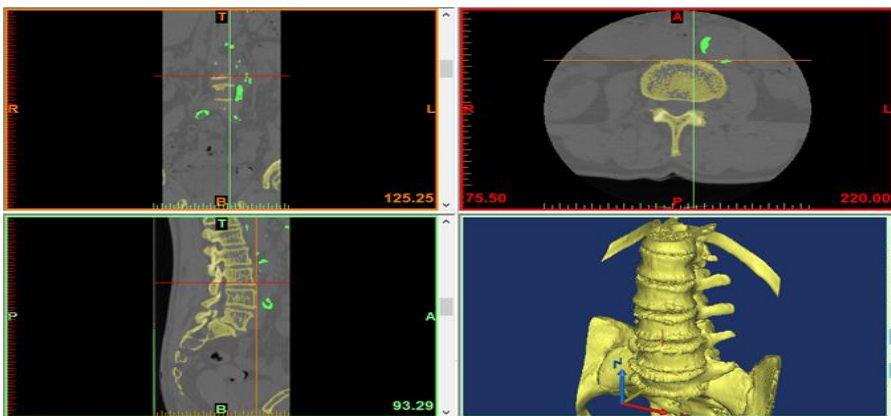


Rys. 3. Seryjne zdjęcia głowy w standardzie DICOM

W celu wygenerowania modelu 3D ze zdjęć 2D posłużył program Mimics 15 firmy Materialise. Mimics (*Materialise's Interactive Medical Image Control System*). Powyższy program jest specjalistycznym oprogramowaniem służącym do przetwarzania obrazów medycznych oraz tworzenia modeli 3D. Po etapie wczytaniu listy zdjęć do Mimics-a program wyświetla obraz w czterech płaszczyznach (rysunek 4, 5): czołowej, osiowej, strzałkowej i 3D. Widok osiowy pochodzi bezpośrednio z importu stosu zdjęć, natomiast widok czołowy i strzałkowy generowany jest automatycznie przez program. Wszystkie widoki są asocjatywne, czyli poprzez kliknięcie na obraz lewym przyciskiem myszy automatycznie aktualizuje pozostałe widoki.

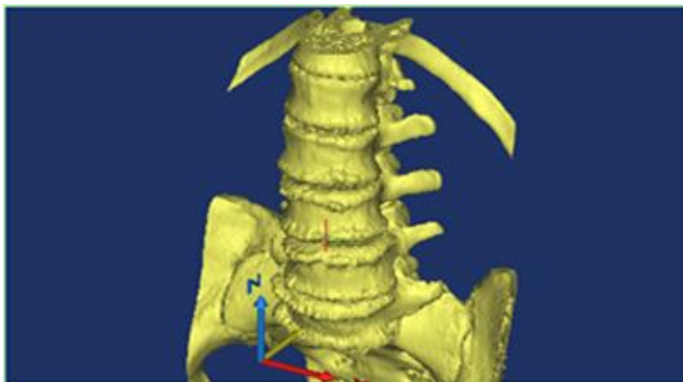


Rys. 4. Mimics – Widok po wczytaniu puli zdjęć



Rys. 5. Mimics – Widok po wczytaniu puli zdjęć

Następnie w wyniku dokonania wielu przekształceń z wykorzystaniem takich narzędzi jak: „Tresholding”, (określenie tkanek za pomocą wyboru zakresu jednostek HU), „Region Growing” (wybór i interpolacja obszarów spełniających kryteria wybrane w poprzednim etapie) oraz „Calculate 3D” następuje wygenerowanie modelu 3D szkieletu kręgosłupa, który jest cyfrowym modelem obiektu. Istotnym aspektem powyższego procesu jest fakt, iż otrzymany model powstał na podstawie rzeczywistych wymiarów kręgosłupa i dzięki temu można przygotować dane dla konkretnego pacjenta, indywidualnie do jego wymiarów anatomicznych. Efekt końcowy modelowania przedstawiono na rysunku 6.



Rys. 6. Model 3D z widocznymi nieciągłościami powierzchni

Powstałe podczas procesu nieciągłości powierzchni, będące naturalnym zjawiskiem występującym podczas procesu powstawania modelu, można usunąć za pomocą funkcji „Edit Mask-Draw”. Dzięki powyższej operacji można usunąć małe niedoskonałości modelu, które w późniejszym etapie uniemożliwiłyby wygenerowanie pliku STL. Następnie po przygotowanym modelu można przystąpić do dalszych prac nad jego geometrią, a mianowicie do eksportu do programów CAD w celu dalszej obróbki oraz programów CAE w celu przeprowadzenia obliczeń i symulacji numerycznych MES. W celu dalszej analizy stworzony w programie Mimics model został wyeksportowany do programu Geomagic Desing X, aby usunąć powstałe w pierwszym etapie nieciągłości. Ze względu na to, że przy istniejących w modelu nieciągłościach nie jest możliwe wygenerowanie pliku w formacie STL wykorzystana została funkcja zapisu modelu Point Cloud i zapisano dane w postaci chmur punktów, będącej niezależnymi od siebie punktami opisanymi współrzędnymi.

Dalsze modelowanie i rekonstrukcja szkieletu kręgosłupa wykonane zostały w programie Geomagic Desing X. Bazując na modułach projektowania modelowego

dokonano rekonstrukcji szkieletu kręgosłupa na odcinku lędźwiowo-krzyżowym na wysokości L2-L5.

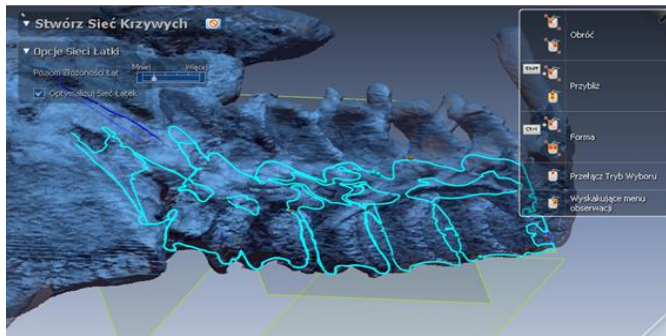
System Geomagic Desing X oferuje moduł umożliwiający projektowanie 3D przy użyciu danych zdigitalizowanych. Digitized Shape Editor, dostępny w module projektowania kształtowego Shape. Powyższe polecenie jest bardzo przydatnym narzędziem służącym do przetwarzania danych w postaci chmur punktów lub sieci zbudowanej z trójkątów lub czworokątów. Poprzez wybranie odpowiedniego pliku, wcześniej wygenerowanego w programie Mimics następuje wczytanie chmury punktów, która zostanie poddana rekonstrukcji. W części „Preview” okna dialogowego, po naciśnięciu klawisza „Update”, następuje wizualizacja importowanej chmury punktów oraz uaktywnia się polecenie do automatycznego tworzenia powierzchni(rysunek 7).



Rys.7. Wczytywanie chmury punktów do programu Geomagic Desing X

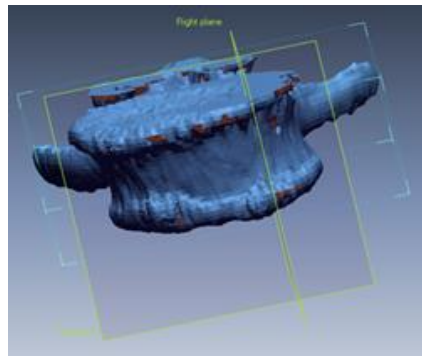
Na powyższym rysunku widoczny jest model chmury punktów, na którym można zaobserwować czerwone punkty. Punkty powyższe są błędnymi elementami tworzącymi chmurę punktów, które utrudniają utworzenie idealnej powierzchni na modelu.

W kolejnym kroku nastąpiło wygenerowanie w modelu chmurowym sieci krzywych opisujących zakładane zarysy kręgów, co skutkuje ukazaniem 2D kształtu szkieletu kręgosłupa (rysunek 8).



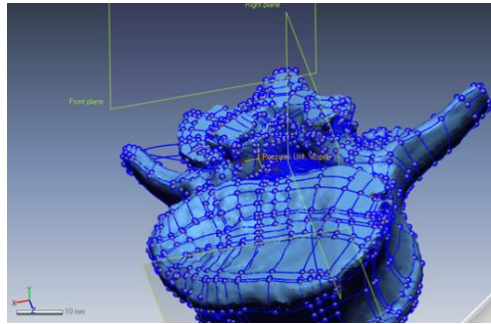
Rys.8. Wygenerowanie sieci krzywych w programie Geomagic Desing X

Po utworzeniu z chmury punktów modelu zawierającego tylko jeden krąg, kolejnym krokiem w procesie modelowania jest stworzenie modelu powierzchniowego umożliwiającego dalszą analizę modelu. Do tego celu nastąpiło w powyższym programie wygenerowanie pliku STL. Plik ten zostanie wykorzystany do stworzenia modelu powierzchniowego w programie CAD/CAM, którym jest program NX9.0. wyposażony w polecenia umożliwiające eksport i obróbkę plików w formacie STL oraz moduł „Reverse Engineering” odpowiedzialny za obróbkę tego rodzaju plików (rysunek 9).



Rys. 9. Model 3D krążka międzykręgowego z widocznymi nieciągłościami powierzchni

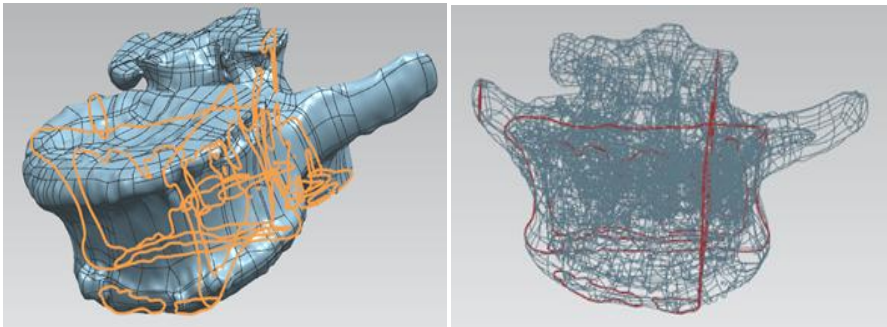
W kolejnym kroku nastąpiło utworzenie z chmury punktów siatki wieloboków rozpiętych na punktach powierzchni obiektu wirtualnego, umożliwiających stworzenie modelu powierzchniowego, który pozwoli na utworzenie postaci modelu umożliwiającą dalszą jego analizę (rysunek 10).



Rys. 10. Model 3D z widoczną siatkę wieloboków

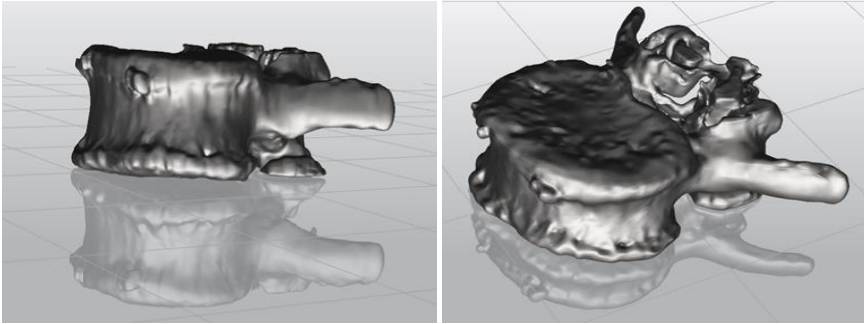
Tworzenie modelu geometrycznego odtwarzanego obiektu, poprzez obróbkę chmur punktów uzyskanych z badania CT (usunięcie wszystkie punktów pomiarowych niezwiązanych z odtwarzanym obiektem, filtrowanie szumów, wygładzanie, wypełnianie ubytków). Tak przetworzoną chmurę punktów pomiarowych przekształca się w obiekt przestrzenny, składający się z wieloboków. Można go poddać dalszej obróbce, która polega głównie na: naprawie siatki wieloboków, wygładzaniu, wypełnianiu ubytków, łączeniu różnych grup wieloboków, obróbce krawędzi, wyostrowaniu naroży. Przetwarzanie to ma na celu przygotowanie właściwych danych umożliwiających realizację ostatniej fazy tworzenia modelu geometrycznego obiektu odtwarzanego. W fazie tej z wieloboków przestrzennych tworzone są płaty powierzchni.

Mając w pełni odbudowany model powierzchniowy należy przekształcić wszystkie powierzchnie w jedną oraz stworzyć z nich jednorodną bryłę. Użyto do tego funkcji „Join” oraz „Close Surface” z modułu „Reverse Engineering” (rysunek 11).



Rys. 11. Model Gotowy model powierzchniowy z widocznymi przekrojami

Po przejściu wszystkich etapów odtwarzania modelu rzeczywistego oraz renderingu modelu wirtualnego otrzymujemy interesujący efekt końcowy (rysunek 12).



Rys. 12. Model bryłowy powstały z przekształcenia modelu powierzchniowego

Tak przygotowany model bryłowy zostaje przeanalizowany pod względem nierówności oraz rodzaju i wielkości deformacji kręgu w module „NX NASTRAN” programu NX 9.0 (rysunek 13).

8. Podsumowanie

Niniejsza praca prezentuje technikę rekonstrukcji elementów szkieletu człowieka na podstawie zdjęć wykonanych tomografem komputerowym oraz rezonansem magnetycznym. Do przedstawienia procesu projektowania elementu (kręgu kręgosłupa) posłużyły zdjęcia 2D szkieletu kręgosłupa, zarejestrowane podczas badania tomograficznego i rezonansu magnetycznego, które zostały zapisane w formacie DICOM.

Poprzez bezpośrednie zastosowanie systemów komputerowego wspomaganie prac inżynierskich istnieje możliwość zbudowania wirtualnego modelu kręgu kręgosłupa, umożliwiając lekarzowi przestrzenne zobrazowanie struktur widocznych na obrazach z tomografu komputerowego jako przekroje. Zaprojektowany model wirtualny może być wykorzystany przy procesie planowania zabiegu operacyjnego i jednocześnie wykonany tzw. przymiar śródoperacyjny jedną z metod szybkiego prototypowania. Technika projektowania ubytków i deformacji tkanek kostnych tworzących trzon kręgu wykorzystywana jest również do planowania zabiegów chirurgicznych, polegających na wypełnianiu cementem ubytków w strukturze kręgu. Na podstawie obrazów uzyskanych metodami obrazowania komputerowego patologiczne obszary kręgu mogą być rekonstruowane w systemie CAD, gdzie tworzony jest projekt kręgu uszkodzonego po czym jest on rekonstruowany (następuje usunięcie deformacji i zniekształceń trzonu kręgu). Po wykonaniu obydwu modeli następuje ich nałożeni na siebie i zaznaczenie

miejsc w które należy wstrzyknąć cement, lecz w przypadkach gdy uszkodzenia są już zbyt rozwinięte zostaje wstawiony implant lub stabilizator.

Stworzony program ekspertowy ma służyć jako pomocne narzędzie doradcze w przypadkach wątpliwych. A mianowicie w takich, gdzie nie jest do końca wiadome co może być mniej inwazyjne dla organizmu pacjenta oraz co może lepiej wpłynąć na ustąpienie schorzenia i pomóc w jego jak najszybszym powrocie do normalnego stanu zdrowia.

Analizowany model wygenerowany w programie Mimics CAD/CAE, a następnie przekonwertowany do formatu txt i jako chmura punktów wyeksportowany do programu Geomagic Desing X, a następnie do NX 9.0. Zaprezentowano kolejne czynności, które należy wykonać by otrzymać poprawny model 3D, na podstawie którego można przeprowadzić analizę odkształceń i deformacji. Wykonane w niniejszej pracy obliczenia posiadają jedynie charakter statyczny. Nie określają natomiast pęknięcia (złamania) kręgu. Jedynie na ich podstawie można określić stopień uszkodzenia i postępu schorzenia.

Dzięki rozwojowi technik obrazowania badań oraz technik projektowych następuje znaczne skrócenie czasu odebrania i wytworzenia implantu lub stabilizatora przy wykorzystaniu inżynierii odwrotnej i sztucznej inteligencji.

Literatura

1. Elman E., *Reversing Secrets of Reverse Engineering*, Willey Publishing Inc. Indianapolis, Indiana 2005
2. Karbowski K., *Podstawy rekonstrukcji elementów maszyn i innych obiektów w procesach wytwarzania*, Monografia 367, Seria Mechanika. Wydawnictwo Politechniki Krakowskiej, Kraków 2008
3. Wawrzyński P., *Systemy adaptacyjne i uczące się*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, 2009
4. Grimm T., *User's Guide to Rapid Prototyping*, Society of Manufacturing Engineers, Hardcover, 2004
5. Sydor M., *Wprowadzenie do CAD. Podstawy komputerowo wspomaganego projektowania*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2009, S. 47
6. Lisowski K., Damps D., *Metody obrazowania w medycynie, Multimedialne systemy medyczne*
7. Varady, T; Martin, R; Cox, J., *Reverse engineering of geometric models-an introduction*, (PDF) (1997). *Computer-Aided Design* 29 (4): 255-268
8. Tritt-Goc J., *Tomografia magnetyczno-rezonansowa*, Instytut Fizyki Molekularnej PAN, Poznań 2007
9. Siczek M., *Tomografia komputerowa i rezonans magnetyczny dla studentów kierunku informatyka*, Instytut Informatyki UMCS, Lublin 2011
10. Ober K., *Proces digitalizacji*, Poznańska Fundacja Bibliotek Naukowych, Poznań 2005

11. Stanisław B. Bartkowski, *Chirurgia szczękowo-twarzowa. Podręcznik dla studentów i lekarzy*, Wyd. 3. Kraków, Collegium Medicum UJ, 1996, s. 314. ISBN 83-86101-42-3
12. Our Final Invention, *Artificial Intelligence and the End of the Human Era*, James Barrat, 2013, ISBN 978-0312622374, s. 152
13. Tadeusiewicz R., *Sieci neuronowe*, Warszawa, Akademicka Oficyna Wydawnicza RM, 1993, s. 13-14
14. Kiszka K., *Zastosowanie automatycznych metod wspomagania detekcji (CAD) w radiologii klinicznej. Znaczenie i kierunki rozwoju CAD w różnych technikach obrazowania*, Przegląd Lekarski 2009/66/8
15. <http://drkregoslup.pl/leczenie-chirurgiczne-stabilizacja-ledzwiowa/leczenie-chirurgiczne/stabilizacja-kregoslupa>

Możliwości zastosowania inżynierii odwrotnej w medycynie

W artykule zostały zaprezentowane możliwości zastosowania inżynierii odwrotnej w inżynierii produkcji wykorzystujące zagadnienie dotyczące realizacji procesu inżynierii odwrotnej na przykładzie obiektu przestrzennego oraz sztucznej inteligencji. Proces inżynierii odwrotnej bezpośrednio stosowany był w celu stworzenia oraz obróbki chmur punktów powstałych w programie Mimics. Chmury punktów wytworzone zostały na podstawie wyników badania tomografem komputerowym oraz rezonansem magnetycznym, a następnie zapisane do formatu STL. Powyższy proces przebiegał w czterech następujących etapach: digitalizacja obiektu z wykorzystaniem tomografu komputerowego (CT) oraz rezonansu magnetycznego (MR), przetwarzanie chmur punktów pomiarowych uzyskanych w wyniku digitalizacji, budowa modelu geometrycznego obiektu na podstawie przetworzonych chmur punktów pomiarowych, sporządzenie kopii odtwarzanego obiektu technikami szybkiego prototypowania.

Słowa kluczowe: inżynieria odwrotna, sztuczna inteligencja, digitalizacja,

Possibilities of using reverse engineering in medicine

The article presents the possibility of the use of reverse engineering in manufacturing engineering using the issue regarding the implementation of the process of reverse engineering on the example of the spatial object, and artificial intelligence. The process of reverse engineering was used directly in order to create and processing of point clouds produced in the Mimics. Point clouds were produced on the basis of the results of the study CT scan and magnetic resonance imaging, and then written to STL format. The above process was conducted in the following four stages: digitization facility using computer tomography (CT) and magnetic resonance (MR), the processing point cloud measurement obtained as a result of digitization, construction of geometric model object based on the processed point cloud measurement, make a copy of the playback object techniques fast prototyping.

Keywords: reverse engineering, artificial intelligence, digitization

Indeks autorów

Augustynik A.	212
Augustynik A. M.	236, 254
Bicz I.	37
Błaszczak-Świątkiewicz K.	7
Boguszewska K.	7
Czubak K. A.	132
Dobosz K.	92
Duma-Kocan P.	25
Durak K.	73
Gajek A.	50
Gil M.	25
Głodek E.	25
Greloch A.	212, 236, 254
Hołyńska-Iwan I.	50
Kaczmarczyk-Sedlak I.	37
Karasiewicz-Urbańska M.	60
Kłodzińska K.	200
Kowalska W.	109, 123
Kozłowska E.	273
Kulik T.	200
Łojewski M.	92
Miaskowski A.	73
Muszyńska B.	92
Nowak M.	179
Pacian A.	200
Paziewska M.	123
Rozenek E.	212
Rozenek E. B.	236, 254
Sochoń K.	212, 236, 254
Sułkowska-Ziaja K.	92
Surowiec Z.	73
Szewczuk M.	7
Szkop U.	60
Szwedo E.	200
Waldowska-Kasprzak M.	109, 123
Wojnar W.	37
Wojtkowski J.	212, 236, 254
Woś J.	109
Wróbel G.	153, 167
Zarobkiewicz M.	123
Zubrzycki J.	273
Żbikowska H. M.	132