

**Osiągnięcia, wyzwania
oraz problemy nauk
przyrodniczych i medycznych**

Osiągnięcia, wyzwania oraz problemy nauk przyrodniczych i medycznych

Redakcja:
Alicja Danielewska
Monika Maciąg

Lublin 2020

**Wydawnictwo Naukowe TYGIEL składa serdecznie podziękowania
dla zespołu Recenzentów za zaangażowanie w dokonane recenzje
oraz merytoryczne wskazówki dla Autorów.**

Recenzentami niniejszej monografii byli:

- prof. dr hab. Monika Kozłowska
- dr hab. Renata Matraszek-Gawron
- dr n. med. Agnieszka Bartoszek
- dr n. farm. Anna Biernasiuk
- dr n. med. Iwona Bodys-Cupak
- dr Beata Daniluk
- dr n. farm. Ewa Gibuła-Tarłowska
- dr n. o zdr. Mariola Janiszewska
- dr Aneta Kondrzycka-Dąda
- dr n. med. Marta Łuczyk
- dr Agnieszka Marzec
- dr Monika Pytka
- dr Dawid Stefaniuk
- dr Małgorzata Telecka
- dr n. med. Gustaw Wójcik

Wszystkie opublikowane rozdziały otrzymały pozytywne recenzje.

Skład i łamanie:
Monika Maciąg

Projekt okładki:
Marcin Szklarczyk

Korekta:
Ewelina Chodźko

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

ISBN 978-83-66489-40-0

Wydawca:
Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o.
ul. Głowackiego 35/341, 20-060 Lublin
www.wydawnictwo-tygiel.pl

Spis treści

Dawid Skarwecki, Robert Nawrot, Alicja Warowicka <i>Farmakologiczna aktywność oraz zastosowanie naturalnych związków roślinnych w terapii schorzeń neurodegeneracyjnych</i>	7
Krystian Cholewa, Michał Siwek Magdalena Kozyra, Magdalena Jańczyk <i>Współczesne spojrzenie na psychofarmakoterapię epizodów depresyjnych u chorych z chorobą Parkinsona</i>	20
Klaudia Antoniak, Katarzyna Zorena, Rita Hansdorfer-Korzon <i>Manualny drenaż limfatyczny, jako jedna z form terapii funkcji układu limfatycznego związanej z otyłością</i>	29
Jagoda Kurowiak, Agnieszka Mackiewicz, Tomasz Klekiel, Romuald Będziński <i>Alginian sodu jako biomateriał stosowany w leczeniu zwężenia cewki moczowej</i>	39
Katarzyna Urbisz, Katarzyna Szałabska-Rapała, Maria Zych <i>Fitoestrogeny w walce z cukrzycą</i>	54
Malwina Agnieszka Sieńko <i>Wpływ tlenu azotu na ludzki organizm z uwzględnieniem męskiej erekcji</i>	75
Weronika Kamińska <i>Znaczenie badań z zakresu socjologii medycyny w obszarze opieki paliatywnej</i>	84
Karolina Emilia Nowak, Mikołaj Buczel, Natalia Grzywna, Kamil Filipiak, Malwina Szpitalak <i>Postawy społeczne wobec osób zmagających się z zaburzeniami psychicznymi i ich leczenia</i>	91
Aleksandra Kucharska <i>Opieka nad pacjentem z zaburzeniami odżywiania w placówce niewyspecjalizowanej</i> ...	105
Marcin Flis <i>E-government w systemie ochrony zdrowia – Internetowe Konto Pacjenta</i>	114
Izabela Oleś <i>Wpływ wirusa wywołującego COVID-19 na człowieka i rozwój nauk przyrodniczych</i>	132

Magdalena Jarosz, Magdalena Wołoszyńska <i>Elongator – białkowy kompleks konserwowany wśród eukariontów, który reguluje proces transkrypcji i translacji</i>	139
Wiktoria Grzebieniarsz, Anna Lenart-Boroń <i>Zanieczyszczenie mikrobiologiczne, lekooporność Escherichia coli i obecność antybiotyków w sztuczным śniegu oraz wodzie</i>	153
Klaudia Staśkiewicz, Anna Szakiel <i>Pionierskie grzyby zlichenizowane, czyli porosty jako samowystarczalne źródło unikalnych metabolitów wtórnych</i>	173
Karolina Felczak-Konarska, Michał Lechowski <i>Wykorzystanie technik biologii molekularnej w diagnostyce Pseudomonas syringae na malinie</i>	191
Wawrzyniec Marek Waclawek, Jolanta Małajowicz, Agnieszka Górka <i>Próby adsorpcji gamma-dekalaktonu z modelowych roztworów wodnych</i>	202
Dominika Dmowska, Agata Fabiszewska, Bartłomiej Zieniuk <i>Olej mikrobiologiczny jako alternatywny suplement wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w diecie człowieka – analiza rynku</i>	213
Beata Grabowska-Polanowska, Agnieszka Kowalczyk <i>Wpływ sposobu zagospodarowywania użytków zielonych na retencję wody i wypłukiwanie składników mineralnych</i>	221
Beata Fornal-Pieniak <i>Ocena przyrodnicza krajobrazu dla potrzeb zachowania bioróżnorodności miasta Tarnowa</i>	233
Indeks autorów.....	244

Farmakologiczna aktywność oraz zastosowanie naturalnych związków roślinnych w terapii schorzeń neurodegeneracyjnych

1. Wprowadzenie

Celem pracy jest przedstawienie aktywności farmakologicznej naturalnych związków roślinnych oraz możliwości ich zastosowania w terapii schorzeń neurodegeneracyjnych na podstawie literatury przedmiotu.

Choroba neurodegeneracyjna to ogólny termin na szereg zaburzeń neurologicznych, które przede wszystkim dotyczą neurony ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Dochodzi do stopniowej utraty neuronów, co prowadzi do upośledzenia określonych funkcji mózgu (pamięci, ruchu i funkcji poznawczych). Choroby neurodegeneracyjne stanowią poważny problem medyczny w krajach rozwijających się i wysoko rozwiniętych. Mimo prowadzonych intensywnych badań w dziedzinie neurobiologii, nadal nie udało się dokładnie poznać wszystkich czynników etiologicznych, powodujących te schorzenia. Najczęściej wymienia się wśród nich niekorzystne warunki środowiskowe, których skutkiem są procesy zapalne. Innym czynnikiem etiologicznym są predyspozycje genetyczne. Do najczęściej występujących chorób zwyrodnieniowych ośrodkowego układu nerwowego należą choroba Alzheimera (ang. *Alzheimer disease*, AD) oraz choroba Parkinsona (ang. *Parkinson disease*, PD), stanowią one ok. 60% przypadków chorób neurodegeneracyjnych [1].

Obecnie stale poszukuje się nowych rozwiązań terapeutycznych. Jednym z aktualnych trendów jest zastosowanie związków o wysokiej aktywności biologicznej i farmakologicznej w leczeniu lub/i neuroprewencji. Silną aktywność biologiczną i farmakologiczną wykazują naturalne związki pozyskiwane z roślin. Duża grupa tych związków posiada właściwości antynowotworowe, antybakteryjne i przeciwwirusowe. Naturalne polifenole, np. kurkumina oraz alkaloidy, np. berberyna posiadają dodatkowo właściwości antyoksydacyjne i przeciwzapalne. Obecnie, dzięki posiadanym właściwościom, m.in. możliwości pokonania bariery krew-mózg oraz działaniu przeciwzapalnym, niektóre z nich mogą być wykorzystane w terapii schorzeń neurodegeneracyjnych.

2. Choroby neurodegeneracyjne

2.1. Choroba Alzheimera

Choroba Alzheimera należy do najczęściej diagnozowanych chorób neurodegeneracyjnych [2]. Nazwa choroby pochodzi od nazwiska niemieckiego lekarza Alojzego Alzheimera, który jako pierwszy zidentyfikował patologiczne zmiany

¹ dawid.skarwecki.pl@gmail.com, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

² mawrot@amu.edu.pl, Pracownia Wirusologii Molekularnej, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

³ alicja@amu.edu.pl, Zakład Fizjologii i Biologii Rozwoju Zwierząt, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Centrum NanoBioMedyczne, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

w mózgu w przebiegu tej choroby. Choroba rozpoczyna się w obszarze kory mózgowej, kolejno zajmuje hipokamp ciało migdałowate, wzgórze, przodomózgowie i liczne monoaminergiczne jądra pnia mózgu. Mózdzek może pozostać nienaruszony aż do końcowej fazy klinicznej, a sama choroba postępując niszczy struktury wchodzące w skład układu limbicznego [1]. U podstaw molekularnego mechanizmu tej choroby leży kumulowanie się nieprawidłowych, patologicznych form białek, tj. hyperfosforowanego białka tau oraz peptydów beta-amyloidu. Peptydy beta amyloidu powstają w wyniku obróbki proteolitycznej białka prekursorowego amyloidu (APP). APP jest białkiem transmembranowym, występującym w większości tkanek organizmu. W wyniku wkroczenia APP na szlak amyloidogenny powstają toksyczne produkty cięcia proteolitycznego tego białka, peptydy zbudowane najczęściej z 39-43 aminokwasów, jak np. amyloidy-beta 40 (A β 40) i 42 (A β 42). Peptydy te mają tendencję do agregacji i wchodzi w skład charakterystycznych płytek starczych (zewnątrzkomórkowe agregaty amyloidu beta). Głównym składnikiem płytek starczych jest A β 42. Rozłożenie płytek starczych w mózgu jest nierównomierne, gdyż najmniej płytek starczych występuje w hipokampie, a najwięcej w korze potyliczno-czołowej. Proces akumulacji płytek starczych w mózgu rozpoczyna się około 50. roku życia i wraz z wiekiem stopniowo narasta [3]. Ponieważ proces akumulacji jest bardzo długotrwały, może dochodzić do modyfikacji amyloidów, co odpowiada za patologię płytek starczych i determinuje nierozpuszczalność złożeń. Do takich modyfikacji zalicza się racemizację, izomerizację, cyklizację oraz oligomeryzację [4]. Kolejną z cech charakterystycznych w przebiegu AD jest tworzenie złożeń lipofuscyny i pigmentu neuromelaminowego [2].

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że AD ma podłoże genetyczne w 10-40% wszystkich przypadków. W innych badaniach wskazuje się, że podłoże genetyczne dotyczy prawie wszystkich chorych [5]. Według badań genetycznych AD ma prosty model dominującego dziedziczenia autosomalnego i odpowiada za około 2,5% wszystkich przypadków wczesnej postaci choroby [6]. W rejonach mózgu objętych patologicznymi procesami, zmniejsza się ilość połączeń synaptycznych oraz spada liczba neuronów. Postępująca degeneracja neuronów w AD determinuje liczne zaburzenia w neurotransmisji cholinergiczej, serotoninerdycznej, noradrenergicznej i dopaminergiczej [7]. Dochodzi również do zmian sygnalizacji komórkowej, w tym wtórnych przekaźników, takich jak cykloaza adenylnowa, fosfoinozotydy i kinazy białkowe C. Zmiany przekaźnictwa sygnałów molekularnych zaburzają metabolizm tlenowy neuronów, obróbkę APP i fosforylację białka tau [8, 9]. Dodatkowo dochodzi do dysfunkcji mitochondriów i generowania wolnych rodników. Również stan zapalny jest ważnym czynnikiem w przebiegu AD, gdyż badania autopsyjne i epidemiologiczne wskazują skuteczną rolę ochronną związków przeciwzapalnych względem AD. Badania pokazują, że lokalna odpowiedź ostrej fazy zachodzi w mózgu, gdzie na samą chorobę wpływają produkowane w trakcie odpowiedzi związku biologicznie czynne [10]. Samopodtrzymujący się stan zapalny doprowadza do nadmiernej aktywacji astrocytów oraz komórek mikrogleju [11]. W obrębie blaszek starczych również stwierdza się stan zapalny, jednakże w przebiegu tego stanu aktywowana jest droga dopełniacza C1q z cytokinami, białkami C-reaktywnymi i oksydazą hemową 1 [12].

Do czynników ryzyka wystąpienia AD należą: zaawansowany wiek, mutacje genów kodujących preseniliny, polimorfizm genów apolipoproteiny E (ApoE) oraz nadaktywność/nieaktywność określonych enzymów. Choroba AD ma również wpływ

wyniszczający na układ odpornościowy, dochodzi do zmniejszenia masy ciała i zwiększenia ryzyka rozwoju infekcji. Ponieważ procesy patologiczne związane są ze stężeniem estrogenów, niektóre dane wskazują na większą zachorowalność wśród kobiet [13]. Oprócz wieku i predyspozycji genetycznych do czynników ryzyka zalicza się również nadciśnienie tętnicze, urazy głowy i hiperhomocysteinemię [14]. Postępująca demencja w chorobie Alzheimera związana jest z lokalizacją patologicznych zmian w regionach mózgu, które odpowiadają za pamięć, uczenie się oraz emocje. Stąd kliniczne objawy AD obejmują zaburzenia w zakresie pamięci (degeneracja neuronów cholinergicznym przodomózgowia) i mowy, orientacji wzrokowo-przestrzennej i wyższej funkcji wykonawczej. Do innych zmian należą zmiany osobowości, zmniejszona zdolność osądu, błąkanie się, psychoza, zaburzenia nastroju, pobudzenie i zaburzenia snu [15].

2.2. Choroba Parkinsona

Po raz pierwszy została opisana przez Jamesa Parkinsona w 1817 roku i kolejno przez Jeana-Martina Charcota. Charakteryzuje się złożonym przebiegiem, z objawami takimi jak drżenie, sztywność i bradykineza, z niestabilnością postawy ciała. Neuropatologia tego schorzenia opiera się na utracie nigrostriatalnego unerwienia dopaminergicznego, w wyniku czego dochodzi do zmniejszenia stężenia dopaminy w mózgu i przewagi neurotransmisji glutaminergicznej. Wskutek powyższych zjawisk aktywność jąder podstawnych mózgu ulega hamowaniu. Jądra te biorą udział w regulacji motoryki człowieka. Z racji niejednorodności PD trudno jest opracować skuteczny test diagnostyczny, zatem obecnie diagnoza polega na rozpoznaniu określonych objawów klinicznych, pozwalająca z pewnym prawdopodobieństwem stwierdzić chorobę lub ją wykluczyć. Ostateczna diagnoza polega na ocenie histopatologicznej tkanki nerwowej celem identyfikacji ciałek Lewy'ego (LB) lub neurytów Lewy'ego zawierających α -synukleinę [16].

2.3. Choroba Huntingtona

Choroba Huntingtona (ang. *Huntington disease*, HD) należy do chorób neurodegeneracyjnych związanych z odkładaniem się nieprawidłowej, patologicznej formy białka. Jest chorobą ośrodkowego układu nerwowego o podłożu genetycznym. Przyczyną tej choroby jest mutacja (ekspansja powtórzeń CAG) w eksonie 1 genu kodującego białko huntingtynę (Htt) (ang. *Huntingtin*) [17]. Nieprawidłowe, neurotoksyczne białko gromadzi się w komórkach nerwowych, doprowadzając do zaburzeń w funkcjonowaniu mitochondriów i śmierci komórek nerwowych [18]. Do typowych objawów tej choroby należą zaburzenia funkcji motorycznych oraz postępujące otępienie, stąd dawniej choroba ta nazywana była płasawicą Huntingtona. Mutacja wywołująca HD dziedziczy się autosomalnie dominująco, ale pierwsze objawy pojawiają się najczęściej dopiero pomiędzy trzecią a czwartą dekadą życia [17, 19].

3. Wybrane roślinne związki bioaktywne – ich aktywność farmakologiczna i neuroprotekcja

3.1. Berberyna

Berberyna (BBR) należy do klasy alkaloidów izochinolinowych, występujących w roślinach, takich jak *Hydrastis canadensis*, *Berberis vulgaris*, *Coptis chinensis* i *Berberis aristata* [20]. Badania naukowe wykazują, że stosowanie berberyny

wywiera korzystny wpływ terapeutyczny w przebiegu chorób neurozwyrodnieniowych i neuropsychiatrycznych, gdyż alkaloid ten wykazuje działanie przeciwłkowe, przeciwdepresyjne i ma potencjał w leczeniu uzależnień od narkotyków [21].

BBR hamuje powstawanie i odkładanie toksycznych beta-amyloidów [22] poprzez zmniejszenie aktywności enzymu BACE-1 (ang. *Beta-Secretase 1*), inicjującego wytwarzanie A β [23], przez co zmniejsza neurodegenerację hipokampa i upośledzenie behawioralne [24]. BBR jest inhibitorem oksydazy monoaminowej (MAO) oraz AChE (ang. *acetylcholinesterase*), których nadaktywność wiąże się z przebiegiem AD [25, 26]. BBR zapobiega uszkodzeniom neuronów dopaminergicznych, przez co poprawia funkcje motoryczne oraz poprawia pamięć krótkotrwałą i stymuluje neurogenezę w zakręcie zębatym hipokampa [27].

BBR może znaleźć zastosowanie w terapii choroby Huntingtona, gdyż działa stymulująco na autofagię nieprawidłowego białka Htt, charakterystycznego dla HD. Przeprowadzone badania naukowe wskazują, że BBR zmniejsza poziom złożeń zmutowanego białka Htt i jego agregację, co poprawia koordynację ruchową i funkcje motoryczne. Stosowanie BBR może być skuteczną formą leczenia epilepsji i drgawek [28]. Wykazano, że ekscytotoksyczność NMDA-R (ang. *N-metylo-D-asparaginian-receptor*) jest przyczyną napadów padaczkowych, a BBR zapobiega nadmiernej aktywacji pozasynaptycznego NMDA-R oraz wpływa modulująco na układ neuroprzeźwienny oparty na NMDA-R, będąc jego antagonistą [29, 30].

3.2. Kurkumina

Kurkumina jest związkiem polifenolowym występującym w kłączu kurkumy, który jest zbudowany z dwóch aromatycznych pierścieni, do których przyłączone są ugrupowania o-metoksyfenolowe połączone α , β -nienasyconymi ugrupowaniami β -diketonu [31]. Związek ten jest głównym składnikiem znanej na całym świecie przyprawy – curry.

Kurkumina wpływa hamująco na aktywność czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w ekspresję amyloidu, takich jak czynnik AP-1. Dodatkowo kurkumina ma właściwości silnie przeciwutleniające poprzez zmniejszenie utleniania LDL, białek, czy generowania ROS oraz wykazuje działanie protekcyjne względem mitochondriów [32, 33]. Ze względu na lipofilowy charakter, kurkumina przenika przez barierę krew-mózg. Ma zdolność wiązania się z płytkami amyloidowymi i jest inhibitorem agregacji beta-amyloidu 40, działając destabilizująco na polimery amyloidowe [34]. Chroni przed neurotoksycznym efektem działania metali ciężkich, takich jak ołów, kadm oraz zapobiega stanom zapalnym wywołanym przez jony miedzi, żelaza, cynku w wyniku aktywacji NF- κ B [35, 36].

3.3. Resweratrol

Resweratrol (3,5,4'-trihydroksystilben) jest polifenolową fitoaleksyną występującą w wielu roślinach jadalnych [37]. Badania wskazują, że moduluje aktywność wielu enzymów, w tym CYP1A2, CYP3A4 i CYP2D6 (ang. *cytochrome P*), S-transferaza glutationu (GST) i katecholo-O-metylotransferaza (COMT) [38].

Resweratrol skutecznie obniża negatywne efekty niedotlenienia i cytotoxyczności poprzez zwiększenie ekspresji mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej 2 (SOD2) [39-41]. Stosowanie resweratrolu przywraca zaburzoną integralność mitochondriów

spowodowaną udarem niedokrwinnym mózgu [42]. Stwierdzono, że resweratrol jest silnym reduktorem toksycznych ROS, chroni przed peroksydacją lipidów błonowych i przed uszkodzeniami DNA powodowanymi przez ROS [43, 44].

Stosowanie resweratrolu wiąże się z poprawą funkcji mózgowych, takich jak pamięć, motoryka oraz zwiększa przeżywalność komórek nerwowych [45-47]. Wykazano, że resweratrol zmniejsza ekspresję genów antyapoptotycznych i utrzymujących komórki nerwowe przy życiu oraz zapobiega apoptozie neuronów dopaminergicznych poprzez hamowanie produkcji mikroglejowych czynników prozapalnych [48, 49].

Resweratrol zwiększa ekspresję białka SIRT1 będącego białkiem jądrowym deacetylującym czynniki transkrypcyjne rządzące centralnymi szlakami metabolicznymi. Działanie SIRT1 reguluje metabolizm energetyczny, rytm okołodobowy i starzenie się [50, 51]. Nadekspresja SIRT1 w mózgu zmniejsza patologie OUN-AD poprzez kierowanie APP-1 na szlak cięcia nieamyloidogenne oraz deacetylację białka tau, co kieruje je na szlak ubiquitynacji i degradację proteasomalną, redukując poziom splątków neurofibrylarnych [52]. Aktywując SIRT1 resweratrol chroni neurony przed ROS i innymi neurotoksynami. Resweratrol działa również przeciwzapalnie w przebiegu neurotoksyczności spowodowanej przez beta-amyloidy poprzez hamowanie aktywności NF- κ B [53-55].

3.4. Alkaloidy indolowe

Alkaloidy indolowe zawierają w swojej strukturze pierścień indolowy. Alkaloidy te cechują się różnymi właściwościami biologicznymi i farmakologicznymi, w tym przeciwbólowymi, regulacyjnymi ośrodkowy i obwodowy układ nerwowy [56]. Duża grupa alkaloidów indolowych, jaką są beta-karboliny często występuje w świecie roślin, jednakże najważniejszymi substancjami z tej grupy są harmina i harmalina [57]. Stosowanie harminy prowadzi do redukcji objawów depresyjnych [58] i przywrócenia czynnika neurotroficznego pochodzenia mózgowego (BDNF) [59]. W badaniach wykazano, że harmina jest silnym inhibitorem kinazy regulowanej fosforylacją tyrozyny o podwójnej specyficzności (DYRK1A), której funkcją jest regulacja i proliferacja neuronów, przez co wpływa na rozwój mózgu [60]. Poprzez hamowanie MAO, harmina zwiększa neurotransmisję katecholaminergiczną, co determinuje jej efekt przeciwdepresyjny oraz stymulujący neurogenezę [61, 62]. N,N-dimetylotryptamina (N,N-DMT) jest agonistą receptorów serotoniny i sigma-1, gdzie receptory sigma-1 (σ 1R) są zaangażowane w przebieg zaburzeń depresyjnych. Agonizm N,N-DMT wobec σ 1R stymuluje produkcję czynników neurotroficznych, takich jak BDNF i NGF [63-65], przez co wpływa pozytywnie na neurogenezę i neuroprotekcję w mózgu.

3.5. Epikatechiny

Epikatechiny są związkami polifenolowymi występującymi w zielonej herbacie. Wyróżnia się 4 pochodne w oparciu o ich zmiany strukturalne, w tym: epikatechina (EC), epigallokatechina (EGC), galusan epikatechiny (EKG) i 3-galusan epigallokatechiny (EGCG) [66, 67].

Japońscy i amerykańscy naukowcy sugerują, że spożycie minimum dwóch filiżanek zielonej herbaty dziennie zmniejsza ryzyko występowania zaburzeń poznawczych i choroby Parkinsona [68-70]. Polifenole zawarte w zielonej herbacie zapobiegają uszkodzeniom oksydacyjnym, regresji pamięci oraz opóźniają starzenie się organizmu

[71]. EGCG ma właściwości chelatujące metale, przez co neutralizuje ich toksyczną aktywność [72, 73]. Stosowanie niskiego stężenia EGCG obniża neurotoksyczność poprzez zmniejszenie ekspresji genów proapoptotycznych bez wpływu na geny antyapoptotyczne [74-78], dodatkowo wpływa na stężenie wtórnych przekazników w sygnalizacji komórkowej, co zwiększa stabilność i integralność mitochondriów [79, 80].

3.6. Fitokannabinoidy

Cannabis sativa (L.) zawiera ponad 400 związków chemicznych, z których około 60 to związki fitokannabinoidowe. Związki te oddziałują w różnym stopniu na receptory CB1 i CB2 znajdujące się w m.in. mózgu [81].

Największą zawartością receptorów CB1 cechują się jądra odplywowe zwojów podstawnych, istota czarna *pars reticulata* (SNr), hipokamp oraz wewnętrzne i zewnętrzne segmenty *globus pallidus* (część mózgu wpływająca na ruchy dobrowolne) [82]. Owe lokalizacje sugerują, że receptor CB1 bierze udział w modulowaniu pamięci, emocji, bólu i ruchu. W kwestii bólu stosowanie preparatów na bazie marihuany wywołuje pozytywne skutki w leczeniu chronicznego bólu [83-86].

Badania dowodzą, że aktywacja CB1 znajdujących się w tkance nerwowej powoduje zmniejszenie aktywności cykazy adenylowej i neurotransmisji chemicznej, co skutkowało stosowaniem kannabinoidów w leczeniu padaczki [87-89]. Dodatkowo działanie CBD obejmuje działanie przeciwdepresyjne, przeciwłękowe, immunomodulujące oraz stymulujące wzrost komórek mikrogleju. CBD wpływa pozytywnie na układ naczyniowy w mózgu zmniejszając stany zapalne i zmiany spowodowane niedokrwieniem [90].

CBD hamuje ekspresję syntazy NO i wpływa negatywnie na aktywację NF-KB w przebiegu stanów zapalnych. Zwiększa poziom adenozyiny w mózgu, co wywiera wpływ neuroprotektoryjny względem tkanki nerwowej [91, 92].

CBD poprzez działanie rozszerzające naczynia krwionośne sprzyja regeneracji tkanki nerwowej po przebytych udarach mózgu. Zapobiega hiperfosforylacji białka tau oraz zmniejsza negatywne efekty behawioralne generowane neurotoksycznością beta-amyloidów w AD oraz hamuje postępującą glezozę. Zmniejsza również pobudzenie w przebiegu AD [93-97].

W przypadku choroby Parkinsona, działając przeciwutleniająco CBD zapobiega uszkodzeniom generowanym przez potraktowanie szczurów 6-hydroksydopaminą [98]. Kannabinoidy mogą być z powodzeniem stosowane w leczeniu stwardnienia rozsianego [99, 100].

4. Wnioski/Podsumowanie

W rozdziale przedstawiono wybrane grupy związków roślinnych w kontekście ich zastosowania w terapii chorób neurodegeneracyjnych. Alkaloidy, np. berberyna i jej pochodne czy związki polifenolowe, do których należą flawonoidy, kwasy fenolowe chronią komórki nerwowe m.in. przed stresem oksydacyjnym, zapobiegają nadmiernemu tworzeniu ROS, działają przeciwzapalnie, hamują odkładanie się nieprawidłowej formy patologicznych białek (np. resweratrol). Naturalne związki roślinne i ich pochodne mogą więc stanowić doskonałe źródło środków terapeutycznych w chorobach neurodegeneracyjnych, niemniej jednak ich stosowanie powinno być konsultowane z lekarzem. Podsumowując, wiele metabolitów wtórnych roślin dzięki

swoim silnym właściwościami biologicznymi wykazuje działanie neuroprotektoryjne. Mechanizm działania tych związków jest złożony, często działają one stymulująco lub hamująco na enzymy i czynniki komórkowe. Silne farmakologiczne działanie ekstraktów pozyskanych z roślin leczniczych może być również wynikiem synergistycznego działania ich składników.

Uwagi ogólne/Podziękowania

Praca została sfinansowana z subwencji dydaktycznej Wydziału Biologii UAM oraz subwencji badawczej Pracowni Wirusologii Molekularnej Wydziału Biologii UAM.

Literatura

1. Holmes C., Wilkinson D., *Molecular biology of Alzheimer's disease*, Advances in Psychiatric Treatment, 6, 2000, s. 193-200.
2. Sisodia S.S., *Alzheimer's disease: perspectives for the new millennium*, Journal of Clinical Investigation, 104 1999, s. 1169-1170.
3. Braak E., Griffling K., Arai K., Bohl J., Bratzke H., Braak H., *Neuropathology of Alzheimer's disease: what is new since A. Alzheimer?*, European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience, 249, 1999, s. 14-22.
4. Andreasen N., Gottfries J., Vanmechelen E., Vanderstichele H., Davidson P., Blennow K., Rosengren L., Blennow K., *Evaluation of CSF biomarkers for axonal and neuronal degeneration, gliosis, and beta-amyloid metabolism in Alzheimer's disease*, Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, 71, 2001, s. 557-558.
5. Chung H., Brazil M.I., Soe T.T., Maxfield F.R., *Uptake, degradation and release of fibrillar and soluble forms of Alzheimers amyloid beta-peptide by microglial cells*, Journal of Biological Chemistry, 274, 1999, s. 301-308.
6. Tanzi R.E., *Alzheimer's disease – from genes to drugs*, IBC 9th Annual Conference on Alzheimers' Gene Discovery to Therapeutic Applications. Atlanta, 8-9 Feb., 2001.
7. Frölich L., Blum-Degen D., Bernstein H.G., Engelsberger S., Humrich J., Laufer S., Muschner D., Thalheimer A., Türk A., Hoyer S., Zöchling R., Boissl K.W., Jellinger K., Riederer P., *Brain insulin and insulin receptor in aging and sporadic Alzheimer's disease*, Journal of Neural Transmission, 105, 1998, 423-438.
8. Dobryszcka W., Leszek J., *Aspekty diagnostyczne i terapeutyczne neurozwyrodnienia w chorobie Alzheimera, ostepieniu, starzeniu*, Continuo, Wrocław 2007.
9. Leszek J., *Choroby ostepienne. Teoria i praktyka*, Continuo, Wrocław 2011.
10. Zotova E., Nicoll J.A.R., Kalaria R.I. wsp., *Inflammation in Alzheimer's disease: relevance to pathogenesis and therapy*, Alzheimer's Research and Therapy, 2, 2010, s. 1-9.
11. Agostinho P., Cunha R.A., Oliveira C., *Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimers disease*, Current Pharmaceutical Design, 16, 2010, s. 2766-2778.
12. Kubis A.M., Janusz M., *Choroba Alzheimera – nowe możliwości terapeutyczne oraz stosowane modele eksperymentalne*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 62, 2008, s. 372-392.
13. Dobryszcka W., Leszek J., *Molekularne i kliniczne aspekty choroby Alzheimera*, Volumed, Wrocław 2001.
14. Hanon O., Latour F., Seux M.L., Lenoir H., Forette F., Rigaud A.S., *Evolution of blood pressure in patients with Alzheimer's disease: a one Year survey of a French Cohort (REALRF)*, Journal of Nutrition, Health and Aging, 61, 2005, s. 1667-1672.
15. Schachter, Armand & Davis, Kenneth., *Alzheimer's disease. Dialogues in clinical neuroscience*, 2, 2000, s. 91-100.

16. Kouli A., Torsney K.M., Kuan W.L., *Parkinson's Disease: Etiology, Neuropathology, and Pathogenesis*, [w:] Stoker T.B., Greenland J.C., *Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects*, Brisbane (AU), 2018.
17. Pandey M., Rajamma U., *Huntington's disease: the coming of age*, *Journal Genetics*, 97, 2018, s. 649-664.
18. Carmo C., Naia L., Lopes C., Rego A.C., *Mitochondrial Dysfunction in Huntington's Disease*, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1049, 2018, s. 59-83.
19. Jodeiri Farshbaf M., Ghaedi K., *Huntington's Disease and Mitochondria*, *Neurotoxicity Research*, 32, 2017, s. 518-529.
20. Schmitt F., Hussain G., Dupuis L., Loeffler J.-P., Henriques A., *A plural role for lipids in motor neuron diseases: energy, signaling and structure*, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 25, 2014), <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00025>.
21. Setchell K.D., Faughnan M.S., Avades T., Zimmer-Nechemias L., Brown N.M., et al., *Comparing the pharmacokinetics of daidzein and genistein with the use of 13C-labeled tracers in premenopausal women*, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77, 2003, s. 411-419.
22. Setti-Perdigão P., Serrano M.A.R., Flausino O.A., Bolzani V.S., Guimarães M.Z.P., Castro N.G., *Erythrina mulungu alkaloids are potent inhibitors of neuronal nicotinic receptor currents in mammalian cells*, *PLoS One*, 8, 2013, s. 8-13.
23. Imenshahidi M., Qaredashi R., Hashemzaei M., Hosseinzadeh H., *Inhibitory effect of Berberis vulgaris aqueous extract on acquisition and reinstatement effects of morphine in conditioned place preferences (CPP) in mice*, *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 9, 2014, 9(3), doi: 10.17795/jjnpp-16145.
24. Han A.M., Heo H., Kwon Y.K., *Berberine Promotes Axonal Regeneration in Injured Nerves of the Peripheral Nervous System*, *Journal of Medicinal Food*, 15, 2012, s. 413-7.
25. Yan R., Vassar R., *Targeting the β secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy*, *The Lancet Neurology*, 13, 2014, s. 319-29.
26. Panahi N., Mahmoudian M., Mortazavi P., Hashjin G.S., *Effects of berberine on beta-secretase activity in a rabbit model of Alzheimer's disease*, *Archives of Medical Science*, 9, 2013, s. 146-50.
27. Mathew B., Suresh J., Mathew G.E., Parasuraman R., Abdulla N., *Plant secondary metabolites-potent inhibitors of monoamine oxidase isoforms*, *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*, 14, 2014, s. 28-33.
28. Huang M., Jiang X., Liang Y., Liu Q., Chen S., Guo Y., *Berberine improves cognitive impairment by promoting autophagic clearance and inhibiting production of β -amyloid in APP/tau/PS1 mouse model of Alzheimer's disease*, *Experimental Gerontology*, 91, 2017, s. 25-33.
29. Jiang W., Wei W., Gaertig M.A., Li S., Li X.J., *Therapeutic effect of berberine on Huntington's disease transgenic mouse model*, *PLoS One*, 10, 2015, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134142>.
30. Ciechanover A., Kwon Y.T., *Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies*, *Experimental & Molecular Medicine*, 47, 2015, e147.
31. Priyadarsini, K.I., *The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent*, *Molecules*, 19, 2014, s. 20091-20112.
32. Kim G.Y., Kim K.H., Lee S.H., Yoon M.S., Lee H.J., Moon D.O., *Curcumin inhibits immunostimulatory function of dendritic cells: MAPKs and translocation of NF- κ B as potential targets*, *The Journal of Immunology*, 174, 2005, s. 8116-24.

33. Rathore P., Dohare P., Varma S., Ray A., Sharma U., Jaganathanan N.R., et al., *Curcuma oil: Reduces early accumulation of oxidative product and is anti-apoptogenic in transient focal ischemia in rat brain*, Neurochemical Research, 33, 2007, s. 1672-82.
34. Ono K., Hasegawa K., Naiki H., Yamada M.J., *Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta fibrils in vitro*, Neuroscience Research, 75, 2004, s. 742-50.
35. Daniel S., Limson J.L., Dairam A., Watkins G.M., Daya S., *Through metal binding, curcumin protects against lead- and cadmium-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates and against lead-induced tissue damage in rat brain*, Journal of Inorganic Biochemistry, 98, 2004, s. 266-75.
36. Baum L., Ng A., *Curcumin interaction with copper and iron suggests one possible mechanism of action in Alzheimer's disease animal models*, Journal of Alzheimer's Disease, 6, 2004, s. 367-377.
37. Jeandet P., Douillet-Breuil A.C., Bessis R., Debord S., Sbaghi M., Adrian M., *Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 2002, s. 2731-2741.
38. de Santi C., Pietrabissa A., Mosca F., Pacifici G.M., *Glucuronidation of resveratrol, a natural product present in grape and wine, in the human liver*, Xenobiotica, 11, 2000, s. 1047-1054.
39. Zamin L.L., Dillenburg-Pilla P., Argenta-Comiran R., Horn A.P., Simao F., Nassif M., Gerhardt D., Frozza R.L., Salbego C., *Protective effect of resveratrol against oxygen-glucose deprivation in organotypic hippocampal slice cultures: Involvement of PI3-K pathway*, Neurobiology of Disease, 24, 2006, s. 170-182.
40. Zhang H., Schools G.P., Lei T., Wang W., Kimelberg H.K., Zhou M., *Resveratrol attenuates early pyramidal neuron excitability impairment and death in acute rat hippocampal slices caused by oxygen-glucose deprivation*, Experimental Neurology, 212, 2008, s. 44-52.
41. Fukui M., Choi H.J., Zhu B.T., *Mechanism for the protective effect of resveratrol against oxidative stress-induced neuronal death*, Free Radical Biology & Medicine, 49, 2010, s. 800-813.
42. Yousuf S., Atif F., Ahmad M., Hoda N., Ishrat T., Khan B., Islam F., *Resveratrol exerts its neuroprotective effect by modulating mitochondrial dysfunctions and associated cell death during cerebral ischemia*, Brain Research, 1250, 2009, s. 242-253.
43. Bavithra S., Selvakumar K., Pratheepa Kumari R., Krishnamoorthy G., Venkataraman P., Arunakaran J., *Polychlorinated biphenyl (PCBs)-induced oxidative stress plays a critical role on cerebellar dopaminergic receptor expression: ameliorative role of quercetin*, Neurotoxicity Research, 2, 2012, s. 149-159.
44. Park S.J., Ahmad F., Philp A., Baar K., Williams T., Luo H., Ke H., Rehmann H., Taussig R., Brown A.L., Kim M.K., Beaven M.A., Burgin A.B., Manganiello V., Chung J.H., *Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases*, Cell, 148, 2012, s. 421-433.
45. Singleton R.H., Yan H.Q., Fellows-Mayle W., Dixon C.E., *Resveratrol attenuates behavioral impairments and reduces cortical and hippocampal loss in a rat controlled cortical impact model of traumatic brain injury*, Journal of Neurotrauma, 27, 2010, s. 1091-1099.
46. Kwon K. J., Kim J.N., Kim M.K., Lee J., Ignarro L.J., Kim H.J., Shin C.Y., Han S.H., *Melatonin synergistically increases resveratrol-induced heme oxygenase-1 expression through the inhibition of ubiquitin-dependent proteasome pathway: a possible role in neuroprotection*, Journal of Pineal Research, 50, 2011, s. 110-123.

47. Andrabi S.A., Spina M.G., Lorenz P., Ebmeyer U., Wolf G., Horn T.F., *Oxyresveratrol (trans-2,3',4,5'tetrahydroxystilbene) is neuroprotective and inhibits the apoptotic cell death in transient cerebral ischemia*, Brain Research, 1017, 2004, s. 98-107.
48. Dudley J., Das S., Mukherjee S., Das D.K., *Resveratrol, a unique phytoalexin present in red wine, delivers either survival signal or death signal to the ischemic myocardium depending on dose*, The Journal of Nutritional Biochemistry 20, 2009, s. 443-452.
49. Blanchet J., Longpre F., Bureau G., Morissette M., DiPaolo T., Bronchti G., Martinoli M.G., *Resveratrol, a red wine polyphenol, protects dopaminergic neurons in MPTP-treated mice*, Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry, 32, 2008, s. 1243-1250.
50. Nakahata Y., Kaluzova M., Grimaldi B., Sahar S., Hirayama J., Chen D., Guarente L.P., Sassone-Corsi P., *The NAD⁺dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control*, Cell, 134, 2008, s. 329-340.
51. Asher G., Gatfield D., Stratmann M., Reinke H., Dibner C., Kreppel F., Mostoslavsky R., Alt F.W., Schibler U., *SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation*. Cell,134, 2008, s. 317-328.
52. Nakahata Y., Kaluzova M., Grimaldi B., Sahar S., Hirayama J., Chen D., Guarente L.P., Sassone-Corsi P., *The NAD⁺dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control*, Cell,134, 2008, s. 329-340.
53. Albani D., Polito L., Signorini A., Forloni G., *Neuroprotective properties of resveratrol in different neurodegenerative disorders*, Biofactors, 5, 2010, s. 370-6.
54. Anekonda T.S. *Resveratrol-a boon for treating Alzheimer's disease?*, Brain Research Reviews,52(2), 2006, s. 316-326.
55. Khan M.A., Chen H.C., Wan X.X., Tania M., Xu A.H., Chen F.Z., Zhang D.Z., *Regulatory Effects of Resveratrol on Antioxidant Enzymes: a Mechanism of Growth Inhibition and Apoptosis Induction in Cancer Cells*, Molecules and Cells, 35, 2013, s. 219-25.
56. Cortes N., Posada-Duque R.A., Alvarez R., Alzate F., Berkov S., Cardona-Gómez G.P. et al., *Neuroprotective activity and acetylcholinesterase inhibition of five Amaryllidaceae species: A comparative study*, Life Sciences-Journal,122, 2015, s. 42-50.
57. Singh B., Sharma R.A., Vyas G.K., *Antimicrobial, antineoplastic and cytotoxic activities of indole alkaloids from Tabernaemontana divaricata (L.)*, Research Brain Current Pharmaceutical Analysis, 7, 2011, s. 125-132.
58. Callaway J.C., Ramon L.P., *Quantitation of N,N-Dimethyltryptamine and Harmala Alkaloids in Human Plasma after Oral Dosing with Ayahuasca*, Journal of Analytical Toxicology, 20(6), 1996, s. 492-7.
59. Farzin D., Mansouri N., *Antidepressant-Like Effect of Harmine and Other Beta-Carbolines in the Mouse Forced Swim Test*, European Neuropsychopharmacology, 16(5), 2006, s. 324-8.
60. Fortunato J.J., Réus G.Z., Kirsch T.R., Stringari R.B., Stertz L., Kapczinski F., Pinto J.P., Hallak J.E., Zuardi A.W., Crippa J.A., Quevedo J., *Acute Harmine Administration Induced Antidepressive-Like Effects and Increases BDNF Levels in the Rat Hippocampus*, Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry, 33, 2009, s. 1425-30.
61. Dakic V., de Moraes Maciel R., Drummond H., Nascimento J.M., Trindade P., Rehen S.K., *Harmine stimulates proliferation of human neural progenitors*. PeerJ, 4, 2016, doi: 10.7717/peerj.2727.
62. Finberg Finberg J.P., *Update on the pharmacology of selective inhibitors of MAO-A and MAO-B: focus on modulation of CNS monoamine neurotransmitter release*, Pharmacology and Therapeutics, 143(2), 2014, s. 133-152. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.02.010.
63. Manev H., Uz T., Smalheiser N.R., Manev R., *Antidepressants alter cell proliferation in the adult brain in vivo and in neural cultures in vitro*, European Journal of Pharmacology, 411, 2001, s. 67-70.

64. Carbonaro T.M., Gatch M.B., *Neuropharmacology of N,N-dimethyltryptamine*, Brain Research Bulletin, 126, 2016, s. 74- 88.
65. Cai S., Huang S., Hao W., *New hypothesis and treatment targets of depression: an integrated view of key findings*, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Neuroscience Bulletin, 31, 2015, s. 61-74.
66. Khokhar S., Magnusdottir S.G.M., *Total phenol, catechin, and caffeine contents of teas commonly consumed in the United Kingdom*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(3), 2002, s. 565-70.
67. Nanjo F., Goto K., Seto R., Suzuki M., Sakai M., Hara Y., *Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical*, Free Radical Biology and Medicine, 21(6), 1996, s. 895-902.
68. Chan D.K., Mellick G.D., Hung W.T., Woo J., *Genetic and environmental risk factors for Parkinson's disease in a Chinese population*, Journal Neurology and Neurosurgery Psychiatry, 65(5), 1998, s. 781-4.
69. Ritchie K., Lovestone S., *The dementias*, Lancet, 360(9347), 2002, s. 1759-66.
70. Gao X., Cassidy A., Schwarzschild M.A., Rimm E.B., Ascherio A., *Habitual intake of dietary flavonoids and risk of Parkinson disease*, Neurology, 78(15), 2012, s. 1138-45.
71. Unno K., Takabayashi F., Yoshida H., Choba D., Fukutomi R., Kikunaga N., Kishido T., Oku N., Hoshino M., *Daily consumption of green tea catechin delays memory regression in aged mice*, Biogerontology, 8(2), 2007, s. 89-95.
72. van Acker S.A., van den Berg D.J., Tromp M.N., Griffioen D.H., van Bennekom W.P., van der Vijgh W.J., Bast A., *Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids*, Free Radical Biology and Medicine, 20(3), 1996, s. 331-42.
73. Grinberg L.N., Newmark H., Kitrossky N., Rahamim E., Chevion M., Rachmilewitz E.A., *Protective effects of tea polyphenols against oxidative damage to red blood cells*, Biochemical Pharmacology, 54(9), 1997, s. 973-8.
74. Mandel S., Grünblatt E., Riederer P., Gerlach M., Levites Y., Youdim M.B.H., *Neuroprotective strategies in Parkinson's disease: An update on progress*, CNS Drugs, 2003, s. 729-62. PMID:12873156.
75. Mandel S., Maor G. Youdim M.B.H., *Iron and alpha-synuclein in the substantia nigra of MPTP-treated mice: effect of neuroprotective drugs R-apomorphine and green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate*, Journal of Molecular Neuroscience 24(3), 2004, s. 401-16.
76. Gassen M., Youdim M., *Free radical scavengers: chemical concepts and clinical relevance*, Journal of Neural Transmission, Supplementa, 56, 1999, s. 193-210.
77. Weinreb O., Mandel S., Youdim M.B.H., *Gene and protein expression profiles of anti- and pro-apoptotic actions of dopamine, R-apomorphine, green tea polyphenol (-)-epigallocatechine-3-gallate, and melatonin*, Analysis of the New York Academy of Sciences, 993, 2003, s. 351-61.
78. Weinreb O., Mandel S., Youdim M.B.H., *cDNA gene expression profile homology of antioxidants and their antiapoptotic and proapoptotic activities in human neuroblastoma cells*, FASEB Journal, 17(8), 2003, s. 935-7.
79. Beal M.F., *Bioenergetic approaches for neuroprotection in Parkinson's disease*, Annals of Neurology, 53, 2003, s. 39-47.
80. Mattson M.P., Kroemer G., *Mitochondria in cell death: Novel targets for neuroprotection and cardioprotection*, Trends Molecular Medicine, 5, 2003, s. 196-205.
81. Maroon J., Bost J., *Review of the neurological benefits of phytocannabinoids*, Surgical Neurology International, 9, 2018, doi: 10.4103/sni.sni_45_18.
82. Pertwee R.G., *Pharmacology of Cannabinoid CB1 and CB2 Receptors*, Journal of Pharmacology & Therapeutics, 74, 1997, s. 129-80.

83. Freund T.F., Katona I., Piomelli D., *Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling*, Physiological Reviews, 83, 2003, s. 1017-1066.
84. Portella G., Laezza C., Laccetti P., De Petrocellis L., Di Marzo V., Bifulco M., *Inhibitory effects of cannabinoid CB1 receptor stimulation on tumor growth and metastatic spreading: actions on signals involved in angiogenesis and metastasis*, FASEB J, 17, 2003, s. 1771-1773.
85. Hill K.P., *Medical marijuana for treatment of chronic pain and other medical and psychiatric problems: A clinical review*, JAMA, 313, 2015, s. 2474-83.
86. Rog D.J., Nurmikko T.J., Friede T., Young C.A., *Randomized, controlled trial of cannabis-based medicine in central pain in multiple sclerosis*, Neurology, 65, 2005, s. 812-9.
87. Guo J., Ikeda S.R., *Endocannabinoids modulate N-type calcium channels and G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels via CB1 cannabinoid receptors heterologously expressed in mammalian neurons*, Molecular Pharmacology, 65, 2004, s. 665-74.
88. Kim D., Thayer S.A., *Cannabinoids Inhibit the Formation of New Synapses between Hippocampal Neurons in Culture*, Journal of Neuroscience, 21, 2001, doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-10-j0004.2001.
89. Brown A.J., *Novel cannabinoid receptors*, British Journal of Pharmacology, 152, 2007, s. 567-75.
90. Campos A.C., Fogac M.V., Sonego A.B., Guimarãesa F.S., *Cannabidiol, neuroprotection and neuropsychiatric disorders*, Pharmacological Research, 112, 2016, s. 119-27.
91. Borea P.A., Gessi S., Merighi S., Vincenzi F., Varani K., *Pathological overproduction: The bad side of adenosine*, British Journal of Pharmacology, 174, 2017, s. 1945-60.
92. Castillo A., Tolóna M.R., Fernández-Ruizb J., Romeroa J., Martínez-Orgadoa J., *The neuroprotective effect of cannabidiol in an in vitro model of newborn hypoxic-ischemic brain damage in mice is mediated by CB2 and adenosine receptors*, Neurobiology of Disease, 37, 2010, s. 434-40.
93. Iuvone T., Esposito G., De Filippis D., Scuderi C., Steardo L., *Cannabidiol: A promising drug for neurodegenerative disorders?*, CNS Neuroscience and Therapeutics, 15, 2009, s. 65-75.
94. Ramirez B.G., Blazquez C., Gomez del Pulgar T., Guzman M., de Ceballos M.L., *Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: Neuroprotection mediated by blockade of microglial activation*, Journal of Neuroscience, 25, 2005, s. 1904-13.
95. Walther S., Mahlberg R., Eichmann U., Kunz D., *Delta-9-tetrahydrocannabinol for nighttime agitation in severe dementia*, Psychopharmacology, 185, 2006, s. 524-8.
96. Esposito G., Scuderi C., Savani C., Steardo L Jr., De Filippis D., Cottone P., Iuvone T., Cuomo V., Steardo L., *Cannabidiol in vivo blunts beta-amyloid induced neuroinflammation by suppressing IL-1 β and iNOS expression*, British Journal of Pharmacology, 151, 2007, s. 1272-9.
97. Hampson A.J., Grimaldi M., Axelrod J., Wink D., *Cannabidiol and (-)- Δ^9 -tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants*, PNAS, 95, 1998, s. 8268-73.
98. Guo J., Ikeda S.R., *Endocannabinoids modulate N-type calcium channels and G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels via CB1 cannabinoid receptors heterologously expressed in mammalian neurons*, Molecular Pharmacology, 65, 2004, s. 665-74.
99. Huntley A., *A review of the evidence for efficacy of complementary and alternative medicines in MS*, International Journal of MS Care, 13, 2006, s. 5-12.
100. Consroe P., Musty R., Rein J., Tillery W., Pertwee R., *The perceived effects of smoked cannabis on patients with multiple sclerosis*, European Neurology, 38, 1997, s. 44-8.

Farmakologiczna aktywność oraz zastosowanie naturalnych związków roślinnych w terapii schorzeń neurodegeneracyjnych

Streszczenie

Rośliny są bogatym źródłem związków aktywnych biologicznie o szerokim zastosowaniu w medycynie. Naturalne, roślinne związki niskocząsteczkowe posiadają szereg właściwości farmakologicznych, wykazują działanie przeciwwirusowe, przeciwbakteryjne i grzybobójcze. Dodatkowo posiadają właściwości przeciwutleniające i przeciwzapalne. Przykładowo syntetyczne pochodne alkaloidów są stosowane w leczeniu chorób nowotworowych. Obecnie coraz więcej badań wskazuje na możliwość zastosowania naturalnych, niskocząsteczkowych związków roślinnych w terapii chorób i schorzeń neurodegeneracyjnych, m.in. w chorobie Alzheimera. Wykazano, że alkaloidy wykazują działanie neuroprotektoryjne. Niektóre z nich mogą hamować akumulację płytek beta-amyloidu oraz obniżać ekspresję enzymu BACE-1 niezbędnego do ich powstawania. Zazwyczaj działanie tych związków jest wielokierunkowe, polega na modulowaniu komórkowych szlaków sygnałowych oraz odpowiedzi immunologicznej. Dodatkowo, związki te mogą być przyłączane do różnych nanomateriałów, np. nanocząstek, liposomów, co stanowi efektywny system transportu leku. Szczególnie interesujące wydaje się być wykorzystanie alkaloidów izochinolinowych, np. z grupy alkaloidów protoberberynowych i ich pochodnych. Wykazano, że berberyna (BBR) hamuje aktywność acetylocholinoesterazy (AChE) oraz butyrylocholinoesterazy (BChE). Poszukiwanie nietoksycznych inhibitorów tych enzymów jest celem w opracowywaniu nowych terapii chorób neurodegeneracyjnych. Inne bioaktywne substancje pochodzenia roślinnego zmniejszają poziom cytokin prozapalnych, neurotoksycznych reaktywnych form tlenu oraz wykazują działanie hamujące aktywację czynnika NF- κ B (np. kurkumina).

Słowa kluczowe: choroby neurodegeneracyjne, choroba Alzheimera, aktywne związki roślinne, alkaloidy, związki polifenolowe

Pharmacological activity and the use of natural plant compounds in the treatment of neurodegenerative diseases

Abstract

Plants are a rich source of biologically active compounds that are widely used in medicine. Natural, plant low-molecular compounds have a number of pharmacological properties, exhibit antiviral, antibacterial and fungicidal properties. Additionally, they have antioxidant and anti-inflammatory properties. For a long time, synthetic derivatives of alkaloids have been used in the treatment of cancer. Currently, more and more studies indicate the possibility of using natural, low-molecular plant compounds in the treatment of neurodegenerative diseases and disorders, including Alzheimer's disease. The alkaloids have been shown to have neuroprotective effects. Some of them can inhibit the accumulation of beta-amyloid plaques and reduce the expression of the BACE-1 enzyme necessary for their formation. Typically, these compounds act in a multi-directional fashion by modulating cell signaling pathways and the immune response. Additionally, these compounds can be attached to various nanomaterials, e.g. nanoparticles, liposomes, which is an efficient drug transport system. The use of isoquinoline alkaloids, e.g. from the group of protoberberine alkaloids and their derivatives, seems to be of particular interest. Berberine (BBR) has been shown to inhibit the activity of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE). The search for non-toxic inhibitors of these enzymes is a goal in developing new therapies for neurodegenerative diseases. Other bioactive substances of plant origin reduce the level of pro-inflammatory cytokines, neurotoxic reactive oxygen species and inhibit the activation of the NF- κ B factor (e.g. curcumin).

Keywords: neurodegenerative diseases, Alzheimer's disease, plant active compounds, alkaloids, polyphenolic compounds

Współczesne spojrzenie na psychofarmakoterapię epizodów depresyjnych u chorych z chorobą Parkinsona

1. Epidemiologia neuropsychiatrycznych cech choroby Parkinsona

Choroba Parkinsona (PD, *Parkinson's disease*) jest w czołówce chorób neurodegeneracyjnych, dotykając 2-3% populacji w wieku ≥ 65 lat [1]. Znaczące objawy depresji stwierdza się aż u około 35% pacjentów z PD [2]. Diagnostyka depresji w PD wymaga zestawienia wyników oceny nastroju z objawami ruchowymi i wegetatywnymi typowymi dla PD. Neuropatologiczne cechy PD to utrata neuronów dopaminergicznych w istocie czarnej oraz obecność wtrętów wewnątrzkomórkowych zawierających agregaty α -synukleiny [1]. Konsekwencją powyższych jest zmniejszona ilość dopaminy w prążkowie oraz kliniczne objawy choroby.

Chociaż diagnoza kliniczna opiera się na obecności bradykinezji i innych kardynalnych cech motorycznych, choroba Parkinsona jest związana z wieloma objawami niemotorycznymi, które zwiększają ogólną niepełnosprawność, między innymi są to objawy afektywne i poznawcze [1]. Upośledzenie funkcji poznawczych jest powszechne nawet u nowo zdiagnozowanych pacjentów z chorobą Parkinsona, a deficyty są najbardziej widoczne w dziedzinie pamięci i funkcji wykonawczych [3]. Apatię i abulję można zaobserwować u pacjentów z PD zarówno w kontekście depresji, jak i przy braku innych objawów klinicznych depresji [4]. Częstym objawem, który występuje nawet u jednej trzeciej pacjentów z PD jest lęk. Może wystąpić samodzielnie lub może towarzyszyć objawom depresji. Co ważne, lęk może być objawem zażywania leków dopaminergicznych u pacjentów, u których występują fluktuacje ruchowe i niemotoryczne [4]. Zaburzenia snu, w tym bezsenność, zespół niespokojnych nóg (RLS) i zaburzenie zachowania podczas snu przy szybkim ruchu gałek ocznych (RBD) są powszechne w PD. Dotyczą one od 55 do 80% pacjentów [4]. Zaburzenia seksualne towarzyszące PD mogą wahać się od niedostatecznej aktywności do hiperseksualności i mogą dotyczyć nawet 25% pacjentów z PD. Pacjenci miewają problem, by spontanicznie poruszać kwestię zaburzeń seksualnych, dlatego ważne jest, aby klinicysta poruszał ten temat w trakcie zbierania wywiadu. Hiperseksualność występuje częściej u młodszych mężczyzn i pacjentów leczonych agonistami dopaminy lub głęboką stymulacją mózgu. W trakcie badania psychiatrycznego nie można zapomnieć o jednostce, jaką jest psychoza, która jest częstym powikłaniem leczenia PD. Charakteryzuje się ona głównie halucynacjami wzrokowymi i urojeniami, często wystąpić mogą również objawy paranoidalne [5]. Halucynacje są najczęstszym objawem i dotyczą do 40% pacjentów

¹ Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Psychologii Stosowanej, krystiancholewa1@wp.pl.

² Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Psychologii Stosowanej.

³ Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Psychologii Stosowanej.

⁴ Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Psychologii Stosowanej.

z PD, szczególnie tych w zaawansowanym stadium choroby. Negatywne działanie leków, w szczególności agonistów dopaminy, jest prawdopodobnie najważniejszą przyczyną psychozy u pacjentów z PD [5]. Psychoza może być również wywoływana przez infekcję, majaczenie, demencję lub leki.

Wiele objawów motorycznych choroby Parkinsona (PD) może być poprzedzonych, czasami przez kilka lat, objawami niemotorycznymi, takimi jak hiposmia, zaburzenia snu, depresja i zaparcia. Cechy te pojawiają się w spektrum pacjentów z PD, w tym u osób z genetycznymi przyczynami PD [6]. Około 15% pacjentów z chorobą Parkinsona (PD) ma wywiad rodzinny, a 5-10% ma monogeniczną postać choroby z dziedziczeniem mendelowskim. Do chwili obecnej znaleziono co najmniej 23 loci i 19 genów chorobotwórczych dla parkinsonizmu, ale w różnych badaniach asocjacyjnych zidentyfikowano o wiele więcej loci ryzyka genetycznego i wariantów typowych dla sporadycznego fenotypu PD [2].

2. Ocena stosowanych standaryzowanych testów w diagnostyce depresji w Chorobie Parkinsona

W diagnostyce PD oraz w okresie dalszego leczenia ważną rolę odgrywa ocena neuropsychologiczna, uwzględniająca funkcjonowanie poznawcze i emocjonalne pacjenta. Diagnostyka depresji u chorych powinna odbywać się w fazie „on”. Najdokładniejsza diagnostyka depresji opiera się na wywiadzie klinicznym, przeprowadzonym przez doświadczonego psychiatrę. Istnieją jednak inne metody psychometryczne, które znajdują swoje zastosowanie w badaniach. Różnią się one pomiędzy sobą swoistością i czułością. Skale oceny, które są wiarygodne, prawidłowe i wrażliwe na zmiany związane z leczeniem, mają kluczowe znaczenie dla badań skuteczności terapii depresji. Część z nich może być traktowana tylko jako badania przesiewowe. Przy ocenie skali ważna jest niezawodność i aktualność skali, częstotliwość stosowania w badaniach nad depresją oraz wszechstronność w ocenie szerokiego zakresu objawów [7]. Zważając na fakt dużej heterogeniczności skal oraz ich ciągłych ulepszeń i modyfikacji, w dalszej części, zostaną wykazane potencjalne korzyści i wady niektórych, często używanych skal w ocenie parametrów psychiatrycznych, w badaniach neurologicznych, pod kątem ich przydatność badawczej i klinicznej. Dwa powszechnie stosowane narzędzia w diagnozowaniu depresji to: Hamilton Rating Scale for Depression (HAM-D) i Montgomery-Asberg Depression Rating Scale (MADRS). Badacze korzystają również ze skali Becka, Zunga, czyli kwestionariuszy przesiewowych i nienadających się do oceny efektów leczenia przeciwdepresyjnego.

Skala oceny depresji Hamiltona (HAM-D) stała się najczęściej stosowaną skalą oceny nasilenia depresji na świecie. Została ona po raz pierwszy przedstawiona przez Maxa Hamiltona w 1960 roku, aby zmierzyć nasilenie objawów depresyjnych u wcześniej zdiagnozowanych pacjentów z depresją [8].

Należy ona do tzw. skal obserwacyjnych, to znaczy, że pacjent jest oceniany przez diagnostę, a nie sam przez siebie. Decydując się na używanie tej skali, każdy punktowany objaw musi mieć kliniczne znaczenie dla pacjenta, tak by zsumowany wynik odzwierciedlał faktyczny konstrukt. Kwestionariusz ten występuje w różnych wariantach; znaleziono ponad 30 różnych anglojęzycznych wersji HAM-D. Kwestionariusz w często stosowanym wydaniu jest złożony z 17 pozycji (HAMD-17) i umożliwia ocenę takich objawów depresji, jak: obniżenie nastroju, niepokój, zaburzenia rytmu

dobowego, zaburzenia snu, spowolnienie psychomotoryczne, obniżenie libido, zaniżenie samooceny, poczucie winy, hipochondria, spadek masy ciała, lęk psychiczny i somatyczny oraz współistniejące dolegliwości somatyczne. Diagnosta wykonujący test może zastosować 3- lub 5-stopniową gradację oceny ilościowej objawów klinicznych.

Skala Montgomerygo-Asberga (MADRS) jest krótka i ma na celu śledzenie objawów zidentyfikowanych jako selektywne i wrażliwe na odpowiedź na leczenie. Jest to 10-punktowe narzędzie, które mierzy nasilenie objawów depresyjnych. Skala ta była traktowana jako punkt odniesienia w Europie. Ostatnia metaanaliza jedenastu wcześniejszych badań pokazuje wysoką korelację między MADRS a skalą oceny depresji Hamiltona (HDRS) w aspekcie oceny nasilenia depresji i odpowiedzi na leczenie.

Skale muszą charakteryzować się niezawodnością oraz jednowymiarowością. Wspomniane powyżej skale prezentowały się w następujący sposób:

- Niezawodność dla skal, takich jak HAM-D i MADRS może odnosić się zarówno do wiarygodności między obserwatorami, jak i do wewnętrznej spójności mierzonej współczynnikiem niezawodności alfa. Niezawodność HAM-D i MADRS między poszczególnymi klasami pod względem współczynników wewnątrzklasowych wynosiła odpowiednio 0,90 i 0,92 – co jest wysokim wynikiem [9];
- Jednowymiarowość, czyli niezmiennosc konstruktów wraz z upływem czasu to kolejna bardzo ważna cecha w używaniu skal w badaniach oceniających natężenie objawów. Badacze, oceniając pełną skalę HAM-D 17 i pełną skalę MADRS 10, doszli do wniosku, że obie są wielowymiarowe, co sugeruje, że ich łączne wyniki są niewystarczające do pomiaru nasilenia depresji [9]. Co ciekawe, jednowymiarowości podskal była odpowiednia tylko dla HAM-D 6. Dodatkowo to właśnie HAM-D 6 został zaakceptowany jako ważna miara zmiany podczas 12 tygodniowego monitorowania postępów leczenia depresji [9].

Należy pamiętać, że w ocenie neuropsychiatrycznej metodą z wyboru jest ustrukturyzowany wywiad, ewentualnie uzupełniony oceną kwestionariuszową. W przypadku obu metod trafność oceny zależy przede wszystkim od wiedzy i doświadczenia klinicysty, w mniejszym zaś stopniu od zastosowanych testów [10]. Jednym z największych aktualnych wyzwań jest identyfikacja markerów dla stadiów choroby zwiastunowej, co umożliwiłoby wcześniejsze rozpoczęcie nowych terapii modyfikujących przebieg choroby.

3. Cechy depresji powszechne w PD

Zarówno lęk, jak i depresja mogą wyprzedzać pojawienie się objawów ruchowych choroby Parkinsona, bądź mogą być niezależnie występującymi schorzeniami. W metaanalizie dowiedziono, że depresja jest niezależną chorobą i czynnikiem ryzyka PD, a nie okresem prodromalnym pełnoobjawowej choroby. Jednakże nie ma wątpliwości, że zaburzenia neuropsychiatryczne, przynajmniej częściowo, są integralną częścią PD. Patofizjologia tych powikłań jest złożona i prawdopodobnie obejmuje mechanizmy dopaminergiczne, serotoninergiczne i noradrenergiczne [11]. PD wiąże się z unikalną kombinacją zaangażowanych obszarów mózgu i złożonymi zmianami w obrębie różnych szlaków modulacyjnych. Zaburzenia te obejmują specyficzne zmiany poziomów ekspresji receptorów i transporterów neuroprzekaźników, które zmieniają się w trakcie

choroby [12]. Etiologia depresji w PD prawdopodobnie różni się od etiologii poważnych zaburzeń depresyjnych, a leki najczęściej przepisywane w przypadku dużych zaburzeń depresyjnych nie są najskuteczniejszą opcją leczenia depresji u pacjentów z PD. Dlatego potrzebne są strategie terapeutyczne specyficzne dla PD [12].

Kluczowymi cechami depresji są obniżenie nastroju oraz brak zainteresowania lub przyjemności (anhedonia), z których jedna jest wymagana do rozpoznania depresji w większości klasyfikacji. Inne cechy depresji mogą występować w różnych wariacjach, ale wiele z nich, takich jak utrata libido, zmieniony apetyt lub sen, zmiana masy ciała, spowolnienie psychoruchowe, pogorszona pamięć i utrata energii mogą pokrywać się z objawami PD, więc diagnoza depresji w PD jest trudna [11]. Niektóre cechy depresji, takie jak poczucie winy lub bezwartościowości oraz myśli samobójcze, mogą być mniej powszechne u pacjentów z PD, chociaż na te ostatnie należy być szczególnie wyczulonym [4]. W szczególności u pacjentów z zaawansowaną PD może wystąpić znaczna trudność w odróżnieniu somatycznych objawów depresji od objawów PD, takich jak spowolnienie ruchów i myślenia, utrata apetytu i masy ciała lub problemy ze snem [13]. Apatia wydaje się być podstawową neuropsychiatryczną cechą PD, podczas gdy, dysforia wydaje się być najbardziej patognomiczna dla depresji [14]. Czasem współtowarzyszą zaburzenia poznawcze, gdzie ogólny wzorzec dotyczy dysfunkcji wykonawczych i upośledzonych funkcji wzrokowo-przestrzennych, z mniej wyraźnymi deficytami pamięci i względnie zachowaną funkcją językową [15]. Ponadto w PD towarzyszą zaburzenia kontroli impulsów wiążące się z deregulacją gospodarki dopaminowej w układzie nagrody. Czasem są one powikłaniem leczenia objawów ruchowych lekami oddziałującymi na układ dopaminergiczny [16]. Kolejnym dużym problemem charakterystycznym dla tej grupy chorych są zaburzenia snu. Stwierdzono, że epizody depresyjne występuje w 10% populacji ogólnej i u 40% uczestników z bezsennością [17]. W badaniach kształtują się one w następujący sposób: częstość przewlekłej bezsenności wynosiła 36,9% (95% CI 33,3-40,5). Trudności w zasypianiu wyniosły 18,0% (95% CI 15,1-20,9), zaburzenia snu 81,54% (78,5-84,4), przebudzenia w nocy 31,3% (27,8-34,8), wczesne przebudzenia 40,4% (36,8-44,1) i inne sen regeneracyjny 38,5% (34,8-42,1) [18]. Co pokazuje, że ponad połowa chorych wykazuje deprywację snu różnego rodzaju. Większość dowodów epidemiologicznych, ale nie wszystkie, sugeruje kobiecą predyspozycję do bezsenności [18].

4. Aktualne doniesienia na temat farmakoterapii leczenia epizodów depresyjnych w PD

Biorąc pod uwagę błędną metodologię diagnozowania zaburzeń depresyjnych w chorobie Parkinsona, w ocenie psychofarmakoterapii nie da się wysunąć jednoznacznych wniosków na temat skuteczności leczenia. Badania są zbyt ogólne, badacze stawiali sobie pytanie czy istnieje uniwersalny lek na epizod depresyjny. Jednak współczesna wiedza neuropsychiatryczna podpowiada, że istnieje heterogeniczność depresji w PD. Czymś innym jest zapewne depresja poprzedzająca lub obserwowana na samym początku objawów ruchowych, czymś innym depresja adaptacyjna, psychologiczna reakcja na diagnozę, i wreszcie czymś innym depresja pojawiająca się późno, wraz z rozpoczynającą się demencją. Co więcej, chory na PD mógł wcześniej chorować na nawracające depresje (lub chorobę afektywną dwubiegunową) i może mieć niezależny od PD nawrót [14]. W większości badań powyższa heterogeniczność nie

została uwzględniona jedynie w jednej metaanalizie; wykluczono chorych, którzy prezentowali chorobę depresyjną na wiele lat przed zdiagnozowaniem PD. Ta metaanaliza wykazała, że inhibitory monoaminooksydazy (MAO – safinamid lub rasagalina) miały największy leczniczy wpływ na depresję w PD (SMD (vs selektywne inhibitory wychwyty zwrotnego serotoniny) = -0,78, CI = -1,55, -0,01) [19]. Co istotne, inhibitory monoaminooksydazy IMAO są również stosowane w leczeniu objawów ruchowych w PD, a więc mogą pomóc zmniejszyć polifarmakoterapię.

Typowo stosowane leki przeciwdepresyjne obejmują trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne (TCA), selektywne inhibitory wychwyty zwrotnego serotoniny (SSRI), inhibitory wychwyty zwrotnego serotoniny i noradrenaliny (SNRI), (MAO) i agonistów dopaminy (DA). Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy IMAO, SARI, SSRI, TCA i SNRI w ryzyku przerwania terapii spowodowanego uporczywymi działaniami niepożądanymi [20].

W terapii zaburzeń depresyjnych w chorobie Parkinsona, lekami z wyboru są terapeutyki przeciwdepresyjne o podwójnym działaniu serotoninergicznym i noradrenergicznym. Wyniki badań wskazują na poważniejszą utratę DA i unerwienia noradrenergicznego (NA) w dyskretnych obszarach mózgu, ustanawiając neuropatologiczną podstawę dla udziału zarówno dopaminy, jak i noradrenaliny w etiologii zaburzeń nastroju związanych z PD [21].

Wielu badaczy jest zgodnych, że leczenie atomoksetyną nie zawsze jest skuteczne w leczeniu klinicznie istotnych objawów depresyjnych w PD, ale wiąże się z poprawą ogólnej wydajności poznawczej i zmniejszeniem senności w ciągu dnia [22]. Co ciekawe, leki przeciw parkinsonizmowi mogą mieć korzystny wpływ nie tylko na objawy ruchowe choroby, ale także na nastrój pacjenta. Pramipeksol wykazał działanie przeciwdepresyjne w kontrolowanych placebo badaniach klinicznych u pacjentów z PD [23], być może dlatego, że pramipeksol jest nieergotropowym agonistą receptora dopaminy o wyższym powinowactwie do D3 niż D2. Receptor D3 ulega ekspresji głównie w limbicznych rejonach mózgu i prążkowi brzuszny [24]. Z tego powodu receptor D3 wydaje się być obiecującym celem dla leczenia objawów bez motorycznych związanych z PD. Wyniki kilku badań klinicznych potwierdzają to przypuszczenie [25]. Co ważne w badaniach z podwójnie ślepą próbą stwierdzono, że pramipeksol jest skuteczny zarówno w depresji jedno, jak i dwubiegunowej u pacjentów bez PD [26].

Trzy prospektywne, otwarte badania kilku różnych SSRI u pacjentów z PD z depresją [27, 28] nie wykazały pogorszenia ilościowych wyników motorycznych po leczeniu trwającym od jednego do sześciu miesięcy. Wśród SSRI sertralina wydaje się w najmniejszym stopniu pogarszać objawy ruchowe, jednakże SSRI niosą ryzyko zaostrzenia objawów ruchowych, mogąc wywoływać lub nasilać dystonię, akatyzyę, drżenie i parkinsonizm [20]. SSRI i inne leki przeciwdepresyjne mogą potencjalnie pogorszyć zespół niespokojnych nóg (RLS) i zaburzenie zachowania podczas snu przy szybkim ruchu gałek ocznych (RBD) [20]. Nie wszyscy pacjenci reagują na leczenie tą grupą leków. Dane te sugerują, że depresja związana z PD nie jest w pełni związana z zaburzeniami w sygnalizacji serotoniny [29].

Nie ma standardowych metod leczenia apatii lub abulii przy braku depresji lub utrzymującej się apatii pomimo leczenia depresji. Na podstawie wyników jednego

małego badania można rozważyć zastosowanie rywastygminy, inhibitora cholinno-esterazy [30].

Zabiegi pozafarmakologiczne takie jak: głęboka stymulacja mózgu mogą pogorszyć depresję u niektórych pacjentów, ale wstępne badania sugerują, że przezczaszkowa stymulacja magnetyczna może poprawić objawy depresji [13]. Inna metaanaliza wykazała, że leczenie farmakologiczne lekami przeciwdepresyjnymi, szczególnie selektywnymi inhibitorami wychwytu zwrotnego serotoniny (SSRI) oraz interwencjami behawioralnymi (CBT) znacznie poprawiło nastrój u pacjentów z chorobą Parkinsona [31]. Dziewięćdziesiąt procent badanych ukończyło badanie, a 88% uczestników losowo przydzielonych do CBT, wzięło udział we wszystkich 10 sesjach leczenia. CBT wiązało się ze znaczną poprawą we wszystkich ocenianych przez lekarza i w zgłaszanych przez pacjenta miarach depresji [32].

5. Podsumowanie

Klinicyści prowadzący pacjentów z PD powinni regularnie sprawdzać stan ich nastroju. Z powodu „masek podobnych do twarzy” i bradyfrenii, pacjenci z depresją w przebiegu PD mogą nie zostać łatwo zidentyfikowani jako depresyjni. Epizody depresyjne są objawami różnych jednostek chorobowych w PD. Zgodnie z najnowszymi doniesieniami powyżej przedstawiliśmy cechy, które statystycznie częściej współtowarzyszą zaburzeniom, między innymi dysforia czy zaburzenia snu. Nie istnieje jednoznaczny konsensus postępowania w wyżej wymienionej jednostce. Wydaje się, że wszystkie standardowo stosowane leki odgrywają rolę w leczeniu zaburzeń nastroju. Część z nich, jak np. SNRI na czele wenlafaksyną i duloksetyną wydają się lepiej odpowiadać na proces patofizjologiczny mający miejsce w mózgu osoby z PD. A znaleziona i metodycznie jedna z lepszych metaanaliza sieci promuje inhibitory MAO-B, np. rasagilina. Jednakże najnowsze badania w dziedzinie neurofarmakologii odkrywają nowe karty w sposobach leczenia zogniskowanych na podtypy receptorów dopaminergicznych, dobrym przykładem jest np. pramipeksol. Wydaje się, że to właśnie odkrycia nowych klas receptorów i ich ligandów niosą nadzieję na lepsze efekty leczenia depresji w PD. Nie można zapomnieć o niszy badawczej, jaką jest subklasyfikacja różnorodnych jednostek chorobowych towarzyszących PD sklasyfikowanych obecnie w jednym konstrukcie zatytułowanym: depresja. Z tego płynie jednoznaczny wniosek dotyczący metodologii badań nad opisywaną jednostką chorobową, do badań należy skrupulatnie dobierać odpowiednie kwestionariusze, które dostarczą nam konkretnych epidemiologicznych danych, a co za tym idzie pozwolą wysnuwać wnioski na temat skuteczności leczenia.

Literatura

1. Poewe W., Seppi K., Tanner C., *Parkinson disease*, Nature Reviews Disease Primers, 3, 2017.
2. van der Velden R.M.J, Broen M.P.G., Kuijf M.L., Leentjens A.F.G., *Frequency of mood and anxiety fluctuations in Parkinson's disease patients with motor fluctuations: A systematic review*, Journal of Movement Disorders, 33, 2018.
3. Muslimović D., Post B., Johannes D., Speelman, Schmand B., *Cognitive profile of patients with newly diagnosed Parkinson disease*, Neurology, 65 (8), 2005, s.1239-1245.
4. Kummer A., Cardoso F., Teixeira A.L., *Mysli samobójcze w chorobie Parkinsona*, CNS Spectrums, 14, 2009, s. 431.

5. Forsaa E.B., Larsen J.P., Wentzel-Larsen T., *A 12-year population-based study of psychosis in Parkinson disease*, Archives of neurology, 67, 2010, s. 996.
6. Schapira, A., Chaudhuri K., Jenner P., *Non-motor features of Parkinson disease*, Nature Reviews Neuroscience, 18, 2017, s. 435-450.
7. Iannuzzo R.W., Jaeger J., Goldberg J.F., Kafantaris V., Sublette M.E., *Development and reliability of the HAM-D/MADRS interview: an integrated depression symptom rating scale*, Journal of Psychiatric Research, 145(1), 2006, s. 21-37.
8. Williams J.B.W., *Standaryzacja Skali Oceny Depresji Hamiltona: przeszłość, terażniejszość i przyszłość*, European Archives of Psychiatry and Clinical, 251, 2001, s. 6-12.
9. Bech P., Allerup P., Larsen E.R., Csillag C., Licht R.W., *The Hamilton Depression Scale (HAM-D) and the Montgomery-Åsberg Depression Scale (MADRS). A psychometric re-analysis of the European genome-based therapeutic drugs for depression study using Rasch analysis*, Journal of Psychiatric Research, 217(3), 2014, s. 226-232.
10. Sitek E.J., Wójcik J., Wieczorek D., Sławek J., *Ocena neuropsychologiczna i neuropsychiatryczna w chorobie Parkinsona – specyfika badania i dobór metod diagnostycznych*, Polski Przegląd Neurologiczny, 9(3), 2013, s. 105-112.
11. Gallagher D.A., Schrag A., *Psychosis, apathy, depression and anxiety in Parkinson's disease*, Neurobiology of Disease, 46(3), 2012, s. 581-589.
12. Brichta L., Greengard P., Flajolet M., *Advances in the pharmacological treatment of Parkinson's disease: targeting neurotransmitter systems*, Trends in Neurosciences, 36(9), 2013, s. 543-554.
13. Aarsland D., Pålhlagen S., Ballard C., *Depression in Parkinson disease – epidemiology, mechanisms and management*, Nature Reviews Neurology, 8, (2012), s. 35-47.
14. Zahodne L.B., Marsiske M., Okun M.S., Bowers D., *Components of depression in Parkinson disease*, Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology, 25(3), 2012, s. 131-137.
15. Muslimovic D., Post B., Speelman J. D., Schmand B., *Cognitive profile of patients with newly diagnosed Parkinson disease*, Neurology, 65(8), 2005, s. 1239-1245.
16. Weintraub D., Claassen D.O., *Impulse Control and Related Disorders in Parkinson's Disease*, International Review of Neurobiology, 133, 2017, s. 679-717.
17. Mallon L., Broman J.E., Akerstedt T., Hetta J., *Insomnia in sweden: a population-based survey*, Journal of Sleep Disorders & Therapy, 2014.
18. Ylikoski A., Martikainen K., Sieminski M., *Parkinson's disease and insomnia*, Journal of the Neurological Sciences, 36, 2015, s. 2003-2010.
19. Mills K.A., Greene M.C., Dezube R., Goodson C., Karmarkar T., Pontone G.M., *Efficacy and tolerability of antidepressants in Parkinson's disease: A systematic review and network meta-analysis*, International Journal of Geriatric Psychiatry, 33(4), 2018, s. 642-651.
20. Bharucha K.J., Sethi K.D., *Complex movement disorders induced by fluoxetine*, Journal of Movement Disorders, 11(3), 1996, s. 324-326.
21. Remy P., Doder M., Lees A., Turjanski N., Brooks D., *Depression in Parkinson's disease: loss of dopamine and noradrenaline innervation in the limbic system*, Brain, 128(Pt 6), 2005, s. 1314-1322.
22. Weintraub D., Mavandadi S., Mamikonyan E., Siderowf A.D., Duda J.E., Hurtig H.I., Colcher A., Horn S.S., Nazem S., Ten Have T.R., Stern M.B., *Atomoxetine for depression and other neuropsychiatric symptoms in Parkinson disease*, Neurology, 75 (5), 2010, s. 448-455.
23. Barone P., Poewe W., Albrecht S., *Pramipexole for the treatment of depressive symptoms in patients with Parkinson's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial*, The Lancet Neurology, 9, (2010), s. 573.
24. Boileau I., Guttman M., Rusjan P., *Decreased binding of the D3 dopamine receptor-preferring ligand [11C]-(+)-PHNO in drug-naive Parkinson's disease*, Brain, 132(Pt 5), 2009, s.1366-1375.

25. Mierau J., Schneider F.J., Ensinger H.A., Chio C.L., Lajiness M.E., Huff R.M., *Pramipexole binding and activation of cloned and expressed dopamine D2, D3 and D4 receptors*, *European Journal of Pharmacology*, 290(1), 1995, s. 29-36.
26. Aarsland D., Marsh L., Schrag A., *Neuropsychiatric symptoms in Parkinson's disease*, *Journal of Movement Disorders*, 24(15), 2009, s. 2175-2186.
27. Hauser R.A., Zesiewicz T.A., *Sertraline for the treatment of depression in Parkinson's disease*, *Journal of Movement Disorders*, 12(5), 1997, s. 756-759.
28. Dell'Agnello G., Ceravolo R., Nuti A., *SSRIs do not worsen Parkinson's disease: evidence from an open-label, prospective study*, *Clinical Neuropharmacology*, 24(4), 2001, s. 221-227.
29. Richard I.H., McDermott M.P., Kurlan R., *A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of antidepressants in Parkinson disease*, *Neurology*, 78(16), 2012, s. 1229-1236.
30. Seppi K., Ray Chaudhuri K., Coelho M., *Update on treatments for nonmotor symptoms of Parkinson's disease-an evidence-based medicine review*, *Journal of Movement Disorders*, 34(2), 2019, s. 180-198.
31. Bomasang-Layno E., Fadlon I., Murray A.N., Himelhoch S., *Antidepressive treatments for Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis*, *Parkinsonism & Related Disorders*, 21(8), 2015, s. 833.
32. Dobkin R.D., Menza M., Allen L.A., *Cognitive-behavioral therapy for depression in Parkinson's disease: a randomized, controlled trial*, *American Journal of Psychiatry*, 168, 2011, s. 1066.

Współczesne spojrzenie na psychofarmakoterapię zaburzeń depresyjnych u chorych z chorobą Parkinsona

Streszczenie

Celem tej pracy było przedstawienie współczesnych doniesień na temat spektrum zaburzeń depresyjnych u chorych z Chorobą Parkinsona i ich farmakoterapii. Metoda: Przegląd i analiza doniesień naukowych w bazach naukowych Pubmed, Uptodate i Google Scholar. Wyniki: Badania nad depresją w przebiegu PD mają kilka potężnych ograniczeń. Badania nie uwzględniają heterogeniczności depresji w PD. Wiele z tych badań używa kompletnie nieadekwatnych narzędzi do oceny depresji – kwestionariuszów Becka czy Zunga, zamiast standardowych narzędzi psychiatrycznych, takich jak HAM-D czy MADRS. Z badań wynika, że depresja związana z PD może być oporna na powszechnie stosowaną klasę leków SSRI i wymaga zastosowania innych klas leków przeciwdepresyjnych. Metaanaliza sieci wykazała, że inhibitory monoaminooksydazy (safinamid lub rasagalina) miały największy leczniczy wpływ na depresję w PD (SMD (vs selektywne inhibitory wychwyty zwrotnego serotoniny) = -0,78, CI = -1,55, -0,01). Nie stwierdzono istotnych różnic w prawdopodobieństwie przerwania terapii pomiędzy MAOI, SARI, SSRI, trójpierścieniowymi i SNRI z ich odpowiednimi grupami porównawczymi, w odpowiedzi na uporczywe działania niepożądane. Wnioski: Większość badań skupia się na ocenie skuteczności leków z grupy SSRI, takich jak fluoksetyna czy escitalopram w terapii epizodów depresyjnych w PD. Badania skuteczności leczenia epizodów depresyjnych w PD są często na niewielkich liczebnie grupach pacjentów, co oczywiście utrudnia generalizację wyników. Należy zawsze oceniać pacjenta z PD pod kątem zaburzeń afektu oraz modyfikując leczenie, zwracać uwagę na profil farmakologiczny leków przeciwdepresyjnych i włączać do leczenia te, które w badaniach charakteryzują się największą skutecznością. Ciekawe jest, że powyższe leki badane są pod kątem neuroprotekcji, a wyniki badań na zwierzętach są optymistyczne.

Słowa kluczowe: epizody depresyjne, psychofarmakoterapia, Choroba Parkinsona, kwestionariusze diagnostyczne

Current view on psychopharmacotherapy of depression disorders in Parkinson's disease

Abstract

The aim of this work is to describe the spectrum of depression disorders among patients with Parkinson's disease (PD) and their treatment. Method: Review and analysis of scientific reports in the scientific bases Pubmed, Uptodate and Google Scholar. Results: Studies of depression in PD have several powerful limitations. Research don't take into account the heterogenic spectrum of depression in PD. Many of these studies use completely inadequate instruments to assess depression – the Beck or Zung questionnaires, instead of standardized psychiatric instruments such as HAM-D or MADRS. Studies show that depression associated with PD may be resistant to the commonly used class of SSRIs and require the use of different classes of antidepressants. A network meta-analysis showed that monoamine oxidase inhibitors (safinamide or rasagaline) had the greatest therapeutic effect on PD-related depression (SMD (vs selective serotonin reuptake inhibitors) = -0.78, CI = -1.55, -0.01). There were no significant differences in the likelihood of discontinuation of therapy compared to MAOI, SARI, SSRI, tricyclic and SNRIs with their respective comparator groups in response to persistent side effects. Conclusions: Most studies focus on assessing the effectiveness of SSRIs such as fluoxetine and escitalopram in the treatment of depressive episodes in PD. Studies on the effectiveness of treating depressive episodes in PD are often performed on small numbers of patients, which of course makes it difficult to generalize the results. It is important to always assess the PD patient for affect disorders and, when modifying treatment, pay attention to the pharmacological profile of antidepressants and include those that are most effective in research. It is interesting that the above-mentioned drugs are still being tested for neuroprotection and the results of animal studies are optimistic.

Keywords: depressive episodes, psychopharmacotherapy, Parkinson's disease, diagnostic questionnaires

Manualny drenaż limfatyczny, jako jedna z form terapii funkcji układu limfatycznego związanej z otyłością

1. Wprowadzenie

Otyłość jest definiowana, jako nieprawidłowe lub nadmierne nagromadzenie tkanki tłuszczowej prowadzące do pogorszenia stanu zdrowia [1]. Otyłość, charakteryzująca się zwiększonym magazynowaniem kwasów tłuszczowych w przerośniętej tkance tłuszczowej, jest głównym problemem zdrowotnym współczesnego społeczeństwa [2]. Dotychczasowe badania wykazały, że podłoże rozwoju otyłości jest wieloczynnikowe. Istotny wpływ odgrywają czynniki genetyczne, endokrynologiczne, metaboliczne, środowiskowe oraz psychologiczno-behawioralne [3-5]. Przewlekła otyłość predysponuje do rozwoju zespołu metabolicznego i zwiększa zapadalność na cukrzycę typu 2 (T2D), powoduje wzrost ryzyka rozwoju insulinooporności, miażdżycy, choroby niedokrwiennej serca, zespołu policystycznych jajników, nadciśnienia, jak też chorób nowotworowych [6, 7]. Ryzyko pojawienia się schorzeń powiązanych z otyłością zależy nie tylko od jej stopnia, ale również od dystrybucji tkanki tłuszczowej. W otyłości typu brzuszego (centralnej) wzrasta przede wszystkim ryzyko rozwoju cukrzycy, nadciśnienia tętniczego i miażdżycy [8]. Otyłość pośladowko-udowa sprzyja zaś wystąpieniu nowotworów hormonozależnych: macicy, jajnika, sutka oraz przewodu pokarmowego [8, 9].

Wiele prac zostało poświęconych tematyce badania wpływu otyłości na zaburzenia czynności naczyń krwionośnych. Natomiast jedynie w nieznacznym stopniu został poznany wpływ otyłości na drugi system krążeniowy, jakim jest układ limfatyczny [10-12].

Na przestrzeni ostatnich kilku lat pojawiły się dowody wskazujące, że dysfunkcja naczyń limfatycznych jest zaangażowana w patogenezę otyłości i dyslipidemii związanej z otyłością, jak również rozwoju przewlekłego zapalenia o niskim stopniu nasilenia [11, 13-15]. W świetle najnowszych doniesień wiadomo, że leczenie otyłości wymaga podejścia wielokierunkowego. Oprócz leczenia farmakologicznego coraz częściej diabetolodzy, dietetycy i fizjoterapeuci zalecają zwiększoną aktywność fizyczną oraz prawidłowo zbilansowaną dietę w zwalczaniu otyłości. Prowadzone są również badania w kierunku poszukiwania innych nefarmakologicznych form wspierania leczenia otyłości i jej następstw [16-19].

¹ klaudia.antoniak@gumed.edu.pl, Zakład Immunobiologii i Mikrobiologii Środowiska, Gdański Uniwersytet Medyczny ul.Dębinki 7, budynek 15, 80-211, Gdańsk; tel. 58 349 17 66.

² katarzyna.zorena@gumed.edu.pl, Zakład Immunobiologii i Mikrobiologii Środowiska, Gdański Uniwersytet Medyczny ul.Dębinki 7, budynek 15, 80-211, Gdańsk; tel. 58 349 17 66.

³ rita.hansdorfer-korzon@gumed.edu.pl, Zakład Fizjoterapii, Gdański Uniwersytet Medyczny, ul. Dębinki 7, 80-211, Gdańsk; tel. 58 349 15 09.

Celem pracy jest przegląd najnowszych badań dotyczących zależności pomiędzy funkcją układu limfatycznego a występowaniem otyłości. Ponadto przedstawienie możliwości zastosowania manualnego drenażu limfatycznego w różnych jednostkach chorobowych w tym otyłości, jako jednej z form terapii funkcji układu limfatycznego.

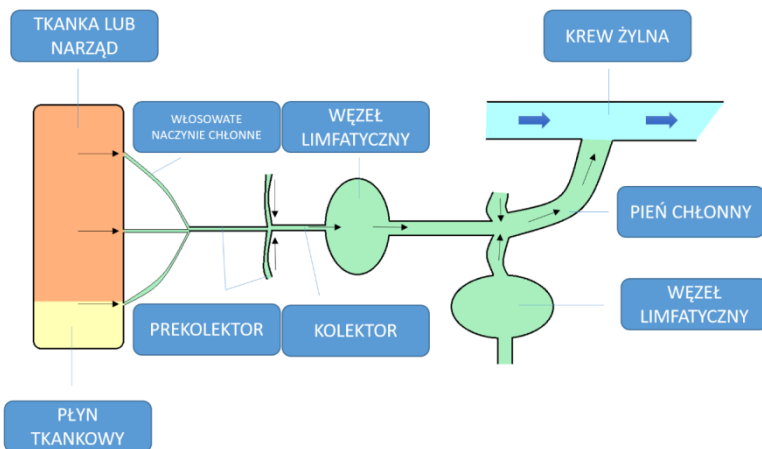
2. Układ limfatyczny

2.1. Budowa układu limfatycznego

Układ limfatyczny rozmieszczony jest w całym organizmie, składa się z narządów i naczyń limfatycznych [20]. W przeciwieństwie do układu krwionośnego stanowi jednokierunkową drogę transportu z przestrzeni pozakomórkowej do naczyń żylnych. W układzie limfatycznym narządy limfatyczne zostały sklasyfikowane, jako narządy limfatyczne pierwotne i narządy limfatyczne wtórne. Pierwotne narządy limfatyczne obejmują grasicę i szpik kostny, odpowiedzialne są za produkcję, dojrzewanie i selekcję komórek odpornościowych. Z pierwotnych narządów chłonnych limfocyty przedostają się do narządów limfatycznych wtórnych tj. śledziony, węzłów chłonnych, tkanki chłonnej błony śluzowej, tkanki chłonnej oskrzeli, tkanki chłonnej jelit, gdzie odbywa się namnażanie oraz dojrzewanie komórek układu odpornościowego [21, 22].

Natomiast system naczyń limfatycznych, to jednokierunkowa sieć, która ze względu na funkcję, jak również wielkość naczyń podzielona jest na cztery części. Naczynia limfatyczne zaczynają się, jako tępo zakończone naczynia włosowate (kapilary limfatyczne). Naczynia włosowate limfatyczne różnią się od włosowatych naczyń krwionośnych obecnością nieciąglej błony podstawnej, brakiem pericytów, nieregularnym ukształtowaniem światła naczynia, tworząc bezzastawkowy system naczyń, gęstą sieć oplatającą ciało [23]. Kapilary limfatyczne obecne są we wszystkich tkankach, z wyjątkiem centralnego układu nerwowego, szpiku kostnego i tkanek nieunaczynionych: chrząstki, rogówki oraz naskórka [24]. Naczynia chłonne włosowate składają się z pojedynczej warstwy limfatycznych komórek śródbłonka, połączonych bezpośrednio z tkanką śródmiąższową poprzez „zakotwiczenie” w otaczającej tkance łącznej za pomocą delikatnych filamentów, które zbudowane są z emiliny i fibryliny [2]. „Zakotwiczenie” ściany naczynia limfatycznego do otaczającej tkanki łącznej ma istotne znaczenie podczas występowania stanu zapalnego, jak również obrzęku. W stanie zapalnym bądź obrzęku naprężone filamenty oddalają od siebie komórki ściany naczynia, co umożliwia bierne otwieranie się połączeń międzykomórkowych i przepływ płynu do światła naczynia [25]. Dodatkowo komórki śródbłonka naczyń limfatycznych zazębiają się wzajemnie swymi wypustkami tworząc typowe połączenia międzykomórkowe: płytki zamykające. W odpowiedzi na różnice ciśnienia, płytki zamykające mogą się otwierać i zamykać, aby regulować ponowne wchłanianie płynów, a także wchłanianie makrocząsteczek i komórek odpornościowych z przestrzeni pozakomórkowej do naczynia chłonnego [2, 26]. Zatem funkcją kapilarów limfatycznych jest drenaż płynu tkankowego, w wyniku czego powstaje przesącz tkankowy zwany limfą. Ze względu na brak zastawek chłonka może przepływać w nich w różnych kierunkach [27]. Kapilary limfatyczne zbiegają się w prekolektory, naczynia o większej średnicy, znajdujące się pomiędzy kapilarami limfatycznymi i kolektorami. Z racji swojego położenia funkcja prekolektorów zbliżona jest częściowo do kapilarów, częściowo odpowiadają za resorpcję płynu tkankowego. Inne odcinki natomiast

odpowiadają za transport limfy do kolektorów. Kolejną część układu naczyń limfatycznych stanowią kolektory, które są właściwymi naczyniami transportowymi. Podobnie jak naczynia żyłne posiadają zastawki. Zastawki kolektorów zazwyczaj są ułożone parzyście i zapobiegają powrotnemu przepływowi limfy. Odległość między dwoma zastawkami jest zależna od przekroju poprzecznego naczynia i stanowi jego około trzy- do dziesięciokrotności. W związku, z czym w małych naczyniach zastawki występują w odległości 0,6-2 cm, zaś w dużym przewodzie piersiowym, co około 6-10 cm. Odległość między dwoma zastawkami nazywana jest limfangionem, dzięki skurczowi tego odcinka limfa przesuwana jest ku przodowi [20, 27-29]. Z kolektorów płyn tkankowy trafia do głównych naczyń limfatycznych nazywanymi pniami limfatycznymi. Zbierające się naczynia limfatyczne przemieszczają się przez łańcuchy węzłów chłonnych, co umożliwi dostarczanie wolnych antygenów i komórek dendrytycznych obciążonych antygenem z tkanki śródmiąższowej w celu stymulacji immunologicznej; centralny układ naczyń limfatycznych ostatecznie łączy się z żyłami podobojczykowymi przez przewód piersiowy, przetransportowując płyn śródmiąższowy przefiltrowany przez węzły chłonne z powrotem do układu krążenia. Chłonka dolnej połowy ciała i lewej górnej części ciała uchodzi przewodem piersiowym do lewego kąta żylnego. Chłonka prawej górnej części ciała płynie przewodem prawym do prawego kąta żylnego [2, 30]. Proponowany mechanizm transportu limfy został przedstawiony na rysunku 1.



Rysunek 1. Proponowany mechanizm transportu limfy w naczyniach chłonnych, opracowanie własne na podstawie [20, 27, 28]

2.2. Funkcja układu limfatycznego

Układ limfatyczny stanowi ważną rolę w utrzymaniu homeostazy organizmu. Utrzymuje równowagę płynów, zapobiegając obrzękom, zapewnia drenaż i filtrację płynu śródmiąższowego, częściowo odpowiada za transport lipidów oraz pełni funkcję immunologiczną [15, 22]. Podstawowa czynność naczyń limfatycznych polega na oczyszczaniu przestrzeni międzykomórkowej z płynów i substancji, które nie mogą być wchłaniane przez łożysko naczyń żylnych [27, 28, 31].

2.3. Transport lipidów za pośrednictwem układu limfatycznego

W organizmie człowieka wchłanianie lipidów z oraz zwrotne usuwanie cholesterolu jest regulowane przez naczynia limfatyczne [32]. Naczynia środkowe kosmków jelitowych (naczynia mleczone) absorbują lipidy w jelicie cienkim przy pomocy chylomikronów bezpośrednio do krwi z pominięciem żyły wrotnej. Dzięki temu lipidy unikają bezpośredniego kontaktu z wątrobą, a trafiają do narządów, gdzie mogą być metabolizowane [15]. Obrazowanie dożylnie wskazuje, że naczynia chłonne kosmków jelitowych mają spontaniczną możliwość kurczenia się, aktywnie absorbują i transportują lipidy przetworzone przez enterocyty do krążenia ogólnoustrojowego, zachodzi to wraz ze skurczem sąsiadujących komórek mięśni gładkich, a kontrolowane jest przez autonomiczny układ nerwowy [33].

Wykazano, że naczynia chłonne środkowych kosmków jelitowych mleczone kontrolują wchłanianie lipidów z pokarmów, co w konsekwencji może wpływać na masę ciała [34, 35].

W tkankach obwodowych układ naczyń limfatycznych jest uważany za jedyną drogę powrotu lipoprotein do krążenia krwi [36]. Usuwanie cholesterolu z płynu śródmiąższowego drogą limfatyczną jest znane, jako odwrotny transport cholesterolu [37]. Badania wykazują, że układ limfatyczny odgrywa szczególną rolę w transporcie i metabolizmie cholesterolu z tkanek obwodowych do osocza, a jego upośledzone funkcjonowanie prowadzi do akumulacji cholesterolu w tkankach. Autorzy sugerują, że wspieranie funkcji transportu limfatycznego może zmniejszyć stężenie cholesterolu tym samym zmniejszając ryzyko następstw wynikających z zaburzeń gospodarki lipidowej [10].

3. Wzajemna zależność między otyłością a układem limfatycznym

Czynniki genetyczne, endokrynologiczne, metaboliczne, środowiskowe oraz psychologiczno-behawioralne wpływają na produkcję fizjologicznych mediatorów, które kontrolują równowagę pomiędzy wydatkiem, a poborem energetycznym [3, 4, 38]. Badania wykazały, że, jeżeli spożycie produktów jest nadmierne, około 70-80% spożycia jest magazynowane w postaci tkanki tłuszczowej, a pozostała część jest przekształcana w glikogen lub białko lub zużywana, jako energia. Długoterminowy dodatni bilans energetyczny ostatecznie prowadzi do otyłości [38].

Układ limfatyczny w obrębie zaburzonej tkanki tłuszczowej wykazuje zmniejszenie gęstości naczyń limfatycznych, **kompresje komórek tłuszczowych na kolektory limfatyczne**, co w efekcie może powodować upośledzenie oczyszczania tkanek z makrocząsteczek oraz opóźnienie przepływu i intensywności transportu płynu limfatycznego [10-12, 14]. W pracy Greene i wsp. autorzy sugerują, że otyłość może prowadzić do zastojów limfatycznych, powodujących dysfunkcję układu limfatycznego do odprowadzania z przestrzeni śródmiąższowej nadmiaru makrocząsteczek takich jak lipidy i białka oraz prowadzić do upośledzenia transportu kompleksów immunologicznych, limfocytów T, czy komórek Langerhansa. Ponadto badacze wskazują również na możliwość upośledzenia działania komórek prezentujących antygen oraz możliwe występowanie zaburzeń w strukturze węzłów chłonnych [13, 40]. Dodatkowo w pracy autorstwa Helyer i wsp. wykazano, że otyłość znacznie zwiększa ryzyko rozwoju obrzęku limfatycznego u pacjentek pooperacyjnych z rakiem piersi [41].

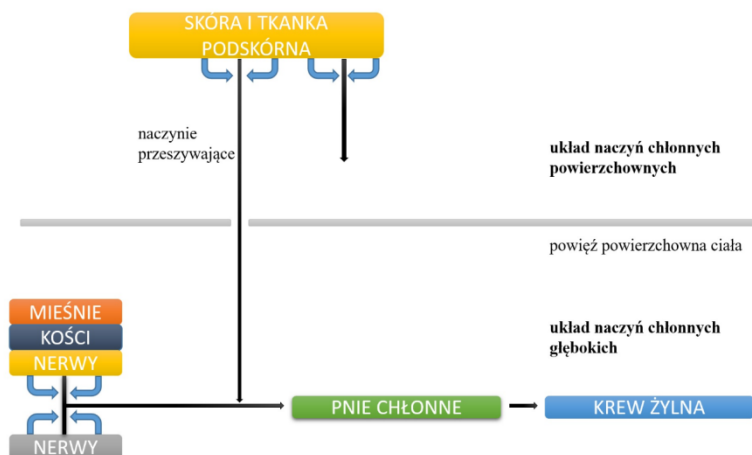
Prace nad wpływem otyłości na układ limfatyczny były przeprowadzane również na myszach, autorzy wykazali, dodatnią zależność pomiędzy przyrostem masy a zmniejszającą się funkcją układu limfatycznego, charakteryzującą się zmniejszoną gęstością naczyń limfatycznych i zmniejszoną częstotliwością pompowania naczyń limfatycznych [14]. Następnie Weitman i wsp. w badaniu na myszach zaobserwowali, że otyłość indukowana dietą wysokotłuszczową spowodowała znaczne upośledzenie transportu płynu limfatycznego. Ponadto, u otyłych myszy wykazano mniejsze węzły chłonne z mniejszą liczbą naczyń limfatycznych [11]. Z dotychczasowych publikacji wynika, że utrata masy ciała może odwrócić zaburzenia limfatyczne wywołane otyłością, co sugeruje, że zmiany patologiczne w układzie limfatycznym mogą być odwracalne [14].

Kilka badań potwierdza pogląd, że dysfunkcje w układzie limfatycznym mogą brać również udział w patogenezie otyłości. U pacjentów z obrzękiem limfatycznym (wtórnym) wywołanym urazem, obserwowany jest wyraźny przerost tkanki tłuszczowej oraz towarzyszący obrzęk i zwłóknienie tkanek [2]. W badaniu Karkkainen i wsp. u myszy z nieprawidłowym rozwojem naczyń limfatycznych, wykazano również nieprawidłową akumulację lipidów w regionie hipoplastycznego naczynia limfatycznego [42]. Badania te sugerują, że dysfunkcja limfatyczna sprzyja otyłości, a tym samym przywrócenie funkcji limfatycznych może hamować rozwój otyłości i łagodzić wywołany otyłością zespół metaboliczny. Zarówno otyłość pogarsza funkcję układu limfatycznego, jak również dysfunkcje w układzie limfatycznym mogą mieć wpływ na rozwój otyłości [2, 11, 14].

4. Manualny drenaż limfatyczny – jako jedna z form terapii przywrócenia sprawności układu limfatycznego

Transport limfy w naczyniach limfatycznych zależny jest od ruchów oddechowych, tętniczej fali pulsacyjnej, pompy mięśniowej i stawowej [27]. Usprawnienie przepływu limfy może częściowo podlegać oddziaływaniu fizjoterapeutycznemu. Manualny drenaż limfatyczny (MDL), jako jedna z form fizjoterapii, ma na celu wspomaganie pracy układu limfatycznego poprzez zwiększenie przepływu limfy. Brak zastawek w kapilarach umożliwia swobodne przemieszczanie się limfy, co wykorzystywane jest do przesuwania nadwyżki płynu tkankowego w kierunku węzłów chłonnych, skąd jest transportowana do nerek i usuwana z organizmu. W MDL wykorzystywana jest jednocześnie obecność naczyń przesywających (poprzecznych połączeń przesywających powięź) znajdujących się pomiędzy naczyniami chłonnymi powierzchownymi a naczyniami chłonnymi głębokimi i trzewnymi. W wyniku oddziaływania na naczynia przesywające możliwe jest odciążenie naczyń chłonnych głębokich [27, 43]. Proponowany mechanizm pośredniego oddziaływania na układ naczyń chłonnych głębokich został przedstawiony na rysunku 2.

Manualny drenaż limfatyczny ma znaczący wpływ na produkcję limfy oraz podwyższenie limfangiomotoryki. Zwiększona objętość limfy przyczynia się do rozciągnięcia wewnętrznej ściany limfangionu. Ponadto ruchy okrężne stosowane w MLD powodują rozciąganie naczynia chłonnego od zewnątrz. Zgodnie z prawem Franka Starlinga następuje wtedy wzrost czasowej objętości limfy. W efekcie stymulowania układu limfatycznego podnosi się również liczba limfocytów transportowanych w jednostce czasu [27].



Rysunek 2. Proponowany mechanizm pośredniego oddziaływania na układ naczyń chłonnych głębokich, opracowanie własne na podstawie [27, 28]

Techniki stosowane w MDL powodują stymulację przepływu limfy w dwóch fazach. W MDL rozróżniana jest faza przesuwania, w której stosowane są bodźce rozciągające ścianę naczyń, wzmagające ich limfangiomotorykę oraz faza odprężenia, w której poprzez działanie ssące ma miejsce ponowne ich napełnienie. MDL pośrednio powoduje przyspieszenie usuwania szkodliwych metabolitów z tkanek ciała, zwiększenie dynamiki płynów ustrojowych oraz zmniejszenie odpowiedzi współczulnego układu nerwowego, jednocześnie zwiększając aktywację jego części przywspółczulnej [44, 45].

Manualny drenaż limfatyczny jest jedną z metod leczenia manualnego stosowaną najczęściej u pacjentów po zabiegach chirurgicznych, radioterapii czy w chorobach nowotworowych [46, 47], jak też u pacjentów z niewydolnością serca [48]. W dostępnych bazach ukazuje się coraz więcej badań wskazujących na efektywną terapię MDL w innych dolegliwościach w tym leczeniu kobiet z niepłodnością [49], a także w leczeniu trądziku różowatego z przewlekłym obrzękiem limfatycznym twarzy [50]. Inne badania dowodzą o skuteczności stosowania manualnego drenażu limfatycznego we wspomaganie leczenia oparzeń [51], jak też w celu obniżania aktywności fal mózgowych alfa u pacjentów ze stresem psychicznym [45]. Manualny drenaż limfatyczny szczególne zastosowanie znajduje w leczeniu obrzęków limfatycznych oraz tłuszczowych, które mogą wynikać z wad genetycznych, zastojów żylnych, nadmiernego wysiłku fizycznego, urazów, czy chorób nowotworowych [52, 53].

W ostatnich latach ukazały się nieliczne badania sugerujące możliwość przywrócenia sprawności układu limfatycznego związanej z otyłością [18, 19, 43]. We wstępnych badaniach wykazano, że zastosowanie manualnego drenażu limfatycznego jamy brzusznej może mieć wpływ na gospodarkę lipidową, jak i węglowodanową, usprawnić motorykę układu limfatycznego, a tym samym polepszyć komfort życia pacjentów z nieprawidłową masą ciała [18, 19]. Terapia manualna poprawiająca przepływ limfy, może być dobrze tolerowaną, stosunkowo niedrogą metodą poprawy funkcji limfatycznej u pacjentów z otyłością [54].

5. Podsumowanie

Cukrzyca typu 2, insulinooporność, dyslipidemia, nadciśnienie tętnicze i choroby sercowo-naczyniowe związane z otyłością są główną przyczyną zgonów w krajach rozwiniętych [55]. Istnieje potrzeba poprawy opieki medycznej, jak również rozszerzenia nefarmakologicznych metod wspomaganie leczenia otyłości. Zrozumienie mechanizmów leżących u podstaw chorób cywilizacyjnych znacznie wzrosło, lecz wciąż potrzebne są nowe badania. Dotychczasowe nieliczne jeszcze badania wskazują na znaczącą rolę układu limfatycznego w metabolizmie tkanki tłuszczowej i otyłości. W ciągu ostatnich kilku lat pojawiły się badania wskazujące, że otyłość może powodować patologiczne zmiany w układzie limfatycznym, które mogą upośledzać jego funkcję [10]. W pracach wykazano również, że dysfunkcje limfatyczne mogą mieć wpływ na rozwój otyłości, a tym samym przywrócenie prawidłowych funkcji limfatycznych może hamować rozwój otyłości [2, 11, 14]. Zastosowanie manualnego drenażu limfatycznego w otyłości może wskazać nowe cele terapeutyczne. Dobre efekty stosowania manualnego drenażu limfatycznego w innych jednostkach chorobowych wskazują na zasadność wdrożenia terapii u pacjentów z otyłością.

Finansowanie

Gdański Uniwersytet Medyczny, projekt, ST-02-0108/ 07/780.

Konflikt interesów: Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów.

Literatura

1. West S.L., *The Epidemic of Obesity and Poor Physical Activity Participation: Will We Ever See a Change*, Journal of Functional Morphology and Kinesiology, 3:34, 2018.
2. Jiang X., Nicolls M.R., Tian W., Rockson S.G., *Lymphatic Dysfunction, Leukotrienes, and Lymphedema*, Annual Review of Physiology, 10; 80, 2018, s. 49-70.
3. Bašić M., *Obesity: Genome and environment interactions*, Archives of Industrial Hygiene and Toxicology, 63(3), 2012, s. 395-405.
4. Engin A., *The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome*, Advances in Experimental Medicine and Biology, 960, 2017, s. 1-17.
5. Zorena K., Jachimowicz-Duda O., Ślęzak D., Robakowska M., Mrugacz M., *Adipokines and Obesity. Potential Link to Metabolic Disorders and Chronic Complications*, International journal of molecular sciences, vol. 21, 10 3570, 2020.
6. Esser N., Legrand-Poels S., Piette J., Scheen A.J., Paquot N., *Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes*, Diabetes Research and Clinical Practice, Aug; 105(2), 2014, s. 141-50.
7. Miczke A., Szulińska M., Hansdorfer-Korzon R., Kręgielska-Narożna M., Suliburska J., Walkowiak J., Bogdański P., *Effects of spirulina consumption on body weight, blood pressure, and endothelial function in overweight hypertensive Caucasians: a double-blind, Placebo-Controlled, Randomized Trial*, European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 20(1), 2016, s. 150-156.
8. Matsuda M., Shimomura I., *Increased oxidative stress in obesity: Implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer*, Obesity Research & Clinical Practice, Sep-Oct;7(5), 2013, s. 330-341.
9. Tumminia A., Vinciguerra F., Parisi M., Graziano M., Sciacca L., Baratta R., Frittitta L., *Adipose Tissue, Obesity and Adiponectin: Role in Endocrine Cancer Risk*, International Journal of Molecular Sciences, Jun 12;20(12), 2019, s. 2863.
10. Escobedo N., Oliver G., *The lymphatic vasculature: its role in adipose metabolism and obesity*, Cell Metabolism, 26(4), 2017, s. 589-609.

11. Weitman E.S., Aschen S.Z., Farias-Eisner G., Albano N., Cuzzone D.A., Ghanta S., Zampell J.C., Thorek D., Mehrara B.J., *Obesity impairs lymphatic fluid transport and dendritic cell migration to lymph nodes*, Public Library of Science, Aug 12;8(8), s. 2013.
12. Ariyagunaratnam R., Chen H.H., *To be or not to be obese: impact of obesity on lymphatic function*, The Journal of Physiology, 595(5), 2017, s. 1449-1450.
13. Greene A.K., *Obesity-induced lymphedema: clinical and lymphoscintigraphic features*, Plastic and Reconstructive Surgery, 06, 2015, s. 1715-1719.
14. Nitti M.D., Hespe G.E., Kataru R.P., García Nores G.D., Savetsky I.L., Torrisi J.S., Gardenier J.C., Dannenberg A.J., Mehrara B.J., *Obesity-induced lymphatic dysfunction is reversible with weight loss*, Journal of Physiology, Dec 1;594 (23), 2016, s. 7073-7087.
15. Aspelund A., Robciuc M.R., Karaman S., Makinen T., Alitalo K., *Lymphatic System in Cardiovascular Medicine*, Circulation Research, Feb 5;118(3), 2016, s. 515-530.
16. Hall K.D., Guo J., *Composition, Obesity Energetics: Body Weight Regulation and the Effects of Diet*, Gastroenterology, 05, 2017, s. 1718-1727.
17. Boff W., da Silva A.M., Farinha J.B., Rodrigues-Krause J., Reischak-Oliveira A., Tschiedel B., Puñales M., Bertoluci M.C., *Superior Effects of High-Intensity Interval vs. Moderate-Intensity Continuous Training on Endothelial Function and Cardiorespiratory Fitness in Patients With Type 1 Diabetes: A Randomized Controlled Trial*, Frontiers in Physiology, Apr 24; 10:450, 2019.
18. Antoniak K., Zorena K., Hansdorfer-Korzon R., *Zastosowanie drenażu limfatycznego jamy brzusznej u osób z nieprawidłową masą ciała: badania wstępne*, III Pabianicka Konferencja Młodych Naukowców, Pabianice, 7 grudnia 2019, s. 28.
19. Antoniak K., Zorena K., Hansdorfer-Korzon R., *Manualny drenaż limfatyczny u osób z nieprawidłową masą ciała – opis przypadków*, Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Wyzwania i problemy nauk biomedycznych” 17 września 2020 r. Wystąpienia Uczestników, 2020, s. 21-22.
20. Hsu M.C., Itkin M., *Lymphatic Anatomy*, Techniques in Vascular and Interventional Radiology, Dec;19(4), 2016, s. 247-254.
21. Choi I., Lee S., Hong Y.K., *The new era of the lymphatic system: no longer secondary to the blood vascular system*, Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2(4), 2012.
22. Ruddle N.H., Akirav E.M., *Secondary lymphoid organs: responding to genetic and environmental cues in ontogeny and the immune response*, The Journal of Immunology, Aug 15, 183(4) 2009, s. 2205-2212.
23. Schulte-Merker S., Sabine A., Petrova T.V., *Lymphatic vascular morphogenesis in development, physiology, and disease*, Journal of Cell Biology, May 16;193(4), 2011, s. 607-18.
24. Ratajska A., Jankowska-Steifer E., Czarnowska E., Flaht A., Radońska-Leśniewska D., *Morfogeneza, budowa i właściwości naczyń limfatycznych [Morphogenesis, structure and properties of lymphatic vessels]*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, Nov 19;66, 2012, s. 901-912.
25. Alders M., Hogan B.M., Gjini E., Salehi F., Al-Gazali L., Hennekam E.A., Holmberg E.E., Mannens M.M., Mulder M.F., Offerhaus G.J., Prescott T.E., Schroor E.J., Verheij J.B., Witte M., Zwijnenburg P.J., Vikkula M., Schulte-Merker S., Hennekam R.C., *Mutations in CCBE1 cause generalized lymph vessel dysplasia in humans*, Nature Genetics, Dec;41(12), 2009, s. 1272-1274.
26. Yao L.C., Baluk P., Srinivasan R.S., Oliver G., McDonald D.M., *Plasticity of button-like junctions in the endothelium of airway lymphatics in development and inflammation*, The American journal of pathology, vol. 180, 6, 2012, s. 2561-2575.
27. Földi M., Strosenreuther R., *Foundations of manual lymph drainage*, Wydawnictwo Mosby, 2005.
28. Schunke M.S.E. *Prometeusz atlas anatomii człowieka tom 2 Narządy wewnętrzne*, Wydawnictwo Medpharm, 2017.

29. Andrade M., Jacomo A., *Anatomy of the Human Lymphatic System, Cancer Metastasis And The Lymphovascular System: Basis For Rational Therapy*, Vol 135 2007, s. 55-77.
30. Thomas S.N., Rohner N.A., Edwards E.E., *Implications of Lymphatic Transport to Lymph Nodes in Immunity and Immunotherapy*, Annual Review of Biomedical Engineering, Jul 11;18, 2016, s. 207-233.
31. Tak W. Mak, *Chapter 2 – Components of the Immune System*, Primer to the Immune Response (Second Edition) Academic Cell, 2014, s. 21-54.
32. Randolph G.J., Miller N.E., *Lymphatic transport of high-density lipoproteins and chylomicrons*, The Journal of Clinical Investigation, 124,3, 2014, s. 929-935.
33. Choe K., Jang J.Y., Park I., Kim Y., Ahn S., Park D.Y., Hong Y.K., Alitalo K., Koh G. Y., Kim P., *Intravital imaging of intestinal lacteals unveils lipid drainage through contractility*, Journal of Clinical Investigation, Nov 2;125(11), 2015, s. 4042-4052.
34. McDonald D.M., *Tighter lymphatic junctions prevent obesity*, Science, Aug 10;361, 2018, s. 551-552.
35. Zhang F.Z., *Lacteal junction zippering protects against diet-induced obesity*, Science, Aug 10;361, 2018, s. 599-603.
36. Cooke C.J., *Variations in lipid and apolipoprotein concentrations in human leg lymph: effects of posture and physical exercise*, Atherosclerosis, 173(1), 2004, s. 39-45.
37. Huang L.H., Elvington A., Randolph G.J., *The role of the lymphatic system in cholesterol transport*, Frontiers in Pharmacology, Sep 2;6, 2015, s. 182.
38. González-Muniesa P., Martínez-González M.A., Hu F.B., Després J.P., Matsuzawa Y., Loos R.J.F., Moreno L.A., Bray G.A., Martínez J.A., *Obesity*, Nature Reviews Disease Primers, Jun 15;3, 2017.
39. Oussaada S.M., van Galen K.A., Cooman M.I., Kleinendorst L., Hazebroek E.J., van Haelst M.M., Ter Horst K.W., Serlie M.J., *The pathogenesis of obesity*, Metabolism, Mar; 9: 2019, s. 26-36.
40. Greene A.K., *Lower-extremity lymphedema and elevated*, The New England Journal of Medicine, May 31; 366(22), 2012, s. 2136-2137.
41. Helyer L.K., Varnic M., Le L.W., Leong W., McCready D., *Obesity is a risk factor for developing postoperative lymphedema in breast cancer patients*, Breast Journal, Jan-Feb;16(1), 2010, s. 48-54.
42. Karkkainen M.J., Saaristo A., Jussila L., Karila K.A., Lawrence E.C., Pajusola K., Bueler H., Eichmann A., Kauppinen R., Kettunen M.I., Yla-Herttua S., Finegold D.N., Ferrell R.E., Alitalo K., *A model for gene therapy of human hereditary lymphedema*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Oct 23;98(22), 2001, s. 12677-82.
43. Varaliová Z., Vlasák R., Čížková T., Gojda J., Potočková J., Šiklová M., Krauzová E., Štěpán M., Bülow J., Štich V., Rossmeislová L., *Lymphatic drainage affects lipolytic activity of femoral adipose tissue in women*, International Journal of Obesity, Sep;44(9), 2020, s. 1974-1978.
44. Vairo G.M., *Systematic Review of Efficacy for Manual Lymphatic Drainage Techniques in Sports Medicine and Rehabilitation: An Evidence-Based Practice Approach*, The Journal Of Manual & Manipulative Therapy, 06, 2009, s. 80-89.
45. Shim J.M., Yeun Y.R., Kim H.Y., Kim S.J., *Effects of manual lymph drainage for abdomen on the brain activity of subjects with psychological stress*, The Journal of Physical Therapy Science, Mar; 29(3), 2017, s. 491-494.
46. Hansdorfer-Korzon R., *Are compression corsets beneficial for the treatment of breast cancer-related lymphedema? New opportunities in physiotherapy treatment – a preliminary report*, OncoTargets and Therapy, 2016, s. 2089-9.
47. Shao Y., Zhong D.S., *Manual lymphatic drainage for breast cancer-related lymphedema*, European Journal of Cancer Care, Sep, 26(5), 2017.

48. Vaassen M.M., *Manual Lymph Drainage in a Patient with Congestive Heart Failure: A Case Study*, *Ostomy Wound Management*, Oct; 61(10), 2015, s. 38-45.
49. Kramp M.E., *Combined manual therapy techniques for the treatment of women with infertility: a case series*, *The Journal of the American Osteopathic Association*, Oct; 112(10), 2012, s. 680-684.
50. Kutlay S., *Complete Decongestive Therapy Is an Option for the Treatment of Rosacea Lymphedema (Morbihan Disease): Two Cases*, *Physical Therapy*, Apr 1; 99(4), 2019, s. 406-410.
51. Loskotová A., Loskotová J., Suchanek I., Brychta P., Lipový B., *Myofascial-manual lymphatic drainage for burn trauma: a service evaluation*, *British Journal of Community Nursing*, May 1;22, 2017, s. 6-12.
52. Kim J., Jeon J.Y., Chae S., Kwon S., Kim H.J., Yoo M.R., Kang C.J., *Prognostic Factors of Quantitative Lymphoscintigraphic Findings in Patients with Breast Cancer-Related Lymphedema*, *Lymphatic Research and Biology*, Mar 27, 2020.
53. Jones G.E., Mansour S., *An approach to familial lymphedema*, *Clinical Medicine (Lond)*, 17(6), 2017, s. 552-557.
54. Huggenberger R., Siddiqui S.S., Brander D., Ullmann S., Zimmermann K., Antsiferova M., Werner S., Alitalo K., Detmar M., *An important role of lymphatic vessel activation in limiting acute inflammation*, *Blood*, Apr 28;117(17), 2011, s. 4667-78.
55. Benjamin E. J., Muntner P., Alonso A., Bittencourt M.S., Callaway C.W., Carson A.P. *Heart disease and stroke statistics – 2019 update: a report from the American Heart Association*, *Circulation*, 139, 2019, s. 56-528.

Manualny drenaż limfatyczny, jako jedna z form terapii funkcji układu limfatycznego związanej z otyłością

Streszczenie

Cukrzyca typu 2 (T2D), insulinooporność, dyslipidemia, nadciśnienie tętnicze i choroby sercowo-naczyniowe związane z otyłością są główną przyczyną zgonów w krajach rozwiniętych. Wiele prac zostało poświęconych tematyce badania wpływu otyłości na zaburzenia czynności naczyń krwionośnych. Natomiast jedynie w nieznacznym stopniu został poznany wpływ otyłości na układ limfatyczny. W niniejszej pracy omówiono rolę układu limfatycznego w otyłości, ze szczególnym uwzględnieniem funkcji transportu lipidów. Omówiono, w jaki sposób otyłość może upośledzić funkcję limfatyczną oraz jakie nieprawidłowości w układzie limfatycznym mogą przyczynić się do rozwoju otyłości. Omówiono również terapię manualnego drenażu limfatycznego, jako jednej z form terapii przywrócenia sprawności układu limfatycznego. Autorzy przedstawili dostępną literaturę z PubMed, Scopus, PEDro oraz zacytowali naukowe czasopisma i książki zarówno z diabetologii jak też fizjoterapii.

Słowa kluczowe: otyłość, układ limfatyczny, manualny drenaż limfatyczny

Manual lymphatic drainage as one of the forms of therapy of the lymphatic system functions related to obesity

Abstract

The main reason for death in the well-developed countries are diabetes of type 2 (T2D), dyslipidemia, high blood pressure, insulin resistance and cardiovascular diseases. There is a lot of research which has been devoted to analyzing the influence of obesity on the disorders of blood vessels. However, the impact of obesity on the lymphatic system has never been researched in-depth. This work discussed the role of lymphatic system in obesity with particular inclusion of the lipid transport function. There were two topics covered. How the obesity can disable the lymphatic function and what are the irregularities in the lymphatic system that can cause obesity. The manual lymphatic drainage as one of the forms of therapy to restore the efficiency of the lymphatic system is also discussed. The authors presented the available literature from PubMed, Scopus, PEDro and cited scientific journals and books on both diabetology and physiotherapy.

Keywords: obesity, lymphatic system, manual lymphatic drainage

Alginian sodu jako biomateriał stosowany w leczeniu zwężenia cewki moczowej

1. Wprowadzenie

Zwężenie cewki moczowej jest obecnie powszechnym patologicznym zjawiskiem dotykającym głównie grupę mężczyzn, gdzie częstotliwość występowania wzrasta wraz z wiekiem. Najczęściej spowodowane jest to stanem zapalnym o różnym pochodzeniu. Schorzenie to prowadzi do częściowego, a niekiedy nawet całkowitego zamknięcia kanału cewki moczowej, uniemożliwiając swobodny przepływ moczu [1, 2]. Dawniej zwężenie cewki moczowej leczono wykorzystując otwarte zabiegi operacyjne. Obecnie poszukuje się metod mniej inwazyjnych, powodujących jak najmniejsze oddziaływanie na tkanki. Jedną ze skuteczniejszych metod leczenia jest zastosowanie stentów cewki moczowej. Stentowanie z powodzeniem udrażnia dolne drogi moczowe. Jak w każdej metodzie odnotowuje się również pewne problemy, tj.: przedwczesną migrację stentu, inkrustrację lub dodatkowe podrażnienia tkanki cewki moczowej [2].

Stenty dedykowane do cewki moczowej, ze względu na panujące w tkance odkształcenia, powinny charakteryzować się dużą odkształcalnością w zakresie odkształceń sprężystych. Mięśnie otaczające cewkę moczową silnie z nią współdziałają w trakcie mikcji, powodując jej znaczne odkształcenia. W związku z tym stenty cewki moczowej powinny charakteryzować się kilkoma podstawowymi cechami:

- udrażniać kanał cewki moczowej;
- być łatwymi do wszczepienia;
- być wykonane z materiałów biodegradowalnych;
- nie wymagać ponownej ingerencji chirurgicznej;
- wykazywać biogodność w kontakcie z tkanką;
- mieć wystarczającą elastyczność utrzymując warunki dla niezakłóconego przepływu.

Podstawowymi materiałami stosowanymi na stenty są stopy metali (stal nierdzewna), polimery syntetyczne bądź naturalne, stopy niklu i tytanu [3], jednak w ostatnim czasie coraz większe znaczenie mają stenty z materiałów, które w środowisku biologicznym degradują bez istotnego wpływu na strukturę i funkcje otaczających tkanek. Park i inni [4] w swojej pracy opisują opracowany stent biodegradowalny wykonany z polidiaksonanu, wszczepiany do psiej cewki moczowej. Przeprowadzone badania eksperymentalne wykazały, że w psiej cewce po implantacji stentu występuje dopuszczalna

¹ j.kurowiak@ibem.uz.zgora.pl, Katedra Inżynierii Biomedycznej, Instytut Inżynierii Materiałowej i Biomedycznej, Wydział Mechaniczny, Uniwersytet Zielonogórski, www.uz.zgora.pl.

² a.mackiewicz@ibem.uz.zgora.pl, Katedra Inżynierii Biomedycznej, Instytut Inżynierii Materiałowej i Biomedycznej, Wydział Mechaniczny, Uniwersytet Zielonogórski, www.uz.zgora.pl.

³ t.klekiel@ibem.uz.zgora.pl, Katedra Inżynierii Biomedycznej, Instytut Inżynierii Materiałowej i Biomedycznej, Wydział Mechaniczny, Uniwersytet Zielonogórski, www.uz.zgora.pl.

⁴ r.bedziński@ibem.uz.zgora.pl, Katedra Inżynierii Biomedycznej, Instytut Inżynierii Materiałowej i Biomedycznej, Wydział Mechaniczny, Uniwersytet Zielonogórski, www.uz.zgora.pl.

reakcja zapalna z niewielkim pojawieniem się tkanki ziarnistej, ale nie powodującej zamknięcia światła cewki. Stenty wykonane z polidiaksonanu degradują całkowicie po upływie 12 tygodni [4]. Kotsar i inni [5] w swoich pilotażowych badaniach oceniali wpływ substancji leczniczych (przeciwzapalnych i przeciwbakteryjnych) na procesy degradacyjne i biogodność w biodegradowalnych stentach cewki moczowej. Leki uwalniano ze stentów wykonanych na bazie kompozytu polilaktyd (PLA)/poliklolid (PGA). Stenty umieszczano w tylnej części przewodu cewki moczowej królika w celu wyeliminowania zwężeń cewki moczowej w przyszłości [5]. Fu i inni [6] prezentują analizy dotyczące biodegradowalnego stentu cewki moczowej do leczenia jej zwężeń u królików z ranami wynikającymi z urazów powodowanych zjawiskami dynamicznymi. Biodegradowalny stent wykonano z kwasu poli(L-laktydu) PLLA. Badania przeprowadzono na 12 królikach. Po 4, 6, 8 i 12 tygodniach przeprowadzono badania kontrolne, które wykazały, że po 4 tygodniach zmniejszył się naciek zapalny w tkance, po 8 tygodniach od implantacji stentu zaobserwowano regenerację nabłonka, a po 12 tygodniach nabłonek błony śluzowej wyglądał zdrowo, a materiał całkowicie zdegradował [6]. Biodegradowalne stenty z powodzeniem są również stosowane w leczeniu patologicznych zmian występujących w tętnicach, aortach i tchawicy [7-10].

Celem badań w niniejszej pracy było określenie zmian geometrii wywołanej zmianą objętości wskutek pęcznienia. Dotychczasowe znane badania były wykonywane wyłącznie poprzez wykorzystanie metod wagowych, wykazujących zmianę masy zanurzonego w cieczy materiału. Metody te nie pozwalały na określenie stopnia zwiększenia objętości materiału, co w przypadku stentów udrażniających kanał cewki moczowej jest istotne, aby nie doszło do powtórnego zatrzymania moczu w wyniku spęcznienia ścian stentu i w konsekwencji całkowitego zamknięcia kanału. Głównym celem badań było określenie stopnia pęcznienia. W tym celu wykorzystano nowatorską metodę trójwymiarowej analizy z wykorzystaniem systemu cyfrowej korelacji obrazu w skali mikro (μ DIC – *micro Digital Image Correlation*). Metoda ta charakteryzuje się znaczną dokładnością pomiaru w mikro-skali, szybkimi cyfrowymi kamerami pozwalającymi na obrazowanie kolejnych etapów badania, zautomatyzowanym modułem obliczeniowym i wizualizacją dla otrzymanych map rozkładów głównych parametrów materiałowych, jak naprężenia i odkształcenia czy zmiany geometrycznej na całej powierzchni, rozszerzonym eksportem danych oraz szerokimi opcjami raportowania. Technika trójwymiarowego μ DIC jest obecnie szeroko stosowana zarówno w mechanice eksperymentalnej, jak i analizie strukturalnej materiałów, umożliwiając badanie przemieszczeń na powierzchni z bardzo dużą precyzją [11-13]. W przypadku badania delikatnych próbek, a takimi są hydrożele na bazie alginianu sodu, konwencjonalne metody badawcze nie zapewniają żądanej dokładności pomiaru. Jedynie bezkontaktowe metody optyczne wydają się skuteczną metodą, umożliwiającą dokładne określenie zmian geometrii w przestrzeni, pod wpływem kontaktu materiału ze środowiskiem wodnym w postaci sztucznego moczu. Ważnym z punktu widzenia właściwego pełnienia funkcji stentu w organizmie są warunki, w jakich prowadzony jest proces degradacji. Nie mniej istotne są również zmiany właściwości mechanicznych.

2. Materiały i metody

W przedstawionej pracy analizowano materiał hydrożelowy na bazie alginianu sodu pod względem jego czasu degradacji, parametrów wytrzymałościowych oraz analizy pęcznienia za pomocą systemu cyfrowej korelacji obrazu μ DIC. Zastosowanie różnego

stężenia alginianu sodu, różnego rodzaju i stężenia substancji sieciującej miało na celu wytypowanie materiału o najlepszych charakterystykach materiałowych, spełniających podstawowe kryteria stawione stentom urologicznym.

2.1. Materiały

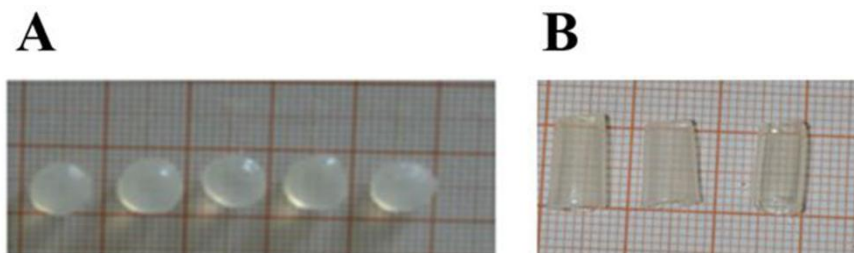
W pracy skupiono się na wytworzeniu i ocenie biodegradowalnego stentu na bazie alginianu sodu. Alginiian sodu pozyskuje się z brunatnic alg morskich. Materiał jest układem anionowym, silnie hydrofilowym, tworzącym strukturę polimerową o złożonych właściwościach wytrzymałościowych i sprężystych. Alginiian sodu tworzą reszty kwasu α -L-guluronowego (bloki G) i reszt kwasu β -L-mannuronowego (bloki M), połączone wiązaniami glikozydowymi. Bloki G i bloki M w strukturze materiału układają się w trzech typach: bloki G-G, bloki M-M lub naprzemienne bloki G-M. Alginiian sodu najczęściej sieciuje się dwuwartościowymi kationami Ca^{2+} [14-18]. W prezentowanych badaniach alginian sodu sieciowano za pomocą kationów Ca^{2+} , Ba^{2+} oraz kombinacji $\text{Ca}^{2+}/\text{Ba}^{2+}$.

Do wytworzenia materiału użyto: alginian sodu (Sigma-Aldrich), chlorek wapnia (Sigma-Aldrich) oraz chlorek baru (Chempur). Degradację materiału prowadzono w roztworze sztucznego moczu, który przygotowano na podstawie Chutipongtante, 2010 [19]. 1 litr roztwór sztucznego moczu składał się z 124,9 g mocznika (Sigma-Aldrich), 10 g kreatyniny (Sigma-Aldrich), 45 g chlorku sodu (Sigma-Aldrich), 12,85 g chlorku amonu (Chempur), 15 g siarczanu sodu (Avantor Performance Materials Poland S.A.) oraz 13,7 g dwuwodorofosforan sodu (Avantor Performance Materials Poland S.A.).

2.2. Przygotowanie materiału

Użyte w badaniach stężenia alginianu sodu dobrano w oparciu o typowe stężenia stosowane podczas wytwarzania tej struktury oraz uwzględniając własne obserwacje materiałów hydrożelowych. Zastosowanie kilku różnych stężeń alginianu sodu, pozwala na sprawdzenie dla każdego indywidualnie właściwości materiałowych.

Procedura przygotowania materiału, polegała na całkowitym rozmieszaniu alginianu sodu o różnym stężeniu 30, 40 i 50 mg/ml w wodzie dejonizowanej do momentu uzyskania jednorodnej struktury. Następnie alginian umieszczano na kilka minut w płuczce ultradźwiękowej w celu usunięcia pęcherzyków powietrza. Substancją sieciującą był chlorek baru i chlorek wapnia o stężeniach odpowiednio: 0,5, 1,0 i 1,5 mola. W uwagi na silną korelację pomiędzy właściwościami materiału a sposobem jego przygotowania, zbadano wpływ stężenia alginianu sodu i substancji sieciującej (tab. 1). W ramach badań przygotowano próbki hydrożelowe w kształcie kulek, rurek oraz próbki płaskie. Materiał w kształcie kulek wykorzystano do analizy stopnia i czasu degradacji, materiał rurowy wykorzystano do analizy wytrzymałościowej (rys. 1), natomiast próbki płaskie poddano analizie pęcznienia na systemie μ DIC. Rurki wytworzono metodą zanurzeniową zol-żel. Próbki płaskie oraz w kształcie kulek przygotowano w foremkach, w których na alginian sodu rozpylano substancje sieciującą, do momentu aż polimeryzacja objęła całą powierzchnię próbki. Po ukończonym procesie polimeryzacji materiał płukano w wodzie destylowanej.



Rysunek 1. Przykładowe próbki na bazie alginianu sodu do badań degradacyjnych (A) oraz do badań mechanicznych (B), [opracowanie własne]

Tabela 1. Nazewnictwo oraz rodzaj analizowanych materiałów

Nazwa próbki	Stężenie alginianu sodu [mg/ml]	Rodzaj i stężenie substancji sieciującej [mol]
Al3_Ca1.0	30	Ca 1,0
Al3_CaBa1.0		CaBa 1,0
Al4_Ba1.0	40	Ba 1,0
Al5_Ba1.5	50	Ba 1,5
Al5_Ca1.0		Ca 1,0
Al5_CaBa0.5		CaBa 0,5

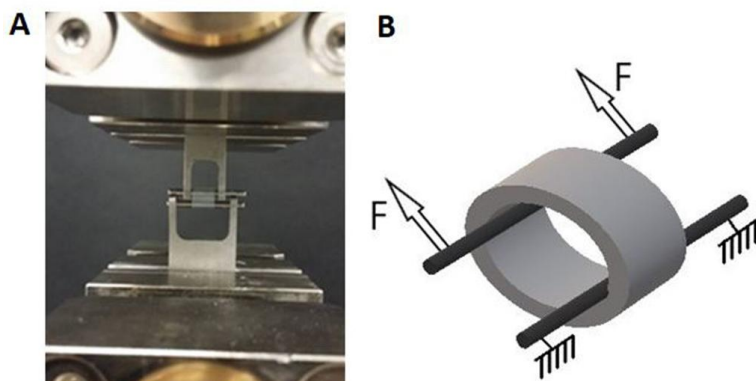
Źródło: Opracowanie własne

2.3. Badania degradacji

Degradację materiału hydrożelowego na bazie alginianu sodu prowadzono w roztworze moczu przygotowanego według receptury AU-5 Mayrovitz [19]. Degradację prowadzono maksymalnie przez 16 h dla wszystkich próbek, gdzie materiał hydrożelowy był zanurzony w moczu przez cały czas. W badaniach degradacji głównym zadaniem było obserwowanie zmian zachodzących w materiale hydrożelowym o różnym stężeniu alginianu i substancji sieciującej w bezpośrednim kontakcie z jednowartościowymi jonami obecnymi w moczu. Próbę wykonano 3-krotnie dla każdego rodzaju próbki.

2.4. Wytrzymałość mechaniczna – statyczna próba rozciągania

W celu określenia charakterystyk materiałowych dla różnych stężeń alginianu sodu i substancji sieciującej przeprowadzono testy jednoosiowego rozciągania. Badania przeprowadzono za pomocą maszyny wytrzymałościowej Zwick Roel EPZ 005. Analizę prowadzono dla próbek rurowych w warunkach statycznej próby rozciągania w kierunku promieniowym (rys. 2 A-B), przy prędkości 5 mm/min [20]. Kierunek ten został zastosowany zgodnie z kierunkiem rozciągania stentu w cewce moczowej podczas przepływu moczu.



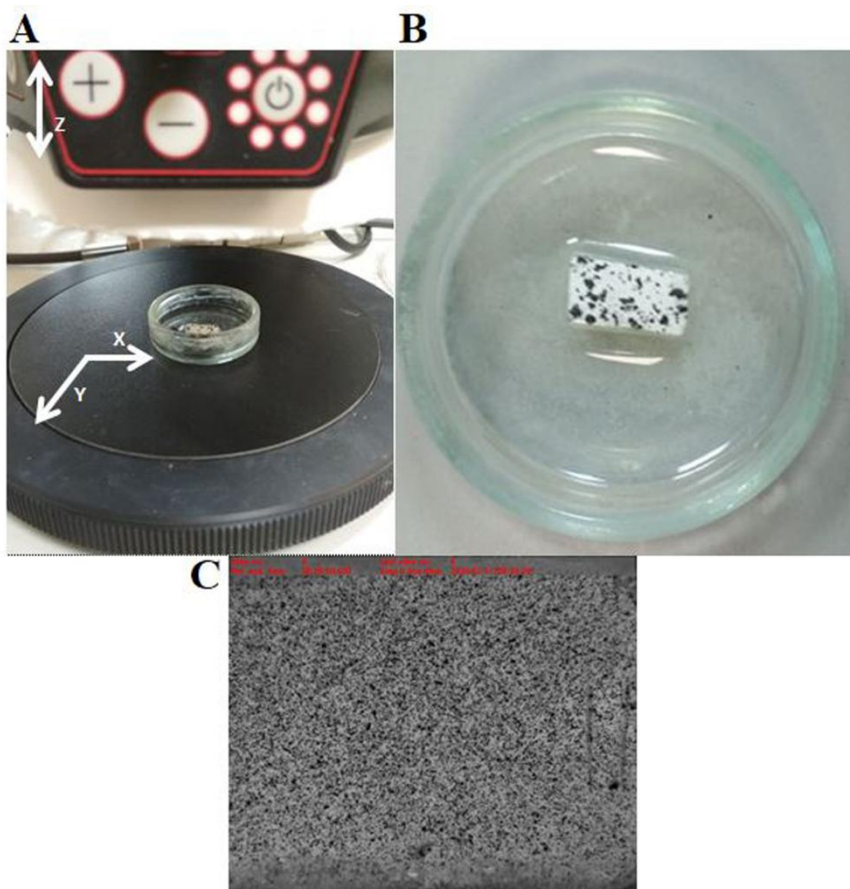
Rysunek 2. Test jednoosiowego rozciągania materiału hydrożelowego na bazie alginianu sodu: (A) przykładowe badanie próbki na maszynie Zwick Roel EPZ 005, (B) schemat rozciągania próbki w kierunku promieniowym, [opracowanie własne]

Wartości modułu Younga wyznaczano dla przedziału liniowego zależności naprężenie – odkształcenie przy odkształceniu w zakresie od 0 do 0,05 mm/mm. Próbę powtórzono dla serii 6 próbek dla każdego stężenia.

2.5. Analiza pęcznienia za pomocą systemu cyfrowej korelacji obrazu μ DIC (*micro Digital Image Correlation*)

System μ DIC pozwala na niezwykle dokładne i precyzyjne badanie określające lokalne mikro zmiany w obrębie badanego materiału w trzech kierunkach X, Y i Z (rys. 3 A-C). Głównym celem przeprowadzonego badania było określenie geometrycznych mikro zmian na powierzchni hydrożelowego materiału podczas procesu pęcznienia pod wpływem zanurzenia w roztworze sztucznego moczu.

W badaniu wykorzystano system Q-400 μ DIC z dwiema wysokorozdzielczymi kamerami (rozdzielność 5 Mpx) firmy Dantec Dynamics, które pozwalają na uzyskanie precyzyjnych obrazów i konturów próbki oraz ocenę stanu odkształceń i przemieszczeń w materiale. Badanie miało na celu określenie jak zmienia się geometria próbki, w tym przypadku jej średnica i grubość. Badania przeprowadzono dla wytypowanego spośród badań degradacji i wytrzymałości jednego rodzaju próbek. Płaską próbkę hydrożelową zanurzano w roztworze moczu po górną granicę jej powierzchni. Górną powierzchnię materiału zmatowiono, a następnie naniesiono patern z pyłu węglowego. Próbkę powtórzono 3-krotnie, czas jednej próby wynosił 3 godziny. Zdjęcie cyfrowe przedstawiające zmiany, wykonywano co 30 min. Badania prowadzono w temperaturze pokojowej.



Rysunek 3. Test pęcznienia na systemie do cyfrowej korelacji obrazu dla próbki Al5_Ba1.5:

- (A) próbka bezpośrednio umiejscowiona na aparaturze DIC wraz z przyjętym układem współrzędnych, (B) próbka zanurzona po górną granicę powierzchni w roztworze moczu, (C) obserwacja próbki systemem DIC z naniesionym patternem gotowa do dalszej analizy, [opracowanie własne]

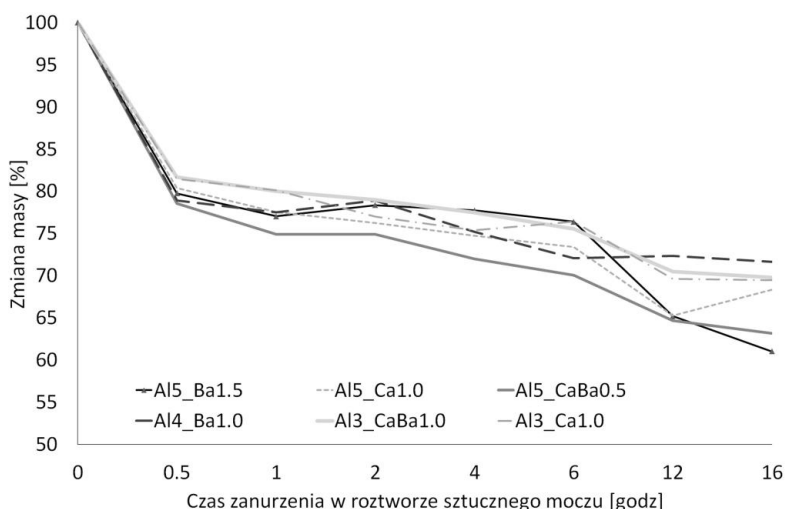
3. Wyniki i dyskusja

3.1. Badania degradacji

Na rysunku 4 przedstawiono zmianę masy dla próbek hydrożelowych na bazie alginianu sodu sieciowanego kationami Ca^{2+} , Ba^{2+} oraz ich kombinacji $\text{Ca}^{2+}/\text{Ba}^{2+}$. Degradację prowadzono w roztworze sztucznego moczu przez maksymalny okres 16 godzin, poprzez zanurzenie próbki w 15 ml moczu. Zmiany masowe wyliczono na podstawie wzoru (1):

$$\text{Zmiana masy} = \left(\frac{M_{\text{mokra}} - M_{\text{sucha}}}{M_{\text{mokra}}} \right) * 100 [\%] \quad (1)$$

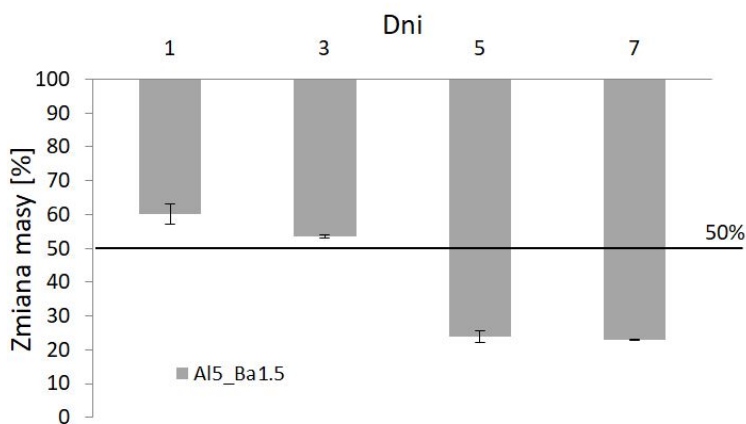
gdzie: M_{mokra} – masa próbki mokrej, M_{sucha} – masa próbki wysuszonej.



Rysunek 4. Wykres zmiany masy materiału hydrożelowego na bazie alginianu sodu w czasie 16 h zanurzenia w roztworze sztucznego moczu, [opracowanie własne]

Z analizy wykresu wynika, że w największym stopniu zdegradowała próbka z zawartością 50 mg/ml alginianu sodu sieciowana 1,5 M roztworem chlorku baru. Pomimo tego, że pozostałe próbki wykazały podobną zmianę masy ich struktura uległa znacznej utracie sztywności, co uniemożliwiło prowadzenie dla nich dalszych etapów badań degradacji. Struktura tych materiałów już po pierwszym kontakcie z moczem uległa szybkiemu i silnemu rozsięciowaniu, co w przypadku stentów urologicznych nie jest pożądane.

Próbka Al5_Ba1.5 o stężeniu 50 mg/ml sieciowana 1,5 M roztworem baru, wykazywała największą odporność na mocz. Dla tej próbki badania degradacji zanurzeniowej przedłużono do 7 dni (rys. 5). W tym okresie zarejestrowano ubytek masy na poziomie 80%.



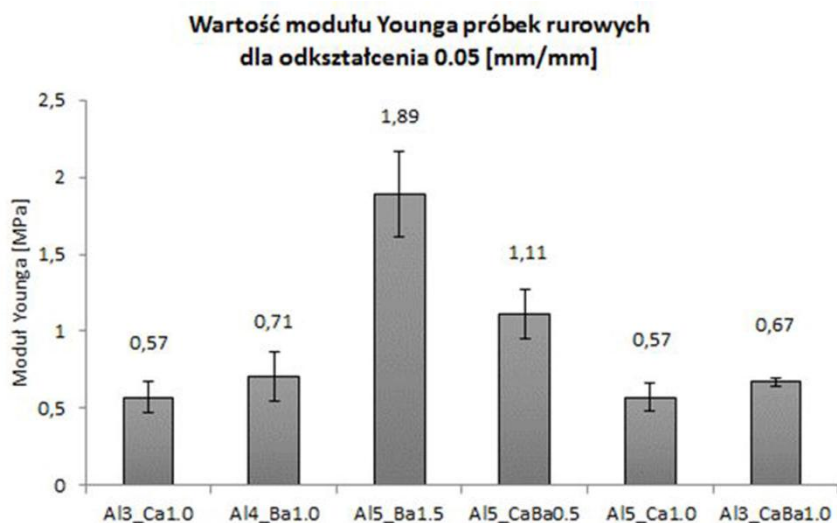
Rysunek 5. Badania degradacji zanurzeniowej dla wytypowanej próbki Al5_Ba1.5 trwające 7 dni, [opracowanie własne]

Utrata masy powyżej 50% wskazuje zmiany w wytrzymałości konstrukcji. Z uwagi na postępujący proces degradacji, w wyniku działania sił zewnętrznych pochodzących od mięśni cewki zaimplantowany stent zostanie rozpuszczony i usunięty poza ustrój.

3.2. Wytrzymałość mechaniczna – test jednoosiowego rozciągania

Na rysunku 6 przedstawiono wyniki modułu Younga dla analizowanych stężeń materiałów. Największe wartości posiada próbka Al5_Ba1.5 i wynosi 1,89 MPa. Kryterium sztywności zostało przyjęte jako podstawowy parametr wpływający na utrzymanie drożności cewki.

Wyniki badań wskazują na to, że sztywność stentu wykonanego z proponowanego materiału przewyższa elastyczność cewek wyznaczonych w pracach Spirka [21] i inni oraz Marinsa i inni [22]. Zestawiając otrzymane wyniki można stwierdzić, że zaproponowany materiał spełnia założenia przyjęte dla stentów urologicznych przeznaczonych do leczenia zwężeń cewki moczowej, zarówno ludzkiej, jak i zwierzęcej. Wyniki wskazują na wystarczającą sztywność materiału mogącą utrzymać światło cewki, a tym samym zapewnić prawidłowy przepływ moczu.



Rysunek 6. Wartość modułu Younga dla materiału hydrożelowego na bazie alginianu sodu, [opracowanie własne]

Badania Spirka (2013) wskazują, że moduł Younga ludzkiej cewki moczowej wynosi około 5,0 MPa, zaś wyniki badań Martinsa wskazują, że wartości modułu Younga ludzkiej cewki moczowej wynoszą 6,2 MPa w kierunku osiowym i 5,4 MPa w kierunku obwodowym. Królicza cewka moczowa według Feng (2010) [23] i Zhang (2017) [24] wynosi odpowiednio 0,5 MPa i 0,25 MPa.

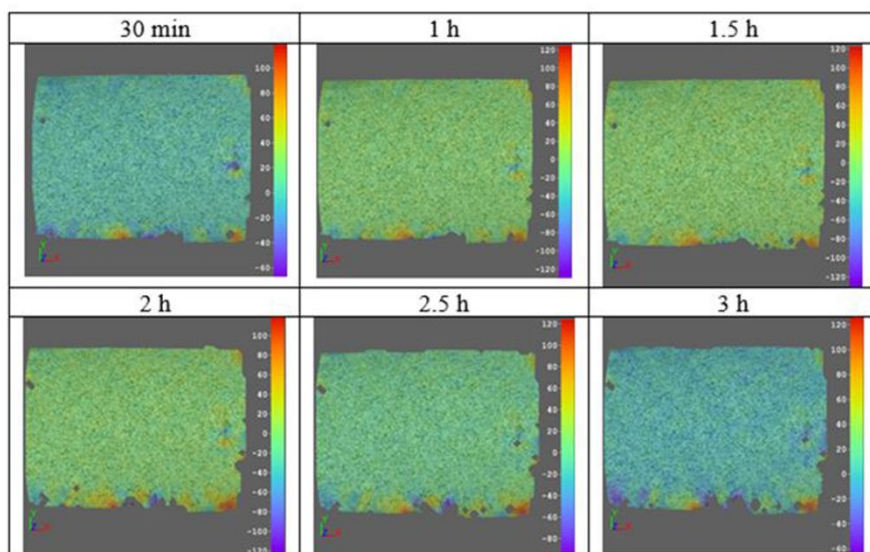
Jak wynika z przedstawionych analiz, sztywność tkanek cewek jest silnie zróżnicowana i sprawia, że charakterystyka mechaniczna materiału na stent powinna być dobierana indywidualnie w zależności od uwarunkowań biologicznych tkanek. Analiza porównawcza wykazała, że sztywność stentu z proponowanego materiału jest wyższa, niż sztywność cewki. Zakładając, że obciążenia pochodzące od skurczu mięśni nie

przekraczają ograniczeń wynikających ze sztywności należy uznać, że zaproponowany materiał pozwala utrzymać stateczność konstrukcji stentu. Jednak z uwagi na stosunkowo szybki proces degradacji materiału, może być on stosowany do krótkotrwałego procesu leczenia.

3.3. Analiza pęcznienia za pomocą systemu cyfrowej korelacji obrazu microDIC

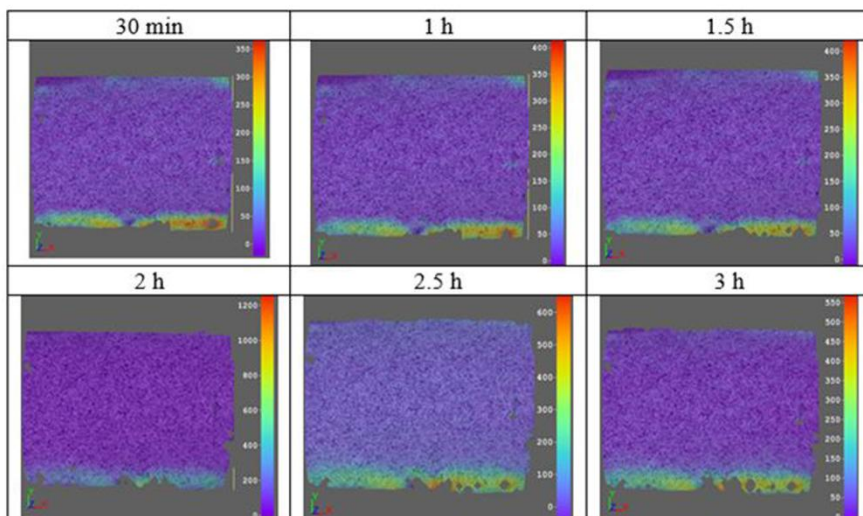
Za pomocą systemu cyfrowej korelacji obrazu μ DIC dokonano analizy lokalnych mikroodkształceń oraz mikroprzemieszczeń na powierzchni wytypowanej z wcześniejszych badań degradacji i charakterystyki wytrzymałościowej próbki Al5_Ba1.5. W równych odstępach czasu (30 min) rejestrowano za pomocą zdjęcia zmiany zachodzące na powierzchni materiału.

W wyniku przeprowadzonych badań uzyskano mapy mikro-odkształceń dla próbek. Odkształcenie badano poprzez pomiar zmian zachodzących na powierzchni próbki. rysunek 7 przedstawia zmiany w kierunku osi Z. Jak widać, odkształcenie zawiera się w przedziale od -146 do 126 [$\text{mm}/\mu\text{mm}$]. Są to maksymalne wartości zmian zaobserwowane w kierunku Z. Należy podkreślić, że są to wartości ekstremum. W centralnej części próbki średnie odkształcenie mieści się w przedziale od 10 do 20 [$\text{mm}/\mu\text{mm}$].



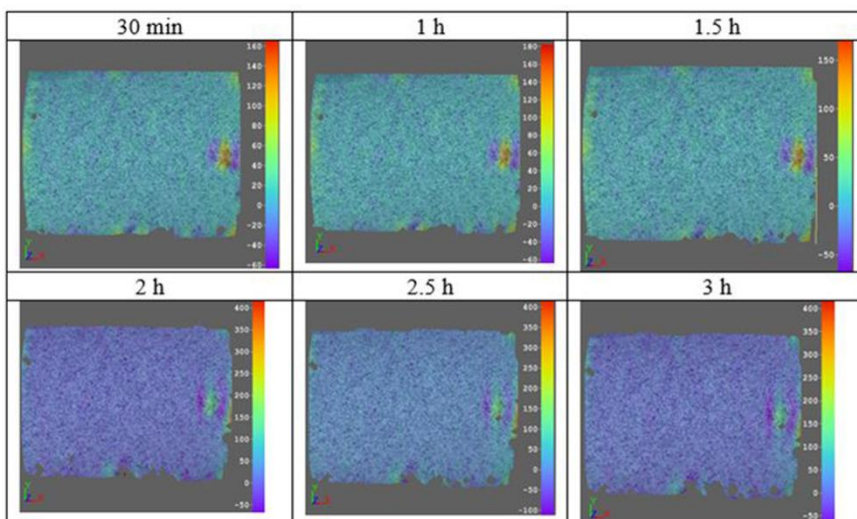
Rysunek 7. Mapa zmian mikro-odkształceń w kierunku Z, [opracowanie własne]

Rysunek 8 przedstawia zmiany w kierunku osi Y. Z jego analizy wynika, że zakres odkształceń powierzchni próbki zawiera się w przedziale od -21 do 1294 [$\text{mm}/\mu\text{mm}$]. W centralnej części próbki średnie odkształcenie mieści się w przedziale od 10 do 50 [$\text{mm}/\mu\text{mm}$].



Rysunek 8. Mapa zmian mikro-odkształceń w kierunku Y, [opracowanie własne]

Zaobserwowane odkształcenia powierzchni próbki w kierunku osi X (rys. 9) mieszczą się w przedziale od -121 do 436 [mm/ μ mm]. W centralnej części próbki średnie odkształcenie mieści się w przedziale od -30 do 50 [mm/ μ mm].

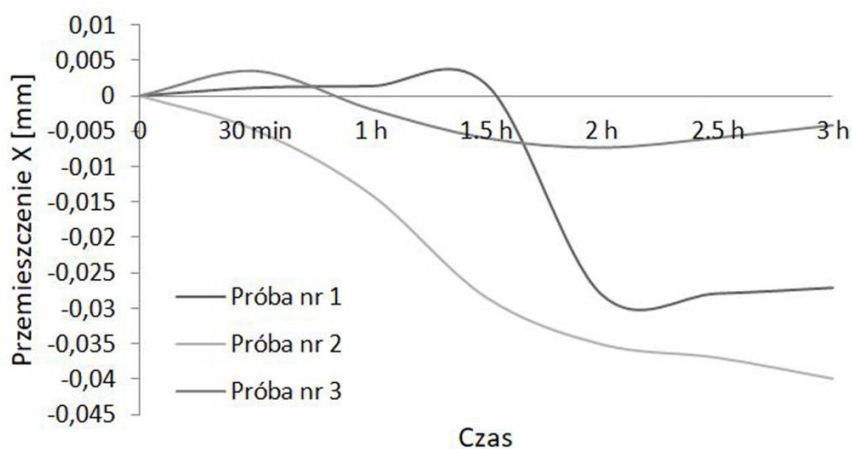


Rysunek 9. Mapa zmian mikro-odkształceń w kierunku X, [opracowanie własne]

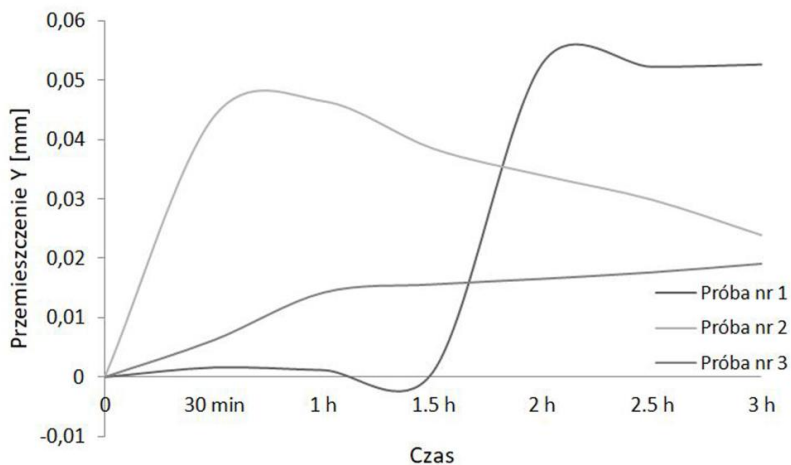
Trzygodzinny test pęcznienia wykazał, że im dłużej próbka znajdowała się w środowisku moczu tym większe było jej mikroodkształcenie wywołane pęcznieniem. Jednocześnie zauważalny był również wzrost odkształcenia proporcjonalnie dla każdego z kolejnych kroków. Uzyskane mapy odkształceń powierzchniowych wykazuje ich równomierny rozkład w centralnej części próbki. Największe wartości odkształceń zaobserwowano na brzegach, co jest związane z bezpośrednim dostępem roztworu

sztucznego moczu i silnym oddziaływaniem na strukturę powierzchni. Porównując stan trójwymiarowego odkształcenia można zauważyć, że choć wartości w centralnej części są podobne, to biorąc pod uwagę całą powierzchnię próbki odkształcenie w kierunku Y wykazuje najwyższe wartości. W tym kierunku próbka nie ulega „rozpuszczeniu” brzegowemu. Skala przedstawiona przy mapach odkształceń wyrażona jest w jednostce $\text{mm}/\mu\text{mm}$, a średni błąd pomiaru dla odkształcenia wynosi $\pm 0,04 \text{ mm}/\mu\text{mm}$.

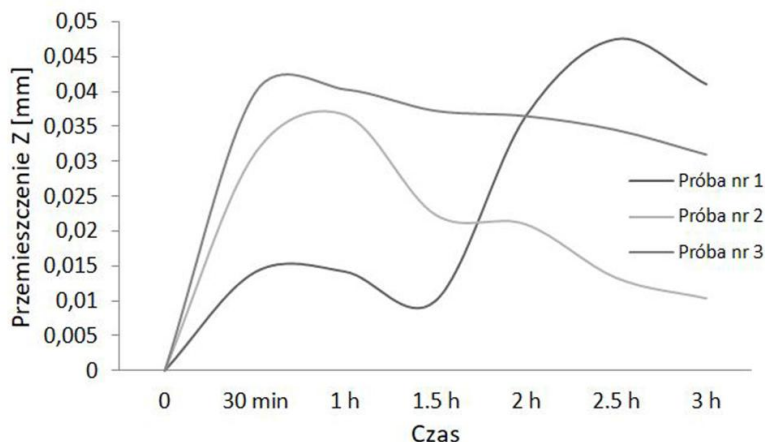
W przypadku mikroprzemieszczeń wygenerowano wykresy serii dla każdego z kierunków X, Y i Z, zestawiając przebadane 3 próbki. Wyniki zostały wygenerowane dla centralnego obszaru powierzchni próbki w celu ominięcia artefaktów na brzegu, typowych miejsc, gdzie zarówno widoczność, jak i oświetlenie jest mniejsze. Wyniki zestawiono na rysunkach 10-12.



Rysunek 10. Wykres przemieszczeń powierzchni w kierunku X, [opracowanie własne]



Rysunek 11. Wykres przemieszczeń powierzchni w kierunku Y, [opracowanie własne]



Rysunek 12. Wykres przemieszczeń powierzchni w kierunku, [opracowanie własne]

Wyniki wykazały zróżnicowaną wartość przemieszczenia materiału w zależności od kierunku. W kierunku X próbki pod wpływem zanurzenia w sztucznym moczu ulegały silniejszej degradacji wskutek czego przemieszczenie powierzchni następowało przeciwnie do przyjętego kierunku układu współrzędnych. W pozostałych kierunkach Y i Z, zaobserwowane przemieszczenia na powierzchni próbki wykazywały większą regularność i podobieństwo. Istotny z punktu widzenia celów obserwacji był pierwotny wzrost, a następnie spadek wartości przemieszczeń powierzchni próbek, co świadczyło o początkowym spęcznieniu, a następnie degradacji wskutek oddziaływania chemicznego sztucznego moczu.

4. Wnioski

W artykule autorzy opisują właściwości degradacyjne, mechaniczne oraz pęcznienia dla materiału hydrożelowego na bazie alginianu sodu. Otrzymane rezultaty wykazały, że stenoza cewki moczowej może być leczona z wykorzystaniem zaproponowanego materiału. Wydaje się być to również naturalne z uwagi na właściwości biologiczne alginianu, tj. biogodność, biodegradowalność i zdolności tkankotwórcze, jak i ze względu na korzyści płynące z braku potrzeby usuwania stentu z kanału cewki po leczeniu. Autorzy przeprowadzili szczegółowe badania właściwości materiałowych stentu wykonanego z alginianu sodu sieciowanego dwuwartościowymi kationami baru i wapnia, ze szczególnym uwzględnieniem dwóch istotnych cech, a mianowicie pęcznienia w środowisku wodnym oraz stopniowej degradacji.

W niniejszej pracy przedstawiono uzyskane wyniki badań dla materiału hydrożelowego na bazie alginianu sodu, które przeprowadzono pod kątem przydatności w zastosowaniach do leczenia stenozy cewki moczowej. Uzyskane wyniki wskazują, że planowana aplikacja jest możliwa w przypadku ściśle określonych warunków, jakie muszą charakteryzować struktury tkankowe cewki. Materiał pod względem sztywności oraz wytrzymałości spełnia kryteria, choć badania należałoby uzupełnić o analizę przepływów oraz ustalenie wpływu pracy mięśni na obciążenie stentu po implantacji.

W ramach zrealizowanych badań udało się wytypować optymalny skład materiału hydrożelowego o najlepszych właściwościach materiałowych – próbka A15_Ba1.5.

Zastosowanie kationów Ba^{2+} pozwoliło na otrzymanie materiału hydrożelowego o większej sztywności, niż w przypadku materiału sieciowanego kationami Ca^{2+} . Wykazano zmiany geometryczne podczas pęcznienia, poprzez określenie powierzchniowych zmian mikroodkształceń w środowisku sztucznego moczu, które wskazują na brak pęknięć i innych nieciągłości materiału w stanie po pęcznieniu. Zachowanie spójności materiału przy spełnieniu warunków wytrzymałościowych pozwala uznać, że zaproponowany materiał jest obiecującym materiałem na konstrukcje stentów urologicznych.

Literatura

1. Mundy A.R., *Management of urethral strictures*, Postgraduate Medical Journal 82, 2006, s. 489-493.
2. Woo C.-W., Song H.-Y., Yoon C.J., Kim T.-H., Kim E.-Y., Kim J.H., Shin J.H., *Is a Flared Stent Effective for Decreasing Stent Migration in Canine Prostatic Urethra?*, Acta Radiologica 49, 2008, s. 285-290.
3. Duvdevani M., Chew B.H., Denstedt J.D., *Urethral Stents: Review of Technology and Clinical Applications*, [w:] Baba S., Ono Y. (red.), *Interventional Management of Urological Diseases. Recent Advances in Endourology*, Springer, Tokyo 2006.
4. Park J.-H., Song H.-H., Shin J.H., Kim J.H., Jun E.J., Cho Y.C., Kim S.H., Park J., *Polydioxanone Biodegradable Stent Placement in a Canine Urethral Model: Analysis of In-inflammatory Reaction and Biodegradation*, Journal of Vascular and Interventional Radiology, 25(8), 2014, s. 1257-1264.
5. Kotsar A., Isotalo T., Uurto I., Mikkonen J., Martikainen P., Talja M., Kellomaki M., Salenius J.-P., Tammela T.L.J., *Urethral in situ biocompatibility of new drug-eluting biodegradable stents: an experimental study in the rabbit*, BJU International, 103(8), 2009, s. 1132-1135.
6. Fu W.-J., Zhang B.-H., Gao J.-P., Hong B.-F., Zhang L., Yang Y., Meng B., Zhu N., Cui F.-Z., *Biodegradable urethral stent in the treatment of post-traumatic urethral strictures in a war wound rabbit urethral model*, Biomedical Materials, 2(4), 2007, s. 263-268.
7. Bartkowiak-Jowska M., Bedzinski R., Chlopek J., Filipiak J., Szafranec B., *Comparative analysis of the deformation characteristics of biodegradable polymers considered as a material for vascular stents*, Polymers 56, 2011, s. 224-231.
8. Novotny L., Crha M., Rauser P., Hep A., Misik J., Necas A., Vondrys D., *Novel biodegradable polydioxanone stents in a rabbit airway model*, The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 143(2), 2012, s. 437-444.
9. Kischkel S., Grabow N., Puschel A., Erdle B., Kabelitz M., Martin D.P., Williams S.F., Bombor I., Sternberg K., Schmirz K.-P., Schareck W., Bunger C.M., *Biodegradable polymeric stents for vascular application in a porcine carotid artery model*, English version. Gefasschirurgie, 21, 2016, s. 30-36.
10. Barros A.A., Oliveira C., Lima E., Duarte A.R.C., Reis R.L., *Gelatin-based biodegradable ureteral stents with enhanced mechanical properties*, Applied Materials Today, 5, 2016, s. 9-18.
11. Lee K.Y., Mooney D.J., *Alginate: properties and biomedical applications*, Progress in Polymer Science, 37, 2012, s. 106-126.
12. Sun J., Tan H., *Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications*, Materials, 6, 2013, s. 1285-1309.
13. Kaczmarek-Pawelska A., *Alginate-Based Hydrogels in Regenerative Medicine*, [w:] Pereira L. (red.), *In Alginates – Recent Uses of This Natural Polymer*, IntechOpen Limited, London 2019.

14. Kurowiak J., Kaczmarek-Pawelska A., Mackiewicz A.G., Będziński R., *Analysis of the Degradation Process of Alginate-Based Hydrogels in Artificial Urine for Use as a Bioresorbable Material in the Treatment of Urethral Injuries*, Processes, 8, 2020, s. 1-11.
15. Klekiel T., Mackiewicz A., Kaczmarek-Pawelska A., Kurowiak J., Piasecki T., Noszczyk-Nowak A., Będziński R., *Novel design of sodium alginate based absorbable stent for the use in urethral stricture disease*, Journal of Materials Research and Technology, 9, 2020, s. 9004-9015.
16. Burguete R., Hack E., Patterson E., Siebert T., Whelan M., *Guidelines for the Calibration and Evaluation of Optical Systems for Strain Measurement*, Michigan State University, Michigan, USA 2010.
17. Pan B., Wang Q., *Single-camera microscopic stereo digital image correlation using a diffraction grating*, Optics Express, 21, 2013, s. 25056-25068.
18. Rusin T., Kopernik M., *Characterization of Biocompatible Materials Using Stereo Microscope 3D Digital Image Correlation*, Advanced Engineering Materials, 18, 2016, s. 1651-1660.
19. Chutipongtanate S., Thongboonkerd V., *Systematic comparisons of artificial urine formulas for in vitro cellular study*, Analytical Biochemistry 402, 2010, s. 110-112.
20. Afonso J.S., Jorge R.M., Martins P.S., Soldi Mda S., Alves O.L., Patricio B., Mascarenhas T., Sartori M.G., Girao M.J., *Structural and thermal properties of polypropylene mesh used in treatment of stress urinary incontinence*, Acta of Bioengineering and Biomechanics, 11, 2009, s. 27-33.
21. Spirka T., Kenton K., Brubaker L., Damaser M., *Effect of Material Properties on Predicted Vesical Pressure During a Cough in a Simplified Computational Model of the Bladder and Urethra*, Annals of Biomedical Engineering, 41, 2013, s. 185-194.
22. Martins P.A., NatalJorge R.M., Ferreira A.J., Saleme C.S., Roza T., Parente M.M., Pinotti M., Mascarenhas T., Santos A., Santos L., Silva-Filho A.L., *Vaginal tissue properties versus increased intraabdominal pressure: a preliminary biomechanical study*, Gynecologic and Obstetric Investigation, 71, 2011, s. 145-150.
23. Feng Ch., Xu Y-M., Fu Q., Zhu W-D., Cui L., Chen J., *Evaluation of the biocompatibility and mechanical properties of naturally derived and synthetic scaffolds for urethral reconstruction*, Journal of Biomedical Materials Research Part A. 94, 2010, s. 317-325.
24. Zhang K., Fu Q., Yoo J., Chen X., Chandra P., Mo X., Song L., Atala A., Zhao W., *3D bioprinting of urethra with PCL/PLCL blend and dual autologous cells in fibrin hydrogel: An in vitro evaluation of biomimetic mechanical property and cell growth environment*, Acta Biomaterialia 50, 2017, s. 154-164.

Alginian sodu jako biomateriał stosowany w leczeniu zwężenia cewki moczowej

Streszczenie

Stenoza cewki moczowej to schorzenie dotykające głównie mężczyzn. Jej terapia ma na celu przywrócenie drożności dolnych dróg moczowych. Obecne leczenie stentami metalowymi, wymaga ponownej ingerencji chirurgicznej zmierzającej do ich usunięcia, co może być przyczyną dodatkowych dolegliwości i urazów. Problemy te skłaniają do zastosowania materiałów o specyficznych właściwościach mechanicznych, chemicznych i biologicznych, które będą samoistnie degradować w czasie niezbędnym do przebudowy tkanek. W efekcie pojawiła się propozycja leczenia z wykorzystaniem stentów na bazie alginianu sodu. Wydaje się to naturalne z uwagi na właściwości biologiczne alginianu, tj. biozgodność, biodegradowalność i zdolności tkankotwórcze, jak i ze względu na korzyści płynące z braku potrzeby usuwania stentu z kanału cewki po leczeniu.

Przebadano właściwości materiałowe stentu alginianowego. Jedną z cech materiału jest jego pęcznienie. Przedmiotem analizy były zmiany geometrii wynikające ze zmiany objętości. Głównym celem badań było określenie stopnia pęcznienia. W tym celu wykorzystano nowatorską metodę analizy z wykorzystaniem systemu cyfrowej korelacji obrazu. Ponadto zbadano właściwości mechaniczne i degradacyjne. Badania mechaniczne wykazały, że stężenie alginianu sodu wpływa na właściwości mechaniczne. Przebadano

próbki alginianowe w zakresie stężeń 30-50 mg/ml, sieciowane kationami Ca^{2+} , Ba^{2+} lub ich kompilacją $\text{Ca}^{2+}/\text{Ba}^{2+}$ o różnym stężeniu. Najlepsze cechy wykazała próbka o stężeniu 50mg/ml alginianu, sieciowana Ba^{2+} o stężeniu 1,5 M. Uzyskane wyniki są obiecujące, a badane pęcznienie systemem cyfrowej korelacji obrazu, okazało się niezwykle cenne i innowacyjne. Zaproponowany materiał wykazuje zbliżone parametry do tych panujących w tkance cewki moczowej. Należy podjąć dalsze kroki mające na celu analizę przepływów oraz pracy mięśni wpływających bezpośrednio na zachowanie się cewki.

Praca powstała w ramach projektu badawczego o nr 2016/21/B/ST8/01972 finansowanego przez NCN.

Słowa kluczowe: alginian sodu, stenoza cewki moczowej, medycyna regeneracyjna

Sodium alginate as a biomaterial used to treat urethral stenosis

Abstract

Urethral stenosis is a disease that mainly affects men. Its treatment aims to restore the patency of the lower urinary tract. The current treatment with metal stents, requires repeated surgical intervention to remove them, which may cause additional complaints and injuries. These problems lead to the use of materials with specific mechanical, chemical and biological properties, which will spontaneously degrade during the time necessary for tissue reconstruction. As a result, a proposal for treatment with sodium alginate-based stents has appeared. This seems natural because of the biological properties of alginate, i.e. biocompatibility, biodegradability and tissue-forming capacity, as well as because of the benefits of not having to remove the stent from the coil channel after treatment.

The material properties of alginate stent were tested. One of the material characteristics is its swelling. The subject of the analysis were geometrical changes resulting from the change of volume. The main aim of the study was to determine the degree of swelling. For this purpose an innovative method of analysis using a digital image correlation system was used. Moreover, mechanical and degradation properties were examined. The mechanical tests showed that the concentration of sodium alginate affects mechanical properties. Alginate samples in the concentration range 30-50 mg/ml, cross-linked with Ca^{2+} , Ba^{2+} or their compilation with $\text{Ca}^{2+}/\text{Ba}^{2+}$ cations of different concentration were tested. The best features were shown by a sample of 50 mg/ml of alginate, cured with Ba^{2+} cations of 1,5 M. The obtained results are promising, and the swelling tested by the digital image correlation system, proved to be extremely valuable and innovative. The proposed material shows similar parameters to those of urethral tissue. Further steps should be taken to analyze the flow and muscle work that directly affect the behavior of the urethra.

This work was developed as part of a research project No. 2016/21/B/ST8/01972 funded by the NCN.

Keywords: sodium alginate, urethra stenosis, regenerative medicine

Fitoestrogeny w walce z cukrzycą

1. Wprowadzenie

Cukrzyca to heterogenna grupa zaburzeń metabolicznych, charakteryzująca się występowaniem hiperglikemii będącej wynikiem upośledzenia działania i/lub wydzielania insuliny [1]. Jako choroba cywilizacyjna stanowi ogromny problem w skali globalnej oraz krajowej.

W celu zapewnienia wydajnego i skutecznego leczenia cukrzycy, naukowcy na całym świecie pracują nad stworzeniem nowych leków przeciwcukrzycowych lub poprawą właściwości obecnie istniejących. W zależności od stopnia rozwoju choroby stosuje się u pacjentów leczenie nefarmakologiczne, polegające na zmianie stylu życia, lub farmakologiczne z zastosowaniem leków syntetycznych oraz fitoterapii. Powstanie niektórych leków syntetycznych nie byłoby możliwe bez wykorzystania potencjału leczniczego ich prekursorów, będących często substancjami aktywnymi zawartymi w roślinach. Przykładem mogą być doustne leki cukrzycowe z grupy flozyn, których prekursorem jest florydzyina, izolowana z kory jabłoni [2]. Flozyny cieszą się dużym zainteresowaniem lekarzy i pacjentów ze względu na niezbyt częste występowanie działań niepożądanych podczas ich stosowania i dużą skuteczność terapii. Najczęściej przepisywanym lekiem przeciwcukrzycowym na świecie jest metformina, której prekursorami są biguanidy, występujące w ziele rutwy lekarskiej (*Galega officinalis*). Za pierwowzór metforminy uważa się galeginę, stosowaną jako lek przeciwcukrzycowy, przez krótki czas na początku XX wieku [3]. Istnieje wiele roślinnych związków o potencjalnym działaniu przeciwcukrzycowym – według etnobotaników nawet ok. 800 roślin wyższych może zawierać substancje posiadające takie właściwości. Dane literaturowe wskazują, że nawet 25% leków syntetycznych, opisanych we współczesnych farmakopeach, jest pochodzenia roślinnego (fitoleki) a znaczna część to analogi związków z nich wyizolowanych [4, 5]. Dowodzi to, że w świecie roślin możemy znaleźć bardzo wiele gatunków, których metabolity mogą okazać się pomocne w walce z cukrzycą lub stanowić podstawę do tworzenia nowych leków syntetycznych usprawniających terapię oraz profilaktykę tej choroby.

2. Cel pracy

Celem niniejszego opracowania, będącego przeglądem danych literaturowych, było przedstawienie mechanizmów przeciwcukrzycowego działania, zaliczanych do fitoestrogenów, wtórnych metabolitów roślin takich jak: izoflawony, stilbeny, lignany oraz kumestany. Cel obejmował także wskazanie naturalnych źródeł występowania

¹ kasiaurbisz@poczta.fm, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Farmakognozji i Fitochemii, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, sum.edu.pl.

² katarzyna.szalabska@gmail.com, Szkoła Doktorska Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, dyscyplina nauk farmaceutycznych, Katedra i Zakład Farmakognozji i Fitochemii, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, sum.edu.pl.

³ mzych@sum.edu.pl, Katedra i Zakład Farmakognozji i Fitochemii, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, sum.edu.pl.

fitoestrogenów oraz próbę odpowiedzi na pytanie – czy mogą one zostać w przyszłości wykorzystane w walce z cukrzycą, stanem przedcukrzycowym i powikłaniami związanymi z tą chorobą.

3. Cukrzyca

3.1. Epidemiologia

Cukrzyca to zespół zaburzeń metabolicznych o różnej etiologii, charakteryzujący się przewlekłym stanem hiperglikemii, połączonym z upośledzeniem gospodarki węglowodanowej, lipidowej i białkowej. Oszacowano, iż w 2015 roku liczba chorych na cukrzycę w wieku 20-79 lat wyniosła 415 mln. W tym roku choroba była w skali globalnej przyczyną śmierci blisko 5 mln osób. Prognozuje się, że do 2040 roku na cukrzycę będzie cierpieć około 642 miliony osób (liczba ta może się wahać od 521 do 829 milionów) w wieku 20-79 lat [6]. International Diabetes Federation podaje, że w 2017 roku na terenie Europy chorowało 58 milionów osób, czyli ok. 8,8% populacji w wieku pomiędzy 20. a 70. rokiem życia. W Polsce liczba chorujących na cukrzycę w roku 2017 stanowiła ok. 7,6% populacji (2,23 miliona osób) [7].

3.2. Objawy i powikłania występujące w przebiegu cukrzycy

Do charakterystycznych objawów cukrzycy typu 1 można zaliczyć poliurię, polidypsję, wzmożoną utratę masy ciała i częste występowanie ketoacydozy. Charakterystyczne cechy tego typu cukrzycy to obecność autoprzeciwciał względem komórek β -trzustki oraz leczenie za pomocą insuliny [1, 8]. Typ 2 cukrzycy związany jest najczęściej z niezdrowym stylem życia. Charakteryzuje się występowaniem chorób towarzyszących (otyłości, nadciśnienia, dyslipidemii), insulinoopornością czy podwyższonym poziomem stresu oksydacyjnego w organizmie. Ryzyko rozwoju cukrzycy typu 2 rośnie wraz z wiekiem [1, 8-10]. Nieleczona cukrzyca może prowadzić w konsekwencji do wystąpienia kwasicy ketonowej, ośpienia, śpiączki i finalnie śmierci chorego. Niestety początkowe objawy cukrzycy nie są na tyle uciążliwe, by zaalarmować osobę chorą, przez co często dochodzi do zaniedbań, nie podjęcia leczenia farmakologicznego i rozwinięcia licznych powikłań cukrzycowych. Wśród patologicznych zmian w całym ustroju, związanych z przewlekłym stanem hiperglikemii, należą: retinopatia, nefropatia, zaburzenia funkcji autonomicznych, neuropatia, zaburzenia funkcjonowania układu sercowo-naczyniowego, krążenia obwodowego oraz mózgowego [8, 11, 12].

3.3. Mechanizm rozwoju cukrzycy i jej klasyfikacja

Zachorowanie na cukrzycę powiązane jest zawsze z upośledzeniem pracy trzustki. Hiperglikemia wywołana poprzez nieprawidłowe działanie tego gruczołu może być wynikiem zbyt małej ilości wytwarzanej przez niego insuliny lub też insulinooporności organizmu przy jej nadprodukcji. Na poziomie biochemicznym przewlekła hiperglikemia powiązana jest z powstawaniem reaktywnych form tlenu poprzez utlenianie glukozy, nieenzymatyczną glikację białek oraz peroksydację lipidów. Nadmiar wolnych rodników w połączeniu z upośledzeniem endogennych mechanizmów antyoksydacyjnych skutkuje wystąpieniem stresu oksydacyjnego, a ten, długotrwale się utrzymujący, prowadzi do licznych powikłań cukrzycowych [13]. Powszechnie przyjmuje się,

iz cukrzycę można podzielić na 4 podstawowe typy: **typ 1** – insulinozależny, nazywany również młodzieńczym, w którym organizm nie wytwarza wystarczającej ilości insuliny; **typ 2** – insulinozależny, inaczej cukrzyca wieku dorosłego, w którym produkowana przez trzustkę insulina nie może być wykorzystywana przez organizm w sposób efektywny; **cukrzyca ciężarnych** – stan, w którym cukrzyca ujawnia się u kobiety po raz pierwszy w okresie ciąży i zazwyczaj ustępuje wraz z jej zakończeniem; **cukrzyca wtórna** – cukrzyca o zróżnicowanej etiologii, na której rozwinięcie mogą mieć wpływ czynniki genetyczne, przyjmowane leki, choroby tkanki egzokrynnej trzustki, przebyte choroby wirusowe czy też schorzenia autoimmunologiczne [1,14]. Na cukrzycę typu 1 cierpi około 5-10% populacji chorej na cukrzycę. Ze względu na podłoże autoimmunologiczne, w typie tym dochodzi do niszczenia komórek β -trzustki (odpowiedzialnych za produkcję insuliny) [15, 16]. Typ 2 cukrzycy, którego etiologia nie jest dokładnie poznana, dotyka około 90-95% populacji chorej na cukrzycę. Ryzyko jego wystąpienia wiąże się często z otyłością, współtowarzyszącą hipertensją, dyslipidemią oraz uwarunkowaniami genetycznymi [8, 9, 12].

3.4. Leczenie cukrzycy

Współczesna medycyna nie jest w stanie zapobiec wystąpieniu objawów cukrzycy typu 1. Jedyną skuteczną farmakoterapią, jaką można zastosować w jej leczeniu, gdy dojdzie już do manifestacji choroby, to iniekcje insuliny. W przypadku cukrzycy typu 2 możliwa jest modyfikacja stylu życia (regularna kontrola masy ciała, ciśnienia tętniczego i poziomu glukozy we krwi, regularna aktywność fizyczna, zbilansowana dieta, unikanie używek) oraz włączenie fitoterapii w celu opóźnienia, a nawet wyeliminowania możliwości jej wystąpienia. W momencie zachorowania na cukrzycę typu 2 oprócz zdrowego stylu życia i fitoterapii, wprowadza się farmakoterapię obejmującą doustne leki przeciwcukrzycowe [8, 12, 14]. Podstawową substancją czynną stosowaną w farmakoterapii cukrzycy jest metformina. W przypadku braku skuteczności terapii metforminą włączany jest kolejny lek przeciwcukrzycowy zawierający w swoim składzie: pochodne sulfonilomocznika, inhibitory dipeptydylopeptydazy 4 (DPP-4), agonistów receptora dla glukagonopodobnego peptydu 1 (GLP-1) lub agonistów receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksysomów (PPAR- γ). W dalszej kolejności stosuje się kombinację metforminy w połączeniu z dwoma lekami z wymienionych powyżej grup lub z akarbozą. W wyjątkowo ciężkich przypadkach wprowadza się insulinoterapię [10, 14]. Solidną podstawę profilaktyki przeciwcukrzycowej może stanowić fitoterapia. Do roślin wykazujących działanie hipoglikemiczne można zaliczyć m.in.: morwę białą (*Morus alba*), kozieradkę pospolitą (*Trigonella foenum-graecum*), cynamonowiec cejloński (*Cinnamomum zeylanicum*) i wonny (*Cinnamomum cassia*), przepęklę ogórkowatą (*Momordica charantia*), imbir lekarski (*Zingiber officinale*) czy gurmara (*Gymnema sylvestre*) [14, 17]. Dodatkowo, biorąc pod uwagę fakt, iż otyłość często towarzyszy cukrzycy typu 2, korzystnym wydaje się włączenie fitoterapii otyłości do kompleksowej opieki nad pacjentem cukrzycowym. W tym celu stosuje się preparaty zawierające błonnik, jak również tamaryndowiec malabarSKI (*Garcinia cambogia*), kapsaicynę, zieloną kawę (*Coffea arabica*), zielony jęczmień (*Hordeum vulgare*) czy mangostan właściwy (*Garcinia mangostana*) [14]. Liczne badania naukowe wskazują, iż rośliny zawierające fitoestrogeny mogą uzupełnić klasyczną terapię doustnymi lekami przeciwcukrzycowymi [18-21].

4. Charakterystyka i występowanie fitoestrogenów

Fitoestrogeny to aktywne związki pozyskiwane z roślin, będące ich wtórnymi metabolitami. Wraz z mykoestrogenami oraz ksenoestrogenami zaliczane są do grupy estrogenów środowiskowych [22]. Wykazują strukturalne podobieństwo do 17- β -estradiolu, co pozwala na ich oddziaływanie z receptorami estrogenowymi (ER). Związki te występują w roślinach stanowiących często podstawę ludzkiej diety (warzywa, owoce, nasiona roślin strączkowych i oleistych, zboża). Fitoestrogeny często uznawane za bezpieczne leki naturalne, są spożywane również w postaci suplementów diety i leków dostępnych bez recepty.

Pod względem budowy chemicznej fitoestrogeny to grupa związków należących do polifenoli, w obrębie której wyróżniamy m.in.: izoflawony, lignany, stilbeny i kumestany [23].

Do izoflawonów należą: daidzeina, genisteina, biochanina A i formononetyna, których najważniejsze źródło stanowi soja warzywna (*Glycine max*) oraz produkty z niej wytwarzane np. tofu, tempeth czy mleko sojowe [23]. Występują one również w innych roślinach strączkowych takich jak groszek zielony, fasolka szparagowa, ciecierzycy pospolita (*Cicer arietinum*), jak również w kwiatach/zielu koniczyny łąkowej (*Trifolium pratense*), ziele/kielkach lucerny siewnej (*Medicago sativa*) czy korzeniu traganka błoniastego (*Astragalus membranaceus*). Ważnym związkiem aktywnym posiadającym właściwości lecznicze jest equol będący produktem metabolizmu daidzeiny przez swoistą florę bakteryjną jelit [18, 24].

W obrębie lignanów ważną podgrupę stanowią tzw. lignany lniane pochodzące z lnu zwyczajnego (*Linum usitatissimum*). Najważniejszymi z nich są sekoizolarycirezynol (SECO) oraz jego diglikozyd (SDG). Inne lignany występujące w nasionach lnu to metairezynol, pinorezinoł czy larycirezynol. Z kolei sezam indyjski (*Sesamum indicum*) jest źródłem lignanu – sezaminy. Najwyższa koncentracja lignanów (75-800 razy więcej SDG niż w innych roślinach) występuje w nasionach lnu oraz sezamu. W mniejszych ilościach występują one także w nasionach zbóż i roślin oleistych, orzechach, owocach lub warzywach [25, 26]. Poziom zawartości lignanów w organizmie i związane z nim właściwości lecznicze są skorelowane ze stosowaniem odpowiedniej diety bogatej w te związki. Istotną rolę odgrywa flora jelitowa, która wpływa na przekształcenie fitoestrogenów z grup izoflawonów i lignanów do, często bardziej aktywnych, ich metabolitów [23, 25].

Ważną podgrupę fitoestrogenów stanowią stilbeny, których najważniejszym przedstawicielem jest resweratrol a jego główne źródło stanowią owoce winorośli właściwej (*Vitis vinifera*). Do stilbenów zaliczane są również pochodne resweratrolu takie jak pterostilben występujący w czerwonym drzewie sandałowym (*Petrocarpus santalinus*), oraz piceid, glukozyd piceatannolu i resweratrolozyd, których źródło stanowi rdestowiec ostrokończysty (*Polygonum cuspidatum*) [27].

Kolejna podgrupa związków należąca do fitoestrogenów to kumestany. Są to wielopierścieniowe, aromatyczne wtórne metabolity roślin zawierające ugrupowanie kumestanu [28]. Głównym ich przedstawicielem jest kumestrol, występujący m.in. w kwiatach/zielu koniczyny łąkowej (*Trifolium pratense*). Kumestany są grupą związków szczególnie obecną podczas kiełkowania roślin, dlatego ich źródłem są kiełki fasoli zwyczajnej (*Phaseolus vulgaris*) lub lucerny siewnej (*Medicago sativa*) oraz innych roślin z rodziny bobowatych (*Fabaceae*) [29].

4.1. Mechanizmy działania fitoestrogenów

Fitoestrogeny wykazują szeroki zakres działania. Regulują one procesy cyklu komórkowego, apoptozy, autofagii, poprawiają właściwości antyoksydacyjne komórek, wpływają na receptory estrogenowe, ścieżki sygnałowe w komórkach oraz wykazują działania epigenetyczne [23]. Wyróżnia się wiele mechanizmów działania tych związków na organizm. Najważniejszy z nich, nazywany mechanizmem genomowym, opiera się na strukturalnym podobieństwie fitoestrogenów do 17- β -estradiolu. Taka analogia w budowie chemicznej umożliwia tym związkom łączenie się z receptorami estrogenowymi (ER) α lub β [30]. Wiążąc się z ER fitoestrogeny mogą wykazywać zarówno agonistyczne, jak i antagonistyczne działanie na receptor [23]. Fitoestrogeny w porównaniu do estradiolu zdecydowanie słabiej oddziałują z receptorami estrogenowymi, przeważnie mają większe powinowactwo do receptora ER β , a każdy z nich ma inny punkt uchwytu, zależny od gęstości receptorowej w danym narządzie. Połączenie fitoestrogenu z receptorem ER powoduje jego przejście z cytoplazmy do jądra komórkowego, gdzie kompleks ten łączy się z elementem odpowiedzi na estrogeny (ERE) obecnym w DNA i w ten sposób oddziałuje na ekspresję określonych genów [23, 31]. Mechanizm epigenetyczny działania fitoestrogenów nie jest dobrze poznany i wymaga dalszych badań. Najlepiej poznane w zakresie działania epigenetycznego są: genisteina, daidzeina i resweratrol [23]. Dane literaturowe wskazują, że niektóre fitoestrogeny np. genisteina, mogą wykazywać działanie poprzez mechanizmy epigenetyczne m.in. zmieniając aktywność metylotransferaz DNA oraz histonów, deacetylaz zależnych od dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NAD) oraz czynników modyfikujących strukturę chromatyny [23, 32]. Fitoestrogeny wpływają na organizm również poprzez nieklasyczne mechanizmy działania, takie jak oddziaływanie z receptorem 1 estrogenu sprzężonym z białkiem G (GPER1, oznaczanym często jako GPR30), receptorami węglowodorów aromatycznych (AhR) czy receptorami PPAR. Niegenomowe mechanizmy oddziaływania fitoestrogenów obejmują: wpływ na ścieżki sygnałowe związane ze stresem oksydacyjnym; interakcje z czynnikami wzrostu oraz cytokinami; wpływ na produkcję i aktywność wtórnych przekaźników (cykliczne AMP, jony wapnia); regulację aktywności kinaz np. tyrozynowych lub aktywowanych mitogenami (MAP); cyklu komórkowego, proliferacji komórek i metabolizmu hormonów steroidowych [23, 31, 32]. Poprzez tak dużą ilość mechanizmów działania fitoestrogeny regulują wiele procesów metabolicznych.

4.2. Przeciwcukrzycowe właściwości fitoestrogenów

Wiele wyników, uzyskiwanych w badaniach *in vitro* oraz *in vivo*, wskazuje na korzystny wpływ fitoestrogenów na homeostazę glukozy i metabolizm lipidów. Jest to bardzo ważne w leczeniu i zapobieganiu wielu chorobom takim jak: cukrzyca (szczególnie typu 2), otyłość, nadciśnienie, miażdżyca czy zespół metaboliczny. Istnieje bardzo wiele mechanizmów odpowiadających za przeciwcukrzycowe działanie fitoestrogenów. Związane są one, m.in.: z hamowaniem przez te związki aktywności enzymów odpowiadających za metabolizm węglowodanów, zmniejszaniem wchłaniania glukozy z jelit, regulacją wydzielania insuliny, działaniem antyoksydacyjnym, wpływem na zawartość frakcji lipidowych w osoczu oraz na metabolizm lipidów czy oddzia-

ływaniem na ścieżki sygnałowe i geny (ich aktywność i transkrypcję) odpowiedzialne za metabolizm glukozy w organizmie [19, 20, 33].

Dobrze poznanym zastosowaniem fitoestrogenów jest ich działanie łagodzące objawy okresu okołomenopauzalnego. Menopauza charakteryzuje się znacznym zmniejszeniem stężeń endogennych estrogenów. Wahaniom hormonalnym towarzyszą zmiany: masy ciała, rozmieszczenia i formowania tkanki tłuszczowej, metabolizmu energetycznego, wydzielania insuliny czy insulinowrażliwości komórek, co w konsekwencji może prowadzić do rozwinięcia się w tym okresie cukrzycy typu 2 [34]. Badania wykazują, iż krótkoterminowe zastosowanie fitoestrogenów u kobiet z cukrzycą typu 2, po okresie menopauzy, powoduje u nich redukcję insulinooporności, poprawia kontrolę glikemii i wpływa na regulację poziomu lipidów. Regulacja ta powoduje obniżenie ryzyka powikłań sercowo-naczyniowych [35]. Długoterminowe badania z użyciem suplementów izoflawonowych wskazują na potencjalną korzystną regulację parametrów związanych z poziomem glikemii u kobiet po menopauzie [36]. Niektórzy autorzy zwracają jednak uwagę na małą ilość badań długoterminowych i niespójność wyników w obrębie eksperymentów krótkoterminowych prowadzonych w tym zakresie [34, 36]. Pomimo tego, iż na chwilę obecną nie można zalecić powszechnego stosowania fitoestrogenów to stanowią one ważny komponent zdrowego schematu żywieniowego w zapobieganiu i uzupełnieniu leczenia cukrzycy typu 2 w okresie okołomenopauzalnym [36].

Fitoestrogeny są uważane za związki o dużym potencjale działania przeciwcukrzycowego, jednak ze względu na niepełne dane dotyczące mechanizmów i ich specyficznego działania względem danego organizmu, potrzebne są dalsze badania w tym zakresie [19, 20, 33]. Terapia fitoestrogenowa może dawać bardzo zróżnicowane wyniki u różnych pacjentów. Działanie fitoestrogenów i jego siła zależy od wielu czynników, takich jak: polimorfizm enzymów odpowiedzialnych za biodostępność fitoestrogenów, zróżnicowanie osobnicze flory jelitowej metabolizującej te związki do aktywniej działających pochodnych, występowanie i gęstość rozmieszczenia danych receptorów estrogenowych, farmakokinetyka danego związku, rodzaj fitoestrogenu oraz wielkość przyjętej dawki [20, 31, 33, 37]. Wątpliwości związane z przeciwcukrzycowym działaniem fitoestrogenów wskazują jak ważne jest ciągłe poznawanie ich mechanizmów oddziaływania na organizm oraz określenie ewentualnych skutków ubocznych w trakcie ich długotrwałego stosowania. Może się to przyczynić do ich optymalnego wykorzystania w profilaktyce i terapii stanu przedcukrzycowego, cukrzycy oraz jej powikłaniach.

4.3. Izoflawony

Izoflawony należą do rodziny izoflawonoidów. Ich budowa chemiczna odznacza się występowaniem struktury charakterystycznej dla izoflawonoidów tzw. difenylopropanu (C6-C3-C6), czyli dwóch pierścieni aromatycznych oraz trzeciego pierścienia powstałego z połączenia trójwęglowego łańcucha z atomem tlenu [38, 39]. W obrębie tej grupy związków możemy wyróżnić: daidzeinę, genisteinę, biochaninę A oraz formononetynę. Nasiona soi warzywnej stanowiące najważniejsze źródło izoflawonów, zawierają ok. 128 mg izoflawonów/100 g [40]. W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania izoflawonami ze względu na tzw. „fenomen japoński” związany z rzadszym występowaniem chorób przewlekłych u Japończyków spo-

żyjących soję od wczesnych lat życia względem ludzi z populacji zachodniej [33]. Wymienia się bardzo wiele korzyści związanych z suplementacją i spożyciem izoflawonów, np. zmniejszenie objawów związanych z okresem menopauzy, chorobą wieńcową, niektórymi nowotworami czy osteoporozą [24]. Wiele badań potwierdza, iż przyjmowane izoflawony, w połączeniu ze zdrowym stylem życia, mogą wpływać na regulowanie poziomu glukozy, zmniejszanie insulinooporności i ograniczać ryzyko wystąpienia cukrzycy [38, 41]. W przypadku izoflawonów sojowych ich działanie może być wspomagane przez białko sojowe, które według danych literaturowych również ma właściwości przeciwcukrzycowe [41]. Fitoestrogeny z grupy izoflawonów wykazują szeroką gamę, często jeszcze nie całkiem poznanych, mechanizmów działania przeciwcukrzycowego.

4.3.1. Genisteina

Genisteina jest izoflawonem sojowym. W roślinach może występować w formie aglikozydu (genisteiny) lub w postaci β -glikozydu (genistyny), który może być przekształcany do właściwego aglikonu, przez bakteryjne glikozydazy w jelitach [41]. Podobnie jak wszystkie fitoestrogeny wykazuje zdolność wiązania się z receptorem estrogenowym, mając 20-krotnie większe powinowactwo do receptora ER β niż do ER α . Wykazuje zarówno działanie agonistyczne, jak i antagonistyczne względem receptora estrogenowego. Posiada ona raczej niską biodostępność ze względu na słabą rozpuszczalność w wodzie [42, 43]. Badania *in vitro* wskazują, że genisteina może wykazywać korzystne działanie, zarówno w cukrzycy typu 2, jak i typu 1, w którym stymulowała sekrecję insuliny [43]. Ma zdolność do obniżania stężenia glukozy we krwi, co potwierdzają badania *in vivo* prowadzone z wykorzystaniem myszy, u których jej poziom uległ redukcji po 5-6 tygodniach stosowania izoflawonu. W tym samym badaniu genisteina obniżała stężenie hemoglobiny glikowanej, glukagonu oraz regulowała zawartość lipidów w osoczu tych zwierząt. Podnosiła u nich także poziom glukokinazy w wątrobie oraz hamowała glukozo-6-fosfatazę (G6Pase), karboksykinazę fosfoenolopirogronianu (PEPCK), syntazę kwasów tłuszczowych (FAS), β -oksydację i palmitoilotransferazę karnityny (CPT) w tym narządzie [41]. Taka regulacja wyżej wymienionych enzymów wskazuje na blokowanie syntezy glukozy w wątrobie przez genisteinę i jest wykazywana w pracach innych autorów [42, 44]. Badanie prowadzone na szczurach z wywołaną za pomocą streptozotocyny (STZ) cukrzycą również potwierdziło wpływ genisteiny na obniżenie stężenia hemoglobiny glikowanej i podwyższenie poziomu insuliny [45]. Podwyższenie poziomu insuliny może być związane z podnoszeniem przez genisteinę wewnątrzkomórkowego gradientu jonów wapnia Ca²⁺ ważnego czynnika pozwalającego na egzocytozę insuliny poza komórkę [42]. Genisteina wykazuje również działania wspomagające leczenie powikłań cukrzycowych. W przypadku retinopatii cukrzycowej normalizuje przepuszczalność naczyń siatkówki u badanych zwierząt. W chorobach sercowo-naczyniowych zmniejsza uszkodzenie miocytów komorowych serca [45]. Badania prowadzone na myszach z wywołaną cukrzycą typu 2 ukazują korzystny wpływ genisteiny na zaburzenia rozrodczości wywołane w przebiegu tej choroby. U mężczyzn stosowanie genisteiny stymuluje proces spermatogenezy [46]. Działanie związane z jej wpływem na stan nefropatii cukrzycowej, jest głównie związane ze zmniejszaniem poziomu stresu oksydacyjnego, który jest jednym z kluczowych czynników wpływających na wystą-

pienie tego powikłania cukrzycowego. Obniża ona poziom markera peroksydacji lipidów, jakim jest malonyldialdehyd (MDA) oraz wpływa na wzrost (obniżonej w przebiegu cukrzycy) aktywności enzymów antyoksydacyjnych – dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) czy peroksydazy glutationowej (GPx) [45]. Jej wpływ na obniżanie poziomu stresu oksydacyjnego, poprzez zwalczanie wolnych rodników i usprawnianie systemu antyoksydacyjnego organizmu, ukazują również inni autorzy [46, 47]. Genisteina wykazuje również właściwości ochronne względem komórek β -trzustki, co jest szczególnie istotne w cukrzycy typu 1, w przebiegu której są one niszczone w wyniku reakcji autoimmunologicznej. U szczurów z wywołaną zastosowaniem STZ cukrzycą wykazywała ochronny, zależny od dawki, wpływ na komórki β -trzustki tych zwierząt, co skutkowało u nich podniesieniem poziomu insuliny w surowicy [47]. Inne badania potwierdzają korzystny wpływ genisteiny na przeżywalność komórek β -trzustki, utrzymanie ich masy i wzrost ich liczby w obrębie tego narządu [42, 44]. Dane z badań *in vitro* wskazują, że genisteina zwiększa także pobór glukozy przez komórki [48]. Niektóre izoflawony sojowe takie jak biochanina A, formononetyna i opisywana genisteina są poddawane modyfikacjom w celu zwiększenia ich rozpuszczalności oraz poprawy biodostępności. Modyfikacje polegają na wprowadzaniu atomu fluoru, estryfikacji kwasem acetylo-felurowym, tworzeniu koordynatów z pierwiastkami śladowymi np. chromem Cr^{3+} , pochodnych sulfonianowych czy izopropylowych. Niektóre powstałe pochodne wykazują większe właściwości przeciw-cukrzycowe niż ich pierwowzory, a stosowane w połączeniu z podstawowymi izoflawonami np. genisteiną wykazują synergistyczne działanie [43]. Genisteina działa również poprzez mechanizm epigenetyczny hamując metylację DNA oraz histonów [33].

4.3.2. Daidzeina

Daidzeina to izoflawon sojowy, różniący się od genisteiny brakiem obecności grupy hydroksylowej (OH) w szkielecie węglowym. W roślinach daidzeina występuje głównie w postaci glikozydu – daidzyny, który jako nieaktywny związek biologiczny pozostaje niezmodyfikowany podczas produkcji i obróbki żywności. Ważną rolę dla leczniczego działania daidziny odgrywa flora jelitowa, zwłaszcza szczepy *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*, dzięki którym nieaktywny glikozyd jest metabolizowany do aglikonu posiadającego aktywność biologiczną. Na aktywność, biodostępność oraz metabolizm daidziny wpływają czynniki, takie jak wiek, nawyki żywieniowe czy obecność konkretnych szczepów flory jelitowej [18]. Daidzeina jest bardzo często stosowana oraz badana pod względem jej zastosowań leczniczych łącznie z genisteiną, gdyż związki te wykazują bardzo podobne mechanizmy działania. Jednym ze wspólnych mechanizmów działania przeciw-cukrzycowego tych związków jest aktywacja receptorów PPAR γ oraz zwiększanie ekspresji transportera glukozy typu 4 (GLUT 4), co skutkuje zwiększonym poborem glukozy przez komórki, zwiększeniem ich insulinowrażliwości oraz powoduje stymulację różnicowania adipocytów. Autorzy podkreślają, iż stymulacja ta jest większa, gdy daidzeina oraz genisteina zostaną zastosowane łącznie (wystąpienie addycyjnego efektu działania) [49]. Wspólny jest również mechanizm aktywacji przez oba izoflawony kinazy białkowej aktywowanej przez AMP (AMPK) i translokacji transportera glukozy GLUT 4. Mechanizm ten jest kluczem do osiągnięcia homeostazy energetycznej komórek i zwiększenia przez nie poboru glukozy [18, 42, 48, 50]. Razem z genisteiną daidzeina wpływa hamująco na

G6Pase, PEPCK, FAS, β -oksydację i CPT w wątrobach myszy z wywołaną cukrzycą [41]. Inny eksperyment przeprowadzony na myszach wskazał, iż połączenie daidzyny oraz glicytyny obniżało stężenie glukozy oraz hemoglobiny glikowanej we krwi zwierząt oraz wpływało na zmniejszenie u nich poziomu stresu oksydacyjnego przez wzrost zawartości zredukowanej formy glutationu w wątrobie czy obniżanie w surowicy stężenia markera stresu oksydacyjnego 8-hydrokso-2-deoksyguanozyny [51]. Daidzeina podana w iniekcji myszom z wywołaną cukrzycą powodowała u nich zwiększenie tolerancji glukozy. Badania wskazują na hamowanie α -glukozydazy i α -amylazy przez daidzeinę, co może uczynić ją w przyszłości skutecznym zamiennikiem akarbozy dla pacjentów z cukrzycą [52]. Daidzeina wykazuje korzystny wpływ na regulację poziomu lipidów oraz leptyn we krwi. Zmniejsza ona również syntezę czynników prozapalnych np. czynnika martwicy nowotworu (TNF- α) czy interleukiny-6 (IL-6) oraz obniża poziom stresu oksydacyjnego [18, 49, 52]. Po aglikozylacji daidzeina może zostać dalej przekształcona do swoich metabolitów: dihydrodaidzeiny, desmetylo-angolensyny oraz equolu [18, 24]. Equol posiada bardzo podobne do swojego związku macierzystego mechanizmy działania przeciwcukrzycowego. Wiele badań potwierdza jego potencjalne, korzystne działanie w leczeniu i profilaktyce cukrzycy. Część autorów uważa, że to equol jest odpowiedzialny za lecznicze działania daidzeiny a zdolność do jego produkcji jest wyznacznikiem siły jej działania leczniczego [24].

4.3.3. Biochanina A

Biochanina A jest O-metylowanym izoflawonem. Jest związkiem słabo rozpuszczalnym w wodzie [53]. Podobnie jak w przypadku innych izoflawonów, źródło biochaniny A stanowią rośliny z rodziny bobowatych (*Fabaceae*) – koniczyna łąkowa, soja warzywna czy lucerna siewna. Jest ona także głównym izoflawonem występującym w nasionach ciecierzycy pospolitej [43, 54]. Jej farmakologiczne właściwości obejmują działania: antyoksydacyjne, antykancerogenne, neuroprotektoryjne, hepatoprotektoryjne, antyalergiczne estrogenopodobne, regulujące metabolizm glukozy oraz lipidów [53-55]. Regulacja poziomu glukozy we krwi oraz gospodarki lipidowej przez biochaninę A czyni ją potencjalnym komponentem w walce z cukrzycą typu 1 i 2. Obniża ona poziom lipidów w organizmie, jednocześnie wpływając na metabolizm i transport cholesterolu. Pomaga to w zachowaniu prawidłowej masy ciała i przeciwdziała otyłości [53, 56]. Efekt hipoglikemiczny jest osiągnięty w dużej mierze dzięki aktywacji przez biochaninę A receptorów PPAR α . Wpływa ona również na podniesienie poziomu, krążącej we krwi, insuliny oraz podnosi wrażliwość komórek na jej działanie. Zmniejsza poziom glukozy w osoczu, obniża współczynnik insulinooporności (HOMA-IR), zwiększając z kolei zapas glikogenu wątrobowego. U szczurów z wywołaną cukrzycą potwierdzono ochronne działanie biochaniny A na komórki β -trzustki. Badania na szczurach z wywołaną cukrzycą wykazały kurczenie się wysepek trzustkowych oraz naciek tłuszczowy w ich obrębie. Po zastosowaniu biochaniny A rozmiar wysepek był prawidłowy a naciek tłuszczowy znacznie mniejszy [53-55]. Ważnym mechanizmem działania przeciwcukrzycowego biochaniny A jest wywoływanie przez nią wzrostu wydzielania i poziomu adiponektyny oraz obniżenia poziomu rezystyny u szczurów z wywołaną cukrzycą. Związki te odgrywają bardzo istotną rolę w metabolizmie węglowodanów i lipidów [55]. Biochanina A może wykazywać potencjalnie korzystne działanie w leczeniu powikłań cukrzycy poprzez inhibicję glikozylacji insuliny oraz

hemoglobiny, a także swoje właściwości antyoksydacyjne [53, 57]. Związek ten wykazuje również skuteczność w leczeniu retinopatii cukrzycowej u szczurów z wywołaną cukrzycą, poprzez hamowanie stanu zapalnego w siatkówce oraz redukcję angiogenezy w jej obrębie. Zmniejszanie poziomu czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF) przez biochaninę A, jest prawdopodobnym mechanizmem obniżenia intensywności procesu angiogenezy [57]. Działania antyoksydacyjne związku obejmują zwiększenie poziomu nieenzymatycznych antyoksydantów np. glutationu (GSH) oraz aktywności enzymów antyoksydacyjnych takich jak SOD i katalaza (CAT) obserwowane u szczurów z wywołaną cukrzycą. U zwierząt stwierdzano także obniżenie stężenia osocznego markera stresu oksydacyjnego MDA oraz podniesienie całkowitego statusu antyoksydacyjnego (TAS) [53, 55, 56]. Biochanina A wpływa na metabolizm glukozy również poprzez regulacje, zaburzonej w przebiegu cukrzycy, aktywności enzymów odpowiadających za metabolizm glukozy takich jak G6Pase oraz fruktozo-1,6-bisfosfataza w nerkach i wątrobach szczurów z cukrzycą [54]. Niektórzy autorzy twierdzą, iż przeciwcukrzycowe działanie biochaniny A oraz wzmacnianie przez nią wrażliwości komórek na insulinę, jest spowodowane tym, iż zwiększa ona ekspresję i aktywację genu SIRT 1 (ang. *silent mating type information regulation 2 homolog 1*) kodującego białko sirtuinę [21].

4.3.4. Formononetyna

Formononetyna to izoflawon, którego źródło stanowią rośliny strączkowe takie jak: zielony groszek, fasola, korzenie lukrecji (*Glycyrrhiza glabra*), nasiona soi, kwiaty/zieleniec koniczyny łąkowej czy korzenie niektórych gatunków z rodzaju *Astragalus* (traganek) [58, 59]. Posiada wiele mechanizmów działania przeciwcukrzycowego, co stwarza możliwości jej zastosowania w leczeniu obu najważniejszych typów cukrzycy. Podobnie jak biochanina A jest aktywatorem receptorów PPAR tak ważnych w metabolizmie glukozy, regulacji gospodarki lipidowej, co pomaga zapobiegać cukrzycy oraz dyslipidemiom. U szczurów z wywołaną za pomocą STZ cukrzycą formononetyna obniżała stężenie glukozy we krwi oraz normowała poziom lipidów takich jak cholesterol, lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL), lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) i triglicerydów (TG) [60]. W badaniu tym wykazano także inne mechanizmy działania tego izoflawonu np. wpływała ona na wzrost zawartości glikogenu wątrobowego. U szczurów z cukrzycą zauważono również zwiększoną ekspresję genu SIRT 1 w tkankach trzustki. Działanie kodowanej przez gen sirtuiny 1 (deacetylazy histonowej klasy III) jest związane z regulacją metabolizmu glukozy i lipidów, produkcji insuliny i zwiększaniem wrażliwości komórek na jej działanie [60]. W cukrzycy typu 1 wywołanej u myszy za pomocą aloksanu, formononetyna hamowała apoptozę komórek β -trzustki, wspomagała ich regenerację, wydzielanie insuliny, normowała poziom glikogenu wątrobowego. Zwiększała także poziom mRNA dla glukokinazy oraz transportera glukozy GLUT 2 w tkankach trzustki badanych zwierząt [61]. W badaniach *in vitro* prowadzonych na komórkach linii HepG2 wykazano znaczący wzrost poboru glukozy przez komórki pod wpływem zastosowanej formononetyny – lepszy efekt był widoczny po długotrwałym stosowaniu fitoestrogenu [48]. Formononetyna wykazuje również właściwości antyoksydacyjne i przeciwzapalne. Poprzez hamowanie aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B zmniejsza stan zapalny i chroni komórki β -trzustki. U szczurów z wywołaną cukrzycą zmniejszała ona poziom cytokin prozapalnych

w nerkach zwierząt [58, 60, 61]. Działanie antyoksydacyjne formononetyny jest widoczne u szczurów z wywołaną cukrzycą typu 2, u których zastosowanie fitoestrogenu wywołało wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych SOD oraz CAT, zawartości nieenzymatycznych przeciwutleniaczy np. GSH oraz obniżenie zawartości markera peroksydacji lipidów MDA w nerkach badanych zwierząt. Właściwości te w połączeniu ze zwiększoną ekspresją SIRT 1 oraz redukcją ilości czynników prozapalnych mogą być potencjalnym mechanizmem działania formononetyny w leczeniu i zapobieganiu nefropatii cukrzycowej [58, 62].

5. Lignany

Lignany to bioaktywne, złożone kompleksy polifenolowe, utworzone poprzez połączenie dwóch reszt alkoholu koniferylowego, szeroko rozpowszechnione w świecie roślinnym. Uważa się, iż ich właściwości prozdrowotne wynikają głównie z aktywności przeciwutleniającej – zdolności do neutralizacji wolnych rodników [26, 63]. Przy normalnych poziomach estradiolu lignany zachowują się jak antagoniści estrogeny, ale już w okresie pomenopauzalnym u kobiet (przy niskim poziomie estradiolu) wykazują działanie podobne (ale słabsze w swoim zakresie) do estrogenów. Dodatkowo lignany mogą wpłynąć na syntezę 2-hydroksyestrogenu a przez to hamować wiązanie estrogeny i testosteronu z receptorami na globulinie wiążącej hormony płciowe (działanie kanceroprotekcyjne). Dodatek grupy hydroksylowej w położeniu *orto* do monofenolu, w szkielecie lignanu, wpływa na wzrost jego właściwości antyoksydacyjnych [26]. Lignany stosowane są w profilaktyce i zwalczaniu objawów klimakterium, cukrzycy, chorób serca i naczyń krwionośnych, chorób neurodegeneracyjnych oraz jako szeroko pojęte antyoksydanty [26, 63].

5.1. Lignany lniane

Diglukozyd sekoizolaricirezinolu (SDG) to główny lignan występujący w nasionach lnu zwyczajnego. Po spożyciu SDG dochodzi do hydrolizacji jego ugrupowania cukrowego przez bakterie zasiedlające przewód pokarmowy. W wyniku tego procesu powstaje sekoizolaricirezinol (SECO). Mikroflora okrężnicy może przekształcić SECO w enterodiol (END) poprzez dehydroksylację i demetylację jego cząsteczki. Przypuszczalnie, w dalszym etapie tego procesu END jest utleniane przez mikroflorę przewodu pokarmowego do enterolaktonu (ENL). Docelowo ENL może również powstać z metairezinolu. END i ENL to „ssacze” lignany (ang. *mammal lignans*) – swoją budową chemiczną zbliżone są do budowy ludzkich estrogenów, dzięki czemu mogą wykazywać powinowactwo do receptorów estrogenowych. Lignany „ssacze” posiadają grupy hydroksylowe w pozycji *meta*, podczas gdy lignany pochodzenia roślinnego posiadają utlenione podstawniki głównie w pozycji *para* [26, 63, 64].

SDG to liniowy kompleks połączony estrami, w którym C6-OH z glukozy zostało zestyfikowane do kwasu karboksylowego kwasu hydroksymetyloglutarowego [63, 65]. Badania *in vivo* prowadzone na zwierzętach wykazały, że dieta wysokotłuszczowa zawierająca 0,5-1,0% SDG wpłynęła na zmniejszenie zawartości TG w wątrobie i surowicy, całkowitego cholesterolu, insuliny i leptyny, co skutkowało zmniejszeniem przyrostu tłuszczu trzewnego [63]. W modelu cukrzycy typu 2, SDG zmniejsza stężenie, powiązanego z insulinopornością, białka C-reaktywnego, ryzyko rozwoju otyłości wywołanej przez nieprawidłową dietę oraz cukromocz [63, 65]. Sugeruje się, iż jego

działanie przeciwcukrzycowe wynika bezpośrednio z właściwości przeciwutleniających. W modelu cukrzycy indukowanej STZ, SDG zmniejszył o 75% ryzyko wystąpienia cukrzycy typu 1, obniżając poziom trzustkowego MDA, a u szczurów „Diabetic Fatty Zucker” (stanowiących genetyczny model cukrzycy typu 2 oraz otyłości) doprowadził do obniżenia poziomu hemoglobiny glikowanej i MDA w surowicy [26, 64, 65]. Karboksykinaza fosfoenolopirogronianowa (PEPCK) to enzym limitujący prędkość glukoneogenezy w wątrobie – SDG podany szczurom w dawce 100 μM całkowicie tłumiał ekspresję genu PEPCK – jest to jedno z wyjaśnień hipoglikemicznego działania tego związku. Modele zwierzęce wskazują jednocześnie na nefroprotektoryjne, hepato-protektoryjne oraz kardioprotektoryjne działanie [64]. SDG wykazał dodatkowo, w badaniach z udziałem ludzi, działanie kardioprotektoryjne związane z modulacją poziomów HDL, LDL, cholesterolu całkowitego, TG i wspomnianego wcześniej metabolizmu glukozy. Jego metabolit – ENL – pośredniczy w zwiększeniu ekspresji czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego, endotelialnej syntazy tlenu azotu i oksygenazy hemowej 1, wpływając na angiogenezę w mięśniu sercowym [63].

Zawarty w żywności o niskim indeksie glikemicznym, rozpuszczalny błonnik pochodzący z lnu, może współuczestniczyć wraz z fitoestrogenami w zapobieganiu niektórym konsekwencjom metabolicznym związanym z insulinoopornością. Za mechanizm tego zjawiska uznaje się modulację wydzielania insuliny skutkującą utrzymaniem homeostazy glukozy w osoczu krwi. Zaobserwowano, iż codzienne spożycie siemienia lnianego w dawce 50 g przez okres 4 tygodni spowodowało u kobiet obniżenie poziomu glukozy we krwi [26].

5.2. Sezamina

Sezamina to lignan o strukturze furofuranu, który znajduje się głównie w nasionach sezamu, oleju i mące sezamowej [66]. W badaniach na mysim i szczurzym modelu cukrzycy typu 2, sezamina wykazała zdolność do obniżenia poziomu glukozy oraz insuliny we krwi. Kombinacja ta świadczy o tym, iż sezamina zwiększyła wrażliwość organizmu na obwodową insulinę, oraz że może mieć ona powinowactwo do receptorów insulinowych oraz zwiększać liczbę receptorów insulinowych o niskim powinowactwie. Sezamina wpływa również na ogólną poprawę kontroli glikemii, powodując wzrost syntezy wątrobowego glikogenu [66, 67]. Dodatkowo związek ten wykazuje działanie hipolipidemiczne. Działanie antyoksydacyjne sezaminy uwidacznia się poprzez korzystny wpływ na markery stresu oksydacyjnego – powoduje ona zmniejszenie stężenia MDA przy jednoczesnym wzroście aktywności enzymów antyoksydacyjnych – SOD i GPx oraz zwiększeniu stężenia glutationu [67]. Badania przeprowadzane z udziałem ludzi potwierdzają hipoglikemiczne działanie sezaminy (obniżenie poziomu glukozy na czczo i hemoglobiny glikowanej) oraz jej korzystny wpływ na parametry związane z otyłością (zmniejszanie obwodu talii, bioder i wskaźnika otyłości ciała). Działanie przeciwzapalne sezaminy wynika z jej zdolności do hamowania Δ -5 desaturazy, zaangażowanej w syntezę wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, zmniejszenia syntezy kwasu arachidonowego i prostaglandyn oraz zwiększenia poziomu γ -tokoferolu w surowicy krwi [66].

6. Stilbeny

Stilbeny to związki fenolowe występujące u różnych gatunków roślin. Ich budowa strukturalna odznacza się szkieletem węglowym zbudowanym z dwóch pierścieni aromatycznych połączonych dwuwęglowym łańcuchem alifatycznym (C6-C2-C6), który u poszczególnych związków różni się rodzajem i położeniem podstawników na pierścieniu [68]. W przyrodzie występują zarówno w formie monomerów, jak i oligomerów, w formie wolnej (aglikony) lub jako skoniugowane glikozydy, a także wykazują izomerię geometryczną *cis* i *trans* (przy czym forma *trans* jest bardziej powszechna i wykazuje wyższą stabilność). Stilbeny są syntetyzowane w roślinach na drodze fenylopropanoidowej – w sposób podobny do flawonoidów. Powszechnie uważa się, iż stilbeny wykazują właściwości kardioprotekcyjne, neuroprotekcyjne, przeciwcukrzycowe, przeciwzapalne czy antynowotworowe na organizm ludzi i zwierząt [69].

6.1. Resweratrol

Resweratrol to polifenolowy związek z grupy stilbenów – swoją budową strukturalną przypomina 17- β -estradiol oraz dietylostilbestrol – syntetyczny estrogen, przez co posiada zdolność do wiązania się z receptorami estrogenowymi typu α i β [70-73]. Występuje głównie w skórce owoców winogron oraz produkcji ich fermentacji – czerwonym winie. Dodatkowo można go znaleźć w korzeniach rdestowca ostrokończystego, orzeszkach ziemnych, owocach morwy, żurawiny, borówkach czy produktach, takich jak kakao i czekolada [74]. Cząsteczka resweratrolu wykazuje stereoisomerię – w środowisku naturalnym dominuje forma *trans*, która to charakteryzuje się również wyższą aktywnością biologiczną [27, 74]. Resweratrol wykazuje dość niską biodostępność po podaniu doustnym (jest bardzo szybko metabolizowany) [69, 75]. Działanie przeciwcukrzycowe resweratrolu wykazano zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo*, prowadzonych na modelach zwierzęcych cukrzycy typu 1 i typu 2 [73, 75-79]. Działanie hipoglikemiczne wywiera on poprzez zmniejszenie oporności na insulinę oraz normalizację jej wydzielania, poprawę homeostazy glukozy, ochronę komórek β wysp trzustki (powoduje wzrost ekspresji i aktywności AMPK oraz SIRT 1), zwiększenie aktywności SOD, CAT, GPx, S-transferazy glutationowej, osłabienie procesu autoimmunologicznego niszczenia komórek β -trzustki u osób chorych na cukrzycę [69, 73-75, 77-80]. Dodatkowo resweratrol wpływa na zmniejszenie wątrobowej produkcji glukozy, zwiększenie obwodowego wykorzystania glukozy, zwiększenie syntezy i gromadzenia glikogenu w wątrobie oraz zmniejszenie aktywności enzymów odpowiedzialnych za glukoneogenezę [79]. W badaniach przeprowadzonych na szczurach, resweratrol wykazał również korzystny wpływ objawiający się niwelowaniem skutków powikłań cukrzycowych, takich jak nefropatia, neuropatia, kardiomiopatia, waskulopatia, retinopatia, kwasica ketonowa czy dysfunkcja mięśni szkieletowych [27, 69, 72, 73, 75, 77, 79]. W kardiomiopatii jego ochronne działanie objawiało się zwiększeniem produkcji tlenu azotu, hamowaniem agregacji płytek krwi, stymulacją rozszerzania naczyń krwionośnych oraz obniżeniem ciśnienia tętniczego krwi [27, 69, 70, 72, 73, 75, 77, 79]. W przebiegu retinopatii resweratrol wpływał na redukcję stresu oksydacyjnego oraz zwiększał wychwyt tlenu singletowego [69, 72, 79]. Jego pozytywny wpływ na ograniczenie dysfunkcji mięśni szkieletowych związany był ze zwiększeniem ekspresji GLUT 4, jego translokacją do błony komórkowej oraz zwiększeniem

wewnątrzkomórkowego transportu glukozy [69, 72, 79]. W tkance tłuszczowej zwierząt z insulinoopornością, resweratrol ograniczał procesy zapalne w niej zachodzące, zmniejszał gromadzenie się lipidów w wątrobie chroniąc ją przed procesami stłuszczenia poprzez zmniejszenie ekspresji FAS i karboksylazy acetylo-CoA oraz zwiększenie aktywności wątrobowego GPx [69, 75, 79]. Resweratrol wpływał na poprawę metabolizmu tkankowego przez zmniejszenie aktywności enzymów lipogennych oraz ograniczanie adipogenezy [74, 79].

6.2. Pterostilben

Pterostilben to pochodna resweratrolu występująca w roślinach z rodzaju: winorośl, borówka czy pterokarpus. Posiada on dwie grupy metoksyłowe w swojej strukturze, które czynią go bardziej lipofilnym, a co za tym idzie, bardziej biodostępnym, w porównaniu do innych przedstawicieli grupy stilbenów [27, 69]. Badania *in vitro* wskazują na działanie kardioprotekcyjne tego związku wynikające ze zwiększania poziomu sirtuiny 1, a co za tym idzie, polepszenia funkcjonalności mitochondriów i zdolności antyoksydacyjnej organizmu. Dodatkowo związek ten chronił komórki β -trzustki przed stresem oksydacyjnym i apoptozą. Badania *in vivo* na zwierzętach wykazały jego właściwości przeciwcukrzycowe wynikające ze zwiększenia aktywności wątrobowej glukokinazy i wychwytu glukozy przez mięśnie szkieletowe oraz kardioprotekcyjne polegające na zmniejszaniu poziomu markerów stresu oksydacyjnego. Co więcej, pterostilben przeciwdziałał powstawaniu otyłości poprzez hamowanie lipogenezy, zwiększenie utleniania kwasów tłuszczowych w wątrobie oraz zwiększenie aktywności AMPK i karboksylazy acetylo-CoA w tkance tłuszczowej. Podczas badań z udziałem ludzi wykazano, iż pterostilben może działać hipotensyjnie, hamować agregację płytek krwi i stymulować produkcję tlenu azotu [69].

6.3. Peonilaktiflorol

Nasiona piwonii chińskiej to potencjalne źródło stilbenów o działaniu przeciwcukrzycowym – w 2019 roku zespół Zhang Ch-Ch wyizolował z nich m.in. nową pochodną resweratrolu – peonilaktiflorol, który jest jego tetramerem [81]. Olej z nasion piwonii, jak również wyizolowane z nasion piwonii frakcje stilbenów, w badaniach typu *in vitro* wykazały silną aktywność przeciwko α -glukozydazie [81, 82]. Podanie oleju z nasion piwonii myszom z cukrzycą wywołaną zastosowaniem STZ, zmniejszyło u nich stężenie glukozy we krwi, jak również akumulację lipidów wątrobowych. Świadczy to o pozytywnym wpływie oleju z nasion piwonii na regulację wchłaniania oraz metabolizm węglowodanów i lipidów [82]. Dodatkowo, nasiona piwonii wykazują działanie hamujące niereceptorową fosfatazę tyrozynowo-białkową typu 1 (enzymu powiązanego z wystąpieniem otyłości i cukrzycy) [81].

7. Kumestany

Kumestany to podgrupa fitoestrogenów wykazująca podobieństwo strukturalne do izoflawonów. Związkami należącymi do kumestanów i wykazującymi jednocześnie najsilniejsze działanie estrogenowe są kumestrol oraz 4'-metoksykumestrol.

Kumestrol to najważniejszy i najlepiej poznany przedstawiciel kumestanów, będący pod względem budowy chemicznej fenylołą pochodną kumaryny [17, 83]. Oprócz wcześniej wymienianych źródeł kumestrolu, takich jak lucerna siewna, koniczyna

czerwona czy fasola zwyczajna, duże ilości tego fitoestrogenu znajdują się w szpinaku (*Spinacia oleracea*), brukselce (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*), czy nasionach soi. Inne kumestany takie jak np. repensol czy trifoliol występują w groszku, różnych odmianach fasoli oraz gatunkach koniczyny [84]. Kumestrol posiada 30-100 razy większą aktywność estrogenową niż izoflawony. W swej strukturze zawiera dwie grupy hydroksylowe umiejscowione w tych samych pozycjach co w 17- β -estradiolu [85]. U myszy z wywołaną cukrzycą typu 2 kumestrol obniżał stężenie glukozy na czczo, hemoglobiny glikowanej, poziomu glukagonu, zmniejszał AUC (pole powierzchni pod krzywą) doustnego testu tolerancji glukozy oraz podwyższał poziom glikogenu wątrobowego u badanych zwierząt [86]. W badaniach *in vitro* stwierdzono, iż kumestrol indukował aktywność SIRT 1 oraz biogenezę mitochondriów. Zwiększając zawartość mitochondriów w komórkach, kumestrol podnosił w nich poziom ATP i zwiększał wychwyt glukozy. Takie działanie sugeruje, że kumestrol może poprawić metabolizm energetyczny [87]. Niektórzy autorzy twierdzą, iż jednym z mechanizmów działania kumestrolu, w metabolizmie węglowodanów, jest powodowanie zmian w obrębie receptorów insulinowych [19]. Kumestrol może znaleźć zastosowanie nie tylko w leczeniu cukrzycy, ale także towarzyszącej jej otyłości. Stosowanie diety zawierającej ten fitoestrogen u kurcząt zmniejszało u nich stężenie cholesterolu w osoczu w sposób zależny od dawki podanego związku [19]. Badania przeprowadzone na myszach karmionych dietą wysokotłuszczową wykazały, że kumestrol redukował masę ciała badanych zwierząt, obniżając zawartość białej tkanki tłuszczowej a podwyższając poziom i aktywność brunatnej, poprawiając zaburzoną tolerancję glukozy i wrażliwość na insulinę [84, 88].

8. Podsumowanie

Fitoestrogeny są związkami szeroko rozpowszechnionymi w świecie roślin i stanowią ważny komponent codziennej diety. Pomimo iż najczęstszym ich zastosowaniem jest łagodzenie objawów menopauzy, mogą one znaleźć zastosowanie w leczeniu i profilaktyce chorób, w tym metabolicznych. Badania prowadzone *in vivo* i *in vitro* wskazują na dużą różnorodność mechanizmów ich przeciwcukrzycowego działania, co zwiększa możliwość ich potencjalnego zastosowania w profilaktyce i/lub leczeniu cukrzycy. Wskazane jest prowadzenie dalszych badań w tym zakresie. Należy jednak zwrócić szczególną uwagę na bezpieczeństwo ich długotrwałego działania i zróżnicowany wpływ na organizm.

Literatura

1. Punthakee Z., Goldenberg R., Katz P., *Definition, classification and diagnosis of diabetes, prediabetes and metabolic syndrome*, Canadian Journal of Diabetes, 42, 2018, s. 10-15.
2. Dadej A., Dadej D., Tomczak S., Jelińska A., *Inhibitory kotransportera sodowo-glukozowego 2 – nowe leki w leczeniu cukrzycy*, Farmacja Współczesna, 12, 2019, s. 23-28.
3. Bailey C.J., Day C., *Metformin: its botanical background*, Practical Diabetes International, 21, 2004, s. 115-117.
4. Thirumalai T., David B.C., Sathiyaraj K., Senthilkumar B., David E., *Ethnobotanical study of anti-diabetic medicinal plants used by the local people in Javadhu hills Tamilnadu, India*, Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2, 2012, s. 910-913.

5. Mukherjee P.K., Nema N.K., Pandit S., Mukherjee K., *Indian Medicinal Plants with Hypoglycemic Potential*, [w:] Watson R., Preedy V. (red.), *Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes*, Elsevier Inc, 2013, s. 235-264.
6. Ogurtsova K., da Rocha Fernandes J.D., Huang Y., Linnenkamp U., Guariguata L., Cho N.H., Cavan D., Makaroff L.E., *IDF Diabetes Atlas: global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040*, *Diabetes Research and Clinical Practice*, 128, 2017, s. 40-50.
7. Topor-Madry R., Wojtyniak B., Strojek K., Rutkowski D., Bogusławski S., Ignaszewska-Wyrzykowska A., Jarosz-Chobot P., Czech M., Kozierkiewicz A., Chlebus K., Jędrzejczyk T., Mysliwiec M., Polanska J., *Prevalence of diabetes in Poland: a combined analysis of national databases*, *Diabetic Medicine*, 36, 2019, s. 1209-1216.
8. Mekala K.C., Bertoni A.G., *Epidemiology of diabetes mellitus*, [w:] Orlando G., Piemonti L., Ricordi C., Stratta R.J., Gruessner R.W.G. (red.), *Transplantation, Bioengineering, and Regeneration of the Endocrine Pancreas. Volume 1*, Elsevier Inc, 2019, s. 49-58.
9. Khawandanah J., *Double or hybrid diabetes: A systematic review on disease prevalence, characteristics and risk factors*, *Nutrition & Diabetes*, 9, 2019, s. 1-9.
10. Grycel S., Błachnio-Zabielska A., *Cukrzyca typu 2 – epidemiologia i farmakoterapia*, *Problemy Higieny i Epidemiologii*, 100, 2019, s. 75-81.
11. Jayanthi R., Srinivasan A.R., Hanifah M., Maran A.L., *Associations among Insulin Resistance, Triacylglycerol/High Density Lipoprotein (TAG/HDL ratio) and Thyroid hormone levels – A study on Type 2 diabetes mellitus in obese and overweight subjects*, *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Review*, 11, 2017, s. 121-126.
12. Chatterjee S., Khunti K., Davies M.J., *Type 2 diabetes*, *Lancet*, 389, 2017, s. 2239-2251.
13. Maritim A.C., Sanders R.A., Watkins J.B., *Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review*, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17, 2003, s. 24-38.
14. Tuszyński P.K. (red.), *Zeszyty Apteczne: Cukrzyca i otyłość z perspektywy farmaceuty*, Wydawnictwo Farmaceutyczne, Kraków 2020, s. 27-52, s. 145-147, s. 161-172.
15. Rogowicz D., Wołowicz Ł., Gilewski W., Chudzińska M., Zukow W., Sinkiewicz W., *Hipoglikemia jako nowy czynnik ryzyka sercowo-naczyniowego*, *Journal of Education, Health and Sport*, 7, 2017, s. 896-911.
16. American Diabetes Association., *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*, *Diabetes Care*, 33, Supplement 1, 2010, s. 62-69
17. Lamer-Zarawska E., Kowal-Gierczak B., Niedworok J. (red.), *Fitoterapia i leki roślinne*, Wydawnictwo Lekarskie PZWZ, Warszawa 2007, s. 1-500.
18. Das D., Sarkar S., Bordoloi J., Wann S.B., Kalita J., Manna P., *Daidzein, its effects on impaired glucose and lipid metabolism and vascular inflammation associated with type 2 diabetes*, *BioFactors*, 44, 2018, s. 407-417.
19. Bhathena S.J., Velasquez M.T., *Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes*, *American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 2002, s. 1191-1201.
20. Peirotén Á., Bravo D., Landete J.M., *Bacterial metabolism as responsible of beneficial effects of phytoestrogens on human health*, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60, 2020, s. 1922-1937.
21. Oza M.J., Kulkarni Y.A., *Biochanin A improves insulin sensitivity and controls hyperglycemia in type 2 diabetes*, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 107, 2018, s. 1119-1127.
22. Kraszewska O., Nynca A., Kamińska B., Ciereszko R., *Fitoestrogeny. I. Występowanie, metabolizm i znaczenie biologiczne u samic*, *Postępy Biologii Komórki*, 34, 2007, s. 189-205.
23. Hsieh C.J., Hsu Y.L., Huang Y.F., Tsai E.M., *Molecular mechanisms of anticancer effects of phytoestrogens in breast cancer*, *Current Protein & Peptide Science*, 19, 2018, s. 323-332.
24. Duru K.C., Kovaleva E.G., Danilova I.G., van der Bijl P., Belousova A.V., *The potential beneficial role of isoflavones in type 2 diabetes mellitus*. *Nutrition Research*, 59, 2018, s. 1-15.

25. Rodríguez-García C., Sánchez-Quesada C., Toledo E., Delgado-Rodríguez M., Gaforio J.J., *Naturally Lignan-Rich Foods: A Dietary Tool for Health Promotion?*, *Molecules*, 24, 2019, s. 1-25.
26. Toure A., Xueming X., *Flaxeed lignans: source, biosynthesis, metabolism, antioxidant activity, bio-active components and health benefits*, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 2010, s. 261-269.
27. Salehi B., Mishra A.P., Nigam M., Sener B., Kilic M., Sharifi-Rad M., Fokou P.V.T., Martins N., Sharifi-Rad J., *Resveratrol: A double-edged sword in health benefits*, *Biomedicines*, 6, 2018, s. 1-20.
28. Nehybová T., Šmarda J., Beneš P., *Plant Coumestans: recent advances and future perspectives in cancer therapy*, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 14, 2014, s. 1351-1362.
29. Boker L.K., Van Der Schouw Y.T., De Kleijn M.J.J., Jacques P.F., Grobbee D.E., Peeters P.H.M., *Intake of dietary phytoestrogens by Dutch women*, *Journal of Nutrition*, 132, 2002, s. 1319-1328.
30. Asokan Shibu M., Kuo W.W., Kuo C.H., Day C.H., Shen C.Y., Chung L.C., Lai C.H., Pan L.F., Padma V.V., Huang C.Y., *Potential phytoestrogen alternatives exert cardio-protective mechanisms via estrogen receptors*, *BioMedicine*, 7, 2017, s. 25-30.
31. Nynca A., Kraszewska O., Słomczyńska M., Ciereszko R., *Fitoestrogeny. II. Wewnątrzkomórkowy mechanizm działania w układzie rozrodczym samicy*, *Postępy Biologii Komórki*, 34, 2007, s. 207-222.
32. Woławek-Potocka I., Mannelli C., Boruszewska D., Kowalczyk-Zieba I., Waśniewski T., Skarzyński D.J., *Diverse Effects of Phytoestrogens on the Reproductive Performance: Cow as a Model*, *International Journal of Endocrinology*, 2013, 2013, s. 1-15.
33. Rietjens I.M.C.M., Louisse J., Beekmann K., *The potential health effects of dietary phytoestrogen*, *British Journal of Pharmacology*, 174, 2017, s. 1263-1280.
34. Paschou S., Anagnostis P., Pavlou D., Vryonidou A., Goulis D., Lambrinoudaki I., *Diabetes in Menopause: Risks and Management*, *Current Vascular Pharmacology*, 17, 2019, s. 556-563.
35. Jayagopal V., Albertazzi P., Kilpatrick E.S., Howarth E.M., Jennings P.E., Hepburn D.A., Atkin S.L., *Beneficial effects of soy phytoestrogen intake in postmenopausal women with type 2 diabetes*, *Diabetes Care*, 25, 2002, s. 1709-1714.
36. Talaei M., Pan A., *Role of phytoestrogens in prevention and management of type 2 diabetes*, *World Journal of Diabetes*, 6, 2015, s. 271-283.
37. Szkutnik-Fiedler D., Jedrzejczyk M., Grześkowiak E., Bartkowiak-Wieczorek J., Seremak-Mrozikiewicz A., Drews K., Mrozikiewicz P.M., *Rola terapii fitoestrogenowej w łagodzeniu dolegliwości u kobiet po menopauzie*, *Ginekologia Polska*, 81, 2010, s. 929-934.
38. Ding M., Pan A., Manson J.E., Willett W.C., Malik V., Rosner B., Giovannucci E., Hu F.B., Sun Q., *Consumption of soy foods and isoflavones and risk of type 2 diabetes: A pooled analysis of three US cohorts*, *European Journal of Clinical Nutrition*, 70, 2016, s. 1381-1387.
39. Czerpak R., Pietryczuk A., Jabłońska-Trypuć A., Katarzyna O., *Aktywność biologiczna izoflawonoidów i ich znaczenie terapeutyczne i kosmetyczne*, *Postępy Fitoterapii*, 2, 2009, s. 113-121.
40. Kwiatkowska E., *Fitoestrogeny sojowe w profilaktyce chorób cywilizacyjnych*, *Postępy Fitoterapii*, 4, 2007, s. 207-211.
41. Ae Park S., Choi M.S., Cho S.Y., Seo J.S., Jung U.J., Kim M.J., Sung M.K., Park Y.B., Lee M.K., *Genistein and daidzein modulate hepatic glucose and lipid regulating enzyme activities in C57BL/KsJ-db/db mice*, *Life Sciences*, 79, 2006, s. 1207-1213.

42. Gętek M., Czech N., Muc-Wierzgoń M., Grochowska-Niedworok E., Kokot T., Nowakowska-Zajdel E., *The active role of leguminous plant components in type 2 diabetes*, Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2014, s. 1-12.
43. Li P., Shi X., Wei Y., Qin L., Sun W., Xu G., Xu T., Liu T., *Synthesis and biological activity of isoflavone derivatives from chickpea as potent anti-diabetic agents*, Molecules, 20, 2015, s. 17016-17040.
44. Choi M.S., Jung U.J., Yeo J., Kim M.J., Lee M.K., *Genistein and daidzein prevent diabetes onset by elevating insulin level and altering hepatic gluconeogenic and lipogenic enzyme activities in non-obese diabetic (NOD) mice*, Diabetes/Metabolism Research and Reviews, 24, 2008, s. 74-81.
45. Chen J., Mangelinckx S., Adams A., Wang Z.T., Li W.L., De Kimpe N., *Natural flavonoids as potential herbal medication for the treatment of diabetes mellitus and its complications*, Natural Product Communications, 10, 2015, s. 187-200.
46. Verma R., Samanta R., Krishna A., *Comparative effects of estrogen and phytoestrogen, genistein on testicular activities of streptozotocin-induced type 2 diabetic mice*, Reproductive Sciences, 26, 2019, s. 1294-1306.
47. El-Kordy E.A., Alshahrani A.M., *Effect of genistein, a natural soy isoflavone, on pancreatic β -cells of streptozotocin-induced diabetic rats: Histological and immunohistochemical study*, Journal of Microscopy and Ultrastructure, 3, 2015, s. 108-119.
48. Roostaei D., Rezazadeh S., Sharafi S., White K., *Isolation and Characterisation of Anti-diabetic Pharmacological Activities of Phytoestrogens*, Journal of Medical Plants, 15, 2016, s. 145-152.
49. Kone O.H., *The combined effects of genistein and daidzein on adipocyte differentiation*, University of Massachusetts Amherst, 2014, Masters Theses, 26.
50. Cederroth C.R., Vinciguerra M., Gjinovci A., Kühne F., Klein M., Cederroth M., Caille D., Suter M., Neumann D., James R.W., Doerge D.R., Wallimann T., Meda P., Foti M., Rohner-Jeanrenaud F., Vassalli J.D., Nef S., *Dietary phytoestrogens activate AMP-activated protein kinase with improvement in lipid and glucose metabolism*, Diabetes, 57, 2008, s. 1176-1185.
51. Zang Y., Igarashi K., Yu C., *Anti-obese and anti-diabetic effects of a mixture of daidzin and glycitin on C57BL/6J mice fed with a high-fat diet*, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 79, 2015, s. 117-123.
52. Tian D., Liu J., Liu N., Wang R., Ai Y., Jin L., Feng L., Wei P., Li Z., Wang C., Zhang W., *Daidzin decreases blood glucose and lipid in streptozotocin-induced diabetic mice*, Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 15, 2016, s. 2435-2443.
53. Yu C., Zhang P., Lou L., Wang Y., *Perspectives regarding the role of biochanin A in humans*, Frontiers in Pharmacology, 10, 2019, s. 1-11.
54. Harini R., Ezhumalai M., Pugalendi K.V., *Antihyperglycemic effect of biochanin A, a soy isoflavone, on streptozotocin-diabetic rats*, European Journal of Pharmacology, 676, 2012, s. 89-94.
55. Salemi Z., Ghasemi H., Morovati A., Sadri H., *Effects of biochanin A on resistin, adiponectin and some stress oxidative markers in normal and STZ- induced diabetic rats*, Medical Laboratory Sciences, 4, 2018, s. 9-16.
56. Sadri H., Goodarzi M.T., Salemi Z., Seifi M., *Antioxidant effects of biochanin A in streptozotocin induced diabetic rats*, Brazilian Archives of Biology and Technology, 60, 2017, s. 1-10.
57. Mehrabadi M.E., Salemi Z., Babaie S., Panahi M., *Effect of biochanin A on retina level of VEGF, TNF- α and IL-1 β in STZ induced diabetic rats*, Canadian Journal of Diabetes, 42, 2018, s. 639-644.

58. Jain P.G., Nayse P.G., Patil D.J., Shinde S.D., Surana S.J., *The possible antioxidant capabilities of formononetin in guarding against streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats*, Future Journal of Pharmaceutical Sciences, 6, 2020, s. 1-9.
59. Kaczmarczyk-Sedlak I., Wojnar W., Zych M., Ozimina-Kamińska E., Taranowicz J., Siwek A., *Effect of formononetin on mechanical properties and chemical composition of bones in rats with ovariectomy-induced osteoporosis*, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013, s. 1-10.
60. Oza M.J., Kulkarni Y.A., *Formononetin treatment in type 2 diabetic rats reduces insulin resistance and hyperglycemia*, Frontiers in Pharmacology, 9, 2018, s. 1-11.
61. Qiu G., Tian W., Huan M., Chen J., Fu H., *Formononetin exhibits anti-hyperglycemic activity in alloxan-induced type 1 diabetic mice*, Experimental Biology and Medicine, 242, 2017, s. 223-230.
62. Oza M.J., Kulkarni Y.A., *Formononetin attenuates kidney damage in type 2 diabetic rats*, Life Sciences, 219, 2019, s. 109-121.
63. Imran M., Ahmad N., Anjum F.M., Khan M.K., Mushtaq Z., Nadeem M., Hussain S., *Potential protective properties of flax lignan secoisolariciresinol diglucoside*, Nutrition Journal, 14, 2015, s. 1-7.
64. Westcott N.D., Muir A.D., *Flax seed lignan in disease prevention and health promotion*, Phytochemistry Reviews, 2, 2003, s. 401-417.
65. Kezimana P., Dmitriev A.A., Kudryavtseva A.V., Romanova E.V., Melnikova N.V., *Secoisolariciresinol diglucoside of flaxseed and its metabolites: biosynthesis and potential for nutraceuticals*, Frontiers in Genetics, 9, 2018, s. 1-9.
66. Shahi M.M., Zakerzadeh M., Zakerkish M., Shahi M.M., Zakerzadeh M., *Effect of Sesamin Supplementation on Glycemic Status, Inflammatory Markers, and Adiponectin Levels in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus*, Journal of Dietary Supplements, 14, 2017, s. 65-75.
67. Hong L., Yi W., Liangliang C., Juncheng H., Qin W., Xiaoxiang Z., *Hypoglycaemic and hypolipidaemic activities of sesamin from sesame meal and its ability to ameliorate insulin resistance in KK-Ay mice*, Journal of the Science of Food and Agriculture, 93, 2013, s. 1833-1838.
68. Kozłowska M., Czekala Ł., *Stilbenes and their role in disease resistance*, Progress in Plant Protection, 57, 2017, s. 27-35.
69. Akinwumi B.C., Bordun K.A.M., Anderson H.D., *Biological activities of stilbenoids*, International Journal of Molecular Sciences, 19, 2018, s. 1-25.
70. Baur J.A., Sinclair D.A., *Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence*, Nature Reviews. Drug Discovery, 5, 2006, s. 493-506.
71. Gambini J., Inglés M., Olaso G., Lopez-Grueso R., Bonet-Costa V., Gimeno-Mallench L., Mas-Bargues C., Abdelaziz K.M., Gomez-Cabrera M.C., Vina J., Borras C., *Properties of resveratrol: in vitro and in vivo studies about metabolism, bioavailability, and biological effects in animal models and humans*, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2015, 2015, 837042.
72. Park E.J., Pezzuto J.M., *The pharmacology of resveratrol in animals and humans*, Biochimica et Biophysica Acta, 1852, 2015, s. 1071-1113.
73. Kuršvietienė L., Stanevičienė I., Mongirdienė A., Bernatoniene J., *Multiplicity of effects and health benefits of resveratrol*, Medicina, 52, 2016, s. 148-155.
74. Kopeć A., Piątkowska E., Leszczyńska T., Biezanowska-Kopeć R., *Prozdrowotne właściwości resweratrolu*, Żywność: nauka - technologia - jakość, 18, 2011, s. 5-15.
75. Reinisalo M., Kårlund A., Koskela A., Kaarniranta K., Karjalainen R.O., *Polyphenol stilbenes: molecular mechanisms of defence against oxidative stress and aging-related diseases*, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2015, 2015, 340520.

76. Yulug E., Tured S., Alver A., Kutlu O., Karaguzel E., Kahraman C., *Effects of resveratrol on testis damage in streptozotocin induced diabetic rats*, Journal of Animal and Veterinary Advances, 12, 2013, s. 747-753.
77. Harikumar K.B., Aggarwal B.B., *Resveratrol: a multitargeted agent for age-associated chronic diseases*, Cell Cycle, 7, 2008, s. 1020-1035.
78. Szkudelski T., Szkudelska K., *Anti-diabetic effects of resveratrol*, Annals of the New York Academy of Sciences, 1215, 2011, s. 34-39.
79. Szkudelski T., Szkudelska K., *Resveratrol and diabetes: from animal to human studies*, Biochimica et Biophysica Acta, 1852, 2015, s. 1145-1154.
80. Vallianou N.G., Evangelopoulos A., Kazakis C., *Resveratrol and diabetes*, The review of diabetic studies, 10, 2013, s. 236-242.
81. Zhang C.C., Geng C.A., Huang X.Y., Zhang X.M., Chen J.J., *Antidiabetic stilbenes from peony seeds with PTP1B, α -glucosidase, and DPPIV inhibitory activities*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 67, 2019, s. 6765-6772.
82. Su J., Wang H., Ma C., Lou Z., Liu C., Tanver Rahman M., Gao C., Nie R., *Anti-diabetic activity of peony seed oil, a new resource food in STZ-induced diabetic mice*, Food & Function, 6, 2015, s. 2930-2938.
83. Kohlmunzer S., *Farmakognozja. Podręcznik dla studentów farmacji*, Wydawnictwo Lekarskie PZWZ, Warszawa 2007, s. 1-670.
84. Kuryłowicz A., Cakała-Jakimowicz M., Puzianowska-Kuźnicka M., *Targeting abdominal obesity and its complications with dietary phytoestrogens*, Nutrients, 12, 2020, 582.
85. Nikolić I., Savić-Gajić I., Tačić A., Savić I., *Classification and biological activity of phytoestrogens: a review*, Advanced Technologies, 6, 2017, s. 96-106.
86. Seo B.H., Kim K.O., Lee J.H., Lee H.S., *Effects of phytoestrogens on glucose metabolism in C57BL/KsOlaHsd-db/db Mice*, The Korean Journal of Nutrition, 44, 2011, s. 275-283.
87. Seo D.B., Jeong H.W., Lee S.J., Lee S.J., *Coumestrol induces mitochondrial biogenesis by activating sirt1 in cultured skeletal muscle cells*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62, 2014, s. 4298-4305.
88. Kim S.N., Ahn S.Y., Song H.D., Kwon H.J., Saha A., Son Y., Cho Y.K., Jung Y.S., Jeong H.W., Lee Y.H., *Antiobesity effects of coumestrol through expansion and activation of brown adipose tissue metabolism*, Journal of Nutritional Biochemistry, 76, 2020, 108300.

Fitoestrogeny w walce z cukrzycą

Streszczenie

Cukrzyca to zespół zaburzeń metabolicznych, charakteryzujący się stanem przewlekłej hiperglikemii. Liczba osób cierpiących na to schorzenie w 2015 roku wynosiła przeszło 415 milionów w skali świata, a prognozy ekspertów wskazują, iż do roku 2040 liczba chorych będzie prawie dwa razy wyższa.

Fitoestrogeny to wtórne metabolity roślin znane powszechnie ze swojego wielokierunkowego, prozdrowotnego działania. Ze względu na kompleksowe właściwości tej grupy związków, obejmujące działanie hipoglikemiczne, kardioprotekcyjne czy hipocholesteremiczne, mogą być one wykorzystywane w profilaktyce cukrzycy oraz łagodzeniu jej powikłań.

Celem niniejszej pracy był przegląd danych literaturowych ukazujących mechanizmy przeciwcukrzycowego działania fitoestrogenów oraz ich występowanie w świecie roślin. Podjęto także próbę odpowiedzi na pytanie, czy związki te w przyszłości mogą stać się komponentem terapii i profilaktyki cukrzycy.

Niniejsze opracowanie przedstawia liczne mechanizmy przeciwcukrzycowego działania fitoestrogenów, odwołuje się do badań *in vitro* i *in vivo*, wskazujących na ich korzystny profil leczniczy. W pracy opisano najważniejsze podgrupy fitoestrogenów: izoflawony, lignany, stilbeny i kumestany. Wskazana jest kontynuacja badań z zakresu wpływu tych związków na cukrzycę. Pozwolą one dokładniej określić skuteczność i bezpieczeństwo podczas długotrwałego stosowania fitoestrogenów.

Słowa kluczowe: cukrzyca, fitoestrogeny, hiperglikemia, metabolity wtórne, fitoterapia

Phytoestrogens in diabetes treatment

Abstract

Diabetes is a group of metabolic disorders characterized by a state of chronic hyperglycemia. In 2015 the number of people suffering from this disease exceeded 415 million worldwide and experts' forecasts indicate that by 2040 this number will be almost twice as high.

Phytoestrogens are secondary plant metabolites commonly known for their multidirectional, pro-health effects. Due to the complex properties of this group of compounds, including hypoglycemic, cardioprotective or hypocholesteric effects, they can be used in the prevention and treatment of diabetes symptoms.

The aim of this study was to review the literature data showing the mechanisms of antidiabetic activity of phytoestrogens and their occurrence in plants. An attempt to determine whether these compounds may become a component of diabetes therapy and prevention in the future has also been made.

This study presents numerous mechanisms of the antidiabetic activity of phytoestrogens, and refers to *in vitro* and *in vivo* studies indicating their favorable therapeutic profile. The paper describes the most important subgroups of phytoestrogens: isoflavones, lignans, stilbenes and coumestans. It is advisable to continue research into the influence of these compounds on diabetes. They will allow to determine more accurately the effectiveness and safety during the long-term use of phytoestrogens.

Keywords: diabetes, phytoestrogens, hyperglycemia, secondary metabolites, phytotherapy

Wpływ tlenu azotu na ludzki organizm z uwzględnieniem męskiej erekcji²

1. Wprowadzenie

Tlenek azotu NO jest bardzo ważnym czynnikiem modulującym fizjologiczne procesy zachodzące w organizmie [1-3]. Na początku lat 80. XX wieku naukowcy odnotowali, iż neurotransmitter acetylocholina powoduje rozluźnienie mięśni gładkich za pomocą nieokreślonego mediatora występującego w tkankach. Ten biologiczny mediator otrzymał nazwę EDRF. EDRF to czynnik rozluźniający komórki śródbłonka (ang. *Endothelial Derived Relaxing Factor*). Dopiero po kilkunastu latach odkryto, iż EDRF i NO to jedna i ta sama substancja [3-7]. Stwierdzono, iż NO wspomaga pracę układu odpornościowego [8, 9] oraz oddziałuje na ośrodkowy układ nerwowy poprzez interakcję z receptorami kwasu n-metylo-d-asparaginowego- NMDA. Zadaniem tego mechanizmu jest wzmożenie procesów regeneracyjnych zachodzących w mózgu. W wyniku korelacji NO z cyklicznym guanozyno-3',5'-monofosforanem – cGMP następuje rozkurczenie mięśnia (obniżenie napięcia mięśniowego), ponadto interakcja NO z cGMP stymuluje syntezę glutaminianu [3, 6, 7, 9, 10]. Główną rolą tlenu azotu przedstawioną w niniejszej pracy jest jego działanie na męski układ rozrodczy: w tym przypadku NO rozluźnia mięśnie wyścielające tętnice i żyły prącia umożliwiając zajście erekcji. NO zgromadzony w jądrach odpowiada także za syntezę plemników [3, 6, 7, 24, 32, 33]. Pomimo zalet, jakie niesie za sobą podaż NO w organizmie nie można wykluczyć jego toksycznego działania w OUN, w sytuacji, gdy ma miejsce nadmierna synteza NO prowadząca do dysfunkcji na tle komórkowej a niekiedy genetycznej (uszkodzenie matrix mitochondrialnej, apoptoza). Skutkiem tych nieprawidłowości jest występowanie schorzeń o podłożu neurologicznym [7, 9, 11].

2. Tlenek azotu – opis, powstawanie i właściwości

Azot jest pierwiastkiem chemicznym powszechnie występującym w środowisku naturalnym jako dwuazot o wzorze N₂ [12-14]. W wyższej temperaturze niż temperatura pokojowa azot ma możliwość wiązania z innymi pierwiastkami, co skutkuje zużyciem dużej ilości energii (reakcja endotermiczna) [1, 4, 5]. Z kolei tlenek azotu-NO stanowi związek chemiczny zbudowany z atomu tlenu oraz azotu [1]. Za syntezę NO odpowiada aminokwas L-arginina oraz 3 indukowalne syntazy tlenu azotu- NOS (ang. *Nitric Oxide Synthases*). W obrębie NOS znajdują się: neuronalny nNOS mający swe położenie w układzie nerwowym, śródbłonkowy/endotelialny eNOS wyścielający ściany naczyń krwionośnych oraz indukowalny iNOS, którego siedzibą jest system odpornościowy [3]. nNOS i eNOS stanowią enzymy konstytutywne zależne od obecności i stężenia kalmoduliny, zaś iNOS to enzym indukowalny odpowiedzialny za

¹ malwa.sienko@gmail.com.

² Przedstawiona praca bazuje na podstawie teorii zawartej w publikacjach literaturowych.

Praca ta nie należy do prac badawczych cechujących się opisami celu badań i metodyki eksperymentalnej (doświadczalnej, badawczej).

funkcjonowanie systemu odpornościowego [9, 15, 16]. NO powstaje z cząsteczek L-argininy na drodze utlenienia guanidyny azotowej (ang. *guanidine nitrogen*) z udziałem dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego NADPH oraz wspomnianych wyżej syntaz NOS [9, 17]. Co ciekawe wszystkie 3 enzymy z serii NOS są w mniejszym lub w większym stopniu zlokalizowane w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN). Śródbłonkowy eNOS jest obecny w splocie naczyniówkowym, gdzie zachodzi wydzielanie płynu mózgowo-rdzeniowego oraz jego niewielkie stężenie zobrazowano w astrocytach. Neuronalny nNOS zakotwiczony jest w hipokampie, podwzgórzu, opuszcze węchowej, ciele migdałowatym, a także we wzgórzu. Stwierdza się, iż śladowe ilości indukowalnego iNOS gromadzą się w niektórych neuronach, głównie w komórkach gleju, chociaż najważniejszymi miejscami lokalizacyjnymi dla iNOS są niewątpliwie neutrofile i makrofagi (komórki żerne) [9, 18-20]. Warto zwrócić uwagę na fakt, iż poszczególne enzymy NOS są regulowane przez odpowiednie kinazy białkowe: A, B, C oraz kinazę indukowalną [9, 21]. Największe ilości NO są syntetyzowane przez iNOS, ponieważ są to stężenia nawet ponad 100 razy większe niż w przypadku syntezy NO z eNOS czy nNOS. Być może jest to spowodowane wydajną funkcjonalnością układu immunologicznego na drodze produkcji cytokin (aktywacji barier ochronnych organizmu) [9, 22].

NO metodą laboratoryjną uzyskuje się poprzez reakcję chemiczną z zastosowaniem schłodzonego kwasu azotowego i miedzi. Końcowymi produktami tej reakcji są NO, azotan miedzi i woda: $8 \text{HNO}_3 + 3 \text{Cu} \rightarrow 3 \text{Cu}(\text{NO}_3)_2 + 4 \text{H}_2\text{O} + 2\text{NO}$ [2].

NO jest gazem bezwonny i bezbarwnym, nieco lżejszym od powietrza. Tlenek azotu NO w temperaturze -152°C skrapla się i przybiera niebieski kolor. NO posiada 1 nieparzysty elektron- tlen ma 8 elektronów, a sam azot jedynie 3 (suma elektronów wynosi 11). Obecność niesparowanego elektronu e^- jest odpowiedzią na pytanie, dlaczego tlenek azotu jest niezwykle reaktywną substancją, która jest zaangażowana w takie procesy, jak synteza i analiza [1, 4, 5].

3. Wpływ NO na układ nerwowy – interakcja NO z cGMP

NO znany jest także z innych ról w organizmie, przede wszystkim w obszarze nerwowym i neurologicznym. Aktywacja cGMP automatycznie prowadzi do uruchomienia szlaku kinazy białkowej G – PKG oraz kinazy białkowej A – PKA [3]. PKG oraz białko synaptofizyna działają korzystnie na tworzenie pęcherzyków presynaptycznych w mózgowiu. Utworzenie młodych synaps jest koniecznym warunkiem neurogenezy [9, 10]. Interakcja glutaminian – NO aktywuje NMDA co wspomaga procesy regeneracyjne układu nerwowego [9, 27]. NO, glutaminian i zaaktywowany NMDA otwierają kanały wapniowe. Jony wapniowe łączą się z kalmoduliną. Po utworzeniu kompleksu wapń-kalmodulina zachodzi kaskada reakcji: wytworzenie nNOS, produkcja NO (z udziałem nNOS), uruchomienie kinaz aktywowanych miogenami – MAPK oraz kinaz sygnalizacyjnych ERK. Końcowym etapem tego mechanizmu jest synteza czynnika transkrypcyjnego CREB (ang. *cyclic AMP – responsible element binding*). CREB odpowiada za tworzenie nowej puli genowej w jądrze komórkowym, a także za kumulowanie neutrofilowego czynnika pochodzenia mózgowego BDNF (ang. *Brain Derived Neurotrophic Factor*) w korze mózgowej [9]. BDNF wzmacnia sygnały generowane przez neurony czuciowe w obwodowym układzie nerwowym [28]. NO wraz z receptorami NMDA wspomagają umiejętności zapamiętywania i przyswajania informacji,

dzięki ich koordynacji możemy pochwalić się dobrą pamięcią i koncentracją [5, 9]. Niestety NO oprócz pozytywnego wpływu na organizm charakteryzuje się także negatywnym oddziaływaniem na OUN. Pod wpływem stanu zapalnego (może nim być stres i depresja [23]) w mózgu dochodzi do intensywnej sekrecji NO z NOS [7, 9, 11]. Ponadto stan zapalny wyzwała reakcję stresu oksydacyjnego, który w krótkim czasie prowadzi do nagromadzenia się szkodliwych form tlenu i azotu, czyli tzw. wolnych rodników. Wytworzone podczas stresu oksydacyjnego nadtlenki stanowią produkt uboczny mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Indukowalna syntaza NO- iNOS oraz neuronalna nNOS odbierając sygnały z systemu immunologicznego wytwarzają nadprogowe stężenie NO w komórkach glejowych mózgu [7, 9, 11, 23]. Anionorodnik ponadtlenkowy $\bullet\text{O}^{-2}$ dociera do OUN, po czym łączy się z NO, tworząc szkodliwy nadtlenoazotyn – ONOO^{-} . ONOO^{-} po uwolnieniu do tkanek wyzwała szereg negatywnych zmian: transformację białek tau w mózgu (towarzyszącą chorobie Alzheimera), apoptozę komórek, utlenienie cysteiny, upośledzenie fizjologii tetrahydrobiopteryny- BH_4 czy zaburzenia gospodarki wapniowej. Wszystkie te anomalie prowadzą do uszkodzenia DNA. ONOO^{-} w reakcji z tyrozyną daje 3-nitrotyrozinę. 3-nitrotyrozyna jest swoistym markerem biologicznym, którego obecność wyraźnie świadczy o występowaniu toksycznych, reaktywnych form azotu w organizmie. Nadmierne ilości NO wytwarzane w czasie trwania stanu zapalnego oraz związana z nimi produkcja ONOO^{-} odpowiadają za szkodliwy mechanizm towarzyszący (a nawet inicjujący) choroby neurologiczne: stwardnienie rozsiane, niedokrwienie mózgu (udar) [7, 9, 11], choroba Huntingtona [7], choroba Parkinsona i wspomniana wyżej choroba Alzheimera. Podsumowując: oddziaływanie NO z NMDA i glutaminianem zapoczątkowuje syntezę dwóch niezbędnych czynników: CREB oraz BDNF zlokalizowanych w systemie nerwowym. Obecność tych czynników przekłada się na sprawne funkcjonowanie mózgu i układu nerwowego. Niestety nadmierna ilość NO w OUN powoduje syntezę wolnych rodników odpowiedzialnych za uszkodzenie komórek nerwowych [7, 9, 11].

4. Wpływ NO na męską fizjologię

NO charakteryzuje się zdolnością rozkurczania mięśni – przykładem opisującym tę zależność jest wzwód prącia (w tym przypadku dochodzi do rozluźnienia mięśni znajdujących się w naczyniach krwionośnych). Sarkomer stanowi podstawową jednostkę czynnościową mięśnia. W skład sarkomeru wchodzi m.in. miozyna i aktyna. Napływ jonów wapniowych Ca^{2+} do siateczki sarkoplazmatycznej wywołuje skręt miozyny i aktyny, co inicjuje skurcz aktywnego mięśnia. Miozyna łączy się z atomami fosforanowymi. Następnie atom fosforu łączy się z adenozyno-5'-difosforanem – ADP. W wyniku tej reakcji zostaje utworzony ATP. Aby zakończyć fazę skurczu mięśnia potrzebny jest napływ NO i cGMP, które prowadzą do usunięcia fosforanów z przestrzeni siateczki – następuje defosforylacja [4, 15]. cGMP wysyła impuls do kanałów potasowych K^{+} w celu ich otworzenia. W rezultacie następuje wyrzut jonów potasu, ilość wapnia ulega zredukowaniu [3, 6, 7]. Pobudzone mięśnie ulegają odprężeniu (przechodzą w stan spoczynku) [4, 15]. Ponadto między NO a cyklazą guanylową (sGC) zachodzi interakcja na zasadzie połączenia obu ich cząstek (kompleksowania). Na budowę cyklazy guanylowej składają się 2 podjednostki α : $\alpha 1$ i $\alpha 2$ oraz 2 podjednostki β : $\beta 1$ i $\beta 2$, a jej funkcjonalność polega na istnieniu miejsca aktywnego, gdzie zachodzi korelacja między aktywną molekułą żelaza Fe^{+3} a histydyną.

Zadaniem NO jest „wybicie” histydyny z centrum aktywacyjnego cykazy i stworzenie kompleksu z Fe^{+3} . Skutkiem tej relacji jest rozpad GTP z utworzeniem cGMP (oraz podwojeniem jego objętości) [5, 9, 16, 23, 24, 26]. Należy także zwrócić uwagę na efekt, jaki powoduje „sojusz” między NO a cyklazą guanylową w ciałach jamistych prącia, gdy utworzona w wyniku katalizy cząsteczka cGMP aktywuje kinazy PKG i PKA. Po włączeniu tych kinaz działanie hormonu noradrenaliny zostaje wstrzymane, kanały potasowe K^+ otwierają się, a poziom Ca^{+2} jest stopniowo redukowany. Mięśnie tętnic oraz żył penisa rozluźniają się, z kolei ich ściany poszerzają się – ten proces ma na celu przygotowanie naczyń układu krwionośnego na przyjęcie zwiększonych porcji krwi (umożliwienie wzwodu) [3, 6, 7].

Męskie jądra są miejscem występowania eNOS i aminokwasu L-argininy. W obecności syntazy oraz L-argininy istnieje sposobność do wydzielania NO w jądrach [24, 32, 33]. Testosteron oraz acetylocholina [3] wyzwalają mechanizm biochemiczny, na drodze którego eNOS i L-arginina syntetyzują NO. NO w gonadach wspomaga produkcję plemników, kieruje także przemianami cGMP co wywołuje i podtrzymuje wzwód prącia [24, 32, 33]. Wnioskując: NO i cGMP ingerują w mechanizm skurczu mięśniowego: biorą udział w rozluźnieniu mięśni zarówno poprzecznie prążkowanych, jak i gładkich (te ostatnie wyściełają naczynia krwionośne występujące w penisie).

4.1. Męska erekcja – przebieg

Wzwód prącia polega na uniesieniu, zeszywnieniu i stwardnieniu mięśni wypełniających męski członek. Prącie zbudowane jest z ciała gąbczastego równolegle biegnącego z cewką moczowo-płciową i kończącego się w żołądź prącia, a także z dwóch ciał jamistych. Ciało gąbczaste jest otoczone błoną białawą, natomiast ciała jamiste wypełniają się dużą ilością krwi w trakcie podniecenia seksualnego. Przekrój poprzeczny tkanki wykorzystany w badaniach histologicznych pokazuje, iż mięsień gładki beleczkowy prącia zajmuje niemal 50% całej powierzchni. Za ukrwienie penisa w trakcie wzwodu odpowiedzialne są tętnica jamista i tętnica grzbietowa. Pierwsza z nich rozszerza trzon członka, podczas gdy druga spulchnia żołądź. Nad powięzią Bucka znajdują się dwie żyły grzbietowe wspomagające cyrkulację krwi [34, 35]. Istotną funkcję pełnią męskie jądra, produkują one plemniki i hormon androgenowy, jakim jest testosteron. Komórki Leydiga indukują spermatogenezę w obu gonadach, zaś sam wyrzut testosteronu ze światła nasieniowodów podnosi ciśnienie w ciałach jamistych penisa, w rezultacie wzmacniając (i wydłużając) erekcję. Syntaza eNOS znajdująca się w mięszu jąder inicjuje produkcję NO. Jak wspomniano w poprzednim podrozdziale NO jest w tym przypadku niezbędnym substratem [24, 32, 33].

Nerwy kierujące impulsy z mózgu do penisa i jąder należą do układu współczulnego, przywspółczulnego, jak i do układu somatycznego [34, 35]. Nerwy czuciowe, które angażują się w pobudliwość organów rozrodczych zarówno u kobiet, jak i u mężczyzn to nerw błędny, nerwy podbrzusza oraz miednicy. Ich fizjologia przekłada się na odczucia towarzyszące stosunkowi seksualnemu. Po zniszczeniu tych struktur następuje całkowity bądź częściowy paraliż, wobec czego genitalia stają się niewrażliwe na bodźce dotykowe – pacjenci po przebytych tego typu urazach tracą czucie w obszarach położonych tuż po niżej sparaliżowanego regionu [36, 37]. Neurologiczna strefa kierująca mechanizmem erekcji obejmuje okolicę przedwzrokową oraz jądro przykomorowe. W tych strukturach intensywnie oddziałują androgeny u mężczyzn

oraz estrogeny u kobiet, które utrzymują łączność z korą mózgową na zasadzie generowania i odbierania bodźców erogennych, które przemieszczają się do płata skroniowego i podwzgórza. Analogicznie w męskim organizmie bodźce kontynuują swoją drogę przez rdzeń przedłużony [32, 36] bezpośrednio dzięki neuronom przedanglowym nerwu czaszkowego (pochodzącym z pnia mózgu i usytuowanym w odcinku krzyżowym kręgosłupa) [36, 38], dalej impulsy wędrują przez rdzeń kręgowy, aż do połączeń nerwowych na poziomie S1-S3 odcinka piersiowego. Stamtąd są transportowane do splotu brzuszego, neuronów miednicy, a następnie do zakończeń nerwowych indukujących erekcję. Na koniec trafiają do tkanek prącia oraz do mięśni zwieraczy worka mosznowego wywołując podniesienie i napięcie ciał jamistych prącia oraz uniesienie worka mosznowego. Ciało gąbczaste pozostaje w spoczynku: ten mechanizm ma na celu pozostawienie cewki moczowo-płciowej w stanie nienaruszonym, rozluźnionym [32, 36]. Erekcja zachodzi stopniowo. Najpierw krew wnika do zatok męskiego członka: im lepsze ukrwienie, tym silniejszy wzwód. Ciała jamiste pęcznieją, a żyły wypustowe kurczą się zamykając przy tym obieg krwionośny. Erekcja nie dotyczy cewki moczowo-płciowej (cewka nie ulega zwężeniu), co jest ogromną zaletą, gdyż ejakulat może swobodnie wydobyć się z ujścia cewki (umożliwienie pełnego wytrysku). Męski członek ulega zeszywnieniu, mięsień dźwigacz podnosi mosznę, położenie jąder zmienia się – są one ulokowane bliżej krocza i penisa. Tuż przed wyrzutem męskich komórek rozrodczych kanaliki najądrzy, nasieniowody, mięśnie prostaty oraz cewka moczowa przechodzą fazę kolejno następujących po sobie skurczy [39]. Prostata zwana też sterczem to niewielki gruczoł produkujący płyn nasienny, w którym zawieszono są dojrzałe plemniki. Skurczom prostaty, a także napływowi plemników z mięszu jąder towarzyszy odczucie pulsowania [36, 40]. Zainicjowane skurcze tworzą siłę napędową umożliwiającą wypływ spermy z najądrzy do trzonu penisa [39].

5. NO i system immunologiczny

W aspekcie odporności iNOS transportuje obfite porcje NO do komórek zainfekowanych, co skutkuje eliminacją drobnoustrojów. Tę informację można uzasadnić tym, iż w trakcie syntezy oraz pobudzenia NO przez syntazy NOS żyły oraz tętnice rozszerzają się, a więc przepływ krwi i tlenu jest przyspieszony: hemoglobina w krótszym czasie dociera do komórek. Zrównoważone dawki tlenu w organizmie pozwalają zregenerować zasoby adenozyno-5'-trifosforanu – ATP, dzięki czemu w obrębie tkanek ma miejsce wydajne oddychanie komórkowe, które mobilizuje siły obronne do wyeliminowania antygeny [8, 9]. NO jako czynnik molekularny hamuje pracę enzymów posiadających w swej strukturze jony żelaza – Fe [24]. Do enzymów zawierających żelazo zalicza się chociażby 2-3-dioksygenazę indol aminy –IDO [29], która w warunkach immunologicznych może wywoływać supresję limfocytów TH pomocniczych (ang. *lymphocytes T helper*) i komórek NK (ang. *natural killers*), a nawet nasilić proliferację struktur komórkowych zmienionych nowotworowo [29-31]. Oddziaływanie NO na związki żelazowe znajduje logiczne wyjaśnienie chociażby przy obserwacji współpracy NO z cyklazą guanylową (gdy NO znajduje się w miejscu aktywnym cyklazy wraz z molekułą Fe^{+3}) [5, 9, 16, 23, 24, 26].

6. Cel pracy

Celem niniejszej pracy pogładowej jest szczegółowa prezentacja tlenku azotu NO: powstawanie NO na drodze syntetycznej (laboratoryjnej), jak i naturalnej (z udziałem aminokwasu i enzymów), mechanizm jego działania w poszczególnych obszarach organizmu oraz wykazanie jego wad i zalet w organizmie. Według niniejszej pracy NO faktycznie spełnia szereg ról w ustroju: najbardziej widoczną funkcją NO jest jego współpraca z sGC, cGMP i acetylocholiną w konsekwencji uczestnicząc w mechanizmie skurczu mięśniowego. Praca ta opisuje głównie wpływ NO na przebieg męskiej erekcji. NO nie tylko rozszerza naczynia krwionośne, ale także wspomaga spermatogenezę, co jest aspektem bardzo istotnym. Opisując fizjologię NO w ustroju nie można pominąć jego negatywnej interakcji w wyzwalaniu chorób neurodegeneracyjnych, które stanowią poważny problem wśród cywilizacji XXI wieku. Zamiarem tejsze pracy pogładowej jest zwrócenie uwagi na fizjologiczne działanie NO, które jest działaniem wszechstronnym: od fizjologii układu mięśniowego poprzez wpływ na neuroprzekazniki OUN. Odpowiedź na pytanie czy NO jest ważnym, kluczowym składnikiem w obrębie organizmu brzmi: Tak, NO jest ważnym składnikiem dla organizmu uwzględniając jego liczne, różnorodne funkcje (zarówno szkodliwe, jak i pożyteczne). Istotnym aspektem niniejszej pracy jest relacja NO i cGMP: relacja ta przekłada się nie tylko na fizjologię jednego układu, lecz warunkuje funkcjonowanie kilku układów: mięśniowego, nerwowego, immunologicznego i płciowego.

7. Metodyka badawcza

Niniejsza praca zawiera przegląd literatury z lat 1976-2018.

Poszczególne mechanizmy funkcjonowania NO nadal mogą budzić wątpliwości, niekiedy kontrowersje: zamiarem niniejszego rozdziału tej pracy jest wykazanie i porównanie tych nieścisłości.

O ile NO cechuje się raczej korzystną fizjologią, o tyle niepokojący jest jego potencjalny wpływ na patogenezę niektórych chorób o podłożu psychiatryczno-neurologicznym [7, 9, 11].

Prawdopodobnie skumulowanie NO i wolnych rodników to efekt ochronny organizmu, ponieważ wolne rodniki pomimo toksyczności wspomagają niszczenie antygenów, do których należą bakterie i wirusy [42]. Niestety pomimo potencjalnej obrony immunologicznej długotrwała sekrecja wolnych rodników po zaistnieniu stresu oksydacyjnego przyczynia się do uszkodzenia mitochondrium. Wysoce spodziewanymi rezultatami tego patologicznego mechanizmu są wspomniane wyżej mutacje w obrębie kodu genetycznego, a nawet obumieranie komórek. W wyniku uszkodzenia DNA i składników komórkowych zachodzą zmiany neurodegeneracyjne ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego. Choroba Alzheimer'a i parkinsonizm to nie jedyne schorzenia OUN generowane przez kompleks NO – reaktywne formy tlenowo-azotowe [7, 9, 11]. Według niniejszej pracy powiązanie NO z wolnymi rodnikami niesie za sobą jednocześnie negatywne, jak i pozytywne właściwości, jednak nie należy zapominać, iż umiarkowana, zrównoważona ilość NO wyzwała prozdrowotne efekty w obrębie organizmu. Niemal identycznie przedstawia się kwestia występowania glutamianu w OUN: zrównoważone stężenie glutamianu koordynuje tworzenie

nowych, młodych ciał synaptycznych, co przekłada się na znaczną poprawę funkcji poznawczych struktur mózgowia [9, 27].

Nadmierna ilość glutamianu uwarunkowana zmianami patologicznymi podobnie jak nadmiar NO i wolnych rodników zaburza funkcjonowanie mitochondrium. Uwolnienie nadprogowej ilości cząsteczkowego wapnia z udziałem glutamianu i NO powoduje zanikanie jonów potasu i sodu. Końcowym efektem tej nienaturalnej modyfikacji jest zniszczenie struktur mitochondrium [41].

8. Podsumowanie

Tlenek azotu to związek chemiczny powstający z udziałem L-argininy i syntaz tlenu azotu NOS. NO odgrywa szereg ról w organizmie. Wytworzony w ustroju NO w ilości przekraczającej normę przyczynia się do występowania schorzeń neurodegeneracyjnych. NO działa agonistycznie względem cGMP: następuje rozkurczanie mięśni gładkich oraz ścian naczyń krwionośnych. NO tworzy molekularny związek z sGC, dzięki czemu można zaobserwować wzrost poziomu cGMP w mięśniach i naczyniach krwionośnych. NO zsyntetyzowany w gonadach uczestniczy w wytwarzaniu plemników oraz umożliwia zajście wzrodu prącia. NO jako inhibitor enzymuIDO koliduje z substancjami zawierającymi żelazo. Pod względem odpowiedzi odpornościowej NO niweluje drobnoustroje z organizmu – wykazuje zdolności immunologiczne.

Literatura

1. Bielański A., *Chemia ogólna i nieorganiczna*, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Wydanie IV, 1976, s. 1-706.
2. Bielański A., *Podstawy chemii nieorganicznej 2*, PWN, Warszawa, 2002, s. 600-667.
3. Andersson K.E., *PDE5 inhibitors- pharmacology and clinical applications 20 years after sildenafil discovery*, British Journal of Pharmacology, 175, 2018, s. 2554-2565.
4. Garthwaite J., Boulton C.L., *Nitric oxide signaling in the central nervous system*, Ann. Rev. Physiol 57, 1995, s. 683-706.
5. Krzyżanowski M., Gos T., Hauser R., *Znaczenie tlenu azotu dla medycyny nie tylko sądowej*, Arch. Med. Sąd. Krym XLIX, 1999, s. 23-30.
6. Forstermann U., Sessa W.C., *Nitric oxide synthases: regulation and function*, Eur Heart J. 33(7), 2012, s. 829-837.
7. Khazan M., Hdayati M., *The Role of Nitric Oxide in Health and Diseases*, Scimetr. 3,1, 2015, s. 1-10.
8. Bozza F.A., D'Avila J.C., Ritter C., Sonnevile R., Sharskar T., DalPizzol F., *Bioenergetics, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the pathophysiology of septic encephalopathy*, Shock, 39, 1, 2013, s. 110-16.
9. Reis P.A., Gonçalves de Albuquerque C.F., Maron-Gutierrez T., Silva A.R., Caire de Castro Faria Neto H., *Role of Nitric Oxide Synthase in the Function of the Central Nervous System under Normal and Infectious Conditions*, InTech Web of Science, 2017, s. 1-70.
10. Wang H.G., Lu F.M., Jin I., Udo H., Kandel E.R., de Vente J., Walter U., Lohmann S.M., Hawkins R.D., Antonova I., *Presynaptic and postsynaptic roles of NO, cGK, and RhoA in long-lasting potentiation and aggregation of synaptic proteins*, Neuron., 45, 2005, s. 389-403.
11. Radi R., *Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant*, The Journal of Biological Chemistry, 288, 2013, s. 26464-26472.
12. Cotton F.A., Wilkinson G., Gaus P.L., *Chemia nieorganiczna. Podstawy*, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2002, s. 1-823.

13. Strona internetowa: <https://zdrowie.tvn.pl/a/czy-burak-leczy-raka-chcecie-poznac-odpowiedz-ogladajcie-program-36-6degc>.
14. Strona internetowa: <https://testosterone.pl/wiedza/sok-buraka-dlaczego-warto/>.
15. Dembińska-Kieć A., *Biosynteza i fizjologiczna funkcja tlenu azotu*, [w:] Konarska L.(red.), *Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce*, PWN, Warszawa 1995, s. 177-189.
16. Zembroń-Łacny A., Orysiak J., Kalina K., Morawin B., Pokrywka A., *The role of nitric oxide in skeletal muscle regeneration*, *TRENDS in Sport Sciences*; 4, 20, 2013, s. 173-179.
17. Virarkar M., Alappat L., Bradford P.G., Awad A.B., *L-Arginine and nitric oxide in CNS function and neurodegenerative diseases*, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.*, 53, 2013, s. 1157-1167.
18. Brown G.C., *Nitric oxide and neuronal death*, *Nitric Oxide*. 23, 2010, s. 153-165.
19. Garry P.S., Ezra M., Rowland M.J., Westbrook J., Pattinson K.T., *The role of the nitric oxide pathway in brain injury and its treatment-from bench to bedside*, *Experimental Neurology*. 263, 2015, s. 235-243.
20. Gunther M., Al Nimer F., Gahm C., Piehl F., Mathiesen T., *iNOS-mediated secondary inflammatory response differs between rat strains following experimental brain contusion*, *Acta Neurochirurgica (Wien)*, 154 2012, s. 689-697.
21. Boehning D., Snyder S.H., *Novel neural modulators*, *Annual Review of Neuroscience*, 26, 2003, s. 105-131.
22. Pautz A., Art J., Hahn S., Nowag S., Voss C., Kleinert H., *Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase*, *Nitric Oxide.*, 23, 2010, s. 75-93.
23. Talarowska M., Bobińska K., Zajączkowska M., Su K.P., Maes M., Galecki P., *Impact of oxidative/nitrosative stress and inflammation on cognitive functions in patients with recurrent depressive disorders*, *Med. Sci. Monit.* 20, 2014, s. 110-115.
24. Antosova M., Plevkova J., Strapkova A., Buday T., *Nitric oxide – Important messenger in human body*, *Open Journal of Molecular and Integrative Physiology*, 2, 2012, s. 98-106.
25. Bryan N.S., Bian K., Murad F., *Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development*, *Front Biosci* 14, 2009, s. 1-18.
26. Koesling D., Russwurm M., Mergia E., Mullershausen F., Friebe A., *Nitric oxide sensitive guanylyl cyclase: structure and regulation*, *Neurochem Int* 45, 2004, s. 813-819.
27. Dzoljic E., Grbatinic I., Kostic V., *Why is nitric oxide important for our brain?*, *Functional Neurology.*, 30, 2015, s. 159-163.
28. Delezie J., Hanschin C., *Endocrine Crosstalk Between Skeletal Muscle and the Brain*, *Biozentrum, University of Basel, Basel, Switzerland. Front. Neurol.* 24, 2018, 9, 698.
29. Podkalicka P., Mucha O., Józkwicz A., Dulak J., Łoboda A., *Heme oxygenase inhibition in cancers: possible tools and target*, *Contemp Oncol*, 22, 1A, 2018, s. 23-32.
30. Jiang T., Sun Y., Yin Z., Feng S, Sun L., LL Z., *Research progress of indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitors*, *Future Medicinal Chemistry*, 7, 2, 2015, s. 185-201.
31. Prendergast G.C., Smith C., Thomas S., Mandik-Nayak L., Laury-Kleintop L, Metz R., Muller A.J., *Szlaki 2,3-dioksygenazy indoloaminowej patogenicznego zapalenia i ucieczki immunologicznej w raku*, *Cancer Immunol Immunother*, 63, 7, 2014, s. 721-735.
32. Dadej R., *Etiologia i leczenie zaburzeń wzrodu prącia, Erectile dysfunction – diagnosis and treatment*, *Geriatrics*, 2, 2008, s. 182-193.
33. Rabijewski M., *Znaczenie testosteronu w fizjologii i zaburzeniach wzrodu prącia*, *Prz Urol* 6, 58, 2009, 31.
34. Andersson K.E., *Mechanisms of Penile Erection and Basis for Pharmacological Treatment of Erectile Dysfunction*, *Pharmacol Rev.*, 2011.
35. Nunes K.P., Webb R.C., *Mechanisms in Erectile Function and Dysfunction: An Overview*, *Georgia Health Sciences University, Augusta, Georgia USA. IntechOpen*, 2012, s. 1-22.

36. Krassioukov A., Elliott S., *Neural Control and Physiology of Sexual Function: Effect of Spinal Cord Injury*, Top Spinal Cord Inj Rehabil. 23, 1, 2017, s. 1-10.
37. Nummenmaa L., Suvilehto J.T., Glerean E., Santilla P., Hietanen J.K., *Topography of human erogenous zones*, Arch Sex Behav., 45, 5, 2016, s. 1207-1216.
38. Krassioukov A., Biering-Sorensen C.F., Donovan W., *International Standards to document remaining Autonomic Function after Spinal Cord Injury*, (ISAFSCI), First Edition 2012. Top Spinal Cord Inj Rehabil., 18, 3, 2012, s. 282-296.
39. Kula K., Słowikowska-Hilczler J., Oszukowska E., Marchlewska K., Walczak-Jędrzejewska R., Filipiak E., Gumińska A., *Medycyna rozrodu z elementami seksuologii*, Uniwersytet Medyczny, Łódź, 2011, s. 2-103.
40. Clement P., Giuliano F., *Physiology and pharmacology of ejaculation*, Basic Clin Pharmacol Toxicol. 119, 3, 2016, s. 18-25.
41. Herculano A. M., Puty B., Miranda V., Lima G.M., Maximino C., *Interactions between serotonin and glutamate – nitric oxide pathways in zebrafish scototaxis*, Pharmacology Biochemistry and Behavior, 129, 2015, s. 97-104.
42. Urbański K., Nowak M., Guzik T.J., *Wpływ stresu oksydacyjnego na funkcjonowanie naczyń krwionośnych*, Małopolski Ośrodek Medycyny Translacyjnej, Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Medycyny Wsi, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum. Postępy biochemii 9, 4, 2013, s. 424-431.

Wpływ tlenu azotu na ludzki organizm z uwzględnieniem męskiej erekcji

Streszczenie

Tlenek azotu znany pod chemiczną nazwą NO jest związkiem powstałym z atomu azotu N oraz atomu tlenu O na drodze przemian fizykochemicznych. W żywym organizmie NO jest syntetyzowany w obecności L-argininy i 3 (trzech) syntaz NOS. NO poprzez biologiczny mechanizm działania indukuje syntezę cGMP oraz kinaz białkowych, dzięki czemu skurczone mięśnie przechodzą w stan spoczynku, następuje ich rozkurcz. Ten aspekt jest bardzo ważny ze względu na przebieg męskiego zwodu prącia – NO wydzielany w gruczołach płciowych współuczestniczy w produkcji plemników oraz rozluźnia ściany naczyń krwionośnych zlokalizowanych w penisie i w jądrach. NO razem z receptorami NMDA pobudza syntezę glutamianu wymaganego do aktywacji czynników neurologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN). Zadaniem tych czynników jest wzmocnienie funkcji poznawczych danego organizmu. W przypadku systemu immunologicznego NO niszczy chorobotwórcze drobnoustroje. Niestety oprócz pozytywnych ról w żywym ustroju NO wykazuje także negatywny wpływ na organizm. NO uwolnione w nadmiernych ilościach z przestrzeni komórek glejowych przyczynia się do wystąpienia chorób neurodegeneracyjnych. Celem pracy poglądowej jest przedstawienie, a także opisanie poszczególnych funkcji NO w organizmie – zarówno tych negatywnych, jak i pozytywnych.

Słowa kluczowe: tlenek azotu, NMDA, cGMP, syntazy NOS, erekcja

The effect of nitric oxide on the human body including the male erection

Abstract

Nitric oxide known under the chemical name NO is a compound produced from the nitrogen atom N and the oxygen atom O through physicochemical changes. In a living organism, NO is synthesized in the presence of L-arginine and 3 (three) NOS synthases. NO through the biological mechanism of induction of the synthesis of cGMP and protein kinases, thanks to which the contracted muscles go to rest, then their relaxation. This aspect is very friendly due to the course of the male erection – NO secreted in the sex glands, it participates in the production of spermatozoa and loose blood vessels located in the penis and testicles. NO together with NMDA receptors stimulates the synthesis of glutamate required for the activation of active neurological in the central nervous system (CNS). These tasks are available for cognitive functions. In the case of the immune system, NO destroys pathogenic microorganisms. Unfortunately, apart from positive compounds in a living system, it also does NO contain a negative effect on the body. NO released in excessive amounts from glial cell spaces contributes to neurodegenerative diseases. The purpose of review work is to present and describe some of the functions of NO in organizations – those negative and positive.

Keywords: nitric oxide, NMDA, cGMP, NOS synthases, erection

Znaczenie badań z zakresu socjologii medycyny w obszarze opieki paliatywnej

1. Wstęp

Umieralność spowodowana między innymi chorobami układu krążenia zmniejsza się (435 osób na 10 tysięcy ludności), natomiast nadal przybywa zgonów spowodowanych chorobą nowotworową (25,9 osób na 10 tysięcy ludności) [1]. Liczba nowych i obecnych chorych na raka powoduje konieczność poszukiwań skuteczniejszych rozwiązań dotyczących zarówno leczenia, jak i profilaktyki – wprowadzono wiele inicjatyw mających na celu zwiększenie świadomości wśród społeczeństwa, między innymi: program „Europe Against Cancer” w 1985 roku, zaś 2 lata później Europejski Kodeks Walki z Rakiem [1, 2]. Wzrost zachorowań i zaawansowanie choroby u pacjentów powoduje natężenie zapotrzebowania na opiekę paliatywną [3, 4]. Medycyna paliatywna jest zorientowana na poprawę jakości życia oraz leczenie objawowe [1, 2]. Choroba terminalna oznacza postępujący proces schorzenia nienadający się do leczenia przyczynowego. Jednym z celów opieki paliatywnej jest podniesienie komfortu życia wśród umierających pacjentów. Obejmuje ona zwalczanie bólu i innych objawów oraz opanowanie problemów socjalnych i duchowych chorego. Holistyczne podejście do potrzeb pacjenta wymaga jednak współpracy wielu dziedzin naukowych, takich jak medycyna, psychologia, czy socjologia, które w swoich działaniach mogą analizować dopasowanie i adekwatność obecnych czynności zarówno medycznych, jak i opiekuńczych. Celem niniejszego artykułu jest refleksja nad możliwością kooperacji interdyscyplinarnej między osobami z różnych profesji, aby spojrzeć szerzej na potrzeby pacjentów w trakcie opieki paliatywnej, podczas której z jednej strony istotne jest monitorowanie stanu chorobowego pacjenta, z drugiej zaś indywidualne podejście i dopasowanie opieki do pozamedycznych potrzeb chorego.

2. Formy opieki paliatywnej

Według Jacka Łuczaka, autora tekstu „Etyka w opiece paliatywnej” opieka paliatywna powinna w sposób ciągły dbać o chorego, niezależnie od formy, jaką wybrał (czy w hospicjum stacjonarnym, czy w opiece domowej) [1]. Często w społeczeństwie naprzemiennie stosowane są dwie definicje: opieka hospicyjna i paliatywna. Zależność tych terminów jest tłumaczona tym, iż w obydwu przypadkach opieka nad chorymi jest prowadzona w tym samym cyklu [3]. Różnica tkwi jednak w historii powstania obu pojęć oraz z ich filozofii, gdzie opieka paliatywna skierowana jest na doraźne umorzenie bólu, gdyż leczenie w tym stanie chorobowym jest niemożliwe. Opieka hospicyjna jest zaś zorientowana na posługę cierpiącym, aby w godny sposób mogli umrzeć. Dlatego często stosuje się łączenie tych dwóch definicji, które stają się pełnym zobrazowaniem idei tego rodzaju opieki nad pacjentem. Dostępnych jest kilka możli-

¹ kaminskaver@gmail.com, Instytut Filozofii, Socjologii i Dziennikarstwa, Wydział Nauk Społecznych, Uniwersytet Gdański, ul. Bażyńskiego 4, 80-309 Gdańsk.

wości, z jakich można skorzystać w ramach opieki w hospicjum. Zależą one przede wszystkim od stanu zdrowia pacjenta oraz od możliwości pielęgnacji, jaką deklarują ich rodziny [1, 4]. Opieka domowa odnosi się do chorych, którymi zajmują się bliscy i pomagają im w czynnościach związanych z pielęgnacją, higieną, czy też wymianą opatrunków. Według Łuczaka jest to „najbardziej naturalna” opieka skierowana przede wszystkim do pacjentów, którzy pragną być wśród najbliższych im osób [5]. Również jej koszt jest niższy. Opieka stacjonarna jest przeznaczona dla osób samotnych oraz tych, których stany bólowe wymagają stałego nadzoru medycznego zespołu interdyscyplinarnego. Dzielne placówki hospicjów są natomiast zorientowane na „realizację pragnień twórczych w obliczu zbliżającej się śmierci” [2-4].

3. Socjologia medycyny jako istotny kierunek zmian w podejściu do życia w chorobie

Przez wiele lat pojęcia zdrowia i choroby nie były precyzyjne – zdrowie określano jako brak choroby. W 1948 roku zdefiniowano zdrowie jako dobrostan w aspekcie fizycznym, społecznym i psychicznym [5]. Następnie w 1985 roku definicja została poszerzona – dodano, iż o jakości życia decyduje pięć czynników: „zdrowie fizyczne i umysłowe, funkcjonowanie społeczne, wypełnienie ról społecznych, ogólny dobrostan” zaś w 1993 roku ujęta została pod kątem indywidualnych jakości życia oraz uwzględniała ważność zarówno społecznych, jak i kulturowych czynników [5, 6]. Spowodowało to zwiększenie zainteresowania naukowców z innych dziedzin niż medycyna do podjęcia badań obejmujących aspekty medyczne [5, 6]. W ostatnich latach próbę zwrócenia uwagi na pozamedyczne aspekty opieki podjął chorujący wówczas na glejaka mózgu ksiądz Jan Kaczkowski. W swoich książkach opisuje jak bardzo istotne jest dbanie o potrzeby psycho-społeczne osób umierających – niezależnie od ich wieku, czy zaawansowania choroby [7, 8].

W podjęciu rozważań nad zmianą medycznego punktu widzenia życia pacjenta w chorobie (szczególnie nowotworowej) istotny udział miał Talcott Parsons. Autor zwrócił uwagę na rosnące zapotrzebowanie „socjomedycznego punktu widzenia”, co spowodowało większą świadomość w realizowaniu nie tylko biologicznych, ale także psycho-społecznych potrzeb u osób chorych [9, 10]. Pomimo że koncepcje socjologii ogólnej nie odnosiły się wprost do zdrowia lub choroby, stały się inspiracją do rozszerzenia problematyki związanej z socjologią medycyny – formalnie wyodrębnioną od połowy lat 50. Wówczas zapoczątkowano analizę teorii socjologicznych, odnosząc je do nauk medycznych. Pierwszą publikacją wpisującą się w ten nurt była praca Parsonsa z 1951 roku „The social system” reprezentująca podejście „strukturalno-funkcjonalne”. Parsons uważał chorobę za rodzaj dewiacji, która w znacznym stopniu utrudnia, bądź całkowicie uniemożliwia spełnienie ról społecznych [6, 11]. Teoria fenomenologiczna miała także duży wpływ na badania czynników pozamedycznych w opiece nad pacjentem. Odnosi się do wewnętrznych przeżyć chorego związanych z nadaniem subiektywnego sensu cierpienia, czy strachu [12, 13]. Następnie, pod koniec lat 60., istotne znaczenie zyskała koncepcja Blumera (1969) i Straussa dotycząca interakcjonizmu symbolicznego, szczególnie analiza relacji lekarz-pacjent i pacjent-lekarz, zaś w latach 80. pojęcie habitusu w odniesieniu do zdrowia jako wyboru stylu życia [13, 14].

Poza istniejącymi teoriami socjologicznymi mającymi kluczowe znaczenie w zapoczątkowaniu subdyscypliny zaczęto tworzyć koncepcje, dotyczące bezpośrednio socjologii medycyny. Socjologia choroby, rozumiana jako kategoria socjologii medycyny, zaczęła być rozróżniana na „chorobę w sensie biologicznym (*disease*)” jako patologiczna zmiana w organizmie, „chorobę w sensie samopoczucia (*ilness*)” jako stan odczuwany w sposób subiektywny przez jednostkę oraz „chorobę jako pojęcie socjologiczne (*sickness*)”, gdzie obecne położenie jednostki jest usytuowane na tle grupy [6, 10, 11]. Eliot Freidson zwrócił uwagę na dwa rodzaje dewiacji obecne w pojęciu choroby – mianowicie dewiację biologiczną i społeczną. Dewiacja biologiczna obejmuje symptomy, które są analizowane w sposób obiektywny i wymagają ingerencji lekarza. Dewiacja społeczna określa, w jaki sposób konstruowana jest choroba, jak interpretowane są jej symptomy i w jaki sposób czynności medyczne, którym poddawany jest pacjent, wpływają na jego społeczne zachowania oraz zachowania ze strony otoczenia [6]. Inną koncepcją jest teoria Anselma Straussa, w której pacjent może inaczej zachowywać się, reagować na otoczenie i codzienne sytuacje będąc w różnych etapach choroby. „Trajektoria chorowania” składa się z pięciu faz: ostrej (interwencja lekarza), zdrowienia, stabilizacji (remisja choroby), niestabilnej oraz fazy spadkowej (wieszczącej zmianę fazy choroby na terminalną) [12, 13]. Objawem poważnego niezaspokojenia potrzeb zarówno fizycznych, psychicznych, jak i duchowych jest cierpienie. Uznawane jest ono za życiowe doświadczenie, które swoje apogeum uzyskuje przed końcem życia. Według Frankla, aby zaspokoić różnorodne potrzeby osób zmagających się z chorobą, należy zrozumieć naturę ich dolegliwości oraz sensu, jaki sami chorzy nadają doświadczanemu [6, 16]. Istotne znaczenie w opisie czynności, jakie podejmują wówczas chorzy ma także wymiar czasu [15]. W jego ramach poddane są analizie działania zależne od okresu choroby, co pokazuje w koncepcji Straussa aktywną rolę, jaką odgrywają jednostki w konstruowaniu toku choroby [13]. Interesująca jest obserwacja czasu podjęcia działań medycznych ze strony jednostki. W tym kontekście Andrew Twaddle i Robert Hessler analizowali fazy choroby. W swojej koncepcji „kariery chorego” („*ilness career*”) autorzy rozpatrywali i interpretowali zmiany, jakie występują w poszczególnych stadiach chorobowych [17]. Koncepcja zakłada, że podczas choroby (czasem nieujawnionej) jednostka podejmuje ciąg kluczowych decyzji, takich jak: decyzja o czasie, kiedy pojawia się fizyczna zmiana w organizmie, decyzja o nadaniu ważności tym zmianom, decyzja o istotności zasięgnięcia pomocy medycznej oraz jej rodzaju, decyzja odnośnie osoby leczącej i chęci do kooperacji z nią [14]. Tigges zwraca uwagę na poziomy utraty jakości życia, które można odnieść do terminalnej fazy choroby, tj.: bezradność (*helplessness*), przejawiająca się w braku możliwości zaspokojenia potrzeb; rozpacz (*hopelessness*), odnosząca się do zaburzeń w poczuciu bezpieczeństwa i braku sensu w życiu; bezcelowość (*uselessness*), związana z izolacją, depresją oraz utratą wewnętrznego świata i wartości [14]. Pacjenci różnią się od siebie w reakcjach na chorobę i zachowaniach w trakcie jej trwania. To, jak jednostka reaguje podczas schorzenia jest związane z uświadomieniem sobie, rozumieniem oraz przewidywaniem jego skutków. Choroba często postrzegana jest również przez pryzmat braku możliwości wykonania obowiązków oraz znaczenia, jakie jest jej przypisywane przez społeczeństwo. Pacjent podczas choroby dokonuje tzw. „samozdefiniowania się” [17, 18].

W Polsce istotne znaczenie dla rozwoju badań z zakresu socjologii medycyny miała Magdalena Sokołowska. Zwróciła ona uwagę na zmianę podejścia do choroby i chorowania przez pacjentów. Zauważyła, że istotne znaczenie z perspektywy podniesienia jakości życia w chorobie mają czynniki psycho-społeczne [7, 14]. Autorka podjęła także tematy dotyczące nierówności w opiece medycznej oraz potrzebę rehabilitacji jako pochorobowego etapu ponownego włączenia jednostki do społeczeństwa [14]. Innym autorem, który także dostrzegł znaczenie współpracy socjologii z medycyną był Jan Szczepański [14]. Jedno z wyróżnionych przez Szczepańskiego podejść badawczych „socjologia choroby i chorowania”, analizuje zarówno zachowania, czynniki, jak i procesy społeczne oddziałujące na powstanie przebiegu choroby, a także na „charakter społecznie sankcjonowanych procesów leczenia”. Również „opis i interpretacja procesu leczenia jako zespołu stosunków społecznych” są ważne dla analizy w kontekście choroby [16]. Autor zwrócił uwagę na istotność podejścia do chorego jako uczestnika pewnych grup społecznych oraz znaczącą rolę postaci lekarza w przebiegu choroby i przeciwdziałania jej skutków [16].

4. Projekty z zakresu socjologii medycyny

Aby pomóc choremu w zaspokojeniu holistycznych potrzeb, a tym samym dokonać podniesienia jakości życia w terminalnej fazie choroby Łuczak, w materiałach skierowanych do osób opiekujących się pacjentami paliatywnymi w placówkach medycznych (szczególnie w hospicjach) wymienia dwa sposoby. Należy do nich: zmiana w oczekiwaniach pacjenta odnośnie obecnej rzeczywistości i pomoc w dopasowaniu aktualnej sytuacji chorobowej oraz dążenie do uzyskania zadowalającego standardu obecnej rzeczywistości. Oba sposoby mają za zadanie zminimalizowanie przepaści między aspiracjami chorego a jego realnymi możliwościami. Konsekwencją choroby jest często znaczne ograniczenie lub całkowity brak możliwości wykorzystania ról społecznych, co przyczynia się do złego stanu emocjonalnego [6]. Co ciekawe, same skutki choroby czasami nie powodują ograniczenia czynności, jakie podejmował pacjent przed chorobą. Niekiedy chory, ze względu na traumatyczne przeżycia związane z nagłym zachorowaniem, odczuwa lęk przed całkowitym powrotem do życia sprzed choroby. Podejmuje tak zwane „oszczędne funkcjonowanie” [6]. Aspekt zmniejszonej aktywności chorego nie spowodował jednak, że naukowcy i wolontariusze nie podejmują działań pobudzających chorych do integracji społecznej, indywidualnej inspiracji lub zwyczajnie zajęcia czasu wolnego, by choć przez chwilę zapomnieć o trudach choroby (przykładowo inicjatywy żeglarskie, zajęcia z wizażu, czy bale marzycieli dla najmłodszych pacjentów). Od kilku lat zyskują na powszechności także projekty skierowane dla chorych poddawanych opiece paliatywnej. Jak zostało wspomniane we wcześniejszej części artykułu, specyfika tejże opieki jest szczególna. Dotyczy chorych, którzy prawdopodobnie nie przeżyją dłużej niż kilka miesięcy, dlatego skontrolowanie projektu dla pacjentów paliatywnych wymaga połączenia wiedzy z zakresu socjologii, medycyny i psychologii. Jednym z głównych zadań jest przebywanie z umierającym, wysłuchanie go, zorganizowanie mu wolnego czasu poprzez zajęcia, które nie wymagają dużego wysiłku fizycznego. Ogromną rolę odgrywa także pomoc bliskim pacjentów na tym etapie choroby. Poniżej ukazane zostaną dwie inicjatywy, które powstały w połączeniu kilku subdyscyplin. Zwrócono w nich uwagę między innymi na potrzeby pacjentów, które ze względu na swoją oczywistość często są pomijane na poczet innowacyjności w opiece medycznej,

a będące niekiedy dla chorych ważniejsze, niż sama opieka medyczna. Projekty zostały wybrane ze względu na ich wyjście poza tradycyjne schematy opieki medycznej. Pierwszy opisuje model hospicjum domowego w oparciu przede wszystkim opiekunów, gdzie oprócz czynności medycznych najważniejsza jest rozmowa, przebywanie z pacjentem i odciążenie jego bliskich. Drugi zaś jest próbą stworzenia podręcznika opieki nad chorym bez pomijania tematów trudnych i niewygodnych, takich jak umieranie [5, 6].

4.1. Nowy Model Hospicjum Domowego

Projekt jest innowacją społeczną, która odpowiada za rzeczywiste potrzeby grupy docelowej – w tym przypadku chorych w terminalnej fazie choroby nowotworowej i ich opiekunów [17]. Głównym celem inicjatywy było zwiększenie zakresu wskazań do opieki hospicyjnej, a także włączenie w pomoc nad chorymi opiekunów, którzy byliby przeszkoleni w zakresie opieki paliatywnej [17]. Pilotaż projektu został wykonany na terenie wiejskim w województwie podlaskim. Obszar, według twórców projektu, został wybrany ze względu na niski dostęp do opieki medycznej osób wymagających nadzoru lekarskiego. Z kolei, bodźcem do powstania tejże inicjatywy było dostrzeżenie deficytu w liczbie miejsc dla osób w hospicjach domowych i stacjonarnych (jest ona dwa razy mniejsza od liczby miejsc rekomendowanych przez Światową Organizację Zdrowia). Chorzy są wówczas zmuszeni do oczekiwania, zaś czas do uzyskania miejsca wynosi do trzech miesięcy. Należy podkreślić, że zgodnie z definicją, paliatywny stan choroby trwa do 6 miesięcy. Kolejną kwestią są choroby kwalifikowane do pobytu w hospicjum – w większości są to nowotwory. Pacjenci z innymi chorobami, którzy także wymagają opieki paliatywnej są często dyskredytowani. Dlatego też inicjatorzy pragnęli rozszerzyć spektrum działalności, włączając w inicjatywę większość pacjentów wymagających opieki. Kolejną istotną dla autorów kwestią była realnie dostępna dla pacjentów pomoc obejmująca potrzeby psycho-społeczne w hospicjum domowym [17]. Twórcy założyli przyjęcie pod opiekę osób niekwalifikujących się do standardowego hospicjum. Ponadto, rozszerzyli zespół interdyscyplinarny wyspecjalizowane opiekunki, aby z jednej strony zoptymalizować czas pracy innych pracowników (m.in. lekarzy, czy fizjoterapeutów), z drugiej zaś by pomóc chorym ulżyć w cierpieniu duchowym, a ich bliskim zapewnić tzw. opiekę wytchnieniową (żeby bliscy mogli zorganizować sobie czas wolny) [17]. Opiekunki mają za zadanie zadbać o „ogólny dobrostan pacjentów”, gdyż niekiedy chorzy najbardziej potrzebują rozmowy z drugim człowiekiem. Projekt ma skutkować podniesieniem jakości życia w chorobie – zniwelować powstawanie nowych dolegliwości oraz korzystnie wpłynąć na zaspokojenie potrzeb psycho-społecznych.

4.2. Projekt „Damy radę”

Projekt jest inicjatywą Fundacji Razem Zmieniamy Świat [18]. Jest wydany w formie szczegółowego podręcznika poruszającego wiele kwestii związanych z opieką nad osobą chorą. Wśród jego głównych założeń znajdują się między innymi:

- uwolnienie chorego od bólu;
- zachęcenie do aktywności;
- wspieranie rodzin w czasie choroby pacjenta i żałoby [18].

Projekt w bardzo szczegółowy sposób ukazuje procedury pielęgnacyjne, z którymi doświadczony personel medyczny ma styczność w codziennej pracy, natomiast opiekun

chorego wymaga wskazania krok po kroku czynności, które mogą wydawać się oczywiste. Dlatego w podręczniku wraz z opisem są dołączone ilustracje pokazujące wizualnie omawianą czynność. Ważnym elementem publikacji są także porady administracyjne ze wskazaniem przykładu sytuacji i nazwy instytucji, gdzie opiekun/chory może uzyskać pomoc. Ukazane są także procedury i czas oczekiwania na opiekę domową i stacjonarną oraz możliwość wypożyczenia sprzętu medycznego, takiego jak wózek inwalidzki czy materac przeciwodłężynowy. W inicjatywie ważną rolę ma zachęcanie opiekunów do rozmów z pacjentami. Dostępne są wytyczne odnośnie formy konwersacji z osobą umierającą, a także jakie tematy poruszać. Inicjatywa, podobnie jak wcześniej omawiany Nowy Model Hospicjum Domowego, podejmuje zagadnienia, które zostały pominięte poprzez nadanie szczególnej wagi samemu leczeniu oraz zabiegom pielęgnacyjnym. Powstała wówczas luka, która spowodowała, jak podkreślił Włodzimierz Piątkowski, że mimo sukcesów w medycynie chorzy nie byli usatysfakcjonowani, wręcz przeciwnie, przejawiali stany depresyjne i miewali myśli samobójcze [6, 17].

5. Podsumowanie

Istotność jakości życia, która jest uwarunkowana przez stan zdrowia została dostrzeżona, gdy sukcesy w postępach medycyny i terapii poszczególnych pacjentów nie były dla nich wystarczające [19, 20]. Choroba nowotworowa wiąże się z walką – o zdrowie i życie. W trakcie leczenia często następuje przedefiniowanie własnej osoby oraz oszacowanie swoich fizycznych możliwości w zmienionej codzienności. Ta niepewność co do przebiegu choroby generuje u chorych większą ostrożność i bardziej oszczędne codzienne funkcjonowanie. W niektórych przypadkach, gdy leczenie nie daje zamierzonych skutków, a choroba cały czas postępuje przemieszczając się na inne narządy pacjenci obejmowani są opieką paliatywną. Jest to trudny moment zarówno dla pacjenta, jak i dla jego bliskich, rodziny. Opieka paliatywna wymaga szczególnego podejścia do chorych, gdzie obok leczenia objawowego istotne jest zaspokojenie pozamedycznych potrzeb. Żeby jednak zaspokoić potrzeby pacjentów paliatywnych konieczna jest współpraca różnych dyscyplin naukowych. Ponadto, dostrzeżenie powagi pozamedycznych aspektów opieki nad pacjentami powinno być sygnałem do szerszego podejścia do chorych. Stworzenie platformy współpracy międzydyscyplinarnej oraz zaangażowanie we wspólne inicjatywy spowoduje włączenie w zakres opieki działań, które są dla pacjenta równie istotne jak opieka medyczna. Ważne są działania, które w kooperacji mogą przynieść znaczący wzrost poziomu jakości życia, szczególnie wśród pacjentów poddawanych opiece paliatywnej.

Literatura

1. Główny Urząd Statystyczny, *Rocznik Demograficzny*, Warszawa 2019.
2. Główny Urząd statystyczny, *Zdrowie i ochrona zdrowia 2017 r.*, Warszawa 2018.
3. Biela A., Block B., Gołofit M., *Eutanazja, a opieka paliatywna. Aspekty etyczne, religijne, psychologiczne i prawne*, Wydział Nauk Społecznych KUL: AM, Lublin 1986.
4. Krakowiak P. SAC, Stolarczyk A., *Ksiądz Eugeniusz Dutkiewicz SAC. Ojciec ruchu hospicyjnego w Polsce*, Fundacja Hospicyjna, Gdańsk 2007.
5. *Opieka Paliatywna w zaawansowanym okresie choroby nowotworowej. Materiały do nauczania medycyny paliatywnej*, Poznań 1999.
6. Uramowska-Żyto B., *Socjologia medycyny. Podejmowane problemy, kategorie analizy*, Wydawnictwo PAN, Warszawa 2009.

7. Żyłka P., ks. Kaczkowski J., *Życie na pełnej petardzie*, WAM, Warszawa 2015.
8. Żyłka P., ks. Kaczkowski J., *Grunt pod nogami*, WAM, Warszawa 2016.
9. Parsons T., *Struktura społeczna, a osobowość*, Państwowe Wydawnictwo Ekonomiczne, Warszawa 1969.
10. Parsons T., *System społeczny*, przeł. Kaczmarczyk M., Zakład Wydawniczy NOMOS, Kraków 2009.
11. Schutz A., *Potoczna i naukowa interpretacja naukowego działania*, [w:] Jasińska-Kania A. (et. al.), *Współczesne teorie socjologiczne, t.1*, Wydawnictwo Naukowe Scholar, Warszawa 2006.
12. Strauss A., Corbin J., *Unending Work and Care: Managing Chronic Illness AT Home*, San Francisco: Josey-Bass 1988.
13. *Zdrowie i choroba w badaniach socjologicznych prowadzonych na Uniwersytecie Medycznym w Lublinie 1995-2013*, Piątkowski W. (red.), Uniwersytet Medyczny, Lublin 2013.
14. Cockerham W.C., Scambler G., *Medical Sociology and Sociological Theory* [w:] Cockerham W.C. (red.) *Medical Sociology*, Wiley-Blackwell, Chichester 2010.
15. Szczepański J., *Elementarne pojęcia socjologii*, PWN, Warszawa 1965.
16. Twaddle A., Hessler R., *A Sociology of Health*, New York 1977.
17. *Nowy Model hospicjum domowego. Poradnik*, Ecorys, Warszawa 2009.
18. *Damy radę. Jak opiekować się osobą przewlekle chorą w domu?*, Fundacja Razem Zmieniamy Świat, Toruń 2018.
19. *Podręcznik koordynatora wolontariatu hospicyjnego*, red. Ks. P. Krakowiak, A. Modlińska, Fundacja Hospicyjna, Gdańsk 2009.
20. *Podręcznik wolontariusza hospicyjnego*, pod. red. Ks. Krakowiak P., Modlińska A., Biblioteka Fundacji hospicyjnej, Gdańsk 2008.

Znaczenie badań z zakresu socjologii medycyny w obszarze opieki paliatywnej

Streszczenie

Według rozporządzenia Narodowego Funduszu Zdrowia prawie wszyscy pacjenci hospicjum to chorzy na nowotwory złośliwe (95%). Rośnie także liczba osób objętych opieką hospicyjną. Mimo że według dostępnych statystyk pacjent przebywa w hospicjum średnio 22 dni, jest to w większości przypadków czas u schyłku życia chorego, po którym następuje śmierć. Ze względu na sytuację graniczną, w jakiej znajdują się pacjenci opieka hospicyjna zajmuje się nie tylko bólem fizycznym związanym z chorobą, ale i psychicznym oraz duchowym. Co więcej, w swoim zakresie uwzględnia także opiekę nad rodzinami przed i po śmierci bliskiego pacjenta. Artykuł jest rozważaniem nad sytuacją związaną z opieką paliatywną z perspektywy socjologicznej, potrzeb, z jakimi mają do czynienia pacjenci w hospicjach, a także refleksją na temat ważności podejmowania badań nad poziomem jakości życia wśród chorych będących pod opieką hospicjów (stacjonarnych i opieki domowej).

Słowa kluczowe: pacjent, medycyna paliatywna, hospicjum, projekt

Importance of medical sociology research in the area of palliative care

Abstract

According to the regulation of the National Health Fund (NFZ), almost all patients of the hospice are cancer patients (95%). The number of people covered by hospice care is also growing. Although, according to available statistics, the patient stays in the hospice on average for 22 days, in most cases it is the time at the end of the patient's life, followed by death. Due to the borderline situation of patients, hospice personnel deal not only with physical pain related to the disease, but also mental and spiritual pain. What's more, it also includes the care of families before and after the death of a close patient. The article is a reflection on the situation related to palliative care from a sociological perspective, the needs faced by patients in hospices, as well as a reflection on the importance of undertaking research on the level of quality of life among patients under the care of hospices (stationary and home care).

Keywords: patient, palliative medicine, hospice, project

Postawy społeczne wobec osób zmagających się z zaburzeniami psychicznymi i ich leczenia

1. Rys historyczny

Zaburzenia psychiczne to temat obecny w literaturze przedmiotu od początku dokumentowania przez ludzi swojej historii [1, 2]. Wzmianki o nich traktujące odnaleźć można w źródłach pochodzących ze starożytnego Egiptu, Grecji, Rzymu czy Chin [2-7]. Zawierały one zarówno charakterystyki poszczególnych zaburzeń, jak i opisy ich przyczyn, sposobów leczenia (w tym załączków psychoterapii) oraz sposobów traktowania osób z zaburzeniami przez społeczeństwo, wskazując na względnie zaawansowany stan wiedzy na ten temat i chęci jego zgłębiania. Oprócz tekstów medycznych, opisy przejawów zaburzeń psychicznych odnaleźć można również np. w księgach religijnych: mitach greckich lub Biblii.

Postrzeganie zaburzeń psychicznych w kręgach kultury europejskiej zmieniło się wraz z końcem starożytności. Przez trwające niemal tysiąc lat średniowiecze nastąpił okres wzrostu nietolerancji i dyskryminacji osób z problemami psychicznymi; jednocześnie drastyczny spadek poziomu leczenia i rozwój poglądów demonologicznych zbudował solidne fundamenty pod niekorzystną sytuację społeczną sprzyjającą powstawaniu zaburzeń psychicznych [8]. Chorych torturowano, topiono, wyrzucano z miast, palono na stosach, a wszystko to łączono zwykle z oskarżeniami o czary, co trwało aż do końca XVIII wieku⁶.

W następnych stuleciach osoby z zaburzeniami zamykano w „domach dla obłąkanych”, sierocińcach i więzieniach, nie oferując żadnej opieki i skazując na dalsze życie w chorobie i cierpieniu. Doradzano również sterylizowanie i kastrowanie osób z zaburzeniami w celu ochrony „czystości rasy”, co osiągnęło swoje apogeum w czasach II wojny światowej, gdy przywódcy III Rzeszy rozpoczęli ich masową eksterminację wraz z innymi mniejszościami. Jednocześnie równolegle rozwijało się coraz intensywniej podejście medyczne [2]. Na przełomie XVIII i XIX wieku podejmowane były próby reformowania szpitali psychiatrycznych, polepszyło się

¹ karolinaaemm@gmail.com, Instytut Psychologii, Wydział Filozoficzny, Uniwersytet Jagielloński, <https://www.uj.edu.pl>.

² mikołaj@buczel.walbrzych.pl, Instytut Psychologii, Wydział Filozoficzny, Uniwersytet Jagielloński, <https://www.uj.edu.pl>.

³ natalia.grzywna@yahoo.com, Instytut Psychologii, Wydział Filozoficzny, Uniwersytet Jagielloński, <https://www.uj.edu.pl>.

⁴ kamfil97@gmail.com, Instytut Psychologii, Wydział Filozoficzny, Uniwersytet Jagielloński, <https://www.uj.edu.pl>.

⁵ malwina.szpitalak@uj.edu.pl, Instytut Psychologii, Wydział Filozoficzny, Uniwersytet Jagielloński, <https://www.uj.edu.pl>.

⁶ Co warte wspomnienia, w porównaniu do reszty Europy z tego okresu, sytuacja osób chorych psychicznie w Polsce była zaskakująco dobra: chorych utrzymywano w klasztorach instytucjach, polecano sprawowanie nad nimi opieki przez rodziny, a tylko tych bardziej agresywnych izolowano [2].

traktowanie pacjentów przez personel medyczny, pojawiły się także pierwsze opracowania z zakresu psychopatologii, wraz z rozwojem których powstawały coraz to nowsze ujęcia zaburzeń psychicznych i odkrycia naukowe w tym zakresie, zarówno w kontekście objawów, ich genezy, jak i leczenia. Choć jednak poczyniono w tej dziedzinie wielki krok naprzód, współcześnie nadal dostrzec można obecność licznych problemów, między innymi dyskryminacji osób z zaburzeniami i nieprawidłowych przekonań na temat zaburzeń psychicznych funkcjonujących w społeczeństwie.

2. Postawy dyskryminacyjne wobec osób z zaburzeniami psychicznymi we współczesnym świecie

Aby przedstawić, w jaki sposób osoby cierpiące na zaburzenia psychiczne postrzegane są w dzisiejszych czasach, należy przeanalizować publikowane badania i metaanalizy, dokonując przeglądu literatury na ten temat. Współcześnie, pomimo istnienia wielu skutecznych metod leczenia zaburzeń psychicznych, znaczna część osób nadal nie jest leczona w odpowiedni sposób [9] lub opóźnia podjęcie decyzji o leczeniu [10]. Istotną rolę w tworzeniu tych barier odgrywa strach przed byciem dyskryminowanym oraz piętnowanym [11].

Społeczny odbiór osób, które doświadczają zaburzeń psychicznych lub przeszły w swoim życiu ich epizod jest niestety często negatywny i nacechowany stereotypami [12, 13]. Nierówne traktowanie, piętno i dyskryminacja towarzyszące zaburzeniom psychicznym stanowią nie tylko czynniki utrudniające poszukiwanie leczenia [14, 15] i opóźniające sam jego proces [16], ale i wpływają szkodliwie na wiele aspektów życia jednostki [17], m.in. uniemożliwiając osiągnięcie równych praw społecznych i pełnego uczestnictwa w życiu ich społeczności. Przyczyniają się także do powstawania przeszkód stojących na drodze do rozwoju bardziej wydajnych środowiskowych usług zdrowia psychicznego [18].

Björkman Svensson i Lunderberg [19], podkreślają, że osobom mającym w swoim życiu historię występowania zaburzeń psychicznych przypisuje się cechy takie, jak: dziwność, odmienność i skłonność do agresji [20], niestabilność, brak samokontroli, a także opisuje się je jako wzbudzające lęk w społeczeństwie [15, 21]. Co więcej, dyskryminowana grupa jest także dewaluowana i negatywnie oceniana w każdej dziedzinie życia [22]. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że większość osób nie zaakceptowałaby osoby cierpiącej na zaburzenia psychiczne jako godnego zaufania członka społeczeństwa, przyjaciela lub współpracownika. Dodatkowo, osoby z zaburzeniami określa się tendencyjnie jako mniej inteligentne niż przeciętny członek społeczeństwa [19]. Wskutek powyższych osoby dyskryminowane często odczuwają odrzucenie społeczne, mają trudności ze znalezieniem pracy, prowadzeniem codziennego życia oraz poszukiwaniem pomocy w sytuacjach, gdy pomoc ta jest niezbędna [15, 19]. Ponadto zdecydowana większość osób, która doświadczała bądź wciąż doświadcza zaburzeń psychicznych, stara się ukryć niniejszy fakt oraz unika rozmów dotyczących tego tematu [19, 23].

W dzisiejszych czasach coraz częściej jednak podnosi się temat zaburzeń psychicznych i przedstawia je społeczeństwu w sposób obiektywny i zawierający informacje pochodzące z badań naukowych. Badania wykazują, że organizowanie kampanii społecznych poruszających omawiany problem może skutkować pewnymi pozytywnymi rezultatami [24]. Przyczyny występowania dyskryminacji osób zmagających się

z zaburzeniami psychicznymi są rozmaite: brak wiedzy, ignorowanie problemu [25], upowszechnienie się negatywnych przekonań oraz krzywdzących zachowań, a także wszechobecnie występujące i sprzeczne z rzeczywistością informacje dotyczące zaburzeń [24]. Wśród nich należy wyróżnić: agresywne tendencje, niespójne i niespokojne zachowanie oraz brak kontroli nad sobą. Rossetto i współpracownicy [24] przeprowadzili analizę skutków kampanii społecznej, która miała na celu uświadomienie społeczeństwu istnienia problemu, jakim są zaburzenia psychiczne. Mimo że kampania ta nie przyczyniła się do zmiany samego postrzegania osób z zaburzeniami psychicznymi przez jej uczestników, wykazano, że świadomość istnienia nierówności między dwiema omawianymi grupami zdecydowanie wzrosła. Zaobserwowano także zwiększenie poziomu wiedzy dotyczącej zaburzeń [24]. Taki stan rzeczy jest niezwykle korzystny, gdyż to właśnie brak wiedzy leży u podstaw wystąpienia dyskryminacji oraz ich nierównego traktowania [24, 26]. Niemniej jednak inne doniesienia sugerują, że, choć społeczeństwo zyskuje wiedzę, potrzeba dystansowania się od osób z zaburzeniami, szczególnie w przypadku ciężkiej depresji i schizofrenii, utrzymuje się lub nawet wzrasta [27]. Ponadto zaobserwowano, że pracownicy służby zdrowia, którzy powinni mieć większą wiedzę na temat zdrowia psychicznego niż reszta ludzi, często mają bardziej negatywne nastawienie do zaburzeń psychicznych niż ogół społeczeństwa [28-30], co przeczy powszechnemu założeniu, że większa znajomość zaburzeń psychicznych skutkuje mniejszym nasileniem postaw dyskryminujących.

3. Rodzina pacjenta wobec choroby i dyskryminacji

Zewnętrzna, społeczna stygmatyzacja jest istotnym czynnikiem wpływającym na postrzeganie zaburzeń psychicznych przez członków rodziny chorego [31]. Wyniki badań wskazują, że, z obawy przed dyskryminacją, rodziny osób cierpiących na zaburzenia psychiczne mogą ignorować ich problemy, ukrywać je przed życiem publicznym, opóźniać szukanie leczenia, a nawet odrzucać profesjonalną pomoc – takie postawy i zachowania mogą determinować przebieg choroby i zwiększać obciążenie psychiczne [32-35]. Pojęcie „postrzeganie choroby” (*illness perception*) odnosi się do poznawczych reprezentacji i postaw poszczególnych osób względem choroby [36]. Termin ten jest szeroko stosowany w dziedzinie psychologii zdrowia; w ostatnim czasie został także zaadaptowany do psychiatrii dziecięcej [37]. Dysponując różnymi reprezentacjami, rodzice oraz najbliżsi opiekunowie mogą być zarówno potencjalnymi wyzwalaczami objawów choroby, jak i partnerami w procesie jej leczenia.

Radzenie sobie z zaburzeniami psychicznymi w rodzinie wywiera wpływ na życie wszystkich jej członków. Rezultaty badań [38] wskazują, że radzenie sobie z ciężarem, jakim jest choroba bliskiego, prowadzi także do cierpienia zdrowych osób z najbliższego otoczenia. Nowsze badania, koncentrujące się na odróżnieniu wpływu stygmatyzacji choroby psychicznej od innych negatywnych doświadczeń opiekuńczych, potwierdzają tę tezę [39]. Autorzy wykazali, że piętno społeczne związane jest z cierpieniem opiekuna, poczuciem uprzedmiotowienia oraz słabszym funkcjonowaniem rodziny, rozumianym jako problemy z zachowaniem dobrych relacji między jej członkami oraz zmniejszenie zdolności do skutecznego rozwiązywania problemów. Postrzeganie zaburzeń psychicznych w kategoriach obciążeń i strat również przyczynia się do budowania ich negatywnego wizerunku. Co więcej, rodzice osób z diagnozą choroby psychicznej czują się często odpowiedzialni za stan swoich dzieci oraz opiekę

nad nimi. Jednocześnie to właśnie rodzice oraz najbliżsi opiekunowie są osobami, których postawa bezpośrednio i najbardziej wpływa na samopoczucie, motywację oraz postrzeganie własnej kondycji przez samego pacjenta [40].

Ferriter i Huband [41] przeprowadzili badania dotyczące doświadczeń rodziców dzieci ze zdiagnozowaną schizofrenią. Przeprowadzono wywiady z opiekunami, aby poznać ich poglądy na temat przyczyn zaburzenia, odczuwanego obciążenia emocjonalnego i przydatności innych osób w poszukiwaniu wsparcia. Wyniki pokazały, że rodzice często obwiniają się za zaburzenia swoich dzieci, nawet jeśli nie są za to obwiniani przez innych. Ponadto, poczucie winy nie wydało się wynikać z wiary w patologiczny model rodzicielski schizofrenii. Opieka nad dziećmi z zaburzeniami często powodowała u badanych znaczny niepokój emocjonalny, który związany był z przeświadczeniem o tym, że profesjonalny personel widzi ich starania jako niepomocne. Oprócz poczucia winy najczęściej zgłaszanymi reakcjami na diagnozę zaburzeń psychicznych były: stres, strach oraz poczucie straty.

Wyniki badań z ostatnich pięciu lat potwierdzają, że rodziny oraz opiekunowie osób z zaburzeniami psychicznymi mogą dokonywać internalizacji stereotypów, przekształcając je tym samym w stygmatyzację afiliacyjną. Określenie to służy do opisanego zjawiska samostygmatyzacji, szczególnie osób z diagnozą zaburzenia psychicznego, ale rozciąga się ono także na ich przyjaciół i członków rodziny, którzy sami nie mają cech będących podstawą stygmatyzacji. Może to skutkować poczuciem nieszczęścia, bezradnością, obniżonym poczuciem własnej wartości oraz obciążeniem emocjonalnym [42]. Ponadto wykazano, że niektóre zaburzenia mogą prowadzić do silniejszej stygmatyzacji wewnętrznej niż inne. Opiekunowie członka rodziny ze zdiagnozowaną schizofrenią przejawiali wyższy poziom piętna afiliacyjnego niż opiekunowie osoby z zaburzeniem afektywnym dwubiegunowym oraz depresją.

Metaanaliza Hasson-Ohayona i in. [40] miała odpowiedzieć na dwa zasadnicze pytania: co charakteryzuje reprezentacje zaburzeń psychicznych u rodziców oraz jaki jest ich związek z przebiegiem choroby i stanem zdrowia ich dzieci? Oceniano konstrukty poznawcze związane z postrzeganiem choroby, takie jak: samostygmatyzacja (*self-stigma*), wgląd i postawy. Przegląd badań wykazał, że reprezentacje zaburzeń psychicznych u rodziców obejmowały kilka wymiarów związanych z etiologią, poczuciem kontroli i stanem zdrowia dzieci. Wymiary te były często konceptualizowane jako przyczyny choroby (z podziałem na: genetyczne, środowiskowe i rodzinne) oraz odpowiedzialność, zarówno za istnienie choroby, jak i jej przebieg oraz rozwój. Wśród rodziców, którzy przypisywali chorobę czynnikom biologicznym lub genetycznym, prawie połowa spodziewała się dobrego stanu zdrowia ich dziecka w przyszłości [43]. Dla powyższych wymiarów wśród rodziców reprezentacje chorób związane były również z poziomem akceptacji stereotypu związanego z chorobą, określanej jako wgląd w chorobę, a także internalizacją stygmatyzujących aspektów zaburzenia [44].

4. Postrzeganie zaburzeń psychicznych a poszukiwanie profesjonalnej pomocy psychiatrycznej

Analizując postawy przejawiane wobec osób doświadczających zaburzenia psychicznego należy również zwrócić uwagę na to, jak ludzie postrzegają profesjonalną pomoc w zakresie leczenia zaburzeń. Wyniki badań wskazują, że wiele osób, doświadczających poważnych problemów psychicznych często nie sięga po profesjonalną

pomoc lub nie w pełni uczestniczy w leczeniu, które otrzymuje [45]. W związku z tym istotne wydaje się zbadanie przyczyn, które wpływają na niechęć do podejmowania takich działań lub na wytrwanie w rozpoczętym już leczeniu. Stygmatyzujące poglądy społeczności na temat pacjentów, na przykład postrzeganie ich jako osoby niebezpieczne, niewarte zaufania lub posiadające niskie umiejętności społeczne, mogą wpływać na ich postawy wobec profesjonalnej pomocy psychiatrycznej i psychologicznej oraz na to, czy z takiej pomocy skorzystaliby w przypadku własnych problemów psychicznych [46-48]. Rezultaty badań pokazują, że posiadanie tego typu przekonań jest istotną przeszkodą w szukaniu odpowiedniej pomocy między innymi w przypadku np. depresji [49, 50]. W badaniu przeprowadzonym przez zespół badawczy Barneya i współpracowników [48] sprawdzano, jak ludzie radziliby sobie w sytuacji, gdyby sami zachorowali na depresję. Badacze wykazali, że ludzie przeważnie wstydziłiby się szukać profesjonalnej pomocy oraz uważaliby, że inni zareagowaliby negatywnie, gdyby dowiedzieli się, że podjęli oni kroki w celu jej znalezienia.

Ze względu na to, że przejawianie określonej postawy wobec systemu opieki psychiatrycznej i psychologicznej wydaje się związane z poszukiwaniem profesjonalnej pomocy w przypadku wystąpienia zaburzeń psychicznych [45, 51, 52], istotne jest zilustrowanie korelatów pozytywnych postaw wobec takiej pomocy. Warto zauważyć, że istnieje stosunkowo niewiele badań podejmujących tę problematykę, a większość z nich przeprowadzana jest w takich krajach, jak Stany Zjednoczone lub Kanada [47]. Analizując ich wyniki, można zauważyć, że poprzednie doświadczenia z systemem opieki zdrowia psychicznego są związane z bardziej pozytywną postawą wobec profesjonalnej pomocy niż w przypadku braku takich doświadczeń [53-55]. Co więcej, osoby z wyższym wykształceniem oraz kobiety dużo częściej przejawiały pozytywne postawy wobec takiej pomocy [56]. Innym wartym uwagi korelatem wydaje się praca w systemie opieki zdrowia psychicznego. Badania w tym temacie zdają się dostarczać niejednoznaczne wyniki. Z jednej strony wyniki badań sugerują, że osoby związane zawodowo z systemem opieki zdrowia psychicznego przejawiają bardziej pozytywne postawy wobec osób cierpiących na zaburzenia psychiczne [57], postrzegając osoby chore jako mniej niebezpieczne i w większym stopniu były w stanie zaakceptować je w takich rolach, jak pracownik, przełożony czy członek rodziny. Z drugiej strony istnieją jednak badania, które nie wykazują takiej zależności. Nordt, Rossler i Lauber [58] porównywali postawy osób związanych zawodowo z systemem opieki psychiatrycznej z postawami osób z populacji ogólnej. Wykazali występowanie tak samo negatywnych stereotypów zarówno u osób zaangażowanych w środowisko opieki, jak i u reszty społeczeństwa (choć ci pierwsi wykazywali mniejsze poparcie dla ograniczeń, które według nich powinny dotyczyć osoby zaburzone) niż ludzie zawodowo niezwiązani z tym systemem. Wobec tych niejasnych wyników rekomenduje się szerszą analizę tego zjawiska, z uwzględnieniem także innych zmiennych, które mogą moderować ten związek.

Ze względu na to, że wyniki doniesień empirycznych wykazują różnice kulturowe w postrzeganiu chorób psychicznych oraz pomocy z nimi związanej [47, 59], istnieje konieczność prowadzenia badań, które zawęziłyby swoje eksploracje do określonych kręgów kulturowych. Analizując badania prowadzone w Europie można zauważyć, że istnieje bardzo niewielka ich liczba sprawdzających te zależności. Jednym z najwięk-

szych badań przeprowadzonych na próbie europejskiej było badanie ten Have'a i współpracowników [47]. Badacze dysponowali obszernymi danymi z Europejskiego Badania Epidemiologicznego dotyczącego zaburzeń psychicznych (*European Study of Epidemiology of Mental Disorders, ESEMeD*), pochodzącymi z sześciu europejskiej krajów: Belgii, Francji, Niemiec, Włoch, Holandii oraz Hiszpanii ($N = 21\,425$). Biorąc pod uwagę ogólne wyniki badania, autorzy zauważyli, że większość osób badanych byłaby skłonna do szukania profesjonalnej pomocy w przypadku wystąpienia u nich poważnych problemów emocjonalnych (70,9%) i czułaby się komfortowo rozmawiając o swoich problemach z profesjonalistą (59,4%). Dodatkowo badani deklarowali, że nie czuliby się skrępowani, gdyby ich znajomi dowiedzieli się, że korzystają z takiej pomocy (80,3%). Postawy wobec profesjonalnej pomocy różniły się znacząco w obrębie badanych krajów. Badani z Hiszpanii przejawiali postawy najbardziej pozytywne, natomiast badani z Niemiec wykazywali postawy najmniej pozytywne ze wszystkich poddanych badaniu krajów. Warto również zwrócić uwagę na to, że 32,2% wszystkich osób badanych wyraziło przekonanie, że profesjonalna pomoc jest nieskuteczna.

Podsumowując, można zauważyć, że wyniki badań wskazują na szerokie rozpowszechnienie negatywnych postaw zarówno wobec osób z zaburzeniami, jak i profesjonalnej pomocy psychiatrycznej czy psychologicznej. Rodzi to szereg problemów, ponieważ posiadanie pozytywnych przekonań wobec pomocy wydaje się związane z jej poszukiwaniem [60, 61] i skorelowane z takimi zmiennymi, jak: płeć, wykształcenie [56] i poprzednie doświadczenia związane z pomocą psychiatryczną [53, 55]. Istnieją również badania, które nie dostarczają jednoznacznych wyników na temat powiązania takich zmiennych, jak praca w systemie opieki zdrowia psychicznego, z przejawianiem pozytywnych przekonań na temat osób cierpiących na zaburzenia psychiczne i profesjonalnej pomocy, którą te osoby otrzymują [57, 58]. Można również dostrzec znaczące różnice kulturowe [47]. W związku z tym, że otrzymanie profesjonalnej pomocy w przypadku wystąpienia zaburzeń psychicznych jest często niezbędne do prawidłowego funkcjonowania, istotne wydaje się analizowanie postaw lokalnych społeczności. Badań takich jest jednak w Europie niewiele, a sytuacja panująca w wielu krajach, w tym Polsce, nieznaną.

5. Postrzeganie zaburzeń psychicznych poza europejskim kręgiem kulturowym

Zgodnie ze stanowiskiem Amerykańskiego Towarzystwa Psychologicznego, przy ustalaniu diagnozy należy brać pod uwagę m.in. normy społeczne, obyczajowe i religijne obowiązujące w danym kręgu kulturowym [62]. Nie sposób zignorować też wpływu tych czynników na samo postrzeganie zaburzeń psychicznych i osób nimi dotkniętych, które doświadczają dyskryminacji w wyniku stygmatyzujących postaw w dużej mierze mających swoje źródło w kontekście społeczno-kulturowym, wpływającym na ekspresję i determinanty stygmatyzacji oraz skuteczność różnych interwencji zmierzających do jej zmniejszenia.

5.1. Bliski Wschód

Jedne z najnowszych i kompleksowo ujmujących poruszany temat badań pochodzą z Arabii Saudyjskiej. Abolfotouh i in. [63] przeprowadzili przekrojową ankietę na dużej, reprezentatywnej dla społeczeństwa saudyjskiego próbie, obejmującej ludzi

o zróżnicowanym statusie społeczno-ekonomicznym, wykształceniu, stanie cywilnym oraz równej liczbie kobiet i mężczyzn. Badacze stwierdzili, że znacząca większość badanych przejawiała brak wiedzy o mechanizmach i naturze zaburzeń psychicznych, co wiązało się także z okazywaniem piętnujących postaw wobec osób nimi dotkniętych. Większą wiedzę i mniejszą liczbę zachowań piętnujących przejawiały kobiety i osoby będące w związkach małżeńskich. Co ciekawe, nie stwierdzono związków między dyskryminacją i wiedzą a czynnikami społeczno-demograficznymi. Prawie wszystkie osoby za przyczyny zaburzeń psychicznych uznawały nieszczęścia, jedna trzecia upatrywała ich źródła w boskiej karze, a prawie połowa winiła duchy. Jednocześnie znaczna część respondentów stwierdzała, że przyczyną zaburzeń może być nadużywanie substancji psychoaktywnych, choroby mózgu i osobista słabość. Podobne wyniki otrzymano w badaniach populacji Iraku [64], w przeciwieństwie do kultury zachodniej, gdzie za przyczyny zaburzeń uznaje się głównie czynniki biologiczne lub stres psychospołeczny [35, 65, 66]. Stwierdzono również, że mniej więcej ¼ osób badanych dyskryminowała osoby chore w kwestii zawierania przez nie małżeństw, posiadania dzieci i wykonywania tej samej pracy, co osoby zdrowe. Ponad połowa respondentów uważała, że osoby cierpiące na zaburzenia psychiczne nie mogą wyzdrowieć i oceniała negatywnie próby szukania przez nie profesjonalnej pomocy. Zgłoszono także niższą chęć korzystania z niej w przypadku problemów emocjonalnych niż w krajach Europy Zachodniej [47]. Autorzy badania spekulują, że dość konserwatywna kultura charakterystyczna dla Arabii Saudyjskiej jest prawdopodobnie istotnym czynnikiem wpływającym na negatywne nastawienie wobec osób z zaburzeniami, jednocześnie zalecając zwiększenie wysiłków i przeznaczania środków na rzecz edukacji i promowania zachowań antydyskryminacyjnych w obrębie regionu Bliskiego Wschodu.

5.2. Chiny

Inne reprezentatywne badanie w tej tematyce przeprowadzono w Chinach [67], wykorzystując dane zebrane za pomocą kwestionariuszy mierzących wiedzę o zaburzeniach psychicznych i postawy dyskryminacyjne osoby z zaburzeniami. Stwierdzono wzrost wiedzy na temat zdrowia psychicznego w stosunku do poprzednich badań w tym kraju [68-70]. Nie przełożył się on jednak na dobre traktowanie osób cierpiących na zaburzenia psychiczne – stosunek większości ludzi wobec nich okazał się negatywny i niezależny od poziomu wykształcenia mimo jego związku z większą wiedzą na temat zaburzeń. Badacze łączą te wyniki z charakterystyczną dla Azji wschodniej odpowiedzialnością społeczną, której zgodnie z przekonaniem osoby chore nie przejawiają. Co zaskakujące, okazało się, że mieszkańcy obszarów wiejskich mieli bardziej pozytywne nastawienie do osób zaburzonych niż osoby mieszkające w miastach, co stoi w sprzeczności z dotychczasowymi doniesieniami [26], również tymi pochodzącymi z Chin [69]. Mniej dyskryminujące postawy przejawiali również ludzie młodszy. W związku z zauważeniem problemów występujących zwłaszcza wśród społeczności wykształconych mieszkańców miast, badacze opowiedzieli się za ogromną potrzebą wdrażania przede wszystkim interwencji i kampanii antydyskryminacyjnych.

5.3. Afryka Subsaharyjska

Innym, kulturowo odmiennym regionem, jest Afryka Subsaharyjska, a zwłaszcza Nigeria, gdzie temat postrzegania zaburzeń psychicznych eksplorowano, jak się wydaje, najczęściej. Etniczne zróżnicowanie tego kraju odnajduje tam swoje związki z twierdzeniami o przyczynach zaburzeń [71-73], wskazując przede wszystkim na nadużywanie narkotyków, przyczyny mistyczne, opętanie przez złe duchy, stres, zdarzenia traumatyczne i dziedziczenie – każde przekonanie przejawiane jest w zróżnicowanym stopniu w różnych regionach kraju. Ponadto, ludzie preferują pomoc tradycyjnych i duchowych uzdrowicieli, którzy sami głoszą nadprzyrodzone przyczyny zaburzeń [74]; co więcej, dostępność świadczeń w zakresie zdrowia psychicznego w Nigerii jest dostarczana głównie w ten sposób [75]. Inne badanie poświęcone uwarunkowaniom przekonań na temat genetyki zaburzeń psychicznych, przeprowadzone z udziałem bardzo dużej, przekrojowej próby, wykonali Adewuya i Makanjuola [76]. Podobnie jak w przypadku poprzednich badań, ustalono, że za najczęściej wymieniane przyczyny zaburzeń wśród mieszkańców Nigerii należy uznać: nadużywanie alkoholu i substancji psychoaktywnych, czary, złe duchy oraz karę boską. Stwierdzono, że mieszkańcy miast częściej przejawiali przekonanie o większej różnorodności czynników etiologicznych w porównaniu do mieszkańców wsi, którzy jednocześnie częściej niż mieszkańcy miast wymieniali czynniki nadprzyrodzone jako najważniejsze; jednocześnie poziom edukacji okazał się nie wiązać w żaden sposób z wiarą w tego rodzaju przyczyny. Zbliżone wyniki otrzymano również w badaniach na populacji ludu Akan w Ghanie [77]. Obecność i utrwalanie takiego rozumowania, według badaczy, jest przyczyną wzrastającej stygmatyzacji osób chorych w Afryce. Sugerują oni również, że w związku ze znaczącymi różnicami w przekonaniach na temat źródeł zaburzeń w porównaniu do Europy, próby wprowadzania w Nigerii „zachodniej” opieki medycznej najprawdopodobniej okazałyby się daremne.

5.4. Indie

W jednym z badań prowadzonych w indyjskim wiejskim regionie Maharashtran [78] skupiono się na różnicach w obrębie postrzegania osób cierpiących na depresję i schizofrenię. Uprzedzenia mierzono, wykorzystując kwestionariusze dystansowania społecznego i chęci do współpracy. Mimo ogólnej dość sporej tolerancji w porównaniu do opisywanych poprzednio rejonów stwierdzono obecność pewnych stygmatyzujących postaw. Osoby uczestniczące w badaniach deklarowały większą chęć dystansu wobec osób ze schizofrenią niż z depresją. Dystansowanie się było widoczne szczególnie w przypadku, gdy osoba cierpiąca na zaburzenia psychiczne stać się miała częścią rodziny, a zwłaszcza małżonkiem, co wiąże się najprawdopodobniej z charakterystyczną dla kultury Indii centralną rolą małżeństwa. Znaczna część uczestników badania stwierdziła, że osoby borykające się z zaburzeniami psychicznymi stanowią zagrożenie dla innych, mogą być nieobliczalne w swoim zachowaniu i należy ich unikać. Prawie wszyscy badani nie traktowali również zaburzeń psychicznych jako prawdziwych chorób natury medycznej. Poglądy te były bardziej stanowczo podtrzymywane przez członków lokalnej społeczności niż osoby zaangażowane w udzielanie pomocy zdrowotnej. Co warto podkreślić, zestaw przekonań o przyczynach zaburzeń psychicznych okazał się znacząco odmienny od charakterystycznych dla

kultury zachodniej lub np. regionu Afryki Subsaharyjskiej – najczęściej uznawanymi przyczynami były różne czynniki społeczno-ekonomiczne, podczas gdy ani przyczyny nadprzyrodzone, ani wyjaśnienia biologiczne nie zyskiwały szerokiego poparcia. Jednocześnie, przekonanie o społeczno-ekonomicznych czynnikach stojących za genezą zaburzeń psychicznych wiązało się z mniejszym dystansowaniem społecznym, w przeciwieństwie do przekonania, że problemy psychiczne wynikają z osobistej słabości chorego lub czynników biologicznych. Badacze zaobserwowali też, że promowanie „europejskich” biomedycznych wyjaśnień zaburzeń psychicznych w tym kręgu kulturowym może zaostriżyć postawy dyskryminacyjne, zamiast je redukować.

6. Podsumowanie

Z przedstawionego przeglądu badań wysnuć można wnioski, że choć czasy średniowiecza i jego metod minęły, problem negatywnego postrzegania osób zmagających się z zaburzeniami psychicznymi jest nadal obecny. Mimo stopniowego zwiększania wiedzy z zakresu zdrowia psychicznego, jednostki chore są wciąż dyskryminowane, obciążone stygmatyzacją i odsuwane od reszty społeczeństwa, co przekłada się na ich niski poziom dobrostanu zarówno bezpośrednio, jak i pośrednio (np. w kwestii unikania profesjonalnej pomocy bądź opóźniania jej poszukiwania). Z problemami tego typu zetknąć się można zarówno w dalszym otoczeniu, jak i najbliższej rodzinie [32]. Dzieje się to bez względu na przynależność kulturową jednostki. Wydaje się, że nie istnieją też uniwersalne metody zwiększania świadomości społecznej i zmniejszania postaw dyskryminujących – metody stosowane w jednej kulturze zastrzażyć mogą dyskryminację w innej lub zwyczajnie nie działać, co podważa skuteczność „zachodnich” metod i wyjaśnień, mimo ich silnie naukowej podstawy. Nie wystarcza również samo edukowanie w obrębie wiedzy o zaburzeniach psychicznych, ponieważ znajomość problematyki zdrowia psychicznego nie stanowi wysoce skutecznego sposobu redukcji dyskryminacji [79]. Aby zmniejszać rozpowszechnienie szkodliwych postaw i zwiększać szansę na pomoc osobom cierpiącym na zaburzenia psychiczne, należy podejmować szereg systematycznych badań o zasięgu lokalnym i opracowywać dostosowane do lokalnych warunków sposoby walki z dyskryminacją – choć i to może okazać się niewystarczające.

Literatura

1. Porter R., *Szaleństwo. Rys historyczny*, Przeł. J. Karłowski, Dom Wydawniczy Rebis, Poznań 2002/2003.
2. Grzywa A., *Oblicza psychozy*, Wydawnictwo Czelej, Lublin 2005.
3. Ebbell B., *The Papyrus Ebers*, Levin and Munksgaard, Kopenhaga 1937.
4. Bryan C., *Ancient Egyptian Medicine. The Papyrus Ebers. Translated from the German version*, Ares Publishers Inc., Chicago, 1930.
5. Okasha A., Okasha T., *Notes on mental disorders in Pharaonic Egypt*, History of Psychiatry, 44, 2000, s. 413-424.
6. Stevens J.M., *Gynaecology from ancient egypt: the papyrus kahun a translation of the oldest treatise on gynaecology that has survived from the ancient world*, Medical Journal of Australia, 25-26, 1975, s. 949-952.
7. Kleisiaris C.F., Sfakianakis C., Papathanasiou I.V., *Health care practices in ancient Greece: The Hippocratic ideal*, Journal of Medical Ethics and History of Medicine, 7, 2014, s. 6.

8. Bilikiewicz T., Gallus J., *Psychiatria polska na tle dziejowym*, PZWL, Warszawa 1962.
9. Patel V., Maj M., Flisher A.J., De Silva M.J., Koschorke M., Prince M., ... & Campodónico F.D., *Reducing the treatment gap for mental disorders: a WPA survey*, World Psychiatry, 3, 2010, s. 169-176.
10. Girma E., Tesfaye M., *Patterns of treatment seeking behavior for mental illnesses in Southwest Ethiopia: a hospital based study*, BMC Psychiatry, 1, 2011, s. 138.
11. Brown N.B., Bruce S.E., *Stigma, career worry, and mental illness symptomatology: Factors influencing treatment-seeking for Operation Enduring Freedom and Operation Iraqi Freedom soldiers and veterans*, Psychological Trauma: Theory, Research, Practice, and Policy, 3, 2016, s. 276-283.
12. Hayward P., Bright J., *Stigma and mental illness: A review and critique*, Journal of Mental Health, 4, 1997, s. 345-354.
13. Wolińska J., *Percepcja społeczna, stereotyp niepełnosprawności – perspektywa aktora i obserwatora*. Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska, sectio J–Paedagogia-Psychologia, 1, 2015, s. 45-66.
14. Al-Darmaki F., Thomas J., Yaaqeb S., *Mental health beliefs amongst Emirati female college students*, Community Mental Health Journal, 2, 2016, s. 233-238.
15. Schomerus G., Stolzenburg S., Freitag S., Seerforck S., Muehlan H. i Schmidt S. *Stigma as a barrier to recognizing personal mental illness and seeking help: a prospective study among untreated persons with mental illness*, European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience 269(4), 2019, s. 469-479.
16. Oexle N., Müller M., Kawohl W., Xu Z., Viering S., Wyss C., Vetter S. i Rüschi N., *Self-stigma as a barrier to recovery: a longitudinal study*. European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience, 2, 2018, s. 209-212.
17. Corrigan P.W., Morris S.B., Michaels P.J., Rafacz J.D., Rusch, N., *Challenging the public stigma of mental illness: a meta-analysis of outcome studies*, Psychiatric Services, 63(10), 2012, s. 963-972.
18. Kohls E., Coppens E., Hug J., Wittevrongel E., Van Audenhove C., Koburger N., Arensman E., Székely A., Gusmão R., Hegerl U., *Public attitudes toward depression and help-seeking: impact of the OSPI-Europe depression awareness campaign in four European regions*, Journal of Affective Disorders, 217, 2017, s. 252-259.
19. Björkman T., Svensson B., Lunderberg B., *Experiences of stigma among people with severe mental illness. Reliability, acceptability and construct validity of the Swedish versions of two stigma scales measuring devaluation/discrimination and rejection experiences*, Nordic Journal of Psychiatry, 61(5), 2007, s. 332-338.
20. Piner K.E., Khale L.R., *Adapting to the stigmatizing label of mental illness: Forgone but not forgotten*, Journal of Personality and Social Psychology, 47, 1984, s. 805-811.
21. Farina A., Thaw J., Lovern J.D., Mangone D., *People's reactions to former patients moving to their neighbourhood*, Journal of Community Psychology, 2, 1974, s. 108-112.
22. Brockington I.F., Hall P., Levings J., Murphy C., *The community's tolerance of mentally ill*, British Journal of Psychiatry, 162, 1993, s. 93-99.
23. Wahl O.F., *Mental health consumers' experience of stigma*, Schizophrenia Bulletin, 25, 1999, s. 467-478.
24. Rossetto A., Potts L.C., Reavley N.J., Henderson C., *Perceptions of positive treatment and discrimination toward people with mental health problems: findings from the 2017 and 2019 Attitudes to Mental Illness Surveys*, Stigma and Health. Advance online publication, 2020.
25. Thornicroft G., Rose D., Kassam A., Sartorius, N., *Stigma: Ignorance, prejudice or discrimination?*, British Journal of Psychiatry, 190, 2007, s. 192-193.

26. Girma E., Tesfaye M., Froeschl G., Möller-Leimkühler A.M., Müller N., Dehning S., *Public stigma against people with mental illness in the Gilgel Gibe Field Research Center (GGFRC) in Southwest Ethiopia*, PloS One, 8(12), 2013, e82116.
27. Link B.G., Yang L.H., Phelan J.C., Collins P.Y., *Measuring mental disorder stigma*, Schizophr Bull, 30, 2004, s. 511-541.
28. Adewuya A.O., Oguntade A.A., *Doctors' attitude towards people with mental illness in Western Nigeria*, Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology, 42(11), 2007, s. 931-936.
29. Harangozo J., Reneses B., Brohan E., Sebes J., Csukly G., López-Ibor J.J., Sartorius N., Rose D., Thornicroft G., *Stigma and discrimination against people with schizophrenia related to medical services*, International Journal of Social Psychiatry, 60(4), 2014, s. 359-366.
30. Schulze B., *Stigma and mental health professionals: a review of the evidence on an intricate relationship*, International Review of Psychiatry, 19(2), 2007, s. 137-155.
31. Tawiah P.E., Adongo P.B., Aikins M., *Mental health-related stigma and discrimination in Ghana: experience of patients and their caregivers*, Ghana Medical Journal, 49(1), 2015, s. 30-39.
32. Gehart D.R., *The mental health recovery movement and family therapy, part I: consumer-led reform of services to persons diagnosed with severe mental illness*, Journal of Marital and Family Therapy, 38(3), 2012, s. 429-442.
33. Larson J.E., Corrigan P., *The stigma of families with mental illness*, Academic Psychiatry, 32(2), 2008, s. 87-91.
34. Ohaeri J.U., Fido A.A., *The opinion of caregivers on aspects of schizophrenia and major affective disorders in a Nigerian setting*, Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology, 36(10), 2001, s. 493-499.
35. Shibre T., Negash A., Kullgren G., Kebede D., Alem A., Fekadu A., Fekadu D., Medhin G., Jacobsson L., *Perception of stigma among family members of individuals with schizophrenia and major affective disorders in rural Ethiopia*, Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology, 36(6), 2001, s. 299-303.
36. Broadbent E., Petrie K.J., Main J., Weinman J., *The brief illness perception questionnaire*, Journal of Psychosomatic Research, 60(6), 2006, s. 631-637.
37. Frosthalm L., Fink P., Christensen K.S., Toft T., Oernboel E., Olesen F., Weinman J., *The patients' illness perceptions and the use of primary health care*, Psychosomatic Medicine, 67(6), 2005, s. 997-1005.
38. Maurin J.T., Boyd C.B., *Burden of mental illness on the family: A critical review*. Archives of Psychiatric Nursing, 4(2), 1990, s. 99-107.
39. Muralidharan A., Lucksted A., Medoff D., Fang, L.J., Dixon L., *Stigma: a unique source of distress for family members of individuals with mental illness*, The Journal of Behavioral Health Services & Research, 43(3), 2016, s. 484-493.
40. Hasson-Ohayon I., Goldzweig G., Lavi-Rotenberg A., Roe D., Pijnenborge G.H.M., *Illness representations among parents of children and adults with serious mental disorders: A systematic review and theoretical model*, European Psychiatry, 58, 2019, s. 27-37.
41. Ferriter M. i Huband N., *Experiences of parents with a son or daughter suffering from schizophrenia*, Journal of Psychiatric and Mental Health Nursing, 10(5), 2003, s. 552-560.
42. Chang C.C., Yen C.F., Jang F.L., Su J.A., Lin C.Y. *Comparing affiliate stigma between family caregivers of people with different severe mental illness in Taiwan*, The Journal of Nervous and Mental Disease, 205(7), 2017, s. 542-549.
43. Moses T., *Adolescent mental health consumers' self-stigma: associations with parents' and adolescents' illness perceptions and parental stigma*, Journal of Community Psychology, 38(6), 2010, s. 781-798.

44. Hasson-Ohayon I., Tuval-Mashiach R., Morag-Yaffe M., Gaziel M., Schapir L., Zalsman G., Shoval G., *Parents of adolescents with psychiatric disorders: insight into the disorder, self-stigma and parental stress*, *Comprehensive Psychiatry*, 55(5), 2014, s. 1106-1110.
45. Corrigan P.W., Druss B.G., Perlick, D.A., *The impact of mental illness stigma on seeking and participating in mental health care*, *Psychological Science in the Public Interest*, 15(2), 2014, s. 37-70.
46. Segal D.L., Coolidge F.L., Mincic M.S., O'riley A., *Beliefs about mental illness and willingness to seek help: A cross-sectional study*, *Aging & Mental Health*, 9(4), 2005, s. 363-367.
47. ten Have M., de Graaf R., Ormel J., Vilagut G., Kovess V., Alonso J., SEMeD/MHEDEA 2000 Investigators, *Are attitudes towards mental health help-seeking associated with service use? Results from the European Study of Epidemiology of Mental Disorders*, *Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology*, 45(2), 2010, s. 153-163.
48. Barney L.J., Griffiths K.M., Jorm A.F., Christensen H., *Stigma about depression and its impact on help-seeking intentions*, *Australian & New Zealand Journal of Psychiatry*, 40(1), 2006, s. 51-54.
49. Hoyt D.R., Conger R.D., Valde J.G., Weihs K., *Psychological distress and help seeking in rural America*, *American Journal of Community Psychology*, 25(4), 1997, s. 449-470.
50. McNair B.G., Highet N.J., Hickie I.B., *Exploring the perspectives of people whose lives have been affected by depression*, *Medical Journal of Australia*, 176(10), 2002, s. 69-76.
51. Corrigan P., *How stigma interferes with mental health care*. *American Psychologist*, 59(7), 2004, s. 614-625.
52. Komiti A., Judd F., Jackson H., *The influence of stigma and attitudes on seeking help from a GP for mental health problems*, *Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology*, 41(9), 2006, s. 738-745.
53. Hatchett G.T., *Additional validation of the attitudes toward seeking professional psychological help scale*, *Psychological Reports*, 98(1), 2006, s. 279-284.
54. Masuda A., Anderson P.L., Edmonds J., *Help-seeking attitudes, mental health stigma, and self-concealment among African American college students*, *Journal of Black Studies*, 43(7), 2012, s. 773-786.
55. Wang J., Patten S.B., *Perceived effectiveness of mental health care provided by primary-care physicians and mental health specialists*, *Psychosomatics*, 48(2), 2007, s. 123-127.
56. Mackenzie C.S., Gekoski W.L., Knox V.J., *Age, gender, and the underutilization of mental health services: The influence of help-seeking attitudes*, *Aging and Mental Health*, 10(6), 2006, s. 574-582.
57. Grausgruber A., Meise U., Katschnig H., Schony W., Fleischhacker W.W., *Patterns of social distance towards people suffering from schizophrenia in Austria: A comparison between the general public, relatives, and mental health staff*, *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 115(4), 2007, s. 310-319.
58. Nordt C., Rössler W., Lauber C., *Attitudes of mental health professionals toward people with schizophrenia and major depression*, *Schizophrenia bulletin*, 32(4), 2006, s. 709-714.
59. Shulman N. i Adams B., *A comparison of Russian and British attitudes towards mental health problems in the community*, *International Journal of Social Psychiatry*, 48(4), 2002, s. 266-278.
60. Bathje G.J., Pryor J.B., *The relationship of public and selfstigma to seeking mental health services*, *Journal of Mental Health Counseling*, 33(2), 2011, s. 161-176.
61. Rüsche N., Evans-Lacko S.E., Henderson C., Flach C., Thornicroft G., *Knowledge and attitudes as predictors of intentions to seek help for and disclose a mental illness*, *Psychiatric Services*, 62(6), 2011, s. 675-678.
62. American Psychiatric Association, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5®)*, American Psychiatric Pub, 2013.

63. Abolfotouh M.A., Almutairi A.F., Almutairi Z., Salam M., Alhashem A., Adlan A.A., Modayfer O., *Attitudes toward mental illness, mentally ill persons, and help-seeking among the Saudi public and sociodemographic correlates*, *Psychology Research and Behavior Management*, 12, 2019, s. 45-54.
64. Sadik S., Bradley M., Al-Hasoon S., Jenkins R., *Public perception of mental health in Iraq*, *International Journal of Mental Health Systems*, 4(26), 2010, s. 1-11.
65. Angermeyer M.C., Matschinger H., *Lay beliefs about mental disorders: a comparison between the western and the eastern parts of Germany*, *Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology*, 34(5), 1999, s. 275-281.
66. Gaebel W., Baumann A., Witte A.M., Zaeske H., *Public attitudes towards people with mental illness in six German cities*, *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 252(6), 2002, s. 278-287.
67. Li J., Zhang M.M., Zhao L., Li W.Q., Mu J.L., Zhang Z.H., *Evaluation of attitudes and knowledge toward mental disorders in a sample of the Chinese population using a web-based approach*, *BMC Psychiatry*, 18(1), 2018, s. 1-8.
68. Hu H. Y., Yan Y.Z, Chen L. M., Pu W.J., Liao W., Li J., *Knowledge about mental health and attitude to mental disorder in urban and rural residents in Guangzhou*, *Chinese Mental Health Journal*, 26(1), 2012, s. 30-35.
69. Yao M.J., Yan X.F., Chang Z.J., Liu J., Yan L., Gao Q., Lv Q.J., *Awareness rate of mental health knowledge in residents in Zheng Zhou City*. *Chinese Mental Health Journal*, 27(9), 2013, s. 682-685.
70. Yu Y., Liu Z.W., Hu M., Liu X.G., Liu H.M., Yang J.P., Zhou L., Xiao S.Y., *Assessment of mental health literacy using a multifaceted measure among a Chinese rural population*. *BMJ Open*, 5(10), 2015, e009054.
71. Akighir A., *Traditional and modern psychiatry: a survey of opinions and beliefs amongst people in plateau state, Nigeria*, *International Journal of Social Psychiatry*, 28(3), 1982, s. 203-209.
72. Gureje O., Lasebikan V.O., Ephraim-Oluwanuga O., Olley B.O., Kola L., *Community study of knowledge of and attitude to mental illness in Nigeria*, *The British Journal of Psychiatry*, 186(5), 2005, s. 436-441.
73. Kabir M., Iliyasu Z., Abubakar I.S., Aliyu M.H., *Perception and beliefs about mental illness among adults in Karfi village, northern Nigeria*, *BMC International Health and Human Rights*, 4(1), 2004, s. 3.
74. Adelekan M.L., Makanjuola A.B., Ndo, R. J.E., *Traditional mental health practitioners in Kwara State, Nigeria*, *East African Medical Journal*, 78(4), 2001, s. 190-196.
75. Ayonrinde O., Gureje O. i Lawal R., *Psychiatric research in Nigeria: bridging tradition and modernisation*, *The British Journal of Psychiatry*, 184(6), 2004, s. 536-538.
76. Adewuya A.O., Makanjuola R.O., *Lay beliefs regarding causes of mental illness in Nigeria: pattern and correlates*, *Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology*, 43(4), 2008, s. 336-341.
77. Opare-Henaku A., Utsey S.O., *Culturally prescribed beliefs about mental illness among the Akan of Ghana*, *Transcultural Psychiatry*, 54(4), 2017, s. 502-522.
78. Kermode M., Bowen K., Arole S., Pathare S., Jorm A.F., *Attitudes to people with mental disorders: a mental health literacy survey in a rural area of Maharashtra, India*, *Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology*, 44(12), 2009, s. 1087-1096.
79. Weisman H.L., Kia-Keating M., Lippincott A., Taylor Z., Zheng J., *Mental Health Stigma Prevention: Pilot Testing a Novel, Language Arts Curriculum-Based Approach for Youth*, *Journal of School Health*, 86(10), 2016, s. 709-716.

Postawy społeczne wobec osób zmagających się z zaburzeniami psychicznymi i ich leczenia

Streszczenie

Celem artykułu jest przybliżenie problematyki postrzegania zaburzeń psychicznych i jego wpływu na zdrowie psychiczne osób chorych. Przybliżono pokrótce zarys historycznego interpretowania i postrzegania zaburzeń psychicznych od starożytności aż po czasy obecne. Następnie przedstawiono sytuację aktualną, rozpoczynając od analizy postaw dyskryminujących i stygmatyzujących osoby z zaburzeniami psychicznymi oraz tego, jaki może mieć to wpływ na ich codzienne funkcjonowanie i podejmowane przez nie próby szukania pomocy. Szczególną uwagę zwrócono na kwestię postrzegania zaburzeń psychicznych w rodzinie osób chorych. Przeanalizowano także relację między postrzeganiem zaburzeń psychicznych przez społeczeństwo a poszukiwaniem profesjonalnej pomocy psychologicznej lub psychiatrycznej. Dokonano również przeglądu prac dotyczących postrzegania zaburzeń poza europejskim kręgiem kulturowym, szczególną uwagę oddając Bliski Wschód, Chiny, Afrykę Subsaharyjską i Indie.

Słowa kluczowe: zaburzenia psychiczne, pomoc psychologiczna, dyskryminacja, postawa

Mental disorders – attitudes towards people with mental illness and their treatment

Abstract

The main purpose of this article was to present the problematic aspects of perception of mental illnesses and its influence on people struggling with mental disorders. The article presents a historic overview of perception and interpretation of mental illnesses from antique to present times. The analysis of present times focuses on discriminatory attitudes, stigmatization of people with mental illness and effects that those factors can have on the mental health as well as professional help seeking processes. The analysis has then been extended to non-European regions such as Middle East, India, China and Sub-Saharan Africa. In addition to this, the article explores attitudes towards mental illnesses and mental illness perception among families of patients with mental disorders.

Keywords: mental disorders, psychological help, discrimination, attitude

Opieka nad pacjentem z zaburzeniami odżywiania w placówce niewyspecjalizowanej

1. Wprowadzenie

Opieka nad pacjentem z zaburzeniami odżywiania na oddziałach ogólnych szpitala psychiatrycznego bywa bardzo trudna ze względu na specyfikę tych chorób. Pielęgniarki, przebywając z pacjentem przez całą dobę, mogą wspomóc swoimi działaniami wyeliminowanie uzależnień behawioralnych, prowadząc terapię na różnych poziomach opieki.

2. Historia zaburzeń odżywiania

Odżywianie jest podstawową potrzebą człowieka. Wraz z zachodzącymi zmianami psychicznymi i emocjonalnymi mogą pojawić się zaburzenia odżywiania, które zaburzają dotychczasowy sposób i potrzebę spożywania posiłków. Spotykamy się z tym nie od dziś, ponieważ już w starożytności opisywane były przypadki głodzenia się na tle religijnym, która miała na celu doznanie duchowej uciechy.

Jednak za pierwszy kliniczny opis zaburzenia odżywiania, konkretniej jadłowstrętu psychicznego, jest ten z roku 1689 autorstwa Richarda Mortona, a jakiś czas później przestano uważać objawy bulimii w przebiegu anoreksji i wyodrębniono kolejną jednostkę chorobową zwaną żarłocznością psychiczną.

3. Przyczyny powstawania zaburzeń odżywiania u ludzi

3.1. Żarłoczność psychiczna

Bulimia charakteryzuje się spożywaniem dużej ilości pokarmów. Chory po zjedzeniu odczuwa strach przed przytęciem, ma wyrzuty sumienia po przyjęciu tylu kalorii. Aby pozbyć się tego uczucia zaczynają zwracać lub przyjmować środki przeczyszczające. Choroba ta często zaczyna się na podstawie kompleksów związanych z wagą. Anomalia w psychice polega na tym, że osoby chore są pewne, że to najlepszy sposób na pozbycie się dodatkowych kilogramów, nie zdając sobie sprawy, jakie skutki za sobą niesie.

Do powikłań bulimii można zaliczyć:

- **zaburzenia pracy serca** ze względu na brak równowagi elektrolitowej;
- **obrzęk kończyn dolnych**, gdy w organizmie gromadzi się za dużo wody, ponieważ ustrój przyzwyczajony do wymiotów nie potrafi poradzić sobie z nadmiarem płynów;
- **choroby zębów i jamy ustnej**, ze względu na ekspozycje na kwas żołądkowy;
- **zaburzenia układu pokarmowego**, ponieważ częste wymioty mogą spowodować pęknięcie przełyku i żołądka, refluks, który może powodować schorzenie zwane „przełykiem Barretta”, który może przekształcić się w raka przełyku;
- **uszkodzenie jelita grubego** poprzez częste stosowanie środków przeczyszczających.

¹ aleks.kucharska@o2.pl, Uniwersytet Technologiczno-Humanistyczny im. K. Pułaskiego w Radomiu, Wydział Nauk Medycznych i Nauk o Zdrowiu.

3.2. Jadłowstręt psychiczny

Polega on na celowej utracie wagi wywołanej i podtrzymanej przez osobę chorą. Zaburzony jest obraz własnego ciała i występuje lęk przed nabraniem wagi. Wyróżnia się typ restrykcyjny i typ bulimiczny. Anorektycy, zarówno jak bulimicy charakteryzują się precyzyjną znajomością kaloryczności większości produktów spożywczych. Prócz głodzenia się, często osoby chore wykonują wyczerpujące ćwiczenia fizyczne.

Do powikłań jadłowstrętu psychicznego można zaliczyć:

- **zmiany hormonalne** wynikające z zaburzenia osi podwzgórzowo przysadkowej, które prowadzą do zaniku miesiączki u kobiet oraz problemu z płodnością;
- **osteoporoza** wynikająca ze zmian hormonalnych;
- **bradykardia i niedociśnienie ortostatyczne** są najczęściej spotykaną przyczyną zgonów ze strony układu krążenia;
- **zaburzenia hematologiczne** i zaburzenia układu krzepnięcia;
- **zaburzenia motoryki przewodu pokarmowego**, w tym żołądka (gastropareza);
- **nadżerki, pęknięcia przełyku** lub żołądka, próchnica w typie bulimicznym.

4. Opieka pielęgniarska nad pacjentem z zaburzeniami odżywiania

Celem działań pielęgniarki wynikającej z funkcji rehabilitacyjnej jest prowadzenie psychoterapii elementarnej. Chcemy, aby pacjent czuł się na tyle silny, by mógł walczyć z chorobą. Jako że, pełnimy nad takim pacjentem całodobową pieczę możemy starać się przez okres leczenia wyeliminować zaburzenia behawioralne, które są podłożem choroby oraz nauczyć pacjenta jak sobie z nimi radzić. Jest to bardzo ciężkie w placówkach niespecjalizujących się w tego typu zaburzeniach, ale nie jest wykluczone.

Uwagę w trakcie planowania opieki pielęgniarskiej jest rodzaj diety, jaką należy zastosować u osób z zaburzeniami odżywiania. Dieta ta powinna być lekkostrawna, ze względu na stan układu trawiennego pacjenta, skurczony żołądek lub zbyt powiększony żołądek, poparzone od kwasu żołądkowego jama ustna i przełyk. U bulimików dieta lekkostrawna zmniejsza ryzyko objadania się ze względu na mniejsze porcje. Warto zaangażować także rodzinę pacjenta i poprosić o nieprzynoszenie dużych ilości jedzenia, co może stać się przyczyną utraty kontroli nad tym, kiedy i ile jedzą pacjenci, co zaburza nasz proces terapeutyczny.

Ważna jest obserwacja pacjenta podczas jedzenia oraz przez następne 2 godziny po spożyciu posiłku. Musimy obserwować podczas wizyt w toalecie w tym okresie bulimików i anorektyków w typie bulimicznym. Zachowując oczywiście prawo do prywatności pacjenta powinniśmy im towarzyszyć podczas wizyt w toalecie jeśli takowej potrzebują.

Osoby chore muszą nauczyć się kultury jedzenia. Ich niezdrowe podejście do posiłków uniemożliwia nam dalszą terapię. Podstawą nauki poprawnego spożywania posiłków jest: branie małych kęsów, umiarkowanie szybkie tempo jedzenia, nieodwracanie uwagi od talerza oraz umiejętność wycucia momentu, w którym jest się najedzonym. Ostatnie z wymienionych jest bardzo ciężkie zarówno dla bulimików jak i anorektyków. Pierwsza grupa pacjentów nie umie wyczuć tego stanu, natomiast druga odczuwa go zbyt szybko. Naszym zadaniem jest ocenienie tego stanu oraz nauka wykrywania sytości przez pacjenta.

Kolejnym naszym celem opieki wobec osób z zaburzeniami odżywiania powinno być odwrócenie ich uwagi od myśli związanych z jedzeniem i kompleksów związanych z wagą. Może to być zalecana terapia zajęciowa lub zwykła rozmowa. Próbowujemy wtedy wyeliminować złe spojrzenie na świat i na samego siebie.

Mimo tak licznych braków wyspecjalizowanych placówek w naszym kraju pielęgniarki mogą w większym stopniu angażować się w proces terapeutyczny. Leczenie farmakologiczne w takich przypadkach nie jest podstawą – większe efekty przynosi terapia prowadzona na każdym etapie pobytu w szpitalu. Wyciągając wnioski – opieka pielęgniarska nie powinna ograniczać się do zadań czysto zawodowych, ale ważne jest dobre podejście psychologiczne.

5. Zaburzenia odżywiania – sygnały ostrzegawcze

Zaburzenia odżywiania rozwijają się powoli. Wykrycie problemu zawczasu będzie miało pozytywne skutki w terapii. Oto pięć sygnałów, które mogą świadczyć o początkach zaburzeń odżywiania.

- 1) Interesowanie się coraz bardziej różnego rodzaju dietami, które nie są do końca sprawdzone.
- 2) Regularne oglądanie materiałów dotyczących odchudzania, sprawdzanie kaloryczności potraw.
- 3) Nagła zmiana diety – na przykład na weganizm bez żadnych podstaw ideologicznych.
- 4) Chodzenie do toalety bezpośrednio po posiłku.
- 5) Opuszczanie rodzinnych posiłków lub wyjść ze znajomymi gdzie należałoby jeść w towarzystwie.

Jako że ZO mogą rozwijać się również u dzieci, rodzice powinni przykładać dużo zainteresowania dietą swoich pociech. Literatura opisuje przypadki pięcioletnich dzieci, które wykazywały objawy zaburzeń odżywiania. Często wiązało się to z brakiem akceptacji zarówno ze strony rodziców, jak i rówieśników. W tak młodym wieku, gdy organizm potrzebuje substancji odżywczych, choroby te są zdecydowanie bardziej niebezpieczne. Może to doprowadzić do wielu powikłań, a nawet do śmierci.

6. Przypadki kliniczne

Podane przypadki zostały opisane na podstawie mojego wywiadu z pacjentami szpitala psychiatrycznego podczas badań i wywiadów prowadzonych w domu oraz obserwacji przez dwa miesiące zachowania pacjentów na oddziałach szpitala psychiatrycznego.

6.1. Przypadek kliniczny nr 1

Mężczyzna, 25 lat

Do placówki zgłosił się po namowie siostry, przyjęty na oddział ogólny w stanie odwodnienia i wycieńczenia. Choruje na bulimię od 12 lat. Chorobę wywołało prześladowanie ze strony rówieśników. Przyznał się do uzależnienia od alkoholu oraz leczenia na depresję. Ze względu na objawy depresyjne został przyjęty na oddział zamknięty oddziału ogólnego. Po 3 dniach przeniesiony na oddział otwarty. Kontynuowano leczenie psychiatryczne. Na oddziale pacjent stabilny, nie przyznaje się do

objawów bulimicznych. Wypisany do domu po 9 tygodniach po wykryciu środków psychoaktywnych w moczu. Nie przyznaje się do spożywania PA.

Na oddziale nie podjęto próby leczenia ani terapii zaburzenia odżywiania. Nie wyznaczono diety. Podjęto leczenie tylko zaburzeń depresyjno-lękowych (F 41.2). Po uzyskaniu stabilizacji humoru oraz gdy pacjent nie wypowiadał myśli samobójczych, został wypisany do domu, gdzie problem bulimii nie został w żaden sposób rozwiązany.

6.2. Przypadek kliniczny nr 2

Kobieta, 31 lat

Przyjęta na oddział z SOR po omdleniu. Przewieziona do zakładu psychiatrycznego za zgodą. Choruje na anoreksję typu restrykcyjnego od 15 lat. Nie przejawia typu bulimicznego. Po przyjęciu na oddział zamknięty oddziału ogólnego podane zostały wlewy kroplowe z pięcioprocentową glukozą i płynem wieloelektrolitowym. Na drugi dzień przeniesiona na oddział otwarty. Pacjentka spokojna, w dobrym kontakcie logicznym. Po osiągnięciu wzrostu wagi o 5 kg wypisana do domu po 6 tygodniach.

Próbowano podjąć leczenie zaburzenia odżywiania, kontrolowano wagę oraz spożywanie posiłków, jednak przy jej wadze (38 kg) wzrost wagi do 43 kg nie powinien być postawą do wypisu ze szpitala, ponieważ nadal BMI < 16, a stan psychiczny nie był na tyle stabilny, aby pacjentka potrafiła kontynuować normalną dietę po wypisie do domu.

6.3. Przypadek kliniczny nr 3

Mężczyzna, 18 lat

Do placówki został przywieziony przez rodziców po próbie samobójczej. Okaleczone lewe przedramię. Przyznaje się do zaburzeń depresyjnych, fobii społecznej oraz bulimii trwającej pół roku. Chorobę spowodował brak akceptacji wśród rówieśników, problem z nadwagą oraz chorujący również na bulimię brat, z którego brał przykład w radzeniu sobie z problemami. Po 5 dniach na oddziale zamkniętym został przeniesiony na oddział otwarty, gdzie miał problem z nawiązywaniem kontaktów zarówno z pacjentami, jak i z zespołem terapeutycznym. Wdrożone zostało leczenie psychiatryczne oraz terapia zajęciowa. Na oddziale przejawiał objawy bulimiczne. Wypisany po 12 tygodniach ze skierowaniem do Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie.

Na oddziale nie podjęto próby leczenia zaburzeń odżywiania, nie wyznaczono diety. Leczenie odbywało się tylko na płaszczyźnie zaburzeń depresyjnych. Jediną próbą podjęcia działania, jest wypisanie skierowania do Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie na oddział nerwic i zaburzeń odżywiania, co jednak wiąże się długim czasem oczekiwania (około roku).

7. Sytuacja pacjentów z zaburzeniami odżywiania w Polsce

Bagatelizacja zaburzeń odżywiania szczególnie w placówkach niewyspecjalizowanych w Polsce jest bardzo często spotykana. Mimo rozpowszechniania informacji na ten temat, nadal wiele osób, w tym personelu medycznego, nie posiada podstawowej wiedzy. W zakładach opieki psychiatrycznej w Polsce rzadko spotykamy placówki specjalistyczne, co jest niezrozumiałe wobec tego jak na dużą skalę występuje ten problem.

Ilość państwowych placówek zajmujących się tego rodzaju problemami jest mocno ograniczona, przez co bardzo ciężko się tam dostać. Pacjenci na przyjęcie na taki oddział czekają nawet rok! Zapewne problem ten nie jest na tyle nagłaśniany jak inne choroby, np. nadciśnienie, cukrzyca itp., ponieważ nie odnotowuje się zaburzeń odżywiania jako bezpośredniej przyczyny zgonu. Jednak mają one wiele groźnych powikłań, które prowadzą do śmierci pacjenta.

8. Inne formy zaburzeń odżywiania

Odnotowujemy również inne rodzaje zaburzeń odżywiania takich jak zespół jedzenia nocnego, zespół gwałtownego objadania się, ortoreksja oraz bigoreksja.

Ortoreksja wiąże się z obsesją na punkcie zdrowego odżywiania, jej skutkiem może być ograniczenie diety jedynie do paru produktów, które według chorego są zdrowe i z najlepszego źródła. Może występować brak uczucia głodu i ciężkie ćwiczenia fizyczne. Ortoreksja może prowadzić do anoreksji lub wywołać podobne skutki jak ona.

Bigoreksja to choroba, która dotyka prawie każdego z nas. Kult ciała, kolorowe billboardy, modelki na okładkach gazet, wpędzają nas w coraz większe kompleksy. Dlatego staramy się być idealni, mieć wyrzeźbiony każdy możliwy mięsień. Bigoreksja polega na ciągłym poczuciu niezadowolenia z osiągniętych efektów. Odczuwa się wtedy potrzebę ciągłego zwiększania masy mięśniowej. Zakładam, że co druga osoba ze stałych bywalców siłowni cierpi na to schorzenie, tylko nie zdają sobie z tego sprawy. Gdzie jest granica budowania masy mięśniowej? Niestety nikt jeszcze jej nie postawił, przez co kulturyści nie są uważani za osoby chore.

9. Otyłość jako rodzaj zaburzeń odżywiania

Otyłość może wywodzić się z różnych przyczyn. Najczęściej są to towarzyszące choroby takie jak cukrzyca, ale także przyjmowanie niektórych leków, zaburzenia pracy podwzgórza albo zaburzenia działania gruczołów wydzielania wewnętrznego. Jednakże nadmierna masa ciała może wywodzić się ze złych nawyków żywieniowych, które uwarunkowane są w psychice. Najczęściej te złe nawyki zakorzeniają opiekunowie, którzy od najmłodszych lat, umyślnie lub nie, uczą nas podejścia do odżywiania się. Często dzieci osób otyłych również mają skłonność do nabierania nadmiernej masy ciała i niekoniecznie musi to być uwarunkowane genetycznie. Jeśli uczy się dzieci od najmłodszych lat podjadania między posiłkami, spożywania nieograniczonych porcji jedzenia i dieta ta nie ma zbyt dużo wartości odżywczych jest pewne, że dzieci również nie będą wiedziały jak jeść „prawidłowo”. Dzieci biorąc przykład z opiekunów nie widzą innej możliwości w sposobie odżywiania, niekiedy traktują jedzenie jak nagrodę bądź jego brak jako karę. Rzutuje to na ich dorosłe życie w taki sposób, że będąc dorośli nie będą musieli ograniczać posiłków.

10. Czy da się pokonać zaburzenia odżywiania?

W dzisiejszych czasach jest dużo możliwości, aby pomóc samym sobie. Konsultacje psychiatryczne, psychologiczne, możliwość terapii to jedne z podstawowych form pomocy. Jednak najważniejsze to uświadomienie sobie, że mamy problem. Póki nie widzimy problemu, powyższe formy pomocy mogą być bezcelowe. Najważniejsze jest, aby zrozumieć, że zachowanie wobec jedzenia może być patologiczne i może stanowić problem. Podejście do posiłków powinno być neutralne, nie powinny one wywoływać

strachu, lęku albo nadmiernej ekscytacji i podniecenia. Dieta powinna być rozbudowana, nieograniczająca się do jednego rodzaju, ponieważ im bardziej zwięźmy zakres spożywanych pokarmów tym więcej strachu odczuwamy w związku z jedzeniem. Z własnego doświadczenia odpowiem na pytanie postawione w tytule podrozdziału – da się pokonać każde zaburzenie odżywiania, tylko potrzebna jest do tego specjalistyczna pomoc i nasza determinacja. Domyślam się, że nie jest to bardzo odkrywczą tezę, ale innych sposobów nie potrafię podać. Problem ten jest głęboko zakorzeniony w nas, przez co tylko my potrafimy go pokonać. Nikt inny tego za nas nie zrobi.

11. Depresja jako początek i skutek zaburzeń odżywiania

Stany depresyjne charakteryzują się brakiem apetytu. Spowodowane jest to niechęcią do wykonywania codziennych czynności. Bardzo często niechęć do jedzenia przekształca się w strach. Głodzenie się czasami jest formą karaniam samego siebie, ale też jest sposobem na zwrócenie na siebie uwagi otoczenia.

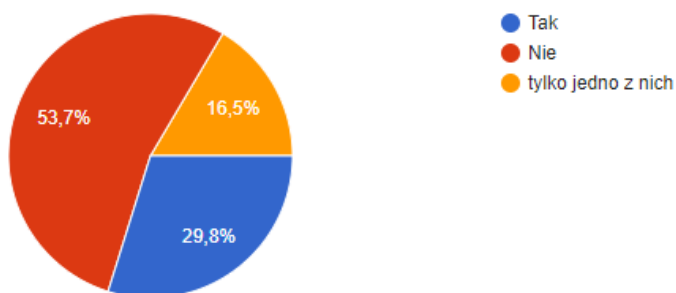
12. Wiedza społeczeństwa na temat zaburzeń odżywiania

Badania zostały wykonane przeze mnie wśród 285 osób w wieku na ogół 15-30 lat, które miały odpowiedzieć na podstawowe pytania związane z zaburzeniami odżywiania, aby ocenić wiedzę społeczeństwa na ten temat. W ramach badań została przeprowadzona ankieta, która zatytułowana była „Podstawowa wiedza na temat zaburzeń odżywiania wśród społeczeństwa”.

- Ponad 99,0% ankietowanych znało termin bulimii i/lub anoreksji. Niestety ponad 50% nie słyszało o innych formach zaburzenia odżywiania. Wnioskuje, że zakres edukacji na ten temat powinien być znacznie szerszy i bardziej nagłaśniany.

Czy słyszałeś/aś o pojęciu ortoreksji i/lub bigoreksji?

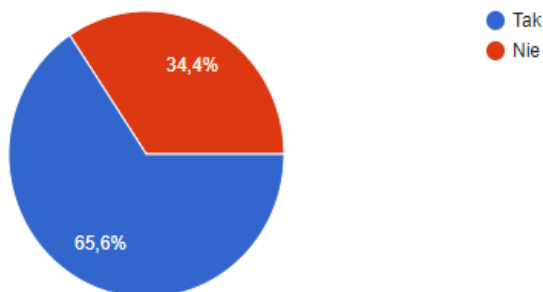
285 odpowiedzi



- Niestety aż 65,6% ankietowanych miała kontakt z osobami z zaburzeniami odżywiania, wnioskuje, że ten problem jest wszechobecny i każdy dotknął się z nim pośrednio.

Czy miałeś kiedyś styczność z osobą z zaburzeniami odżywiania?

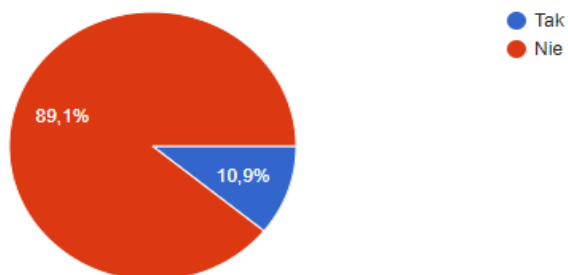
285 odpowiedzi



- Również prawie 90% badanych uważa, że polska służba zdrowia nie jest w stanie na chwilę obecną udzielić w tym zakresie pomocy. Myślę, że są także osoby, które chciałyby zwrócić się o pomoc, a niestety nie wiedzą, gdzie i do kogo mogą się zgłosić. Daje nam to do zrozumienia, że wiele ludzi zostaje bez podstawowej pomocy psychologicznej, jak i psychiatrycznej, która powinna być łatwiej dostępna.

Myślisz, że polska służba zdrowia jest wystarczająco wyszkolona w terapii zaburzeń odżywiania?

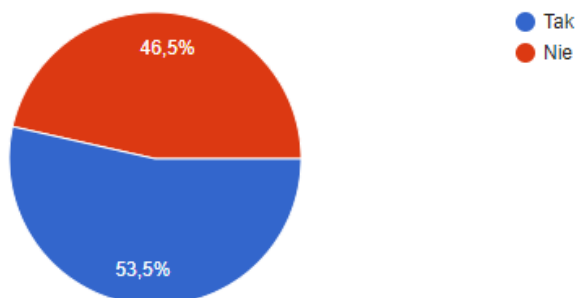
285 odpowiedzi



- Ponad 40% ankietowanych nie spotkało się z terminem „prewencji” zaburzeń odżywiania, co powinno być przedmiotem zajęć w szkołach/uczelniah.

Czy spotkałeś/aś się z terminem „prewencja zaburzeń odżywiania”?

284 odpowiedzi



13. Podsumowanie

Chcę kontynuować oraz rozszerzyć w przyszłości treść mojej pracy. Moim założeniem jest przeprowadzenie większej ilości wywiadów z chorymi oraz wizyta w ośrodkach zajmujących się zaburzeniami odżywiania. Pragnę również poszerzać wiedzę na ten temat wśród osób środowiska medycznego.

Zgromadzona przeze mnie wiedza powinna być użytkowana podczas terapii osób z ZO. Osobiście chciałabym zainwestować mój czas i wiedzę w pomocy osobom, które przez polską służbę zdrowia są ignorowane. Jako pielęgniarka będę na pierwszej linii kontaktu personel medyczny-pacjent. I to właśnie ja mogę zapewniać pacjentowi całodobową opiekę, jak i terapię. Z funkcji pielęgniarki wynika, że powinnam wykonywać zabiegi pomagające wyeliminować niewłaściwe zachowania behawioralne.

Literatura

1. Ogden J., *Psychologia odżywiania się*, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, 2011 r.
2. Christopher G. Fairburn, *Terapia poznawczo-behawioralna i zaburzenia odżywiania*, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, 2013 r.
3. Funez-Sokoła K., *Zaburzenia odżywiania u współczesnych nastolatków*, Psychologia w praktyce, NR 10 (Lipiec 2018).
4. Brytek-Matera A., *Obraz ciała-obraz siebie. Wizerunek własnego ciała w ujęciu psychospołecznym*, Wyd. Centrum Doradztwa i Informacji Difin, Warszawa 2008.
5. Romanowska D., *Atak ortoreksji*, Wprost nr 12, 2001.
6. Januchowska M., *Za chudzi za brzydcy-Bigoreksja*, Październik 2010.
7. Michalska A., Szejko N., Jakubczyk A., Wojnar M., *Niespecyficzne zaburzenia odżywiania się-subiektywny przegląd*, psychiatriapolska.pl.

Opieka nad pacjentem z zaburzeniami odżywiania w placówce niewyspecjalizowanej

Streszczenie

Treść artykułu obejmuje wiedzę na temat zaburzeń odżywiania: jadłowstrętu oraz żarłoczości psychicznej pozyskanej nie tylko z literatury, lecz również na podstawie badań własnych autora. Zawarte są również statystyki na temat wiedzy o tych jednostkach chorobowych przeprowadzone wśród ludzi z różnych środowisk, które dają obraz na to, jaka w dzisiejszych czasach panuje wiedza oraz przekonanie o chorobach psychicznych związanych z odżywianiem.

Moja praca oparta jest przede wszystkim na klinicznej obserwacji osób z jadłowstrętem lub żarłoczością psychiczną, śledzeniem postępowania z takimi osobami na oddziałach ogólnych szpitala psychiatrycznego oraz na prywatnych doświadczeniach związanych z tymi jednostkami chorobowymi. Zawiera one praktyczne wskazówki do opieki nad takimi osobami zarówno w warunkach szpitalnych, jak i domowych.

Celem pracy jest pomoc w zrozumieniu zaburzeń odżywiania, co może skutkować lepszą opieką nad chorymi, jak i również zwrócenie uwagi na to, jak poważnym schorzeniem są anoreksja i bulimia i inne zaburzenia odżywiania. Pragnę również rzucić światło na problem, jakim jest niewielka ilość placówek wyspecjalizowanych w opiece nad pacjentami z tego typu zaburzeniami.

Słowa kluczowe: bulimia, anoreksja, ortoreksja, bigoreksja, szpitale psychiatryczne

Care for a patient with eating disorders in a non-specialized institution

Abstract

This article include knowledge about eating disorders: anorexia nervosa and bulimia nervosa obtained not only from literatue but also referring my own experience. I made a statistics: knowledge about eating disorders carried out among people from different environments. They show what knowledge and belief prevails these days about mental disorders related with eating.

My science work is based on clinical observation person they have eating disorders, following procedures in general wards psychiatric hospital and private experience with this disease entity. My article contains tips for caring for patients in hospital and home settings. The purpose of the article is to help you understand eating disorders what may results better patient care. Second purpose is paying attention how serious are anorexia and bulimia and other eating disorders. Third purpose is to show how few specialized institutions in Poland.

Keywords: anorexia, bulimia, ortorexia, bigorexia, psychiatric hospital

E-government w systemie ochrony zdrowia – Internetowe Konto Pacjenta

1. Wstęp

Informatyzacja polskiej służby zdrowia działającej w ramach państwowego systemu zdrowia była długotrwałym procesem, który rozpoczął się już w latach 90. XX wieku. Dzisiaj można stwierdzić, że został on zrealizowany. Ustawa z dnia 28 kwietnia 2011 roku o systemie informacji w ochronie zdrowia określa organizację i zasady działania systemu informacji w ochronie zdrowia, w którym przetwarzane są dane do prowadzenia polityki zdrowotnej. Podmioty tworzące system zdrowotny zobowiązane są prowadzić bazy danych, w których powinny być zawarte informacje na temat udzielonych, udzielanych i planowanych świadczeń, usługodawców i pracowników medycznych oraz usługobiorców. W praktyce dotyczy to przede wszystkim relacji Narodowego Funduszu Zdrowia (NFZ) z usługodawcami; od roku 2015 dokumentacja medyczna ma być prowadzona tylko w formie elektronicznej i w takiej formie przesyłana do NFZ w celu rozliczenia kontraktu i przesłaniu do Rejestru Usług Medycznych (RUM). Od 1 grudnia 2018 roku, jeżeli lekarz podejmie decyzję o wystawieniu pacjentowi zwolnienia lekarskiego, musi dokonać tego przy pomocy e-zwolnienia, a od 8 stycznia 2020 recepta ma być wystawiona w formie elektronicznej. Każdy świadczeniodawca ma obowiązek wysyłać co tydzień do NFZ „listę kolejkową”, czyli dane osób oczekujących na wizytę oraz informacje o wolnym terminie, które potem umieszczone są w Informatorze o Terminach Leczenia (IoTL). Dodatkowo świadczeniodawca musi zweryfikować każdego pacjenta w dniu wizyty w systemie Elektronicznej Weryfikacji Upnień Świadczeniobiorców (eWUŚ) i na koniec miesiąca wysłać te dane wraz z rozliczeniem miesięcznym. Pacjent może także skorzystać z dedykowanych mu systemów informatycznych w administracji państwowej. Narzędziem cyfrowym, które służy udostępnieniu danych pacjentowi to uruchomiony w lutym 2019 Internetowe Konto Pacjenta (IKP). Niezalogowany użytkownik może wyszukać termin leczenia (IoTL). Zalogowany użytkownik może sprawdzić swój status ubezpieczenia (eWUŚ), zobaczyć swoje zwolnienia lekarskie (eZLA) czy recepty (eRecepta), ma także podgląd do wykonanych procedur medycznych w ramach NFZ (RUM). Interfejs oraz rola tych podsystemów dostosowana jest do użytkownika indywidualnego- pacjenta. Problem badawczy został określony jako: Jak Internetowe Konto Pacjenta usprawnienia realizację zadań polityki zdrowotnej? Celem opracowania jest zbadanie funkcjonowanie i wykorzystanie narzędzia e-government, jakim jest Internetowe Konto Pacjenta w publicznym systemie ochrony zdrowia przez jego aktorów. W celu zbadania relacji pomiędzy podmiotami w systemach IT, wykorzystano diagramy przepływu danych (ang. *Data Flow Diagram*), jest to prezentacja przepływu danych w formie graficznej. Metoda analizy systemowej została wykorzystana w celu analizy publicznego systemu ochrony zdrowia wraz z działającymi w nim IKP. Metoda porównawcza pomogła określić zadania podmiotów w polityce zdrowotnej oraz rolę, jaką spełniają w systemie IKP.

¹ marcinflis@easynerd.pl, Instytut Nauk o Polityce i Bezpieczeństwie, Wydział Nauk Społecznych, Uniwersytet Szczeciński.

2. E-government a ochrona zdrowia

Cyfryzacja (inaczej digitalizacja) to rozpowszechnianie i popularyzowanie techniki cyfrowej i komputerowej oraz wprowadzanie na szeroką skalę infrastruktury elektro-nicznej lub nadawanie postaci cyfrowej danym pisanym i drukowanym. Informatyzacja (lub komputeryzacja) to pojęcie, które także jest stosowane w określaniu tego procesu [1]. Dlatego też polityką cyfryzacji możemy określić taką, która dąży do cyfryzacji danych państwowych oraz udostępniania jej obywatelowi w formie cyfrowej [2]

Poprzez zastosowanie procesu cyfryzacji państwa następuje proces tworzenia się e-government (e-administracji), który definiuje się jako wykorzystanie technologii informacyjno-komunikacyjnej w administracji publicznej. Używa się do tego technologii informacyjnej – IT (ang. *information technology*), która służy zbieraniu, przechowywaniu, przetwarzaniu, przesyłaniu, a także prezentacji informacji za pomocą technologii komputerowej i komunikacyjnej, jest więc automatyzacją procesu obróbki informacji. System informatyczny służy przetwarzaniu danych przy użyciu techniki komputerowej. Elementami składowymi systemu są natomiast: sprzęt, oprogramowanie, zasoby osobowe, elementy organizacyjne oraz elementy informacyjne (bazy wiedzy). E-government służy usprawnieniu kontaktowania się z władzami wszystkich szczebli i przyspieszenie procedur załatwiania spraw urzędowych. Najważniejsze zadaniem e-government jest świadczenie usług drogą elektroniczną [3].

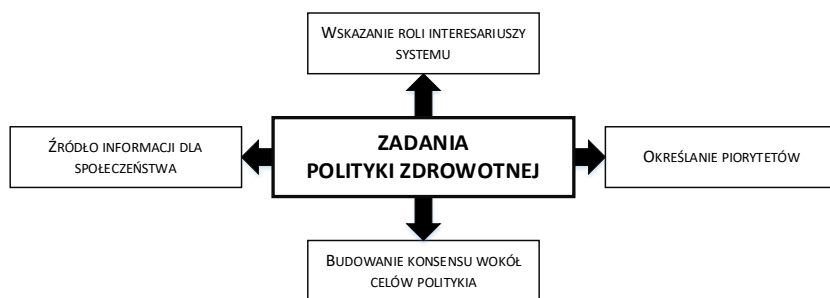
Istnieją cztery stopnie rozwoju e-government w państwie. Stopień pierwszy to tzw. informacja online, czyli możliwość wyszukania informacji na stronie urzędu na temat świadczonych usług oraz danych o nim samym (adres, numer telefonu). Stopień drugi, tzw. interakcja jednokierunkowa, umożliwia wyszukiwanie informacji oraz pobieranie oficjalnych formularzy urzędowych ze strony urzędu (e-urząd). Stopień trzeci – tzw. interakcja dwukierunkowa, która zapewnia wyszukiwarkę informacji, plików oraz pozwala na odsyłanie wypełnionych formularzy. Ostatni, czwarty stopień, to tzw. transakcja. Umożliwia ona pełną obsługę procesu administracyjnego elektronicznie, czyli załatwienie każdej możliwej urzędowej sprawy drogą elektroniczną. Polega głównie na pobraniu, wypełnieniu i złożeniu podpisu elektronicznego, a także otrzymaniu oficjalnej odpowiedzi z urzędu dotyczącej załatwianej sprawy urzędowej [4]

Konstytucja Światowej Organizacji Zdrowia określa, że prawo do zdrowia jest podstawowym prawem człowieka, niezależnym od religii, przekonań, warunków społecznych i ekonomicznych. Globalizacja powinna dotyczyć także wiedzy zdrowotnej, ponieważ rozwój innych krajów w zdrowiu (w walce z chorobami, zwłaszcza zakaźnymi), stanowi korzyść dla wszystkich narodów. Konstytucja WHO porusza także kwestię rządzących, jako tych, którzy przy pomocy odpowiednich środków zdrowotnych i społecznych ponoszą odpowiedzialność za zdrowie swoich obywateli [5]. Traktuje ona ochronę zdrowia jako dobro publiczne. Zdrowie posiada aspekt publiczny, ponieważ zorganizowany wysiłek społeczeństwa łączy instytucje, naukę i działania praktyczne, które mają doprowadzić do umocnienia zdrowia ludzi [6]. Główne cele zdrowia publicznego to: kontrola stanu środowiska, zwalczanie chorób, organizowanie świadczeń zdrowotnych, edukacja zdrowotna oraz osiągnięcie pewnego poziomu życia. Zdrowie publiczne można określić jako zaplecze polityki zdrowotnej [7].

System ochrony zdrowia, zwany też zdrowotnym, jest pewnym formalnym układem, w którym tworzone są cele, osiągnięte dzięki wykorzystaniu lub przetworzeniu zasobów

ludzkich (lekarze, pielęgniarki), zasobów materialnych (aparatura medyczna, leki), procesów przetwarzania (procedury medyczne), środków finansowania (metody ekonomiczne) oraz wyników (efekty związane ze zdrowiem). System zdrowotny postrzegany jest jako główny obszar oddziaływań polityki zdrowotnej [8]. Ważnym aspektem w systemie jest spełnienie oczekiwań społecznych, takich jak np. zapewnienie podstawowych warunków komfortu przy uzyskaniu potrzebnego świadczenia zdrowotnego [9]. Światowa Organizacja Zdrowia określa go jako spójną całość, w której występują liczne powiązania oddziałujące pozytywnie na stan zdrowia populacji. Obejmuje wszystkie organizacje, nakłady oraz instytucje, które wpływają na poprawę stanu zdrowia społeczeństwa oraz indywidualnie jednostki [10].

Polityka zdrowotna definiowana jest jako zbiór zasad określających sposób alokacji i dystrybucji dóbr na ochronę zdrowia, ich koszt oraz bilans wynikających z tego korzyści dla poszczególnych grup społecznych [11].



Rysunek 1. Zadania polityki zdrowotnej [opracowanie własne na podstawie [12]]

Powyżej przedstawiona klasyfikacja najogólniej określa zadania polityki zdrowotnej; możemy jednak ją rozbudować o zadania szczegółowe [13]:

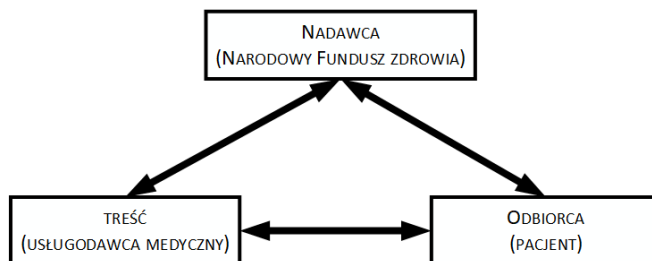
- rozpoznanie realnych potrzeb społeczeństwa dotyczących kwestii zdrowotnych;
- ocenę zasobów, które posiada system zdrowia;
- analizę i ocenę działania systemu;
- jakość i poziom świadczeń z zakresu zdrowia;
- ocenę potencjału naukowego i technicznego oraz jego wykorzystanie;
- kalkulację realnych kosztów leczenia;
- uświadomienie uczestnikom kreacji polityki zdrowotnej współodpowiedzialności za stan zdrowia społeczeństwa.

3. E-Government, a realizacja IKP

Wdrożenie systemów informatycznych w polski system ochrony zdrowia był długotrwałym, żmudnym i czasochłonnym projektem. Jedną z pierwszych wzmianek o informatyzacji służby zdrowia znajduje się w „Strategii Informatyzacji Rzeczypospolitej polskiej – E-Polska na lata 2004-2006”, przygotowanej przez Ministerstwo Nauki i Informatyzacji. Projekt określony mianem „Wrota Polski” planował udzielanie porad przez lekarza i rejestrację pacjenta za pomocą komunikacji elektronicznej.

Plan Informatyzacji Państwa na lata 2007-2010 mówił o elektronicznej platformie gromadzenia analizy i udostępniania zasobów cyfrowych o zdarzeniach medycznych,

którego częścią miał być system przeznaczony dla pacjentów (w skrócie P1). System ten miał na celu zbudowanie systemu informatycznego i jednolitych standardów, które pomogą w realizacji zadań polityki zdrowotnej (np. elektroniczne rozliczenie procedur medycznych). Szacowany koszt projektu na lata 2007-2013 wynosił 877 mln złotych (15% pokrywał budżet państwa, a 85% Europejski Fundusz Rozwoju Regionalnego). W roku 2007 rozpoczął się projekt e-zdrowie, składający się z tzw. P1, P2, P3 i P4. Odpowiedzialnym organem za ten projekt było Centrum Systemów Informatycznych Ochrony Zdrowia. Każdy z tych systemów miał mieć inną funkcję, które razem miały doprowadzić do cyfryzacji całego systemu ochrony zdrowia wraz ze wszystkimi podmiotami. Projekt P1 zawierał w sobie portal dla pacjentów, na którym miały być udostępnione zasoby cyfrowe o zdarzeniach medycznych. W przeciwieństwie do typowego systemu informatycznego w e-administracji, gdzie komunikacja jest dwustronna (nadawca oraz odbiorca), pojawia się trzeci podmiot, który tworzy treść zawartą w systemie IT (usługodawcy medyczni). Na rysunku nr 2 przedstawiono komunikacja informatyczna i wymianę informacji w systemie ochrony zdrowia. Występuje ona w trzech obrębach: nadawcy, treści i odbiorcy.



Rysunek 2. Triada kompetencji informatycznych i jej przełożenie na relacje w systemie opieki zdrowotnej (opracowanie własne na podstawie [14])

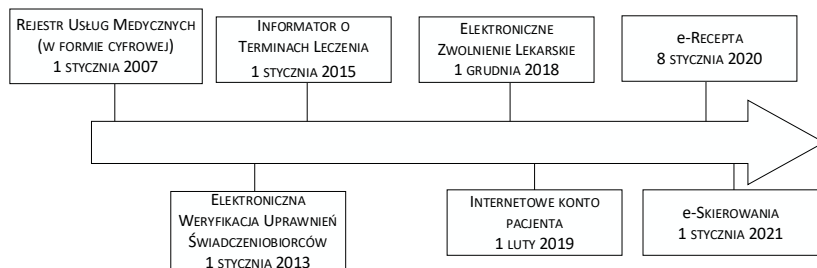
Plan Informatyzacji Państwa na lata 2011-2015 zawiera w sobie plan uruchomienia elektronicznej platformy konsultacyjnych usług telemedycznych. W tym czasie nie przewidziano jednak, jakie problemy w praktyce napotka projekt e-zdrowie. 1 lutego 2011 roku ogłoszono postępowanie przetargowe w celu wyłonienia podmiotów, które zrealizują system e-zdrowie. Na początku 2012 roku CSIOZ ogłosiło wyniki postępowania, a przewidywany czas uruchomienia określono na drugą połowę 2013 roku. Dotyczyło to m.in. e-Recepty; e-Skierowania i e-Zwolnienia; osobistej dokumentacji medycznej, portalu dla pacjentów oraz aplikacji dla usługodawców medycznych [15]. Mimo to od roku 2011 pod adresem ww.ikp.gov.pl została uruchomiona strona internetowa, na której znajdowały się informacje dla pacjentów oraz personelu medycznego na temat funkcjonalności IKP. W założeniu portal ten miał zawierać: historię zdrowia, choroby, szczepień, recept, skierowań, zaświadczeń, badań i wyników laboratoryjnych. Strona posiadała możliwość rejestracji i zalogowania się, jednak po kliknięciu w tę opcję użytkownik był informowany że ta funkcja zostanie udostępniona wkrótce. Na przełomie lat 2013 i 2014 miała być dostępna główna funkcja: Internetowe Konto Pacjenta miało być dostępne dla pacjentów, z możliwością rejestracji konta. Na połowę roku 2014 planowane było zaś uzyskanie pełnej zakładanej funkcjonalności Platformy P1, czyli zakończenie prac nad hurtownią danych i systemem wykrywania nadużyć.

Jednak w tym okresie strona IKP została przekształcona i znajdowały się na niej tylko podstawowe informacje na temat projektu P1, czym jest IKP, jakie korzyści przyniesie i w jaki sposób zarejestrować konto (mimo że nie można było tego zrobić, bo system nie działał). W latach 2014-2015 „tworzą” IKP była dziennikarka Dorota Wellman, aby później zniknąć ze wszystkich materiałów promocyjnych oraz głównej strony tego projektu.

Realizacja systemu P1, w tym IKP, napotykała kolejne problemy, została odstąpiona umowa pomiędzy polskim rządem a wykonawcami dnia 2 grudnia 2015 roku. Nowy przetarg ogłoszono w kwietniu 2016 roku – rozstrzygnięto go już w czerwcu tego samego roku. W Programie Zintegrowanej Informatyzacji Państwa, wydanym we wrześniu 2016 roku z perspektywą do roku 2020, rekomendowanymi e-usługami dla pacjentów w ochronie zdrowia określono: e-dokumentację medyczną, portal dla pacjentów, e-Recepty, e-Skierowania, e-Zwolnienia [16].

Przełomem było rozpoczęcie wraz z dniem 16 lutego 2018 roku programu pilotażowego w Siedlcach oraz Skierniewicach. Pacjentom biorącym udział w testach udostępniono także po raz pierwszy nową wstępną wersję IKP. Dzięki temu można było sprawdzić funkcjonalność portalu dla pacjentów oraz systemu e-Recepty wraz z portalem dla pacjentów. Pilotaż zakończył się sukcesem 31 sierpnia 2018 roku [17]. Doprowadziło to do możliwości wdrażania e-Recept w całym kraju, początkowo dla chętnych podmiotów medycznych, aptek czy lekarzy.

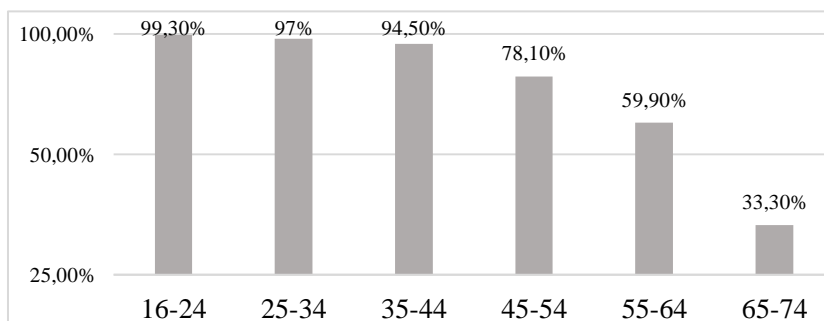
1 lutego 2019 roku uruchomiona portal IKP dla wszystkich chętnych użytkowników, jednak nie zawierał on w sobie wszystkich w pełni działających funkcji obiecanych od roku 2007. W nowej perspektywie ogłoszonej w roku 2019 Program Zintegrowanej Informatyzacji Państwa, w którym znajduje się kwestia rozbudowy portalu IKP, budowę ogólnopolskiej e-rejestracji, oraz dokumentacji medycznej i zakończenie realizacji projektu e-zdrowia (P1). IKP nastawiony jest na długofalowy rozwój w perspektywie kolejnych lat, ma być i jest on rozbudowywany, co ma doprowadzić do spełnienia oczekiwanej funkcjonalności.



Rysunek 3. Harmonogram uruchomienia elementów systemu eZdrowie [opracowanie własne]

CSIOZ rozpoczął realizację projektu „Wprowadzenie Nowoczesnych e-Usług w Podmiotach Leczniczych Nadzorowanych przez Ministra Zdrowia” współfinansowany przez UE, planowany całkowity koszt realizacji: 144 749 629,78 zł. W wyniku realizacji projektu w podmiocie leczniczym zostaną wdrożone następujące e-usługi: e-zlecenie, e-rejestracja. Planowany okres zakończenia to 30 września 2021 roku. Celem projektu jest wdrożenie rozwiązań informatycznych zakładających poprawę

dostępności, jakości i efektywności realizowanych świadczeń opieki zdrowotnej oraz integracja wdrażanych rozwiązań z innymi systemami IT wykorzystywanymi wewnątrz podmiotów [18].



Wykres 1. Osoby korzystające regularnie z Internetu według grup wieku w roku 2019 [15]

Jak pokazują dane, polskie społeczeństwo jest przygotowane na cyfryzację. Z upływem czasu edukacja informatyczna oraz wykorzystanie komputerów na stanowiskach pracy przyczyniły się do tendencji zwykłej w znacznej większości statystyk dotyczących społeczeństwa informacyjnego w Polsce. W 2004 roku tylko 8% gospodarstw domowych posiadało szerokopasmowy dostęp do Internetu, w 2007 roku odsetek ten już wynosił 29,6%, aby podwoić do 61,1% w roku 2011, osiągając w 2014 roku 74,8%, a w 2019 aż 86,7%. Jak wskazują badania, w 13,3% gospodarstw domowych w Polsce nie ma komputera, Jako najczęstszą przyczynę takiego stanu badani podawali: brak potrzeby (67,6%) oraz brak odpowiednich umiejętności (52,0%). Dostęp do Internetu posiada 80,44%, gospodarstwa domowych bez dzieci, aż 99,3%, gospodarstw z dziećmi posiadało dostęp do sieci [19] (GUS, 2019).

42,8% osób wieku 55-75 lat korzystało z komputera w roku 2019 [15]. W grupie wiekowej 65-74 lata zauważono z kolei największy, bo aż 10% wzrost (z 20,1% w 2018 do 30,6%) w roku 2019. Grupą społeczną najbardziej wykluczoną cyfrowo w badanym roku są emeryci. W grupie tej najmniejszy odsetek badanych korzysta regularnie z komputera – tylko 43,4% [15]. Badania pokazują powolny, acz stały wzrost liczby emerytów korzystających z Internetu. Niestety wciąż 56,6% osób w wieku emerytalnym jest wykluczonych cyfrowo. Doprowadza je to niemożności skorzystania z części usług (w tym e-recept) publicznego systemu ochrony zdrowia, którego są przecież największym beneficjentem. Problemem są także obszary wiejskie, gdzie wskaźnik jest znacząco niższy niż w dużych i mniejszych miastach. Obszary te wykluczone są często z dostępu do podstawowych świadczeń medycznych i muszą realizować przysługujące im świadczenie medyczne w większych ośrodkach. W czasie pandemii COVID grupy te mogą mieć utrudniony dostęp do usług Z roku na rok jednak liczba osób posiadających umiejętności cyfrowe w tych grupach wzrasta.

4. Internetowe Konto Pacjenta i jego podsystemy

Internetowe Konto Pacjenta jest portalem internetowym pozwalającym pacjentowi na dostęp do innych podsystemów w eZdrowiu. Głównym celem jego powstania jest zebranie danych medycznych zalogowanego użytkownika (pacjenta) w jednym

ogólnodostępnym systemie. Serwis jest bezpłatny. Oficjalną datą uruchomienia tego portalu to 1 lutego 2019.

Prowadzona od września 2019 do grudnia 2019 była kampania edukacyjno-informacyjna promująca ten portal pt. „Internetowe Konto Pacjenta. Tu zapisuje się historia Twojego zdrowia”. Podzielona była na dwa etapy: kampanię informacyjną, której głównym celem było zbudowanie świadomości istnienia i uruchomienia IKP oraz działania edukacyjne, które miały przyczynić się do zwiększenia liczby zakładanych kont. Działania marketingowe obejmowały media tradycyjne, social media, publikacje artykułów w prasie. W ramach kampanii przygotowano dwa spoty, które były emitowane w radio, telewizji, kinach oraz serwisach internetowych. Dodatkowo w wielu podmiotach medycznych dostępne były ulotki oraz zawieszane plakaty promujące IKP. Budżet tej kampanii wynosił 1,8 mln zł, a jej zasięg określono na ponad 8 milionów obywateli.

Pacjent wchodzący na stronę pacjent.gov.pl (domena ikp.gov.pl przekierowując pod ten adres www) niezalogowany użytkownik może zobaczyć aktualne informacje dotyczące zagadanie z zakresu zdrowia. Dotyczą one m.in. praw pacjenta, działania systemu ochrony zdrowia, profilaktyki. Informacji jednak nie jest wiele. W czasie pandemii COVID-19 na jego stronie głównej można było znaleźć numer telefonu informacyjnego oraz link do strony rządowej zawierające informacje dotyczące koronawirusa (nie jest ona częścią portalu). W zakładce „ochrona zdrowia” znajduje się podstrona „szukam wolnych terminów”, tam ukryta jest funkcjonalność IoTL. Główna strona portalu IKP realizuje też jedno z zadań polityki zdrowotnej – jest źródłem informacji dla społeczeństwa na temat zdrowia i systemu ochrony zdrowia.

System Elektroniczna Platforma Usług Administracji Publicznej (ePUAP) w wersji 2.0 pozwala korzystać z logowania do systemów informatycznych w polskiej administracji. Pacjent na IKP z wykorzystaniem konta ePUAP loguje się do systemu za pomocą Profilu Zaufanego, e-dowodu lub e-Tożsamości. Profilu Zaufanego jest całkowicie darmowy i dostępny dla wszystkich obywateli, którzy posiadają numer PESEL. Można go założyć zdalnie (bez wizyty w urzędzie), korzystając z bankowości internetowej lub systemu Envelo. Po założeniu jest ważny przez trzy lata, jednak można wydłużyć ważność konta samodzielnie, na kolejny okres 3 lat. Osoby nie posiadające konta w obsługiwanym banku (lub nie posiadają go wcale), mogą rozpocząć rejestrację przez internet, a następnie potwierdzić swoją tożsamość w punkcie potwierdzającym (np. w urzędzie gminy czy na poczcie). Na początku roku 2014 liczba użytkowników tego systemu wynosiła tylko 190 000 [20]. Od roku 2016 część banków umożliwiła wykorzystanie podpisu bankowego jako podpisu kwalifikowanego. W celu stworzenia takiego należy zalogować się za pomocą konta internetowego w banku. Pomogło to przekroczyć ePUAPowi liczbę 1 mln użytkowników w marcu 2015 roku [21]. Natomiast w marcu 2019 roku swoje konto miały 3 miliony polskich obywateli [22]. W 2019 roku liczba osób korzystająca z usług bankowych była prawie o połowę wyższa niż tych, którzy wysłali elektronicznie wypełniony formularz do urzędu. Tego samego roku w lipcu osiągnięto wynik 4 milionów użytkowników [23]; początek następnego półrocza to przyrost o kolejny milion użytkowników, aby osiągnąć cel 5 milionów w lutym 2020 [24]. Kolejny wzrost o milion nastąpił już w kwietniu 2020, obecnie jest powyżej 6 mln użytkowników ePUAP. [25] W związku z pandemią COVID-19 w Polsce przewidywany jest gwałtowny wzrost liczby użytkowników

systemu ePUAP, z analizy danych, można przepuszczać wzrost o kolejny 1-2 mln użytkowników do końca roku 2020. Do tego pojawiły się kampanie społeczne banków, które mają na celu zachęcić osoby starsze do korzystania z e-bankowości. Dzięki posiadaniu konta internetowego seniorzy mogą korzystać także z systemu ePUAP, do czego zachęca klientów większość banków, zwłaszcza w czasie pandemii. Wzrost liczby kont w systemie ePUAP pozwoli korzystać z innych systemów informatycznych w Polsce, także tych z zakresu ochrony zdrowia. Tabela 1 przedstawia systematyczny wzrost wykorzystania e-Government oraz usług bankowych w latach 2004-2009.

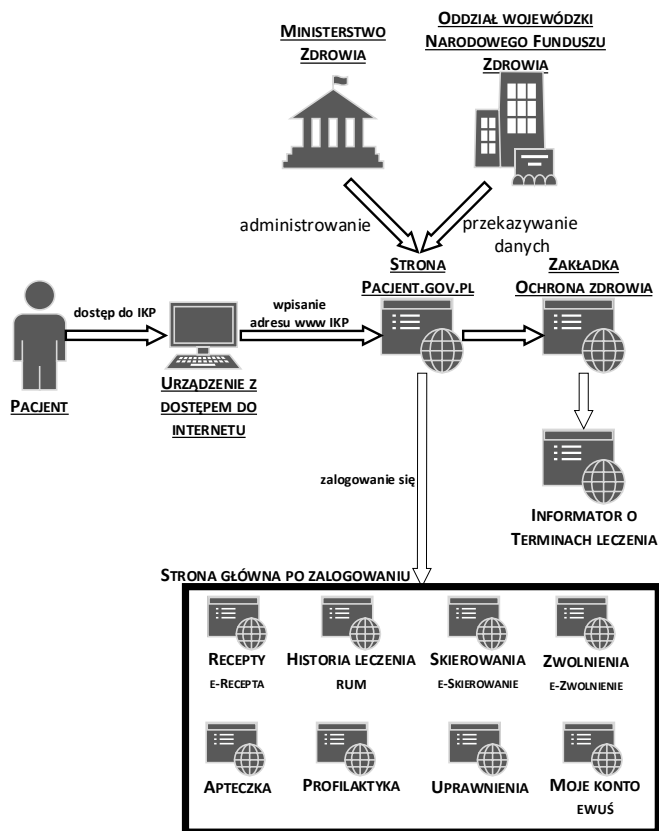
Tabela 1. Korzystanie z usług bankowej oraz usług e-Government przez Polaków w wybranych latach.

	2004	2009	2014	2019
Korzystanie z usług bankowych	4%	21,2%	32,6%	58,8%
Korzystanie z e-Government	-	24,7%	26,4%	40,4%
W celu:				
Wyszukiwanie informacji na stronach administracji	-	22,5%	20,4%	24,9%
Pobierania formularzy urzędowych	-	16,1%	19,0%	24,6%
Wysyłania wypełnionych formularzy	-	7,9%	18,8%	31,4%

Źródło: opracowanie własne na podstawie danych GUS z lat 2004-2019

Na rysunku numer 4 przedstawiono przepływ danych w systemie IKP, do jakich systemów cyfrowych w ochronie zdrowia pacjent ma dostęp. Zalogowany użytkownik uzyskuje dostęp do pełnej funkcjonalności IKP. Ma możliwość sprawdzić swój status ubezpieczenia (eWUŚ), zobaczyć swoje zwolnienia lekarskie (eZLA) czy recepty (eRecepta), ma także podgląd do wykonanych procedur medycznych w ramach NFZ (RUM). Interfejs oraz rola tych podsystemów dostosowana jest do użytkownika indywidualnego – pacjenta. IKP składa się z wielu podsystemów, tworząc funkcjonalny system dla świadczeniobiorców. Każda z tych funkcji jest bazą danych na temat zalogowanego użytkownika z innych systemów informatycznych w ramach innych publicznych systemów informatycznych – Rejestru Usług Medycznych (RUM) czy Platformy Usług Elektronicznych Zakładu Ubezpieczeń Społecznych (PUE ZUS).

Użytkownik ma także dostęp do innych funkcji IKP. Na podstronie „Apteczka” znajdują się informacje o lekach wykupionych przez pacjenta od stycznia 2019 roku, użytkownik może także wyszukać nazwy handlowe leków przyjętych do obrotu w Polsce w bazie danych pod nazwą „Baza leków”. Zakładka profilaktyka jest bardzo uboga i znajduje się tam tylko ankieta, pozwalająca zbadać własne zachowania zdrowotne. W ustawieniach kontaktach (Moje Konto) możemy wybrać swojego lekarza lub pielęgniarkę POZ. „Uprawnienia” służą ustawianiu dostępności do innych kont, do których użytkownik ma dostęp (np. dziecka do 18. roku życia czy osoby starszej) czy upoważniania pełnomocnika do przeglądania danych użytkownika lub udostępniania swoich danych medycznych lekarzowi, pielęgniarce lub farmaceucie. Funkcja ta może się okazać przydatna w czasie pandemii dla osób, które mają osobę starszą czy przewlekle chorą. Dzięki temu będzie miała szybko dostęp do recept czy wykonanych świadczeń, z uprawnionego konta.



Rysunek 4. Przepływ danych w systemie IKP dla pacjenta [opracowanie własne]

4.1. Informator o Terminach Leczenia

Na stronie głównej IKP znajdującego się pod adresem pacjent.gov.pl, w zakładce „Ochrona Zdrowia” znajduje się podstrona „Szukam wolnych terminów Leczenia” gdzie pacjent może znaleźć wyszukać termin świadczenia refundowanego w ramach NFZ w jednej z 14 tysięcy placówek w całym kraju. Pacjent może tego dokonać za pomocą strony głównej w IKP lub pod adresem www.kolejki.nfz.pl, na której znajdują się zmagazynowane dane z serwerów NFZ. Informator o Terminach Leczenia został uruchomiony w styczniu 2015 roku.

Na stronie znajduje się wyszukiwarka kolejek dla podmiotów medycznych, udzielających świadczeń w ramach NFZ. Lista oczekujących na udzielenie świadczenia jest integralną częścią dokumentacji medycznej prowadzonej przez świadczeniodawcę, dlatego też pacjent ma prawo do uzyskania informacji z nią związanej (w tym przypadku uzyskuje ją za pomocą portalu internetowego).

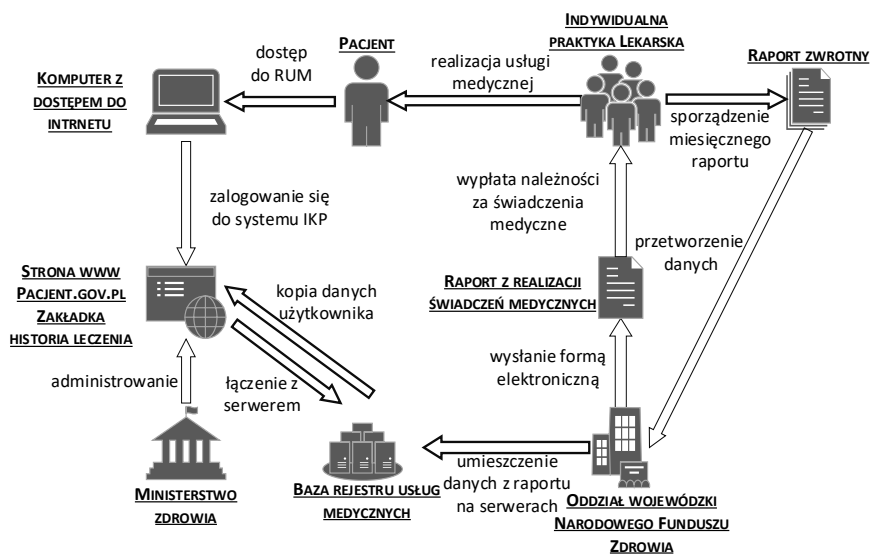
Przepływ danych w tym systemie obrazuje rysunek 4. Funkcją, jaką ma spełniać system IoTL, jest – jak sama nazwa wskazuje – informowanie świadczeniobiorców o czasie oczekiwania na świadczenie medyczne. Użytkownik wybiera rodzaj swojego przypadku (stabilny/pilny), wybiera z listy konkretne świadczenie, może także wskazać województwo i wpisać miasto, aby zawęzić pole wyszukiwania. Po kliknięciu

w ikonę „sprawdź czas oczekiwania”, wyświetla się lista podmiotów udzielających dane świadczenie. Poniżej tych danych znajdują się informacje na temat kolejek: liczba osób oczekujących, liczba osób skreślonych, średni czas oczekiwania określony w dniach, a także pierwszy wolny termin. Każdy świadczeniodawca od 1 stycznia 2015 roku zobowiązany jest do prowadzenia listy oczekujących w wersji elektronicznej i przekazywania jej do wojewódzkiego oddziału NFZ [26]. Placówki medyczne przekazują taką informację co tydzień o pierwszym wolnym terminie. Oddział wojewódzki przetwarza uzyskane dane i umieszcza je na serwerach, gdzie są dostępne dla użytkowników w formie portalu internetowego.

4.2. Rejestr Usług Medycznych

„Historia wizyt” pozwala na sprawdzenie historii wizyt refundowanych, które są kopią systemu Rejestru Usług Medycznych. Można wyszukać wizytę po dacie czy nazwie placówki lub wybrać z listy, na stronie widać także podsumowanie kosztów refundacji. Wyświetlamy szczegóły kliknięciem i wtedy widoczne dan placówki, data, wykonane procedury medyczne oraz informacje rozliczeniowe NFZ (koszt wypłaty podmiotowi medycznemu). Możemy także zgłosić nieprawidłowość do NFZ, jeżeli zabieg nie był zrealizowany lub dane są nieprawdziwe. Należy pamiętać, że te dane nie są elektroniczną historią choroby, a raczej danymi na temat zrealizowanych świadczeń medycznych. Na podstronie RUM możemy znaleźć koszty refundacji usług medycznych (także za leki, sprzęt medyczny). Znajdujące się tam dane dotyczą miejsca udzielenia świadczenia, wykonanych procedur medycznych (w formacie ICD9), czasu realizacji oraz całkowitego kosztu, jaki poniósł NFZ w stosunku do świadczeniobiorcy. NFZ posiada elektroniczną bazę danych wykonanych świadczeń od roku 2004, jednak w systemie RUM udostępnia je od roku 2008. Administrator systemu opracowuje, ustanawia, wdraża, eksploatuje, monitoruje, przegląda, utrzymuje i doskonali system zarządzania bezpieczeństwem informacji, zapewniając przy tym poufność, dostępność oraz integralność informacji. Głównym administratorem RUM jest NFZ – system jest także finansowany ze środków Funduszu. System ten ma zapewnić w swojej minimalnej funkcjonalności m.in.: przetwarzanie danych usługodawców świadczeń medycznych i dostęp do przetwarzanych przez nich danych; wymianę danych o udzielanych świadczeniach i finansowe rozliczenie ich z podmiotem zdrowotnym; dostęp do danych przetwarzanych przez usługodawców; udostępnianie danych dotyczących umów o udzielanie świadczeń zdrowotnych; przetwarzanie danych o udzielonych świadczeniach osobom uprawnionym [27].

Na rysunku nr 5 przedstawiono przepływ danych w systemie RUM. Rejestr jest narzędziem służącym kontroli usługodawców przez NFZ, jak również kontroli Funduszu przez Ministerstwo Zdrowia. Dzięki temu widać koszt, datę, miejsce oraz formę wykonania świadczenia medycznego. Pacjent dzięki skorzystaniu z systemu RUM znajdującego się w ZIP, może kontrolować realizowane usługi medyczne oraz wykryć fikcyjnie zrealizowane świadczenie. Zgłoszenie nieprawidłowości w NFZ skutkuje wszczęciem czynności merytorycznych, które mogą skutkować nawet odebraniem kontraktu wykonawcy. Wykaz procedur medycznych nie jest jednak tym, czego oczekuje pacjent – elektroniczną historią choroby, która przyspieszyłaby proces leczenia i skomunikowała dokumentację medyczną na poziomie ponadjednostkowym.



Rysunek 5. Przepływ danych w systemie Rejestr Usług Medycznych na przykładzie działania IKP [opracowanie własne]

4.3. Elektroniczna Weryfikacja Upnień Świadczeniobiorców

Na podstronie „Moje konto”, w której można zmienić swoje dane kontaktowe (np. numer telefonu, aby otrzymywać e-receptę SMS-em), może także zobaczyć swoje ubezpieczenie zdrowotne czy sprawdzić wybraną Podstawową Opiekę Zdrowotną. Zakładka „Składki” to na niej można sprawdzić własne składki na ubezpieczenie zdrowotne. eWUŚ ten różni się od tego dostępnego dla świadczeniodawców, ponieważ sprawdza w sposób automatyczny prawo do świadczeń użytkownika. Użytkownik nie może sprawdzić z tego powodu ubezpieczenia zdrowotnego innej osoby. Podstrona „składki” składa się z danych na temat podmiotu płacącego składkę ubezpieczenia użytkownika. Informacja ta pochodzi z instytucji odpowiedzialnej za ubezpieczenie zdrowotne (ZUS, KRUS, MSW). Informacje znajdujące się tam to data zgłoszenia do ubezpieczenia zdrowotnego, NIP/REGON podmiotu zgłaszającego lub odprowadzającego składkę oraz datę ostatniej składki, która została zarejestrowana w systemie. System IKP animizuje dane podmiotu płacącego składkę (w systemie ZIP był widoczny cały numer). Dzięki temu świadczeniobiorca może zobaczyć, czy składki są za niego odprowadzane regularnie.

Od 1 stycznia 2013 roku świadczeniodawca musi zweryfikować uprawnienia pacjenta do skorzystania z publicznej opieki zdrowotnej; weryfikacja następuje w systemie eWUŚ. System eWUŚ jest dzienną repliką wybranych informacji z Centralnego Wykazu Ubezpieczonych, które przekazywane są do niego m.in.: z ZUS, KRUS oraz MSWiA. Dane te są codziennie aktualizowane i przedstawiają stan uprawnień na dzień ich weryfikacji. Pacjent w systemie może posiadać dwa statusy, „zielony”, czyli osoba ma prawo do świadczenia medycznego lub „czerwony” – system nie potwierdza tego prawa. Usługodawca ma obowiązek gromadzić zweryfikowane dane o pacjentach i dołączyć je do miesięcznego raportu z realizacji świadczeń. Plik ten wskazuje datę weryfikacji danych, która musi pokrywać się z datą realizacji świadczenia medycznego zawartego w raporcie miesięcznym. Taka procedura ma

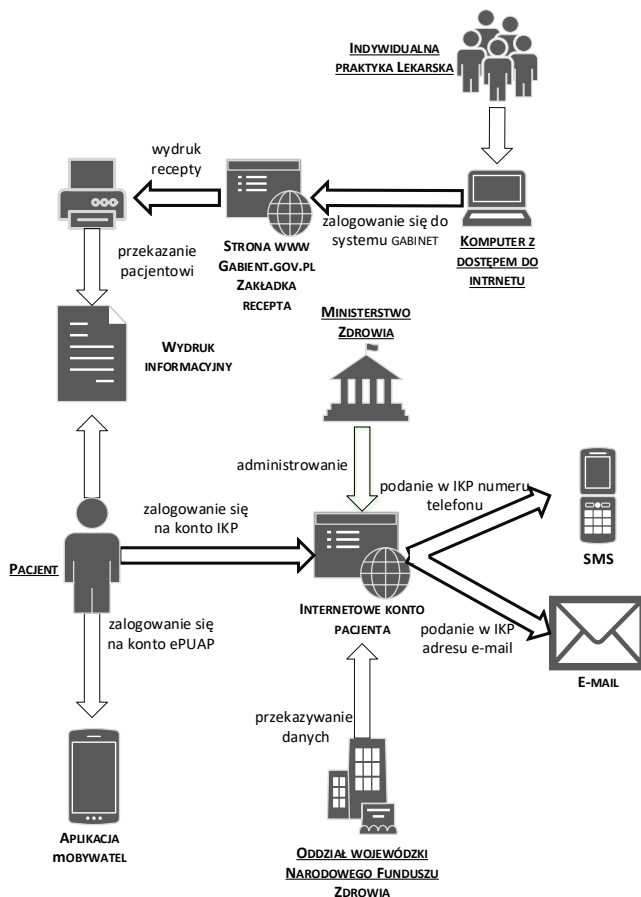
służyć kontroli i zmniejszeniu nadużyć ze strony usługodawców. Według danych NFZ w roku 2017 średnia miesięczna liczba zapytań o uprawnienia pacjenta w systemie eWUŚ wykonanych przez lekarzy wynosiła 75,6 mln.

4.4. E-recepta

Przełomem dla rozwoju e-Government w polskiej ochronie zdrowia było rozpoczęcie wraz z dniem 16 lutego 2018 roku programu pilotażowego e-Recepty w Siedlcach oraz Skierniewicach, który zakończył się sukcesem 31 sierpnia 2018 roku [28]. Doprowadziło to do możliwości wdrażania e-Recept w całym kraju, początkowo dla chętnych podmiotów medycznych, aptek czy lekarzy. W nowej perspektywie ogłoszonej w roku 2019 Program Zintegrowanej Informatyzacji Państwa, w którym znajduje się kwestia rozbudowy portalu IKP, budowę ogólnopolskiej e-rejestracji, oraz dokumentacji medycznej i zakończenie realizacji projektu e-zdrowia. Do systemu e-Recepta na dzień 7 stycznia 2019 roku podłączonych było 81 tysięcy podmiotów medycznych (wystawiło jedną e-Receptę) oraz wystawiono 1,6 mln takich e-Recept. Najlepiej przygotowane były apteki, 99% było gotowych do realizacji e-Recepty [29].

IKP w zakładce „recepty” można wyszukać receptę po nazwie leku, nazwisku lekarza albo nazwie placówki oraz ustawić przedział czasowy. Możemy także ustawić status wyświetlonych recept: wszystkie, wystawione, w przygotowaniu, częściowo zrealizowane i zrealizowane. Każdy wynik zawiera datę, kod recepty, nazwę leku, imię i nazwisko lekarza oraz status. Możemy także wybrać opcję „zobacz receptę”, która wyświetla na stronie gotowy wydruk recepty pacjenta. Pacjent ma również opcję pobrania recepty w formie PDF. Później może ją wydrukować lub wyświetlić w swoim telefonie lub wysłać komuś. Możliwe jest także wybranie odnośników w pdf dotyczące szczegółów recepty, a także można pobrać ulotkę przyjmowanego leku. Pacjent może zrealizować e-Receptę w kilku formach, przepływ danych w systemie e-Recepta przedstawiono na rysunku 6. Pacjent musi podać swoje dane (numer telefonu adres skrzynki pocztowej) w IKP, aby móc otrzymywać receptę SMS-em lub na pocztę email.

Jedną z możliwości zobaczenia swoich recept na smartphonie jest aplikacja mObywatel, która można ściągnąć z Play Store oraz Apple Store. Działa ona kolejno na systemach operacyjnych Android oraz iOS. Aplikacja została uruchomiona 29 października 2017 roku [30] i od tego momentu miała wiele aktualizacji usprawniających jej działanie i wprowadzających nowe e-dokumenty. Według badań GUS w roku 2019 86,5% osób w wieku 16-24 lat łączy się z Internetem za pomocą smartfonu, w kategorii wiekowej 55-64 taki telefon ma 20,2%, a w wieku 65-17 tylko 8,9%. Problemem jest jednak to, że do działania wymaga ona Internetu – w celu logowania się do PZ. Do końca roku 2019 aplikacja miała ponad milion użytkowników, jednak była to liczba pobrań, ponieważ liczba zalogowanych użytkowników wynosiła 500 tysięcy [31]. Zalogowania można dokonać przez ePUAP. W czasie pandemii wiosną 2020 roku użytkownik miał do wyboru dwie opcje związane z ochroną zdrowia: e-Recepta oraz Koronawirus: informacje i zalecenia. Po kliknięciu w e-Receptę wyświetla się lista recept, dzień ich wystawienia oraz podmiot wystawiający. Brak jest informacji o nazwie leku, który wyświetla się po kliknięciu w daną zakładkę, dodatkowo pojawia kod recepty, który należy wraz z numerem pesel w aptecę oraz kod QR, który można pokazać w aptecę. W aplikacji pojawiła się także zakładka dotycząca koronawirusa.



Rysunek 6. Przepływ danych w procesie otrzymania e-Recepty przez pacjenta [opracowanie własne]

Korzyści, jakimi zachwala Ministerstwo Zdrowia elektroniczną receptę, to czytelność e-Recepty (w przeciwieństwie do niestarannego pismo lekarza), wygodniejszy sposób odpisu recepty, możliwość zakupu każdego leku w dowolnej aptece (wcześniej wykup leków z odpisu recepty w formie papierowej należało dokonać w aptece, która dokonała odpisu). Takiej e-Recepty nie można też zgubić, ponieważ jest elektroniczna (wszystkie zapisują się także w IKP), receptę w formie elektronicznej można zrealizować w każdej aptece w Polsce (wszystkie wdrożyły system w swoich placówkach).

Proces uzyskania możliwości realizacji e-Recepty przez podmioty medyczne jest bardzo skomplikowany. NFZ przeprowadził wiele szkoleń przed oficjalnym startem systemu, w trakcie których tłumaczył działanie e-Recepty. Dużym problemem po stronie podmiotów działających w ramach NFZ jest słaba infrastruktura komputerowa. Częstym przypadkiem jest wykorzystywanie do tego celu prywatnego sprzętu lekarza, problemem jest nieposiadanie drukarki w placówce medycznej, bez której nie można wydrukować recepty. W takich przypadkach pacjenci otrzymują kod, który jest zapisywany na małej kartce. W pierwszym okresie działania e-Recepty pacjenci, zwłaszcza starsi, nie mieli dowodu w czasie wykupowania leków, co uniemożliwiło realizację zakupów w aptece.

4.5. Elektroniczne Zwolnienie Lekarskie

Zakładka „zwolnienia” pokazuje wystawione e-Zwolnienia, po kliknięciu w szczegóły wyświetla się data wystawiania, okres, na jaki przysługiwało oraz jaki lekarz wystawił zwolnienie. Zwolnienia w formie elektronicznej oraz szczegóły wystawionych zaświadczeń lekarskich – dane te są kopią z bazy danych ZUS Elektroniczne zwolnienia lekarskie (e-ZLA). Pracodawca po zalogowaniu się do systemu PUE ZUS może zobaczyć zwolnienia lekarskie swoich pracowników. Lekarz, aby móc wystawić e-ZLA, musi posiadać profil na PUE ZUS lub mieć swoją aplikację gabinetową zintegrowaną z PUE. Elektroniczne Zwolnienie Lekarskie zostało wprowadzono pilotażowo od 1 stycznia 2016 roku, a od 1 grudnia 2018 roku obowiązują wyłącznie zwolnienia lekarskie wystawione w formie elektronicznej. W założeniu wystawienie takiego rodzaju zwolnienia ma trwać krócej niż tradycyjnego, dzięki automatycznemu uzupełnieniu informacji po wpisaniu numeru PESEL pacjenta. Dzięki zastosowaniu tego systemu, pacjent nie musi dostarczyć pracodawcy zwolnienia w ciągu 7 dni. Wygodą dla pracodawcy jest posiadanie w swoim profilu płatnika wszystkich zwolnień lekarskich swoich pracowników.

4.6. E-skierowanie

E-skierowanie, jest kluczowym systemem wdrażanych w ramach procesu cyfryzacji ochrony zdrowia w Polsce. 16 października 2019 rozpoczął się pilotaż e-Skierowania. Obecnie trwa podłączanie podmiotów leczniczych do systemu oraz testy. Docelowo pilotaż e-Skierowania przeprowadzony zostanie w około 200 placówkach. Pilotaż potrwa do połowy 2019 roku. Pacjenci nie będą musieli dostarczać skierowania do placówki medycznej w wersji papierowej osobiście – wystarczy telefon i zdalna rejestracja, zostanie rozwiązany problem nieczytelności skierowań, zostanie wyeliminowane ryzyko zgubienia skierowania, a pacjent będzie miał wgląd do wystawionych e-skierowań poprzez IKP. Elektroniczne skierowanie będzie obowiązywać w całym kraju od 1 stycznia 2021 roku [32].

Pacjent po wypisaniu przez lekarza e-Zwolnienia, otrzyma dane dostępne. Wybiera placówkę, w której dane świadczenie medyczne ma być zrealizowane. Następnie pacjent kontaktuje się z wybraną placówką i podaje dane dostępne: kod (z numerem PESEL) lub klucz. Placówka przesyła otrzymane dane do systemu P1. System weryfikuje otrzymane dane. W przypadku pozytywnej weryfikacji pacjent zostaje zapisany na wizytę.

5. Podsumowanie

System IKP po 12 latach wszedł do użytku publicznego, zbierając wszystkie systemy IT dostępne w publicznym systemie ochrony zdrowia w Polsce. Według postu zamieszczonego dnia 31 marca 2020 roku na facebookowym koncie IPK, konta posiadała 2 mln zarejestrowanych Polaków. Prace nad projektem P1, czyli Elektroniczną Platformą Gromadzenia, Analizy i Udostępniania zasobów cyfrowych o Zdarzeniach Medycznych, którego częścią jest IKP trwają od 2007 roku, system ten napotyka na kolejne przeszkody. Trzeba kilku kolejnych lat, aby pacjent mógł skorzystać ze wszystkich zaplanowanych od początku funkcji systemu. Nie spełnia przewidywanej od początku funkcjonalności. Kartoteka medyczna, to kopia danych RUM z indywidualnego konta ZIP, czyli zrealizowane, e-skierowanie jest w fazie pilotażowej, oba

ma wejść w życie z dniem 1 stycznia 2021. Projekt miał być już ukończony wraz z wszystkimi podsystemami już w 2012 roku. Problemy, które napotkał wtedy to m.in. oskarżenia korupcyjne dotyczące przetargów czy brak kompatybilności poszczególnych systemów. Zakończenie prac nad systemem musiało dojść do skutku, ze względu na współfinansowanie z UE i konieczność rozliczenia się z wykorzystanych funduszy. IKP zawiera w sobie „nową generację” systemów IT w ochronie zdrowia. Centrum e-Zdrowia (dawniej CSIOZ) przeprowadziło badanie „Świadomość i postrzeganie IKP” w kwietniu 2020 roku. W badaniu znajomości serwisów usług medycznych, 33% badanych zna IKP, 31% pod adresem www.pacjent.gov.pl. System ZIP, który jest protoplastą IKP nie został ujęty w badaniu. Za tym, że e-Recepta (zdecydowanie/raczej) przydatna jest 84% badanych, 76% badanych tak ocenia przydatność IKP, aż dla 20% IKP, jest ani nieprzydatna, ani przydatna. Wraz z rozwojem o nowe funkcje IKP przewiduje się zamknięcie serwisu ZIP. Kolejne lata będą kluczowe dla rozwoju systemu IKP w związku z poszerzaniem funkcjonalności. Kluczowa tu będzie wprowadzenie elektronicznej dokumentacji medycznej w roku 2021, ponieważ wprowadzenie tego elementu było odraczane, spotykało się także ze sprzeciwem lekarzy, którzy twierdzą, że nie są przygotowani technicznie. W dniu 14 kwietnia 2020 r. opublikowano nowe rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 6 kwietnia 2020 r. w sprawie rodzajów, zakresu i wzorów dokumentacji medycznej oraz sposobu jej przetwarzania. Brakuje informacji dotyczących zabiegów medycznych wykonanych w prywatnych placówkach (posiadają swoje własne systemy, co pokazało badanie CZIOS), mają one mieć jednak obowiązek zgłaszania do NFZ wszystkich zrealizowanych zabiegów. Spowoduje to zamknięcie cyfrowej rewolucji w polskiej ochronie zdrowia.

Przeanalizowanie schematów przepływu danych w systemach informatycznych działających w ramach polskiej publicznej ochrony zdrowia wskazuje role każdego z trzech aktorów. NFZ jest organem, który gromadzi bazy danych, wykorzystuje je na użytek pacjentów i usługodawców, a także zarządza nimi i administruje. Bazy danych wykorzystywane są w celu kontroli i weryfikacji realizowanych świadczeń medycznych. Każdy z systemów spełnia inną funkcję w systemie. Posiadanie informacji w formie elektronicznej umożliwia sprawniejsze wykrywanie nieprawidłowości w realizacji świadczeń (także przez osoby nieuprawnione) czy sprawdzanie ich dostępności. Systemy informatyczne pomagają spełniać obowiązki nałożone przez ustawy na NFZ, ale także na usługodawców medycznych, udostępnienia informacji o dostępie i czasie realizacji świadczeń medycznych, obowiązku prowadzenia kartoteki medycznej w formie elektronicznej czy weryfikacji uprawnień świadczeniodawców. Pojawiają się jednak głosy świadczeniodawców, że systemy informatyczne, zamiast ułatwiać im przeprowadzanie procedur medycznych, nadmiernie je komplikują. Tworzenie elektronicznej dokumentacji medycznej zajmuje czas, który mogliby poświęcić pacjentowi. Rozwiązaniem mogłoby być zatrudnienie dodatkowej kadry pomocniczej, zajmującej się obowiązkami informatycznymi i pomagającej lekarzowi w trakcie wizyty, dopiero w lipcu 2019 roku wprowadzono zawód Asystenta Medycznego do polskiego prawa. Programy wykorzystywane w ochronie zdrowia należą do skomplikowanych, co wynika z mnogości występujących w nich opcji. Znaczna część usługodawców korzysta z pomocy informatyków we własnym zakresie. Lekarz nie musi się znać na komputerach, on ma leczyć. Należy jednak zwrócić uwagę, że dzięki elektronicznemu rozli-

czeniu się świadczeniodawców z NFZ, możliwa jest sprawniejsza wypłata należności za realizowany kontrakt.

IKP realizuje część zadań ochrony zdrowia, ale także przy odpowiednim wykorzystaniu danych, możliwe jest wykorzystanie ich w celu realizacji innych zadań polityki zdrowotnej. IKP pomaga w kalkulacji realnych kosztów leczenia, jednak są one i tak nie doszacowane po stronie NFZ, w wielu dziedzinach np. stomatologii, koszty świadczeń nie były podnoszone przez ostatnie kilka lat. Zbadanie kosztów indywidualnego pacjenta w leczeniu choroby przewlekłej, można zbadać wykorzystanie systemu ochrony zdrowia i proces udzielania pomocy w trakcie leczenia (wykorzystanie świadczeń medycznych). Dane można wykorzystać do analizy i oceny działania systemu, dokonać ewaluacji funkcjonowania za pomocą uzyskanych danych, co pozwoli na łatwiejsze przeprowadzenie analiz, które mogą być wykorzystywane w wielu miejscach jednocześnie.

Dzięki miesięcznym rozliczeniom, można dokonać ocenę zasobów, które posiada system zdrowia, w których obszarach czas oczekiwania jest długi, na jakich terenach ten problem występuje. Możliwa jest realna analiza i rozpoznanie realnych potrzeb społeczeństwa dotyczących kwestii zdrowotnych, dzięki wykorzystaniu baz danych z zakresu zdrowia.

Należy zwrócić uwagę na wzrost umiejętności cyfrowych w grupie emerytów oraz w kategorii wiekowej 64-74 lat. W czasie pandemii wiele banków, ale także administracja publiczna zachęcała osoby starsze (a także młodsze do pomocy), aby skorzystały z możliwości zdalnego załatwienia wielu spraw, bez wizyty w placówkach bankowych czy urzędzie. Należy podejmować więcej takich działań w przyszłości, zwłaszcza gdy wejdą w życie e-Skierowania. Należałoby także zwiększyć ilość informacji dla niezalogowanych użytkowników, zwłaszcza a profilaktyce, programach zdrowotnych i działaniach pro zdrowotnych w gminach w całej Polsce. Pomoże to w uświadomienie uczestnikom kreacji polityki zdrowotnej współodpowiedzialności za stan zdrowia społeczeństwa, zwłaszcza na linii pacjent władza publiczna.

Systemy cyfrowe są nową i niezbadaną materią dla systemu administracji państwa. Ochrona zdrowia w Polsce po wielu latach może stać się cyfrowa. Należy pamiętać jednak o wsparciu podmiotów medycznych w procesie cyfryzacji.

Literatura

1. Krzemińska W., *Co z tą cyfryzacją*, [w:] Krzemińska W., Nowak W. (red.), *Cyfryzacja w procesach komunikowania*, Sorus Wydawnictwo i Drukarnia, Poznań 2007, s. 11-23.
2. Stempnakowski Z., *Administracja elektroniczna*, [w:] Szewczyk A. (red.), *Spoleczeństwo informacyjne – problemy rozwoju*, Difin, Warszawa 2007, s. 44-76.
3. Muchacki M., *Cywilizacja informatyczna i Internet*, Impuls, Kraków 2014, s. 87.
4. Przybyłka A., *Systemy ochrony zdrowia*, Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego, Katowice 2001, s. 12.
5. Konstytucja Światowej Organizacji Zdrowia, Porozumienie zawarte przez Rządy reprezentowane na Międzynarodowej Konferencji Zdrowia i Protokół dotyczący Międzynarodowego Urzędu Higieny Publicznej, podpisane w Nowym Jorku dnia 22 lipca 1946 r., Dz.U. 1948, nr 61, poz. 477.
6. Leowski J., *Polityka zdrowotna a zdrowie publiczne. Ochrona zdrowia w gospodarce rynkowej*, CeDeWu, Warszawa 2009, s. 28.
7. Karski J.B., *Polityka zdrowotna samorządu terytorialnego a członkostwo Polski w Unii Europejskiej*, CeDeWu, Warszawa 2005, s. 10-11.

8. Włodarczyk C., *Polityka zdrowotna w państwie demokratycznym*, Vesalius, Łódź-Kraków-Warszawa 1996.
9. Grycner S., *Polityka zdrowotna*, CeDeWu, Warszawa 2015, s. 28.
10. Przybyłka A., *Systemy...*, poz. cyt., s. 11.
11. Włodarczyk C., *Polityka zdrowotna w państwie demokratycznym*, Vesalius, Łódź-Kraków-Warszawa 1996, s. 28.
12. Kulik T.B., Pacian A. (red.), *Zdrowie publiczne*, PZWL, Warszawa 2014, s. 248.
13. Karski J., *Postępy promocji zdrowia – przegląd międzynarodowy*, CeDeWu, Warszawa 2011, s. 14.
14. GUS, *Spoleczeństwo informacyjne w Polsce. Wyniki badań statystycznych z lat 2015-2019*, Warszawa, Szczecin 2019.
15. Muchacki M., *Cywilizacja informacyjna i Internet*, Impuls, Kraków 2014, s. 57.
16. Jadcak A., *CSIOZ rozstrzygnął przetargi na 256 mln zł*, <https://www.computerworld.pl/news/CSIOZ-rozstrzygnal-przetargi-na-256-mln-zl,379683.html>, data dostępu 14 VI 2020.
17. Uchwała Nr 117/2016 Rady Ministrów z dnia 27 września 2016 r. zmieniająca uchwałę w sprawie przyjęcia programu rozwoju „Program Zintegrowanej Informatyzacji Państwa”.
18. Markłowska-Dzierżak M., *Pierwsza faza programu pilotażowego e-recepty już się zakończyła*, <https://pulsfarmacji.pl/4706227,76237,pierwsza-faza-programu-pilotazowego-e-recepty-juz-sie-zakonczyła>, data dostępu 1 VII 2020.
19. Centrum e-Zdrowia, *E-usługi*, <https://cez.gov.pl/projekty/realizowane/e-uslugi/>, data dostępu 1 VII 2020.
20. Szubkowska S., Zieliński R., *EPUAP kosztuje miliony, a mało kto z niego korzysta*, <https://forsal.pl/artykuly/773790,epuap-kosztuje-miliony-a-malo-kto-z-niego-korzysta.html>, data dostępu 1 VII 2020.
21. Interia Biznes, *Już ponad milion osób ma dostęp do ePUAP*, <https://biznes.interia.pl/gospodarka/news-juz-ponad-milion-osob-ma-dostep-do-epuap,nId,4026465>, data dostępu 1 VII 2020.
22. Ministerstwo Cyfryzacji, *Mamy to! 3 miliony Polaków ma już Profil Zaufany. Dołącz do nas!*, <https://www.gov.pl/web/cyfryzacja/mamy-to-3-miliony-polakow-ma-juz-profil-zaufany-dolacz-do-nas>, data dostępu 1 VII 2020.
23. Ministerstwo Cyfryzacji, *4 miliony Polaków ma już Profil Zaufany!*, <https://www.gov.pl/web/cyfryzacja/4-miliony-polakow-ma-juz-profil-zaufany>, data dostępu 1 VII 2020.
24. Ministerstwo Cyfryzacji, *Ponad 5 milionów Polaków ma już profil zaufany!*, <https://www.gov.pl/web/cyfryzacja/ponad-5-milionow-polakow-ma-juz-profil-zaufany>, data dostępu 1 VII 2020.
25. *6 milionów Polaków z profilem zaufanym*, <https://www.gov.pl/web/cyfryzacja/6-milionow-polakow-z-profilem-zaufanym>, data dostępu 1 VII 2020.
26. Ustawa z dnia 27 sierpnia 2004 r. o świadczeniach opieki zdrowotnej finansowanych ze środków publicznych, Dz.U. 2004 nr 210 poz. 2135, art. 19-23.
27. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 19 kwietnia 2013 r. w sprawie Systemu Rejestru Usług Medycznych Narodowego Funduszu Zdrowia, Dz.U. 2013 poz. 514.
28. Markłowska-Dzierżak M., *Pierwsza faza programu pilotażowego e-recepty już się zakończyła*, <https://pulsfarmacji.pl/4706227,76237,pierwsza-faza-programu-pilotazowego-e-recepty-juz-sie-zakonczyła>, data dostępu 1 VII 2020.
29. Chmielewska M., *Janusz Cieszyński: 7 stycznia wystawiono ponad 1.6 mln e-recept*, <https://www.medexpress.pl/7-stycznia-wystawiono-ponad-1-6-mln-e-recept/75968>, data dostępu 1 VII 2020.

30. Ministerstwo Cyfryzacji, *Wystartowała aplikacja mObywatel*, <https://www.gov.pl/web/cyfryzacja/oficjalna-premiera-aplikacji-mobywatel-transmisja-online>, data dostępu 1 VII 2020.
31. Msnet, *Aplikacja mObywatel ma pół miliona aktywnych użytkowników – powiedział minister cyfryzacji Marek Zagórski*, <https://www.telepolis.pl/wiadomosci/aplikacje-i-rozrywka/mobywatel-pol-miliona-aktywnych-uzytkownikow-marek-zagorski-minister-cyfryzacji>, data dostępu 1 VII 2020.
32. Redakcja, *Czas start e-recepty. Już ruszyły*, <https://niezalezna.pl/305216-czas-start-e-recepty-juz-ruszyly>, data dostępu 31 VI 2020.

E-government w systemie ochrony zdrowia – Internetowe Konto Pacjenta

Streszczenie

Współczesny świat jest cyfrowy, znaczna część społeczeństwa korzysta z systemów informatycznych w codziennym życiu. Aspekt cyfryzacji dotknął także systemy państwowe, działające w ramach administracji publicznej. Poprzez zastosowanie procesu cyfryzacji państwa następuje proces tworzenia się e-Government (e-Administracji). Pacjent może także skorzystać z dedykowanych mu systemów informatycznych w administracji państwowej. Platforma zbierająca większość danych pacjenta to uruchomionym w lutym 2019 Internetowe Konto Pacjenta (IKP), na którym zalogowany użytkownik może sprawdzić swój status ubezpieczenia (eWUŚ), zobaczyć swoje zwolnienia lekarskie (eZLA) czy recepty (eRecepta). Ma także podgląd do wykonanych procedur medycznych w ramach NFZ (RUM). Interfejs oraz rola tych podsystemów dostosowana jest do użytkownika indywidualnego – pacjenta. Problem badawczy został określony jako: Jak Internetowe Konto Pacjenta usprawnienia realizację zadań polityki zdrowotnej? Celem opracowania jest zbadanie funkcjonowanie i wykorzystanie narzędzia e-government, jakim jest Internetowe Konto Pacjenta w publicznym systemie ochrony zdrowia przez jego aktorów. W celu zbadania relacji pomiędzy podmiotami w systemach IT, wykorzystano diagramy przepływu danych (ang. *Data Flow Diagram*), jest to prezentacja przepływu danych w formie graficznej. Metoda analizy systemowej została wykorzystana w celu analizy publicznego systemu ochrony zdrowia wraz z działającymi w nim IKP. Metoda porównawcza pomogła określić zadania podmiotów w polityce zdrowotnej oraz rolę, jaką spełniają w systemie IKP. Organy państwowe wymuszają na usługodawcach medycznych korzystanie z systemów informatycznych, bez nich nie można realizować kontraktu z NFZ. Okres pandemii wpływa na wzrost wykorzystania publicznych systemów IT przez obywateli, także w dziedzinie ochrony zdrowia (np. wyszukiwanie informacji o SARS-CoV2). Kolejne lata działania IKP pozwolą na głębszą analizę działania tego narzędzia e-Government.

Słowa kluczowe: polityka publiczna, zdrowie, ochrona zdrowia, e-administracja, cyfryzacja

E-government in the health care system – Patient Internet Account

Abstract

The modern world is digital, a significant part of society uses information systems in everyday life. The digitization aspect also affected systems operating within public administration. By applying the process of digitizing the state, the process of creating e-Government takes place. The patient can also use dedicated IT systems in the state administration. The platform that collects most of the patient's data is the Internet Patient Account (IKP) launched in February 2019. The logged user, can check insurance status (eWUŚ), see sick leave (eZLA) or prescriptions (eRecepta). User can view the medical procedures performed under the National Health Fund (RUM). The interface and the role of these subsystems is adapted to the individual user – the patient. The research problem was defined as: How can the Internet Patient Account improve the implementation of health policy tasks? The aim of the study is to examine the functioning and use of the e-government tool, which is the Patient's Internet Account, in the public health care system by its actors. In order to examine the relationship between entities in IT systems, Data Flow Diagrams were used, it is a presentation of data flow in a graphic form. The system analysis method was used to analyze the public health care system together with the IKP operating in it. The comparative method helped to define the tasks of entities in health policy and the roles they play in the IKP system. State authorities force medical service providers to use IT systems, without them it is impossible to perform contracts with the National Health Fund. The period of the pandemic affects the increase in the use of public IT systems by citizens, also in the field of health care (e.g. searching for information on SARS-CoV2). The following years of IKP operation will allow for a deeper analysis of the operation of this e-Government tool.

Keywords: public policy, health, Healthcare, e-government, digitization

Wpływ wirusa wywołującego COVID-19 na człowieka i rozwój nauk przyrodniczych

1. Wstęp

Choroba koronawirusowa COVID-19 jest wywoływana przez SARS-CoV-2. Stanowi ona poważny problem zdrowotny na całej kuli ziemskiej. COVID-19 prowadzi do poważnych powikłań zdrowotnych i jest uznawana za chorobę śmiertelną. Według analizy filogenetycznej wykazano, iż ten koronawirus wywołujący COVID-19 jest wirusem odzwierzęcym. Prawdopodobnie pochodzi od nietoperza. W związku z rozprzestrzenianiem się wirusa konieczne jest ograniczanie kontaktów międzyludzkich [1].

2. Cel pracy, materiały i metody

Celem pracy jest omówienie aktualnej wiedzy na temat choroby koronawirusowej oraz na przedstawienie istoty rozwoju nauk przyrodniczych pomocnych w diagnozowaniu i leczeniu choroby. W pracy wykorzystano przegląd dostępnej literatury dotyczący tej tematyki, pochodzącej m.in.: z bazy PubMed, Google Scholar, Medline.

3. Koronawirus

Według raportu Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) w grudniu 2019 r. w miejscowości Wuhan u pacjenta z ostrą niewydolnością oddechową zidentyfikowano nowego koronawirusa. Wirus wywołujący COVID-19 początkowo był zwany jako 2019-nCoV. Jest on pod względem klinicznym i patogennym podobny do koronawirusa zespołu ostrej niewydolności oddechowej. COVID-19 jest wywoływany przez wirusa SARS-CoV-2. Wirus ten to czynnik chorobotwórczy, który należy do grupy wirusów RNA. CoV to wirusy, które pod mikroskopem elektronowym wyglądają jak korony, gdyż mają dodatnią nić z obecnymi glikoproteinami na kolczastej otoczce. Nazwa COVID-19 została nadana przez Światową Organizację Zdrowia. Nazwa zawiera kilka pojęć „CO” – korona, „VI” – wirus, „D” – choroba, 19 – rok pojawienia się wirusa [2-4].

3.1. Objawy choroby koronawirusowej COVID-19

Według danych przedstawionych przez WHO okres inkubacji wirusa powodującego COVID-19 waha się przedziale 1-14 dni. Najczęściej wynosi około 5 dni. Choroba ta objawia się poprzez wysoką temperaturę ciała, kaszel oraz zmęczenie. Inne objawy obejmują wytwarzanie płwociny, ból głowy, biegunkę, duszność, krwioplucie i limfopenię. Wirus ten prowadzi do wystąpienia zespołu ostrej niewydolności oddechowej, a w ciężkich przypadkach obustronne rozlane uszkodzenie pęcherzyków płucnych. Zakażenie wirusem u młodych ludzi może być praktycznie niezauważalne. Choroba może przebiegać bez podwyższonej temperatury oraz bez kaszlu. Zauważalnym objawem może być lekkie klucie w płucach i obniżony zmysł węchu i smaku. Przebieg

¹ izabela.oles97@gmail.com, Katedra Pielęgniarstwa i Położnictwa, Collegium Medicum, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach.

choroby koronawirusowej jest bardzo zróżnicowany. Może przybierać formę bezobjawową, łagodną chorobę układu oddechowego, jak również ciężkie zapalenie płuc z zespołem ostrej niewydolności oddechowej, a nawet niewydolnością wielonarządową [5, 9].

3.2. Rozprzestrzenianie wirusa

Pierwsze przypadki choroby COVID-19 odnotowano w Chinach. Były one związane z bezpośrednią ekspozycją na tak zwany mokry targu w mieście Wuhan. Za główny mechanizm uznano przenoszenie wirusa ze zwierzęcia na człowieka. Kolejne przypadki zachorowań nie były jednak związane z tym mechanizmem. Wywnioskowano, iż wirus można przenosić się także z człowieka na człowieka. Osoby, które mają objawy zakażenia zostały uznane jako główne źródło rozprzestrzeniania się wirusa. Osoba zakażona koronawirusem może nie wykazywać objawów, jednakże jest ona nosicielem choroby koronawirusowej i może zarażać nieświadomie innych. Przenoszenie się wirusa następuje głównie poprzez bezpośredni kontakt lub poprzez rozprzestrzenianie się kropelek przez kaszel lub kichanie od zarażonej osoby. Z tego faktu, stwierdzono, że izolacja jest najlepszym sposobem na zastopowanie transmisji wirusa. SARS-CoV-2 przenosi się drogą kontaktową i kropelkową – do zakażenia dochodzi podczas osiadania aerozolu wytworzonego podczas kaszlu, czy kichania osoby chorej na błonach śluzowych osoby zdrowej (błony jamy ustnej, nosowej, a także spojówek) [3, 5, 6].

3.3. Rozpoznanie zakażenia wirusem SARS-CoV-2

U pacjenta z podejrzeniem choroby COVID-19 pobiera się materiał diagnostyczny w postaci wymazu, próbki krwi, czy wydzieliny. W celach diagnostycznych pobiera się próbki z górnych dróg oddechowych: wymazy z gardła lub nosogardła, popłuczyny, aspiraty z nosogardła. Można również pobrać krew. Pobrany materiał poddaje się badaniom laboratoryjnym na obecność koronawirusa. W diagnostyce COVID-19 wykonuje się testy serologiczne z próbki krwi żyłnej, testy kasetkowe z próbki krwi włosniczkowej lub żyłnej, testy metodą RT-PCR za pomocą pobranego wymazu. Metoda PT-PCR jest rekomendowana przez WHO, służy ona do wykrywania obecności wirusa SARS-CoV-2. Na wynik testu oczekuje się od 1 do 3 dni. Metoda testu kasetkowego polega na jakościowym oznaczeniu przeciwciał anti-SARS-CoV-2. Dodatni wynik badania może świadczyć o przebyciu zakażenia w przeszłości, bądź toczącej się infekcji. Test ten nie służy do rozpoznawania COVID-19. W przypadku badań serologicznych rozpoznawane jest przebycie lub proces toczącej się infekcji. Test ten nie jest testem służącym do diagnostyki COVID-19 [7].

3.4. Algorytm postępowania i leczenia w przypadku choroby koronawirusowej

Gdy u pacjenta zdiagnozowany zostanie COVID-19 istnieje pewien sposób postępowania, pewien algorytm, który obowiązuje w przypadku potwierdzenia choroby. Pacjent skąpoobjawowy ze zdiagnozowaną chorobą COVID-19 musi udać się do domu transportem własnym, bądź sanitarnym. Jako takiego pacjenta uznaje się chorego spełniającego kliniczne lub epidemiologiczne kryteria przypadku podejrzanego o COVID-19. Chory zostaje poddany ocenie pielęgniarskiej. Nie priorytetyzuje się osób z ciepłotą ciała poniżej 38°C, liczbą oddechów poniżej 20/min oraz saturacją

krwi tętnicznej powyżej 95%. Następnie taka osoba odbywa konsultację lekarską u to lekarz decyduje o tym, gdzie pacjent ma przebywać podczas trwania choroby. Lekarz informuje stację sanitarno-epidemiologiczną o potwierdzonym przypadku choroby koronawirusowej w celu podjęcia odpowiednich procedur oraz wszczęciu leczenia objawowego. Pacjent po konsultacji lekarskiej udaje się do domu transportem sanitarnych. W przypadku braku możliwości leczenia w warunkach domowych, powinien się udać do miejsca izolacji wskazanego przez Wojewodę. Sanepid pobiera wymazy kontrolne od chorych w miejscu izolacji po upływie 10-12 dni od wystąpienia objawów. U dzieci wymazy kontrolne są pobierane do 14 dni od wystąpienia objawów, bądź od potwierdzenia wystąpienia zakażenia. W przypadku pacjentów, u których choroba koronawirusowa przebiega bezobjawowo ponowny wymaz jest pobierany 10-12 dni od pobrania wymazu, wykazującego zakażenie SARS-CoV-2. Kiedy wynik testu kontrolnego wyjdzie ujemny w takim przypadku wykonuje się drugie badanie kontrolne po przynajmniej 24 godzinach. Po uzyskaniu dwukrotnego wyniku ujemnego pacjent może zostać zwolniony z izolacji. Pacjent po zwolnieniu z izolacji dostaje zalecenia odnośnie zachowania szczególnej higieny rąk przez przynajmniej 7 dni. W przypadku któregośkolwiek dodatniego wyniku testu kontrolnego, badania należy powtarzać do czasu uzyskania wyniku ujemnego. Należy zachować 7-dniowy odstęp między badaniami [8].

Leczenie pacjentów niewykazujących objawów, czy skąpoobjawowych zakażonych SARS-CoV-2 polega na izolacji i łagodzeniu objawów. W przypadku cięższych postaci zakażenia pacjenci przebywają w szpitalu. Na obecnym etapie nie wynaleziono jeszcze szczepionki, ani swoistego systemu leków przeciwwirusowych, które miałyby zastosowanie w leczeniu krytycznie chorych pacjentów. Podczas pracy z osobami z dodatnim wynikiem testu leczenie koncentruje się głównie na zapewnieniu opieki podtrzymującej. Opieka ta polega na dotlenianiu, wentylacji i płynoterapii. W ramach krytycznego postępowania z COVID-19 stosuje się leczenie kortykosteroidowe i przeciwwirusowe, a także stosuje się inhalację atomową interferonu. Innymi zgłoszonymi środkami terapeutycznymi stosowanymi w leczeniu ciężko chorych pacjentów są środki przeciwwirusowe, leki przeciwmalaryczne, w Chinach stosowane są również zabiegi ziołowe [9].

4. Dane epidemiologiczne z dnia 13.06.2020 r.

Według danych z raportu sytuacyjnego Światowej Organizacji Zdrowia z dnia 13 czerwca 2020 roku na całym świecie odnotowano 7 553 182 przypadków zachorowań na chorobę koronawirusową. Z powodu zakażenia SARS-CoV-2 zmarło aż 423 349 osób. Dotychczas najwięcej zakażeń odnotowano w Ameryce (3638 525 przypadków), tam też zmarło najwięcej osób w skali całego świata. Europa znajduje się na drugim miejscu pod względem liczby zachorowań. Najmniej odnotowanych przypadków jest w Afryce. Liczba osób chorych wynosi tam 161 254. W Polsce odnotowano 28 577, w tym 376 nowych przypadków, zmarło 1 222 osób [10].

5. Wpływ zakażenia SARS-CoV-2 na zdrowie psychiczne człowieka

Choroby zakaźne są znane ludzkości od bardzo dawna. Pojawianie się ich powodowało różne reakcje psychologiczne u społeczeństwa. W wyniku szczerzenia się chorób ludzkość była zobligowana do zmiany zachowań i zwyczajów w celu zapobiegania rozprzestrzenianiu się zarazy. W walkach z epidemiami zostawały wprowadzane

różne metody leczenia, te skuteczne i te mniej. Aby wyeliminować niektóre choroby konieczne było stworzenie odpowiedniej szczepionki [11].

Pandemia COVID-19 jest zagrożeniem dla życia i zdrowia człowieka. Spowodowała ona istotne zmiany w codziennym funkcjonowaniu. Niektóre są postrzegane przez społeczeństwo jako negatywne [12].

Wiadomo, jakie jest w skutkach zakażenie SARS-CoV-2 na zdrowie człowieka. Choroba koronawirusowa wpływa również na zdrowie psychiczne. Według badań przeprowadzonych w Polsce i na świecie wysunięto wnioski, iż pandemia może wpływać negatywnie na zdrowie psychiczne człowieka. Jest to ściśle związane ze zmianami, do jakich doszło i do jakich człowiek musiał się przystosować w związku z wybuchem pandemii koronawirusa. Czynniki te mogą się przyczyniać do nasilania depresji i leku u całej populacji. Podwyższone nasilenie tych objawów może w obecnej sytuacji wydawać się za całkiem normalne, gdyż jest to związane z naturalną reakcją na zmiany, wyzwania, zagrożenia i niepewność związaną z postępem epidemii i jej konsekwencjami. U niektórych osób epidemia i jej konsekwencje mogą być przyczyną poważnego w konsekwencjach stresu, z którym człowiek nie potrafi sobie poradzić. Stan taki prowadzi to rozwoju objawów depresyjnych i lękowych [13].

Niektóre grupy społeczne mogą być bardziej narażone na skutki epidemii w sferze psychicznej. Epidemia szczególnie może wpływać na osoby, które w tym czasie muszą się mierzyć z całkowicie nowymi doświadczeniami. Sytuacja ta wpływa w szczególności na osoby, które nisko oceniają swoją sytuację materialną, gdyż strach i lęk przed jeszcze gorszym stanem materialnym wpływa niekorzystnie na ludzi. Sytuacja epidemiologiczna w kraju zmusiła wielu studentów, osoby wchodzące w dorosłe życie do ponownego zamieszkania w domu rodzinnym. Osoby te mogą się mierzyć z poważnymi konfliktami interpersonalnymi z rodzicami. Niegdyś normalne życie wielu ludzi przez pandemię zostało poddane próbie poprzez wprowadzenie wielu obostrzeń. Sytuacje takie mogą powodować zaniepokojenie i przygnębienie. Ograniczenie kontaktów społecznych może powodować osamotnienie. W czasie epidemii zupełnie nowym wyzwaniem dla nauczycieli, uczniów, studentów jest zdalne nauczanie. Lęk przed nie poradzeniem sobie w nowej rzeczywistości może powodować przygnębienie i smutek. Pojawienie się COVID-19 postawiło przed tymi grupami niesamowite wyzwania. Nie każda z osób zmierzająca się z nowymi wyzwaniami jest w stanie sobie poradzić. Sytuacja taka wyzwała negatywne emocje i stres. Podane sytuacje wymagają rozwoju nowych schematów postępowania dla społeczeństwa. Kiedy występuje brak możliwości bądź występują poważne utrudnienia w rozwiązywaniu problemów i radzeniu sobie w sytuacjach problemowych dochodzić może do przeciążenia emocjonalnego. Często tak się dzieje przy braku wsparcia społecznego. Przeciążenie emocjonalne może przybierać formę smutku i niepokoju. Postać i nasilenie tych objawów są zbliżone do zaburzeń depresyjnych i/lub lękowych [12].

Stany depresji i lęku rozwinięte podczas epidemii są przede wszystkim wyrazem przejściowych problemów adaptacyjnych. U niektórych osób mogą stanowić poważniejszy problem psychiczny. Osoby te mogą wymagać profesjonalnej pomocy specjalistycznej. W wyniku pandemii u populacji może dochodzić do występowania pandemicznego ostrego zaburzenia stresowego. Objawia się ono poprzez przedłużoną reakcję lękową oraz stałe przeżywanie traumy. Obserwowane jest stałe przedłużanie się strachu i poczucia bezradności. Występują również stany paniki, beznadziei oraz rozpacz [13].

6. Wpływ rozwoju nauki na skuteczną walkę z COVID-19

Pandemia koronawirusa na świecie przyczyniła się do rozwoju nauki. W zetknięciu z niepożądaną zarazą konieczne było wynalezienie testów, które będą przydatne w diagnostyce zakażeń SARS-CoV-2. Ważnym również aspektem dla rozwoju nauki i leczenia choroby koronawirusowej jest odkrycie działania osocza ozdowieńców podawanych osobom chorym. Sytuacja epidemiologiczna postawiła świat do góry nogami. Aby móc ograniczać zachorowania konieczne jest stosowanie zachowań prewencyjnych, jednakże należało przeprowadzić badania wirusologiczne, aby dowiedzieć się jakie środki ochrony osobistej będą pomocne w walce z koronawirusem. Obecnie cały czas trwają poszukiwania skutecznej substancji w leczeniu COVID-19 [5, 14].

Wirusologia jest działem mikrobiologii, który zajmuje się badaniem wirusów. Bada ich systematykę, budowę, właściwości antygenowe i chorobotwórcze. Wirusologia zajmuje się również opracowywaniem metod izolacji, oczyszczania, namnażania i zwalczania wirusów [14].

Poprzez zetknięcie narodu z pandemią koronawirusa konieczny był rozwój nauk pod kątem diagnostycznym, leczniczym i zapobiegawczym. Aby dokonać tego konieczne było wyizolowanie i zbadanie właściwości wirusa. Wciąż trwają prace nad opracowaniem odpowiedniej i skutecznej szczepionki, która pomoże zastopować rozwój SARS-CoV-2. Pojawienie się tego koronawirusa było szybkim impulsem, aby badacze zajęli się wynalezieniem metod diagnostyki. Dzięki przeprowadzanym badaniom w leczeniu COVID-19 wiadomo, jakie leki mogą pomagać w walce z wirusem. Remdesivir jest obecnie w fazie testów w kilkunastu instytucjach medycznych w Wuhan i wiadomo, że zapobiega MERS-CoV. Dowiedziono również, że przeciwmalaryczny fosforan chlorochiny ze względu na jego działanie przeciwwirusowe i przeciwzapalne skutecznie hamuje zaostrzenia zapalenia płuc. W Chinach w leczeniu objawów koronawirusa stosowane są zabiegi ziołowe. Do nich używane są zioła takie jak: *Astragali Radix*, *Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma*, *Saposhnikoviae Radix*, *Attractylodis Macrocephalae Rhizoma* oraz *Lonicerae Japonicae*. Podczas ostatniej epidemii SARS-COV były one również stosowane i przynosiły pozytywne korzyści terapii [9].

Metodą diagnostyki COVID-19 jest wykrywanie kwasów nukleinowych SARS-CoV-2. Polega to na pobraniu wymazu od osoby podejrzanej o zakażenie COVID-19. Aby zwiększyć czułość wykrywania wirusa kluczowe jest pobranie właściwej próbki w odpowiedni sposób i o właściwym czasie. Dużą zawartością kwasów nukleinowych charakteryzują się próbki pobierane z dolnych dróg oddechowych oraz płwocina. Jeśli na początku choroby przeprowadzony test na obecność kwasów nukleinowych wyjdzie ujemny należy przeprowadzić następne badanie, ponieważ najwyższa aktywność wirusa pojawia się w granicach 3 do 5 dni od początku choroby. Po zainfekowaniu organizmu koronawirusem możliwe jest wykrywanie specyficznych przeciwciał w osoczu. Specyficzne przeciwciała IgM dodatnie lub przeciwciała IgG cztery razy wyższe w fazie zdrowienia niż w fazie ostrej choroby mogą być używane jako kryterium diagnostyczne u pacjentów, u których podejrzewamy zakażenie SARS-CoV-2. Podstawę do tworzenia strategii leczenia stanowi wykrywanie wskaźników odpowiedzi zapalnej. Pozwala to na ocenę stanu klinicznego pacjenta. Ułatwia również poznanie skłonności chorego do ciężkiego bądź krytycznego przebiegu choroby [15].

7. Podsumowanie

Pandemia koronawirusa w znaczny sposób wpłynęła na funkcjonowanie społeczeństwa. Wiele osób zachorowało już na chorobę koronawirusową. Epidemia zbiera również śmiertelne żniwo. Zaobserwowano negatywny wpływ pojawienia się wirusa na zdrowie człowieka, również zdrowie psychiczne. Dowiedziano, iż izolacja społeczna jest jedną z metod zapobiegania rozprzestrzenianiu się SARS-CoV-2, gdyż przenosi się on z człowieka na człowieka. Rozwój nauk pod kątem diagnostyki, leczenia i zapobiegania zakażeniu koronawirusem okazują się kluczowe w tej walce. Testy na obecność koronawirusa stają się coraz bardziej dostępne i każdy obywatel może je wykonać. Badaczom udało się wyizolować wirusa. Stosowane jest leczenie objawowe. W dalszym ciągu trwają prace nad wynalezieniem szczepionki, która zahamuje rozprzestrzenianie się SARS-CoV-2.

Literatura

1. Rothan A.H., Byrareddy N.S., *The epidemiology and pathogenesis of corona virus disease (COVID-19) outbreak*, Journal of Autoimmunity, 109, 2020, s. 1-4.
2. World Health Organization, Novel Coronavirus (2019-nCoV). Situation report, <http://www.who.int/docs/default-source/co-ronaviruses/situation-reports/20200121-strip-1-2019-ncov.pdf>, 12.06.2020.
3. Kannan S., Shaik Syed Ali P., Sheeza A., Hemalatha K., *COVID-19 (Novel Coronavirus 2019) – Recent Trends*, European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 24, 2020, s. 2006-2011.
4. Cascella M., Rajnik M., Cuomo A., Dulebohn C. D., Di Napoli R., *Features, Evaluation and Treatment Coronavirus (COVID-19)*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/?report=printable>, [12.06.2020].
5. Krzystyniak K., *KORONAWIRUS – COVID-19, MERS, SARS – epidemiologia, leczenie, profilaktyka*, Medyk, 2020.
6. Bereza D., Biały M., Bieniasz J., *Epidemiologia*, [https://www.umed.wroc.pl/sites/default/files/files/aktualnosci/2020/03/COVID_19_1_0_popraviony_26_03_2020__wersja_po_formatowaniu_\(2\).pdf](https://www.umed.wroc.pl/sites/default/files/files/aktualnosci/2020/03/COVID_19_1_0_popraviony_26_03_2020__wersja_po_formatowaniu_(2).pdf), [14.06.2020].
7. Bielawska-Drózd A., Michalski A., Cieślak P., Makowski P., Kocik J., *Metody diagnostyki laboratoryjnej COVID-1*, <https://wiedzamedyczna.pl/index.php/wm/article/view/41/15>, [12.06.2020].
8. Kocik J., Pinkas J., *Rozpoznanie i leczenie łagodnych przypadków COVID-19 w warunkach domowych – wyzwania i ryzyka*, Wiedza Medyczna, 2020, s. 10-13.
9. Cunningham A.C., Goh H.P., Koh D., *Treatment of COVID-19: old tricks for new challenges*, Cunningham et al. Critical Care, 2020, s. 24, 91.
10. Światowa Organizacja Zdrowia, Raport sytuacyjny- 145, https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200613-covid-19-sitrep-145.pdf?sfvrsn=bb7c1dc9_2, [14.06.2020].
11. Hays J.N., *Epidemics and pandemics: Their impacts on human history*, ABC- CLIO; Santa Barbara 2005, s. 23-24.
12. Gambina M., Sękowski M., Woźniak-Prus M., Cudo A., Hansen K., Gorgol J., Huflejt-Łukasik M., Kmita G., Kubička K., Łyś A.E., Maison D., dr Oleksy T., Wnuk A., *Uwarunkowania objawów depresji i lęku uogólnionego u dorosłych Polaków w trakcie epidemii Covid-19 - raport z pierwszej fali badania podłużnego*, http://psych.uw.edu.pl/wp-content/uploads/sites/98/2020/05/Uwarunkowania_objawow_depresji_leku_w_trakcie_pandemii_raport.pdf, [14.06.2020].
13. Heitzman J., *Wpływ pandemii COVID-19 na zdrowie psychiczne*, Psychiatria Polska, 2020, 54, s. 187-198.

14. Collier L., Oxford J., *Wirusologia: podręcznik dla studentów medycyny, stomatologii i mikrobiologii*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2001.
15. *Podręcznik prewencji i leczenia COVID-19*, <https://ptp.edu.pl/covid-19/351%20podrecznik-prewencji-i-leczenia-covid-19>, 16.06.2020.

Wpływ wirusa wywołującego COVID-19 na człowieka i rozwój nauk przyrodniczych

Streszczenie

Choroba koronawirusowa COVID-19 jest wywoływana przez SARS-CoV-2. Stanowi ona poważny problem zdrowotny na całej kuli ziemskiej. COVID-19 prowadzi do poważnych powikłań zdrowotnych i jest uznawana za chorobę śmiertelną. Pierwsze przypadki choroby COVID-19 odnotowano w Chinach. W związku z rozprzestrzenieniem się wirusa konieczne jest ograniczanie kontaktów międzyludzkich. Celem pracy było omówienie aktualnej wiedzy na temat choroby koronawirusowej oraz przedstawienie istoty rozwoju nauk przyrodniczych pomagających w diagnozowaniu i leczeniu choroby. W pracy wykorzystano przegląd dostępnej literatury dotyczący tej tematyki, pochodzącej m.in. z bazy PubMed, Google Scholar, Medline. Według badań przeprowadzonych w Polsce i na świecie wysunięto wnioski, iż pandemia może wpływać negatywnie na zdrowie psychiczne człowieka. Przyczynia się ona do nasilania depresji i leku u całej populacji. Pandemia koronawirusa na świecie przyczyniła się do rozwoju nauki. Rozwój nauk pod kątem diagnostyki, leczenia i zapobiegania zakażeniu wirusem okazują się kluczowe w tej walce. Testy na obecność koronawirusa stają się coraz bardziej dostępne i każdy obywatel może je wykonać. Polegają one na wykrywaniu kwasów nukleinowych SARS-CoV-2. Badaczom udało się wyizolować wirusa. Podczas pracy z pacjentami z dodatnim wynikiem testu na koronawirusa koncentruje się głównie na zapewnieniu opieki podtrzymującej. Opieka ta polega na dotlenianiu, wentylacji i zarządzaniu płynami. Stosowane jest leczenie objawowe. W dalszym ciągu trwają prace nad wynalezieniem szczepionki, która zahamuje rozprzestrzenianie SARS-CoV-2.

Słowa kluczowe: koronawirus, rozwój nauki, wirus, człowiek

Impact of the virus causing COVID-19 on humans and the development of life sciences

Abstract

COVID-19 coronavirus disease is caused by SARS-CoV-2. It is a serious health problem throughout the globe. COVID-19 leads to serious health complications and is considered a fatal disease. The first cases of COVID-19 disease have been reported in China. Due to the spread of the virus, it is necessary to limit people-to-people contacts. The aim of the study was to discuss current knowledge about coronavirus disease and to present the essence of the development of natural sciences that help diagnose and treat the disease. The work uses a review of the available literature on this subject, originating, among others from PubMed, Google Scholar, Medline. According to research carried out in Poland and in the world, conclusions have been drawn that pandemics may have a negative impact on human mental health. It contributes to the aggravation of depression and the drug in the entire population. The coronavirus pandemic in the world has contributed to the development of science. The development of sciences for diagnosis, treatment and prevention of viral infection is proving to be crucial in this fight. Coronavirus tests are becoming more available and can be done by any citizen. Researchers in several countries have been able to isolate the virus. Effective COVID-19 treatment is still not available. Symptomatic treatment is used. Work is still underway to develop a vaccine that will stop the spread of SARS-CoV-2. Coronavirus tests are becoming more available and can be done by any citizen. Researchers in several countries have been able to isolate the virus. Effective COVID-19 treatment is still not available. Symptomatic treatment is used. Work is still underway to develop a vaccine that will stop the spread of SARS-CoV-2. Coronavirus tests are becoming more available and can be done by any citizen. They rely on SARS-CoV-2 nucleic acid detection. Researchers have been able to isolate the virus. When working with patients with a positive coronavirus test, he focuses primarily on providing supportive care. This care consists of oxygenation, ventilation and fluid management. Symptomatic treatment is used. Work is still underway to develop a vaccine that will stop the spread of SARS-CoV-2.

Keywords: coronavirus, development of science, virus, human

Elongator – białkowy kompleks konserwowany wśród eukariontów, który reguluje proces transkrypcji i translacji

1. Wprowadzenie

Termin epigenetyka po raz pierwszy został użyty w połowie lat 40. W odniesieniu do badań nad „interakcjami między genami a ich produktami, które przyczyniają się do pojawienia się fenotypu” [1]. Obecnie słowo to określa gałąź biologii molekularnej, która bada mitotycznie lub mejotycznie przekazywane modyfikacje materiału genetycznego mogące wpływać na aktywność genów, jednocześnie pozostawiając nienaruszoną pierwszorzędową strukturę DNA. Do epigenetyki należą badania nad modyfikacjami DNA lub histonów, wariantami histonów, remodelowaniem chromatyny, składaniem nukleosomów i kierowanymi przez niekodujące cząsteczki RNA procesami związanymi z transkrypcją. Mechanizmy te wspólnie kształtują konformację chromatyny i tworzą epigenetyczną informację określającą transkrypcyjną aktywność genów. Obecnie badania z zakresu epigenetycznej regulacji ekspresji genów cieszą się dużym zainteresowaniem w różnych dziedzinach nauki dotyczących wielu organizmów, rozpoczynając od drożdży i kończąc na człowieku. Postępy w zrozumieniu epigenetycznych mechanizmów kontroli transkrypcji mogą przyczynić się do zrozumienia interakcji między organizmami żywymi a środowiskiem, ponieważ zmiany epigenetyczne powstają w odpowiedzi na czynniki środowiskowe [2].

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie aktualnej wiedzy na temat budowy i funkcji Elongatora, który jest białkowym kompleksem konserwowanym wśród eukariontów. Badania prowadzone na roślinach, w szczególności wykorzystujące roślinę modelową *Arabidopsis thaliana*, wskazują na szereg procesów kontrolowanych przez Elongator za pomocą epigenetycznych modyfikacji histonów i metylacji DNA, które regulują ekspresję genów. Elongator uczestniczy również w modyfikacji cząsteczek tRNA, kontrolując w ten sposób translację mRNA i biosyntezę białka. Jest to zatem drugi, obok epigenetycznego, mechanizm, za pomocą którego Elongator wpływa na ekspresję genów i fenotyp organizmów żywych nie wprowadzający zmian w pierwszorzędowej strukturze DNA.

2. Identyfikacja kompleksu Elongatora

Elongator to białkowy kompleks, który po raz pierwszy został zidentyfikowany w 1999 roku u drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*), kiedy odkryto jego zdolność wiązania polimerazy RNA II (RNAPII) oraz regulacji transkrypcji [3]. Opisano udział tego kompleksu w acetylacji nukleosomalnych histonów [4], a fenotyp szczepów

¹ mjarosz48@gmail.com, Katedra Genetyki, Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, upwr.edu.pl.

² magdalena.woloszynska@upwr.edu.pl, Katedra Genetyki, Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, upwr.edu.pl.

posiadających mutacje w genach kodujących podjednostki Elongatora wskazywał na defekt procesu transkrypcji, co wydawało się potwierdzać początkowe założenia o regulacji transkrypcji. Poza tym, u drożdży Elongator bierze udział w egzocytozie [5], oporności na zymocynę [6], wyciszaniu genów okołotelomerowych i naprawie DNA [7].

W pierwszej dekadzie XXI w. Elongator został zidentyfikowany u wielokomórkowych organizmów eukariotycznych, takich jak człowiek [8, 9], mysz domowa [10], *Caenorhabditis elegans* [11] oraz *A. thaliana* [12, 13]. Co więcej, homolog jednej z podjednostek kompleksu Elongatora – Elp3 został opisany u *archaea* [14]. Analiza komplementarności genów kodujących poszczególne podjednostki pomiędzy różnymi gatunkami potwierdziła konserwowany charakter kompleksu zarówno pod względem budowy, jak i interakcji pomiędzy poszczególnymi podjednostkami u drożdży [15], owadów [16, 17], nicieni [11], roślin [18] i człowieka [9].

3. Budowa Elongatora

Sześć podjednostek Elongatora, Elp1-6 jest rozdzielonych między dimer zawierający podjednostki Elp1-3 (który stanowi rdzeń kompleksu), a połączony z nim heksameryczny pierścień tworzony przez Elp4-6 (będący subkompleksem pomocniczym) [19-21]. Delecja któregokolwiek z genów kodujących podjednostki Elongatora prowadzi do defektu wzrostu oraz powstania fenotypu charakterystycznego dla warunków stresowych. Dowodzi to, że obecność każdej z podjednostek jest niezbędna dla zachowania funkcjonalności całego kompleksu.

Elp1 jest największą podjednostką Elongatora i zawiera dwie N-końcowe domeny WD40 oraz motyw tetratrikopeptydów (TPR) na C-końcu [22]. Silnie oddziałuje z Elp2 oraz Elp3 i najprawdopodobniej pełni funkcję rusztowania dla całego kompleksu, dzięki czemu zapewnia stabilność pozostałym podjednostkom. Elp1 pośredniczy również w interakcjach z czynnikami regulującymi aktywność Elongatora, o czym świadczy charakter domeny WD40, która na ogół jest ośrodkiem utrzymującym integralność przez tworzenie stabilnych interakcji typu białko-białko [23, 24]. Na C-końcu Elp1 zlokalizowany jest zasadowy region przypominający sygnał lokalizacji jądrowej NLS, który jest zaangażowany w regulację wiązania cząsteczek tRNA [25]. U drożdży aktywność Elongatora związana z modyfikacją tRNA regulowana jest przez fosforylację dwóch pozycji w podjednostce Elp1 (Ser-1198 oraz Ser-1202) [26].

Elp2 jest drugą największą podjednostką Elongatora i stanowi kolejny element rdzenia kompleksu. Zawiera dwie domeny WD40 o strukturze zwanej β śmigłem [27, 28]. Podobnie do Elp1, podjednostka Elp2 również bierze udział w modyfikacji cząsteczek tRNA [28] oraz wpływa na aktywność Elongatora jako acetylotransferazy i stanowi centrum wszelkich tworzonych przez niego kompleksów [27].

Elp3 jest ostatnią składową rdzenia kompleksu i odpowiada za aktywność enzymatyczną Elongatora. Jako jedyna z podjednostek posiada ortologi obecne u archeonów, bakterii i wirusów [14]. Elp3 posiada dwie domeny: N-końcową domenę wiążącą S-adenozylometioninę (SAM) oraz na C-końcu domenę HAT (z ang. *histone acetyltransferase*) prawdopodobnie odpowiedzialną za aktywność Elongatora podczas acetylacji białek. W domenie SAM zlokalizowane jest centrum żelazowo-siarkowe, którego organizacja przestrzenna przypomina sześciąt. Klaster ten na drodze mechanizmu rodnikowego ma zdolność wiązania i rozszczepiania S-adenozylometioniny.

Aktywność ta ma swój udział w modyfikacji urydyny w pozycji wahadłowej w obrębie pętli antykodonowej cząsteczek tRNA. Sekwencja domeny HAT wykazuje homologię w stosunku do przedstawicieli rodziny Gcn5 N-acetylotransferaz (GNAT) [29]. U drożdży Elongator odpowiada za acetylację lizyny 14 histonu H3 oraz lizyny 8 histonu H4 [4]. Konserwowany charakter Elp3, o którym świadczy zachowanie tej podjednostki wśród archaeonów i eukariontów, prowadzi do wniosku, iż domeny HAT i SAM pełnią pierwotne funkcje w modyfikacji tRNA [14].

Elp4, Elp5 i Elp6 są najmniejszymi podjednostkami Elongatora, które wspólnie tworzą subkompleks pomocniczy. Podjednostki te zostały wyizolowane jako kompleks białek związanych z HAT po zastosowaniu łagodniejszych warunków oczyszczania w porównaniu do wcześniej zidentyfikowanych trzech pierwszych podjednostek [20, 21]. W 2012 roku dwie grupy badawcze opublikowały wyniki analizy krystalograficznej Elp4, Elp5 i Elp6 u drożdży wykazując, że podjednostki te łączą się, tworząc heterotrimer. Jest to struktura zbudowana z trzech różnych białek, które wykazują pewien stopień podobieństwa strukturalnego. Heterotrimer następnie dimeryzuje do heteroheksamerycznego pierścienia [30, 31]. Opisane struktury krystaliczne ujawniły, że podjednostki subkompleksu pomocniczego przyjmują identyczną formę fałdowania jak RecA-podobne ATP-azy. Budowa ta umożliwiła Elongatorowi bezpośrednie wiązanie wahadłowej urydyny cząsteczki tRNA. Ponadto, podjednostki subkompleksu pomocniczego Elongatora mogą wiązać i hydrolizować ATP [29, 30]. W zależności od stężenia, obecność ATP obniża powinowactwo Elp4, Elp5 i Elp6 do wiązania tRNA, co może świadczyć o tym, że hydroliza ATP promuje dysocjację cząsteczki tRNA po zakończonej modyfikacji wahadłowej urydyny [31].

4. Procesy regulowane przez Elongator

W odróżnieniu od konserwowanej budowy Elongatora, kompleks ten pełni zróżnicowane funkcje w poszczególnych królestwach. U człowieka Elongator jest powiązany z występowaniem rodzinnej dysautonomii – genetycznie uwarunkowanej choroby związanej z zaburzonym rozwojem czuciowego i autonomicznego układu nerwowego [32, 33]. U myszy mutacje w genach kodujących podjednostki Elongatora prowadzą do zaburzenia przebiegu mejozy podczas spermatogenezy oraz nieprawidłowej demetylacji DNA oocytów [34]. Ponadto zarówno u myszy, jak i *C. elegans* opisano rolę tego kompleksu w acetylacji neuronalnej alfa-tubuliny [35, 36]. U *Drosophila melanogaster* Elongator jest zaangażowany w rozwój larwalny i w proces kształtowania układu nerwowego [16, 17].

W przypadku roślin Elongator bierze udział w wielu procesach, takich jak: wzrost i różnicowanie komórek [12], rozwój liści [37] i korzeni [38], odpowiedzi obronne [39], regulacja cyklu komórkowego [40], odpowiedzi związane z kwasem abscysynowym [41], przeciwdziałanie stresowi oksydacyjnemu, biosynteza antocyjanów [42], skotomorfogeneza, fotomorfogeneza oraz zachowanie prawidłowego funkcjonowania zegara okołodobowego [43].

Wysoce konserwowany charakter budowy kompleksu Elongatora u eukariontów oraz jego specyficzne dla poszczególnych królestw funkcje prowadzą do wniosku, że Elongator reguluje wzrost, rozwój oraz odpowiedzi na różne bodźce.

4.1. U drożdży główną aktywnością Elongatora jest regulacja translacji

Początkowo badania nad drożdżami wskazywały na rolę Elongatora w transkrypcji. Jednakże, później publikowane wyniki świadczyły o braku aktywności Elongatora jako regulatora transkrypcji, np. nie uzyskano biochemicznych dowodów na proponowaną aktywność domeny HAT podczas acetylacji histonów u człowieka [44]. Ostatecznie, w przypadku drożdży dowiedziono, że wszystkie obserwowane fenotypy komórek pozbawionych Elongatora są powiązane z jego funkcją podczas translacji, jaką jest wprowadzanie modyfikacji cząsteczek tRNA [45, 46]. Co ciekawe, ustalono, że zymocyna jest enzymem o aktywności RN-azy ukierunkowanym na antykodony cząsteczek tRNA, które posiadają modyfikacje wprowadzane przez Elongator, co może tłumaczyć oporność na zymocynę szczepów pozbawionych Elongatora [47]. Obecnie uważa się, że u drożdży kompleks Elongatora funkcjonuje tylko w procesie syntezy białek, a nie podczas transkrypcji.

Sam udział Elongatora w modyfikacji tRNA wydaje się być zachowany ewolucyjnie, jako że mutacje w genach kodujących podjednostki Elongatora powodują jej całkowity brak u *C. elegans* [11] i *A. thaliana* [18]. Podobnie w mysich komórkach zarodkowych pozbawionych jednej z podjednostek Elongatora [34] oraz w fibroblastach i tkankach mózgu pacjentów cierpiących na rodzinną dysautonomię stwierdzono obniżony poziom cząsteczek tRNA z wprowadzonymi przez Elongator modyfikacjami [48, 49].

5. Elongator u *Arabidopsis thaliana*

Badania prowadzone na roślinach wskazują na szereg procesów kontrolowanych przez Elongator za pomocą różnych mechanizmów molekularnych. Wzrost roślin [13, 42], odpowiedzi obronne [39, 50], rozwój korzeni [38] oraz procesy rozwojowe zależne od światła [43] są regulowane przez aktywność acetylacji histonów i/lub modyfikacji metylacji DNA podczas transkrypcji. Poza tym Elongator acetyluje niehistonowe białko – alfa-tubulinę [51] oraz bierze udział w transkrypcji i procesowaniu mikro RNA za pomocą nieznanego mechanizmu [52, 53]. Ponadto, opisano aktywność Elongatora we wprowadzaniu modyfikacji wahadłowej urydyny znajdującej się w pętli antykodonowej cząsteczki tRNA [18, 54-56].

5.1. Rola Elongatora w transkrypcji

5.1.1. Acetylacja histonów

Elongator posiada zdolność regulacji transkrypcji na etapie elongacji (wydłużania) transkryptu, prowadzonej przez polimerazę RNA II, dzięki aktywności acetylacji histonów oraz poprzez modyfikację metylacji DNA. Histony to białka wchodzące w skład chromatyny mające zdolność wiązania DNA. Acetylacja to jedna z modyfikacji potranslacyjnych histonów, która polega na przyłączeniu grupy acetylowej do wybranych N-końcowych reszt lizyn „wystających” z nukleosomu stanowiących strukturalną jednostkę chromatyny [57]. Nukleosom składa się z odcinka DNA, który w większości swojej długości jest nawinięty na 8 następujących histonów rdzeniowych: H2A, H2B, H3 i H4, gdzie każdy z nich występuje podwójnie. Dodatkowo histon H1 ma zdolność wiązania się z DNA łącznikowym, występującym pomiędzy rdzeniami dwóch nukleosomów, dzięki czemu następuje stabilizacja nukleosomów [58]. Chromatyna jest strukturą dynamiczną, a stan jej upakowania ściśle reguluje proces

transkrypcji. Jednym z procesów wpływających na jej formę jest właśnie acetylacja histonów, która jest katalizowana przez acetylotransferazy histonowe HAT (z ang. *histone acetyltransferase*) i stanowi jeden z mechanizmów epigenetycznej regulacji ekspresji genów. Prowadzi ona do rozluźnienia chromatyny, dzięki czemu następuje podwyższenie ekspresji docelowych genów. Innym wytłumaczeniem aktywacji genów poprzez acetylację histonów jest możliwość podwyższania aktywności czynników transkrypcyjnych i tym samym aktywacji transkrypcji.

Elongator posiada domenę HAT zlokalizowaną w podjednostce Elp3, której wpływ na aktywację transkrypcji genów u roślin został dobrze opisany. Do tej pory zidentyfikowano grupę genów, które są bezpośrednimi celami dla aktywności Elongatora polegającej na acetylacji histonów. Geny te są związane z różnymi procesami w życiu rośliny, takimi jak regulacja wzrostu kontrolowana przez auksyny [13], rozwój korzeni [38], ścieżki obrony przed patogenami zależne od kwasu salicylowego oraz kwasu jasmonowego i etylenu [50, 59], ogólne odpowiedzi obronne [59] oraz skotomorfogeneza, fotomorfogeneza i funkcjonowanie zegara okołodobowego [43]. U roślin Elongator acetyluje lizyny w pozycji 9 i 14 histonu H3 (odpowiednio H3K9 i H3K14) tylko niektórych genów kodujących białka aktywne w wymienionych procesach. Uważa się zatem, że Elongator działa selektywnie acetylując histony wybranych genów, co prowadzi do rozluźnienia struktury chromatyny i ostatecznie podnosi poziom ich ekspresji.

5.1.2. Modyfikacja metylacji DNA

Kolejną aktywnością Elongatora, która reguluje proces transkrypcji, jest zdolność do wprowadzania zmian we wzorze metylacji DNA. Miejscem przyłączenia grupy metylowej jest atom węgla znajdujący się w piątej pozycji w pierścieniu cytozyny. U roślin metylacji ulegają cytozyny znajdujące się w określonych sekwencjach DNA: CG, CHG i CHH (gdzie H=A,T,C), a poziom metylacji jest silnie zróżnicowany pomiędzy gatunkami [60-62]. Reakcja metylacji DNA jest katalizowana przez enzymy zwane metylotransferazami [62]. Natomiast demetylacja następuje na skutek podziałów komórkowych i „rozcieńczania” już istniejących metylacji lub w wyniku aktywnego procesu usuwania grup metylowych przez glikozylazy DNA [63]. Podczas transkrypcji genów metylacja DNA niesie ze sobą różne konsekwencje w zależności od lokalizacji i kontekstu. W przypadku *Arabidopsis* intensywna metylacja DNA promotorów i miejsc początku transkrypcji wyciszonych genów prowadzi do hamowania transkrypcji [64]. Tak więc, metylacja promotorów genów koreluje z obniżeniem poziomu ich ekspresji, natomiast demetylacji towarzyszy aktywacja transkrypcji [65, 66]. Rola tego procesu w obrębie sekwencji kodującej genu nie jest poznana, lecz metylowane w ten sposób geny są dłuższe, pełnią ważne funkcje i ewoluują wolno, a status ich metylacji jest wysoce konserwowany [66]. U wielu gatunków roślin zmiany w poziomie metylacji specyficznych sekwencji DNA są indukowane przez stres biotyczny i abiotyczny, powodując zmienioną ekspresję genów związanych z odpowiedzią na stres, obroną i adaptacją [67].

W przypadku Elongatora po raz pierwszy zaproponowano jego udział w demetylacji histonów u drożdży [68]. Następnie badania na mysich zygotach wykazały, że to domena SAM, a nie HAT, jest wymagana do demetylacji DNA [10]. U roślin dzięki badaniom na organizmach posiadających mutacje w genach kodujących podjednostki

Elongatora zidentyfikowano geny ze zmienionym poziomem metylacji DNA w porównaniu do typu dzikiego. Wykazano, że geny *NPR1* (z ang. *nonexpresser of PR genes 1* AT1G64280) i *PAD4* (z ang. *phytoalexin deficient 4* AT3G52430), pełniące kluczowe funkcje podczas odpowiedzi na działanie patogenów, podlegają zarówno metylacji, jak i demetylacji kontrolowanej przez Elongator. Dostarczyło to dowodów przemawiających za nową rolą Elongatora w epigenetycznej regulacji ekspresji genów u roślin [39]. Kolejnym genem podlegającym, tym razem tylko metylacji, jest *CYCB1* (z ang. *cyclin dependent protein kinase 1* AT4G37490) pełniący istotną funkcję dla prawidłowego przebiegu cyklu komórkowego [38]. Podsumowując, badania wskazują na udział Elongatora w epigenetycznej regulacji genów poprzez zmiany w metylacji DNA, jednakże obecny stan wiedzy nie jest wystarczający, aby jednoznacznie określić czy Elongator jest zaangażowany w metylację lub demetylację cytozyny, czy w obie aktywności. Niewykluczone, że Elongator może również niebezpośrednio wpływać na metylację DNA poprzez regulację poziomu transkryptów metylotransferaz DNA [69].

5.1.3. Transkrypcja i procesowanie mikro RNA

Elongator jest zaangażowany w proces syntezy RNA również na poziomie miRNA, ponieważ jego udział jest wymagany do transkrypcji niektórych genów kodujących miRNA, jednakże dokładny mechanizm tej regulacji nie jest znany. Częsteczki miRNA mają zdolność regulacji ekspresji wielu genów poprzez blokowanie translacji mRNA lub bezpośrednie kierowanie docelowych RNA do degradacji [70]. Elongator przez interakcje z endorybonukleazą DCL1 bierze udział w dalszych etapach biogenezy miRNA, między innymi wpływając na wiązanie się tego białka z chromatyną. Elongator rekrutuje DCL1 do powstających pre-miRNA, dzięki czemu pozytywnie reguluje ich obróbkę potranskrypcyjną przyczyniając się do przekształcania pre-miRNA w dojrzałe cząsteczki miRNA. Dotychczas opisano udział Elongatora w regulacji grupy genów MIR, które charakteryzują się precyzyjnymi wzorcami ekspresji dzięki specyficznym promotorom. Badania roślin posiadających mutacje w genach kodujących podjednostki Elp2 i Elp5 umożliwiły identyfikację obniżonej zawartości grupy cząsteczek miRNA w porównaniu do roślin typu dzikiego. Prowadzi to do podwyższenia poziomu transkryptów ich genów docelowych, takich jak *CUC2* (z ang. *cup shaped cotyledon 2* AT5G53950), który jest zaangażowany w rozwój liści oraz *ARF17* (z ang. *auxin response factor 17* AT1G77850) i *ARF8* (z ang. *auxin response factor 8* AT5G37020), które są zaangażowane w odpowiedzi rośliny związane z auksynami [52, 53].

5.2. Rola Elongatora w translacji

Jedną ze strategii, która „dostraja” proces syntezy białek jest potranslacyjna modyfikacja tRNA. Częsteczki tRNA, czyli transportującego RNA, składają się z kilkudziesięciu nukleotydów, a ich rola polega na przenoszeniu wolnych aminokwasów z cytoplazmy do rybosomów zgodnie z zasadą komplementarności kodonu mRNA z antykodonem tRNA [71]. Pętla antykodonowa tRNA odpowiada za rozpoznanie i wiązanie komplementarnego kodonu mRNA, dzięki czemu możliwy jest odczyt informacji genetycznej. Dotychczas opisano ponad 170 rodzajów modyfikacji cząsteczek tRNA, które przyczyniają się do skutecznego rozpoznania kodonu i antykodonu oraz ogólnej kontroli szybkości translacji [72, 73]. Funkcje modyfikacji tRNA można podzielić na trzy główne kategorie. Pierwsza kategoria obejmuje modyfikacje, których

funkcją jest stabilizacja integralności strukturalnej rdzenia cząsteczki tRNA. Modyfikacje drugiej kategorii przygotowują cząsteczki tRNA do aminoacylacji i w efekcie do syntezy aminoacylo-tRNA, który jest zdolny do dostarczenia aminokwasu do odpowiedniego miejsca na rybosomie [74, 75]. Trzecia kategoria modyfikacji tRNA odpowiada za zwiększenie potencjału dekodowania oraz wierności translacji na rybosomie. Modyfikacje tej kategorii zachodzą w obrębie pętli antykodonowej, szczególnie w pozycji 34 i 37 cząsteczki tRNA [76, 77]. W pozycji 34 antykodonu cząsteczek tRNA transportujących: lizynę – LysUUU, kwas glutaminowy – GluUUC i glutaminę – GlnUUG, znajduje się tak zwana „wahadłowa urydyna” podlegająca specjalnej modyfikacji (z ang. *wobbleU* modification*). Polega ona na przyłączeniu atomu siarki do atomu węgla w drugiej pozycji cząsteczki urydyny oraz grupy metoksykarbonylometylowej do atomu węgla w pozycji piątej, co jest zwane również modyfikacją cm5. Tak zmodyfikowana urydyna nazywana jest 5-metoksykarbonylometylo-2-tiourydyną (cm5s2U) i przyczynia się do precyzyjnego dekodowania informacji zawartej w mRNA [56, 77].

Szlak związany z modyfikacją cm5 wahadłowej urydyny kontrolowany jest przez białkowy kompleks Elongatora dzięki aktywności enzymatycznej podjednostki Elp3 [18]. Wyniki ostatnich prac potwierdzają, że Elongator odpowiada za przyłączenie grupy karbonylometylowej do atomu węgla znajdującego się w piątej pozycji cząsteczki urydyny [77]. Utworzona grupa cm5 może zostać dodatkowo metylowana, co ostatecznie tworzy urydynę mcm5 [78]. Na podstawie modelu drożdżowego zaproponowano mechanizm reakcji modyfikacji cm5 z udziałem podjednostki Elp3 Elongatora, jednakże dla zachowania aktywności całego kompleksu wymagana jest obecność wszystkich podjednostek. Po pierwsze domena SAM Elp3 rozszczepia S-adenozylometioninę (SAM), w wyniku czego powstaje rodnik 5’deoksyadenozyny. Następnie dzięki domenie HAT Elp3 hydrolizuje acetylo-CoA, a powstały rodnik acetylowy jest przenoszony na piąty węgiel urydyny w pozycji 34 cząsteczki tRNA.

Podsumowując, najnowsze wyniki badań dostarczyły dowodów, że Elongator to enzym wiążący tRNA, a utworzony kompleks Elongatora i cząsteczki tRNA ma zdolność hydrolizy acetylo-CoA u bakterii, archeonów i eukariontów, a więc we wszystkich domenach życia. Prowadzi to do dołączenia grupy cm5 do wahadłowej urydyny cząsteczki tRNA, co ma znaczenie w dostrajaniu procesu translacji białek [77].

5.3. Regulacja skotomorfogenezy i fotomorfogenezy przez Elongator

Siewki, które prawidłowo przeszły etap kiełkowania rozwijają się zgodnie z programem skotomorfogenezy, który zachodzi w ciemności i jest hamowany przez światło. Skotomorfogeneza to proces wzrostu i różnicowania komórek, tkanek i organów rośliny, którego efektem jest obecność u siewek wydłużonych hipokotyli oraz zamkniętych liścieni. W momencie dotarcia siewek do powierzchni gleby i ekspozycji na światło, natychmiastowo uruchamiany jest program fotomorfogenezy, który prowadzi do zahamowania wydłużania hipokotyli oraz rozwoju i otwarcia liścieni [79].

Jednym z regulatorów procesu fotomorfogenezy jest Elongator, który poprzez regulację sieci kontrolującej wzrost, na którą składają się: zegar okołodobowy, regulatory skoto- i fotomorfogenezy, szlaki hormonalne oraz biogeneza ściany komórkowej, bierze udział w regulacji rozwoju rośliny na świetle. W ciemności siewki mutantu insercyjnego *elo3-6* (GABI555_H06) charakteryzują się krótszymi hipokotylami,

natomiast rozwój liścieni nie różni się od typu dzikiego. Sugeruje to, że mutacje w genach kodujących podjednostki Elongatora wpływają tylko na rozwój hipokotyli. Podobny eksperyment wykonany w warunkach oświetlenia różnymi długościami fali wykazał hiponastyczny rozwój liścieni oraz zahamowanie deetioloacji siewek, co skutkowało wykształceniem dłuższych hipokotyli u *elo3-6* niż u typu dzikiego. Wyniki świadczą o udziale Elongatora w regulacji wzrostu hipokotyli zarówno w ciemności, jak i na świetle. Zaproponowano model kontroli wydłużania hipokotyli i rozwoju liścieni, gdzie w zależności od warunków oświetlenia Elongator promuje przeciwne wzorce wzrostu rośliny [43].

W ciemności Elongator dzięki aktywności acetylacji histonów aktywuje ekspresję genu zegara okołodobowego *LHY* (z ang. *late elongated hypocotyl 1* AT1G01060) i pozytywnych regulatorów fotomorfogenezy *HFR1* (z ang. *long hypocotyl in far-red 1* AT1G02340) i *HYH* (z ang. *HY5-homolog* AT3G17609). Ponadto, inny gen zegara okołodobowego *CCA1* (z ang. *circadian clock associated 1* AT2G46830) również promuje wydłużanie hipokotyli. Możliwe, że w mechanizm ten jest zaangażowany czynnik transkrypcyjny PIF4 (z ang. *phytochrome interacting factor 4* AT2G43010), który jest kontrolowany przez zegar okołodobowy [80] i stymuluje ekspresję genów biorących udział w wydłużaniu hipokotyli.

Na świetle Elongator jest wymagany do ekspresji pozytywnych regulatorów fotomorfogenezy *HY5* (z ang. *elongated hypocotyl 5* AT5G11260), *HYH* i *HFR1*, lecz nie poprzez acetylację H3K14. Możliwe, że Elongator wpływa pośrednio na etap wydłużania transkryptu przez polimerazę RNA II lub przez wprowadzanie innych epigenetycznych zmian, jak acetylacja lub przez udział w procesowaniu miRNA. W roślinach typu dzikiego wystawionych na działanie światła następuje szybkie zatrzymanie wydłużania hipokotyli, między innymi dzięki działaniu wspomnianych regulatorów, prawdopodobnie przez hamowanie aktywności *WAK1* (z ang. *wall-associated kinase 1* AT1G21250) w promowaniu wydłużania komórek. W mutancie *elo3-6* obniżona ekspresja *HY5* prowadzi do podwyższenia poziomu mRNA genu *WAK1* i tym samym wzmożenia wydłużania hipokotyli. Możliwe również, że podwyższenie ekspresji *WAK1* prowadzi do wywołania odpowiedzi obronnych rośliny, o czym mogłaby świadczyć obniżona ekspresja genów związanych z biogenezą ściany komórkowej, a ostatecznie może prowadzić do hamowania wydłużania hipokotyli. Opisane szlaki przyczyniają się do wytworzenia dłuższych hipokotyli u mutantu *elo3-6* niż u siewek typu dzikiego, natomiast zaburzenie w rozwoju liścieni wynika z niższej ekspresji *HY5*, *HYH* i *HFR1*, co finalnie składa się na fenotyp typowy dla defektu fotomorfogenezy [43].

6. Podsumowanie

Elongator jest konserwowanym wśród eukariontów białkowym kompleksem składającym się z sześciu podjednostek. Poznano wiele aktywności biochemicznych Elongatora (m.in.: acetylacja histonów, modulacja metylacji DNA bądź modyfikacja tRNA) podczas różnych mechanizmów molekularnych (m.in.: transkrypcja i translacja). U drożdży wykazano, że aktywność podczas translacji jest odpowiedzialna za wszystkie obserwowane fenotypy szczepów pozbawionych Elongatora. Jednakże, w przypadku roślin wykazano szerokie spektrum fizjologicznych i molekularnych fenotypów mutantów posiadających mutacje w genach kodujących podjednostki Elongatora. Wiele z tych efektów udało się powiązać ze zmianami w poziomie ekspresji istotnych

genów oraz w acetylacji histonów i metylacji DNA w ich częściach kodujących. Przemawia to silnie za rolą Elongatora w epigenetycznej regulacji transkrypcji. Zatem, czy podobnie jak u drożdży, możliwe jest, aby regulacja translacji była u roślin główną aktywnością Elongatora? Czy raczej, w zależności od organizmu, rola i ranga jego różnych aktywności może być odmienna? Czy Elongator reguluje inne niż dotychczas zidentyfikowane procesy u przedstawicieli poszczególnych królestw? I wreszcie, najciekawsze chyba pytanie: czy i jak różne aktywności Elongatora mogą być zsynchronizowane w regulacji tych samych procesów fizjologicznych? Pozostaje wiele pytań dotyczących roli Elongatora w funkcjonowaniu eukariontów, a poznanie odpowiedzi wymaga dogłębnej analizy wpływu poszczególnych aktywności biochemicznych tego kompleksu na fizjologię poszczególnych organizmów.

Projekt OPUS (2017/27/B/NZ1/00449) pt.: „Regulacja *fotomorfogenezy Arabidopsis thaliana* przez Elongator – białkowy kompleks epigenetycznie regulujący ekspresję genów” finansowany przez NCN.

Literatura

1. Waddington C.H., *Towards a theoretical biology*, Nature, 1968, 218, s. 525-527, doi:10.1038/218525a0.
2. Feil R., Fraga M.F., *Epigenetics and the environment: Emerging patterns and implications*, Nat. Rev. Genet., 2012, 13, s. 97-109, doi:10.1038/nrg3142.
3. Otero G., Fellows J., Yang L., De Bizemont T., Dirac A.M.G., Gustafsson C.M., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Svejstrup J.Q., *Elongator, a multisubunit component of a novel RNA polymerase II holoenzyme for transcriptional elongation*, Mol. Cell, 1999, 3, s. 109-118, doi:10.1016/S1097-2765(00)80179-3.
4. Winkler G.S., Kristjuhan A., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Svejstrup J.Q., *Elongator is a histone H3 and H4 acetyltransferase important for normal histone acetylation levels in vivo*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2002, 99, s. 3517-3522, doi:10.1073/pnas.022042899.
5. Rahl P.B., Chen C.Z., Collins R.N., *Elp1p, the yeast homolog of the FD disease syndrome protein, negatively regulates exocytosis independently of transcriptional elongation*, Mol. Cell, 2005, 17, s. 841-853, doi:10.1016/j.molcel.2005.02.018.
6. Frohloff F., Fichtner L., Jablonowski D., Breunig K.D., Schaffrath R., *Saccharomyces cerevisiae Elongator mutations confer resistance to the Kluyveromyces lactis zymocin*, EMBO J., 2001, 20, s. 1993-2003, doi:10.1093/emboj/20.8.1993.
7. Li Q., Fazly A.M., Zhou H., Huang S., Zhang Z., Stillman B., *The elongator complex interacts with PCNA and modulates transcriptional silencing and sensitivity to DNA damage agents*, PLoS Genet., 2009, 5, doi:10.1371/journal.pgen.1000684.
8. Close P., Gillard M., Ladang A., Jiang Z., Papuga J., Hawkes N., Nguyen L., Chapelle J.P., Bouillenne F., Svejstrup J., et al., *DERP6 (ELP5) and C3ORF75 (ELP6) regulate tumorigenicity and migration of melanoma cells as subunits of elongator*, J. Biol. Chem., 2012, 287, s. 32535-32545, doi:10.1074/jbc.M112.402727.
9. Hawkes N.A., Otero G., Sebastiaan Winkler G., Marshall N., Dahmus M.E., Krappmann D., Scheiderei C., Thomas C.L., Schiavo G., Erdjument-Bromage H., et al., *Purification and characterization of the human elongator complex*, J. Biol. Chem., 2002, 277, s. 3047-3052, doi:10.1074/jbc.M110445200.
10. Okada Y., Yamagata K., Hong K., Wakayama T., Zhang Y., *A role for the elongator complex in zygotic paternal genome demethylation*, Nature, 2010, 463, s. 554-558, doi:10.1038/nature08732.

11. Chen C., Tuck S., Byström A.S., *Defects in tRNA modification associated with neurological and developmental dysfunctions in Caenorhabditis elegans elongator mutants*, PLoS Genet., 2009, 5, doi:10.1371/journal.pgen.1000561.
12. Nelissen H., Fleury D., Bruno L., Robles P., De Veylder L., Traas J., Micol J.L., Van Montagu M., Inze D., Van Lijsebettens M., *The elongata mutants identify a functional Elongator complex in plants with a role in cell proliferation during organ growth*, Proc. Natl. Acad. Sci., 2005, 102, s. 7754-7759, doi:10.1073/pnas.0502600102.
13. Nelissen H., De Groeve S., Fleury D., Neyt P., Bruno L., Bitonti M.B., Vandenbussche F., Van Der Straeten D., Yamaguchi T., Tsukaya H., et al., *Plant Elongator regulates auxin-related genes during RNA polymerase II transcription elongation*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2010, doi:10.1073/pnas.0913559107.
14. Selvadurai K., Wang P., Seimetz J., Huang R.H., *Archaeal Elp3 catalyzes tRNA wobble uridine modification at C5 via a radical mechanism*, Nat. Chem. Biol., 2014, 10, s. 810-812, doi:10.1038/nchembio.1610.
15. Frohloff F., Jablonowski D., Fichtner L., Schaffrath R., *Subunit communications crucial for the functional integrity of the yeast RNA polymerase II elongator (γ -toxin target (TOT)) complex*, J. Biol. Chem., 2003, 278, s. 956-961, doi:10.1074/jbc.M210060200.
16. Singh N., Lorbeck M.T., Zervos A., Zimmerman J., Elefant F., *The histone acetyltransferase Elp3 plays an active role in the control of synaptic bouton expansion and sleep in Drosophila*, J. Neurochem., 2010, 115, s. 493-504, doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06892.x.
17. Walker J., Kwon S.Y., Badenhorst P., East P., McNeill H., Svejstrup J.Q., *Role of elongator subunit Elp3 in Drosophila melanogaster larval development and immunity*, Genetics, 2011, 187, s. 1067-1075, doi:10.1534/genetics.110.123893.
18. Mehlgarten C., Jablonowski D., Wrackmeyer U., Tschitschmann S., Sondermann D., Jäger G., Gong Z., Byström A.S., Schaffrath R., Breunig K.D., *Elongator function in tRNA wobble uridine modification is conserved between yeast and plants*, Mol. Microbiol., 2010, 76, s. 1082-1094, doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07163.x.
19. Krogan N.J., Greenblatt J.F., *Characterization of a Six-Subunit Holo-Elongator Complex Required for the Regulated Expression of a Group of Genes in Saccharomyces cerevisiae*, Mol. Cell. Biol., 2001, 21, s. 8203-8212, doi:10.1128/mcb.21.23.8203-8212.2001.
20. Li Y., Takagi Y., Jiang Y., Tokunaga M., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Kornberg R.D., *A Multiprotein Complex That Interacts with RNA Polymerase II Elongator*, J. Biol. Chem., 2001, 276, s. 29628-29631, doi:10.1074/jbc.C100274200.
21. Sebastiaan Winkler G., Petrakis T.G., Ethelberg S., Tokunaga M., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Svejstrup J.Q., *RNA Polymerase II Elongator Holoenzyme Is Composed of Two Discrete Subcomplexes*, J. Biol. Chem., 2001, 276, s. 32743-32749, doi:10.1074/jbc.M105303200.
22. Stirnimann C.U., Petsalaki E., Russell R.B., Müller C.W., *WD40 proteins propel cellular networks*, Trends Biochem. Sci., 2010, doi:10.1016/j.tibs.2010.04.003.
23. Xu C., Min J., *Structure and function of WD40 domain proteins*, Protein Cell 2011.
24. Glatt S., Müller C.W., *Structural insights into Elongator function*, Curr. Opin. Struct. Biol. 2013, 23, s. 235-242.
25. Di Santo R., Bandau S., Stark M.J.R., *A conserved and essential basic region mediates tRNA binding to the Elp1 subunit of the Saccharomyces cerevisiae Elongator complex*, Mol. Microbiol., 2014, 92, s. 1227-1242, doi:10.1111/mmi.12624.
26. Abdel-Fattah W., Jablonowski D., Di Santo R., Thüring K.L., Scheidt V., Hammermeister A., ten Have S., Helm M., Schaffrath R., Stark M.J.R., *Phosphorylation of Elp1 by Hrr25 Is Required for Elongator-Dependent tRNA Modification in Yeast*, PLoS Genet., 2015, 11, doi:10.1371/journal.pgen.1004931.

27. Dong C., Lin Z., Diao W., Li D., Chu X., Wang Z., Zhou H., Xie Z., Shen Y., Long J., *The Elp2 Subunit Is Essential for Elongator Complex Assembly and Functional Regulation*, Structure, 2015, 23, s. 1078-1086, doi:10.1016/j.str.2015.03.018.
28. Dauden M.I., Kosinski J., Kolaj-Robin O., Desfosses A., Ori A., Faux C., Hoffmann N.A., Onuma O.F., Breunig K.D., Beck M., et al., *Architecture of the yeast Elongator complex*, EMBO Rep., 2017, 18, s. 264-279, doi:10.15252/embr.201643353.
29. Dalwadi U., Yip C.K., *Structural insights into the function of Elongator*, Cell. Mol. Life Sci. 2018, 75, s. 1613-1622.
30. Glatt S., Létoquart J., Faux C., Taylor N.M.I., Séraphin B., Müller C.W., *The Elongator subcomplex Elp456 is a hexameric RecA-like ATPase*, Nat. Struct. Mol. Biol., 2012, 19, s. 314-320, doi:10.1038/nsmb.2234.
31. Lin Z., Zhao W., Diao W., Xie X., Wang Z., Zhang J., Shen Y., Long J., *Crystal structure of elongator subcomplex Elp4-6*, J. Biol. Chem., 2012, 287, s. 21501-21508, doi:10.1074/jbc.M112.341560.
32. Anderson S.L., Coli R., Daly I.W., Kichula E.A., Rork M.J., Volpi S.A., Ekstein J., Rubin B.Y., *Familial dysautonomia is caused by mutations of the IKAP gene*, Am. J. Hum. Genet., 2001, 68, s. 753-758, doi:10.1086/318808.
33. Slangenaupt S.A., Blumenfeld A., Gill S.P., Leyne M., Mull J., Cuajungco M.P., Liebert C.B., Chadwick B., Idelson M., Reznik L., et al., *Tissue-specific expression of a splicing mutation in the IKBKAP gene causes familial dysautonomia*, Am. J. Hum. Genet., 2001, 68, s. 598-605, doi:10.1086/318810.
34. Lin F.J., Shen L., Jang C.W., Falnes P., Zhang Y., *Ikkap/Elp1 Deficiency Causes Male Infertility by Disrupting Meiotic Progression*, PLoS Genet., 2013, 9, doi:10.1371/journal.pgen.1003516.
35. Creppe C., Malinouskaya L., Volvert M.L., Gillard M., Close P., Malaise O., Laguesse S., Cornez I., Rahmouni S., Ormenese S., et al., *Elongator Controls the Migration and Differentiation of Cortical Neurons through Acetylation of α -Tubulin*, Cell, 2009, 136, s. 551-564, doi:10.1016/j.cell.2008.11.043.
36. Solinger J.A., Paolinelli R., Klöß H., Scorza F.B., Marchesi S., Sauder U., Mitsushima D., Capuani F., Stürzenbaum S.R., Cassata G., *The Caenorhabditis elegans elongator complex regulates neuronal α -tubulin acetylation*, PLoS Genet., 2010, 6, doi:10.1371/journal.pgen.1000820.
37. Falcone A., Nelissen H., Fleury D., Van Lijsebettens M., Bitonti M.B., *Cytological investigations of the Arabidopsis thaliana elo1 mutant give new insights into leaf lateral growth and elongator function*, Ann. Bot., 2007, 100, s. 261-270, doi:10.1093/aob/mcm102.
38. Jia Y., Tian H., Li H., Yu Q., Wang L., Friml J., Ding Z., *The Arabidopsis thaliana elongator complex subunit 2 epigenetically affects root development*, J. Exp. Bot., 2015, 66, s. 4631-4642, doi:10.1093/jxb/erv230.
39. Wang Y., An C., Zhang X., Yao J., Zhang Y., Sun Y., Yu F., Amador D.M., Moua Z., *The Arabidopsis elongator complex subunit2 epigenetically regulates plant immune responses*, Plant Cell, 2013, 25, s. 762-776, doi:10.1105/tpc.113.109116.
40. Xu D., Huang W., Li Y., Wang H., Huang H., Cui X., *Elongator complex is critical for cell cycle progression and leaf patterning in Arabidopsis*, Plant J., 2012, 69, s. 792-808, doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04831.x.
41. Chen Z., Zhang H., Jablonowski D., Zhou X., Ren X., Hong X., Schaffrath R., Zhu J.-K., Gong Z., *Mutations in ABO1/ELO2, a Subunit of Holo-Elongator, Increase Abscisic Acid Sensitivity and Drought Tolerance in Arabidopsis thaliana*, Mol. Cell. Biol., 2006, 26, s. 6902-6912, doi:10.1128/mcb.00433-06.
42. Zhou X., Hua D., Chen Z., Zhou Z., Gong Z., *Elongator mediates ABA responses, oxidative stress resistance and anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis*, Plant J., 2009, 60, s. 79-90, doi:10.1111/j.1365-313X.2009.03931.x.

43. Woloszyńska M., Gagliardi O., Vandenbussche F., Groeve S. De, Baez L.A., Neyt P., Gall S. Le, Fung J., Mas P., Van Der Straeten D., et al., *The Elongator complex regulates hypocotyl growth in darkness and during photomorphogenesis*, J. Cell Sci., 2018, 131, doi:10.1242/jcs.203927.
44. Kim J.H., Lane W.S., Reinberg D., *Human elongator facilitates RNA polymerase II transcription through chromatin*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2002, 99, s. 1241-1246, doi:10.1073/pnas.251672198.
45. Esberg A., Huang B., Johansson M.J.O., Byström A.S., *Elevated Levels of Two tRNA Species Bypass the Requirement for Elongator Complex in Transcription and Exocytosis*, Mol. Cell, 2006, 24, s. 139-148, doi:10.1016/j.molcel.2006.07.031.
46. Chen C., Huang B., Eliasson M., Rydén P., Byström A.S., *Elongator complex influences telomeric gene silencing and DNA damage response by its role in wobble uridine tRNA modification*, PLoS Genet., 2011, 7, doi:10.1371/journal.pgen.1002258.
47. Lu J., Huang B.O., Esberg A., Johansson M.J.O., Byström A.S., *The Kluyveromyces lactis γ -toxin targets tRNA anticodons*, RNA, 2005, 11, s. 1648-1654, doi:10.1261/rna.2172105.
48. Karlsborn T., Tükenmez H., Chen C., Byström A.S., *Familial dysautonomia (FD) patients have reduced levels of the modified wobble nucleoside mcm5s2U in tRNA*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2014, 454, s. 441-445, doi:10.1016/j.bbrc.2014.10.116.
49. Yoshida M., Kataoka N., Miyauchi K., Ohe K., Iida K., Yoshida S., Nojima T., Okuno Y., Onogi H., Usui T., et al., *Rectifier of aberrant mRNA splicing recovers tRNA modification in familial dysautonomia*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2015, 112, s. 2764-2769, doi:10.1073/pnas.1415525112.
50. Wang C., Ding Y., Yao J., Zhang Y., Sun Y., Colee J., Mou Z., *Arabidopsis Elongator subunit 2 positively contributes to resistance to the necrotrophic fungal pathogens Botrytis cinerea and Alternaria brassicicola*, Plant J., 2015, doi:10.1111/tpj.12946.
51. Tran H.T., Nimick M., Uhrig R.G., Templeton G., Morrice N., Gourlay R., Delong A., Moorhead G.B.G., *Arabidopsis thaliana histone deacetylase 14 (HDA14) is an α -tubulin deacetylase that associates with PP2A and enriches in the microtubule fraction with the putative histone acetyltransferase ELP3*, Plant J., 2012, 71, s. 263-272, doi:10.1111/j.1365-313X.2012.04984.x.
52. Fang X., Cui Y., Li Y., Qi Y., *Transcription and processing of primary microRNAs are coupled by Elongator complex in Arabidopsis*, Nat. Plants, 2015, 1, s. 1-9, doi:10.1038/nplants.2015.75.
53. Laubinger S., *MicroRNA transcription and processing: Elongator caught in the act*, Nat. Plants, 2015, 1, doi:10.1038/nplants.2015.76.
54. Leitner J., Retzer K., Malenica N., Bartkeviciute R., Lucyshyn D., Jäger G., Korbei B., Byström A., Luschnig C., *Meta-regulation of Arabidopsis Auxin Responses Depends on tRNA Maturation*, Cell Rep., 2015, 11, s. 516-526, doi:10.1016/j.celrep.2015.03.054.
55. Iñigo S., Durand A.N., Ritter A., Le Gall S., Termathe M., Klassen R., Tohge T., De Coninck B., Van Leene J., De Clercq R., et al., *Glutaredoxin GRXS17 associates with the cytosolic iron-sulfur cluster assembly pathway*, Plant Physiol., 2016, 172, s. 858-873, doi:10.1104/pp.16.00261.
56. Nakai Y., Horiguchi G., Iwabuchi K., Harada A., Nakai M., Hara-Nishimura I., Yano T., *tRNA Wobble Modification Affects Leaf Cell Development in Arabidopsis thaliana*, Plant Cell Physiol., 2019, 60, s. 2026-2039, doi:10.1093/pcp/pcz064.
57. Verdone L., Agricola E., Caserta M., Di Mauro E., *Histone acetylation in gene regulation. Briefings Funct.*, Genomics Proteomics 2006, 5, s. 209-221.
58. Happel N., Doenecke D., *Histone H1 and its isoforms: Contribution to chromatin structure and function*, Gene 2009, 431, s. 1-12.
59. An C., Wang C., Mou Z., *The Arabidopsis Elongator complex is required for nonhost resistance against the bacterial pathogens Xanthomonas citri subsp. citri and*

- Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121, *New Phytol.*, 2017, 214, s. 1245-1259, doi:10.1111/nph.14442.
60. Lister R., O'Malley R.C., Tonti-Filippini J., Gregory B.D., Berry C.C., Millar A.H., Ecker J.R., *Highly Integrated Single-Base Resolution Maps of the Epigenome in Arabidopsis*, *Cell*, 2008, 133, s. 523-536, doi:10.1016/j.cell.2008.03.029.
 61. Gent J.I., Ellis N.A., Guo L., Harkess A.E., Yao Y., Zhang X., Dawe R.K., *CHH islands: De novo DNA methylation in near-gene chromatin regulation in maize*, *Genome Res.*, 2013, 23, s. 628-637, doi:10.1101/gr.146985.112.
 62. Finnegan E.J., Kovac K.A., *Plant DNA methyltransferases*, In *Plant Gene Silencing*; Springer Netherlands, 2000, s. 69-81.
 63. Gehring M., Henikoff S., *DNA Methylation and Demethylation in Arabidopsis*, *Arab. B.*, 2008, 6, e0102, doi:10.1199/tab.0102.
 64. Saze H., Tsugane K., Kanno T., Nishimura T., *DNA methylation in plants: Relationship to small rnas and histone modifications, and functions in transposon inactivation*, *Plant Cell Physiol.*, 2012, 53, s. 766-784.
 65. Xie M., Wu X., He C., Zhang J., Zhang J., *WITHDRAWN: Ski is silenced by methylation and acts as tumor suppressor in non-small cell lung cancer*, *Oncotarget*, 2015, 0, doi:10.18632/oncotarget.6583.
 66. Takuno S., Gaut B.S., *Body-methylated genes in arabidopsis thaliana are functionally important and evolve slowly*, *Mol. Biol. Evol.*, 2012, 29, s. 219-227, doi:10.1093/molbev/msr188.
 67. Elhamamsy A.R., *DNA methylation dynamics in plants and mammals: overview of regulation and dysregulation*, *Cell Biochem. Funct.*, 2016, 34, s. 289-298.
 68. Chinenov Y., *A second catalytic domain in the Elp3 histone acetyltransferases: A candidate for histone demethylase activity?*, *Trends Biochem. Sci.* 2002, 27, s. 115-117.
 69. Zhu M., Li Y., Chen G., Ren L., Xie Q., Zhao Z., Hu Z., *Silencing SIELP2L, a tomato Elongator complex protein 2-like gene, inhibits leaf growth, accelerates leaf, sepal senescence, and produces dark-green fruit*, *Sci. Rep.*, 2015, 5, doi:10.1038/srep07693.
 70. Grennan A.K., *Arabidopsis microRNAs*, *Plant Physiol.* 2008, 146, s. 3-4.
 71. Sharp S.J., Schaack J., Cooley L., Burke D.J., Soil D., *Structure and transcription of eukaryotic tRNA gene*, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 1985, 19, s. 107-144, doi:10.3109/10409238509082541.
 72. Machnicka M.A., Milanowska K., Oglou O.O., Purta E., Kurkowska M., Olchowik A., Januszewski W., Kalinowski S., Dunin-Horkawicz S., Rother K.M., et al., *MODOMICS: A database of RNA modification pathways – 2013 update*, *Nucleic Acids Res.*, 2013, 41, doi:10.1093/nar/gks1007.
 73. Helm M., *Post-transcriptional nucleotide modification and alternative folding of RNA*, *Nucleic Acids Res.* 2006, 34, s. 721-733.
 74. Wellner K., Betat H., Mörl M., *A tRNA's fate is decided at its 3' end: Collaborative actions of CCA-adding enzyme and RNases involved in tRNA processing and degradation*, *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.*, 2018, 1861, s. 433-441, doi:10.1016/j.bbagr.2018.01.012.
 75. Agris P.F., *The importance of being modified: An unrealized code to RNA structure and function*, *RNA* 2015, 21, s. 552-554.
 76. Väre V.Y.P., Eruysal E.R., Narendran A., Sarachan K.L., Agris P.F., *Chemical and conformational diversity of modified nucleosides affects tRNA structure and function*, *Biomolecules*, 2017, 7, doi:10.3390/biom7010029.
 77. Lin T.Y., Abbassi N.E.H., Zakrzewski K., Chramiec-Głąbik A., Jemiola-Rzemińska M., Różycki J., Glatt S., *The Elongator subunit Elp3 is a non-canonical tRNA acetyltransferase*, *Nat. Commun.*, 2019, 10, doi:10.1038/s41467-019-08579-2.

78. Chen C., Huang B., Anderson J.T., Byström A.S., *Unexpected accumulation of ncm5u and ncm5s2u in a trm9 mutant suggests an additional step in the synthesis of mcm5u and mcm5s2u*, PLoS One, 2011, 6, doi:10.1371/journal.pone.0020783.
79. Xu X., Paik I., Zhu L., Huq E., *Illuminating Progress in Phytochrome-Mediated Light Signaling Pathways*, Trends Plant Sci., 2015, 20, s. 641-650, doi:10.1016/j.tplants.2015.06.010.
80. Nozue K., Covington M.F., Duek P.D., Lorrain S., Fankhauser C., Harmer S.L., Maloof J.N., *Rhythmic growth explained by coincidence between internal and external cues*, Nature, 2007, 448, s. 358-361, doi:10.1038/nature05946.

Elongator – białkowy kompleks konserwowany wśród eukariontów, który reguluje proces transkrypcji i translacji

Streszczenie

Elongator to białkowy kompleks, którego budowa jest wysoce konserwowana wśród eukariontów. Jednocześnie pełni on zróżnicowane funkcje u przedstawicieli poszczególnych królestw. U drożdży odgrywa rolę w odporności na zymocynę, w egzocytocie, wyciszaniu genów okołotelomerowych i procesach naprawy DNA, natomiast u zwierząt jest głównie powiązany z rozwojem układu nerwowego. W przypadku roślin Elongator bierze udział w wielu procesach, takich jak: wzrost i różnicowanie komórek, rozwój liści i korzeni, odpowiedzi obronne, biosynteza antocyjanów oraz fotomorfogeneza. W niniejszej pracy przedstawiono obecny stan wiedzy na temat budowy i funkcji Elongatora z naciskiem na jego funkcjonowanie u *Arabidopsis thaliana*, ponieważ to właśnie badania na roślinach dostarczają wiele dowodów na szerokie spektrum aktywności biochemicznych Elongatora. Wykazano, że kompleks ten bierze udział w epigenetycznej regulacji ekspresji genów poprzez acetylację histonów, modyfikację poziomu metylacji DNA oraz transkrypcję i procesowanie miRNA. Poza tym, Elongator posiada również zdolność regulacji translacji za pomocą wprowadzania modyfikacji wahadłowej urydyny cząsteczek tRNA. W ostatnich latach dokonano znaczących postępów w zrozumieniu działania kompleksu Elongatora, jednakże u roślin nadal nie poznano jego prawdziwej aktywności biochemicznej. Ciekawość budzi również zróżnicowanie procesów regulowanych przez Elongator wśród eukariontów oraz to, czy pozostają dotychczas niezidentyfikowane mechanizmy regulacji funkcjonowania organizmów z poszczególnych królestw.

Słowa kluczowe: Elongator, transkrypcja, translacja, epigenetyka

Elongator – a protein complex conserved in eukaryotes that regulates transcription and translation

Abstract

Elongator is a protein complex with well-preserved structure among eukaryotes. However, diversity of processes and activities of Elongator are linked to kingdom-specific functions. As for yeast it plays role in toxin zymocin resistance, exocytosis, telomeric gene silencing and DNA repair. In animals it is mainly associated with the development of the nervous system. As for plants, Elongator is involved in many processes, such as growth and cell proliferation, leaf and root development, immune response, anthocyanin biosynthesis and photomorphogenesis. This paper presents the current state of knowledge about Elongator, primarily its functioning in *Arabidopsis thaliana*, as the plant-related research provides evidence for a broad spectrum of biochemical activities of Elongator. Elongator is involved in epigenetic regulation of gene expression through histone acetylation, modification of DNA methylation levels and miRNA transcription and processing. In addition, Elongator also regulates translation by the wobble uridine modification in tRNA molecules. In recent years significant progress has been made in understanding the role of Elongator complex. However, the true biochemical activity of Elongator complex in plants is still unknown. The diversity of processes regulated by Elongator among eukaryotes and whether unidentified mechanisms regulating the functioning of organisms from each kingdoms also arouse curiosity.

Keywords: Elongator, transcription, translation, epigenetics

Zanieczyszczenie mikrobiologiczne, lekooporność *Escherichia coli* i obecność antybiotyków w sztucznym śniegu oraz wodzie

1. Wstęp

Woda jest dla człowieka bardzo cennym bogactwem oraz czynnikiem warunkującym życie na Ziemi. Jej jakość w znaczącym stopniu wpływa na zdrowie, a także długość życia u ludzi. Niestety w ostatnich latach wraz z rozwojem cywilizacji jej czystość uległa drastycznemu pogorszeniu. Proces ten jest niestety nieunikniony, a emisja zanieczyszczeń do środowiska naturalnego nie do zahamowania przy tak dynamicznym tempie postępu [1].

Obecność w wodzie patogennej mikroflory bakteryjnej, najczęściej wiąże się z występowaniem w jej składzie zanieczyszczeń o charakterze fekalnym. Naturalnie występujące w przewodach pokarmowych ludzi i zwierząt do wód dostają się najczęściej poprzez nielegalne odprowadzanie ścieków. Spożywanie przez człowieka wody o niskiej jakości mikrobiologicznej, prowadzi do zakażenia organizmu drobnoustrojami chorobotwórczymi, a nawet do długofalowych konsekwencji zdrowotnych [2]. W wodach poza patogenną mikroflorą mogą występować inne substancje chemiczne mające wpływ na nasze zdrowie. Jednymi z takich związków są antybiotyki. Powszechnie ich stosowanie nie tylko w celach eliminacji chorób u człowieka, ale także w hodowli i leczeniu zwierząt stało się przyczyną gwałtownego wzrostu oporności bakterii, przede wszystkim tych obecnych w środowisku wodnym. Obecność szczepów lekoopornych, niesie za sobą ryzyko m.in. horyzontalnego transferu genów oporności. Przed dzisiejszą medycyną stawiane jest poważne wyzwanie zahamowania rozprzestrzeniania się tego zjawiska, w szczególności u bakterii na co dzień wywołujących zakażenia i choroby u człowieka. Bakterie z nabytą opornością, są także odporne na stosowane w oczyszczaniu ścieków procesy i detergenty co uniemożliwia ich całkowitą degradację. Pomimo stosowania bardzo zaawansowanych metod oczyszczania wody, pewna część farmaceutyków nie jest ostatecznie eliminowana i zostaje wprowadzona do obiegu. W Polsce do wód powierzchniowych wypuszczanych jest 10% ścieków, a także 30% słabo oczyszczonych ścieków, które stanowią największy rezerwuuar bakterii lekoopornych [3].

Analizie poddane zostały próbki wody oraz sztucznego śniegu. Pobierane były z rzeki Białki, jej dopływu potoku Remiaszów oraz wybranych stoków narciarskich w miejscowości Białka Tatrzańska, a także wyciągu Jurgów oraz Harenda. Zbadano je pod kątem zanieczyszczenia mikrobiologicznego, obecności antybiotyków oraz wyznaczenia stężeń hamujących wzrost i namnażanie wyizolowanych szczepów *Escherichia coli*. Wyniki badań umożliwiły ocenę oporności izolatów tych bakterii na poszczególne

¹ wiktoria.grzebieniarska@urk.edu.pl, Katedra Chemii, Wydział Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie.

² anna.lenart-boron@urk.edu.pl, Katedra Mikrobiologii i Biomonitoringu, Wydział Rolniczo-Ekonomiczny, Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie.

antybiotyki, zweryfikowanie jakości mikrobiologicznej rzeki Białki, jej dopływów oraz śniegu z wybranych stoków. Pozwoliło to na wysunięcie wniosków czy intensywny rozwój turystyki, duży napływ ludności, a także szybko postępująca zabudowa wpływają na zwiększający się poziom zanieczyszczenia mikrobiologicznego i szerzenia antybiotykoodporności bakterii.

Dane literaturowe dotyczące zawartości antybiotyków, a także obecności lekoopornych bakterii w wodzie i śniegu są bardzo okrojone. Stała kontrola i badania obejmujące ten temat są bardzo przydatne i ważne, zwłaszcza że wody powierzchniowe najczęściej są głównym źródłem wody pitnej dla okolicznych domostw i gospodarstw. Wody te są również wykorzystywane w znacznej mierze do produkcji sztucznego śniegu na stoki narciarskie, a także w przemyśle (paliwowym, energetycznym, chemicznym), rolnictwie (produkcja roślinna, nawadnianie pól, utrzymanie stawów hodowlanych) oraz leśnictwie.

2. Metodyka

Celem badań była analiza próbek wód powierzchniowych oraz produkowanego z nich sztucznego śniegu, przeznaczonego na naśnieżanie stoków narciarskich. Były one pobierane w miejscowości Białka Tatrzańska, Jurgów oraz z okolic Zakopanego w okresie zimowym na przełomie 2018/2019 roku, w trzech terminach tj. 23 listopada, 20 grudnia 2018 r. oraz 6 stycznia 2019 r. (tab. 1). Badane one były pod kątem zanieczyszczenia mikrobiologicznego oraz potencjalnego niebezpieczeństwa z punktu widzenia epidemiologicznego. Praca obejmowała również badania dotyczące wykrywania obecności wybranych antybiotyków oraz zbadanie oporności szczepów *Escherichia coli* pochodzących z wyżej wymienionych prób środowiskowych na antybiotyki.

Tabela 1. Terminy poboru, lokalizacja oraz rodzaj materiału pobieranego do badań

Termin poboru	Punkt poboru	Rodzaj materiału
23 listopad 2018 r.	R	śnieg, woda
	K1	śnieg, woda
	K2	śnieg, woda
	O	woda
	U	woda
20 grudzień 2018 r.	R	śnieg, woda
	K1	śnieg, woda
	K2	śnieg, woda
	J	śnieg, woda
	H	śnieg, woda
	O	woda
	U	woda
6 styczeń 2019 r.	R	śnieg, woda
	K1	śnieg, woda
	K2	śnieg, woda
	J	śnieg, woda
	B	śnieg, woda (próby K)
	O	woda
	U	woda

Źródło: Opracowanie własne

Tabela 2. Objasnienie skrótów podanych na wykresach

Punkt poboru	Materiał	Skrót
R	woda	RW
	śnieg	RS
K	woda	KW
	śnieg	KŚ
J	śnieg	JS
	woda	JW
H	śnieg	HŚ
	woda	HW
B	śnieg	BŚ
	woda	KW

Źródło: Opracowanie własne

Analiza bakteriologiczna obejmowała oznaczenie liczebności bakterii *E. coli*, bakterii grupy *coli*, *E. faecalis*, ogólnej liczby bakterii mezofilnych i psychrofilnych oraz gronkowców. Próby wody oraz śniegu pobierane były do sterylnych pojemników w warunkach pogodowych opisanych w tabeli 3.

Tabela 3. Warunki pogodowe podczas pobierania prób

Data	Temperatura [°C]	Wilgotność względna [%]	Opady [mm]
23.11.2018 r.	2	90	0
20.12.2018 r.	-3/2	60	0
06.01.2019 r.	-10/-2	95	12

Źródło: Opracowanie własne

Badania dotyczące zanieczyszczenia mikrobiologicznego wykonywane były metodą seryjnych rozcieńczeń. W warunkach sterylnych sporządzane zostały kolejne rozcieńczenia dziesiętne badanych prób w jałowym roztworze soli fizjologicznej. Następnie każde z rozcieńczeń przeniesione zostało w objętości 1 ml na wcześniej przygotowane szalki Petriego, zalewane podłożami mikrobiologicznymi i inkubowane [4]. Tą metodą badana była liczebność bakterii mezofilnych, psychrofilnych oraz gronkowców. Wszystkie informacje dotyczące warunków inkubacji zostały zawarte w tabeli 6.

Metodą, którą analizowano liczebność bakterii *E. coli*, grupy *coli*, *E. faecalis* to filtracja membranowa. Do badania wykorzystano jałowe filtry z nitrocelulozy, które nakładano na podstawę kamiennego filtra, a następnie po zamknięciu i uszczelnieniu lejka, wprowadzono litr badanej próby. Pod wpływem powstającego ciśnienia wytwarzanego przez pompę próżniową, próba zostawała przesączana do kolby Büchnera, a obecne drobnoustroje osadzone zostawały na nitrocelulozowym filtrze, który został przeniesiony do szalki Petriego z odpowiednią zestaloną pożywką i inkubowane (tab. 6) [4].

W trakcie wstępnych badań jakości mikrobiologicznej wody i śniegu, izolowano z wybranych prób czyste szczepy bakterii *Escherichia coli* z kolonii wyrosłych na podłożu TBX. Jałową czą bakteriologiczną pobierano materiał, a następnie posiewano go metodą redukcyjną i inkubowano (tab. 6). Przeznaczano je do analiz antybiogramu podstawowego i rozszerzonego oraz wykrywania obecności genów oporności na antybiotyki (tab. 4).

Tabela 4. Terminy poboru, lokalizacja, rodzaj pobranego materiału, a także spis wyizolowanych szczepów do badań

Miejsce	R	K1		K2		H	J
Materiał	śnieg (Ś)	woda (W)	śnieg (Ś)	woda (W)	śnieg (Ś)	śnieg (Ś)	woda (W)
Szczepy z poboru 23.11.2018 r.	RŚ1, RŚ2, RŚ3, RŚ4	KW1.1, KW1.2, KW1.3, KW1.4	KŚ1.1, KŚ1.2, KŚ1.3, KŚ1.4	KW2.1, KW2.2, KW2.3, KW2.4	KŚ2.1, KŚ2.2, KŚ2.3, KŚ2.4		
Szczepy z poboru 20.12.2018 r.		KW1.1, KW1.2, KW1.3, KW1.4	KŚ1.1, KŚ1.2	KW2.1, KW2.2		HŚ1, HŚ2, HŚ3	JŚ1, JŚ2, JŚ3
Ilość szczepów	4	8	6	6	4	3	3

Źródło: Opracowanie własne

Analiza opierała się na 34 wyizolowanych szczepach, których badania obejmowały antybiogram podstawowy (6 antybiotyków), oraz antybiogram rozszerzony (14 antybiotyków). Antybiogram wykonany został metodą dyfuzyjno-krążkową. Wyniki analizy interpretowane były według wytycznych EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) (tab. 5). Zawierały one informacje dotyczące wrażliwości (S), średniej wrażliwości (I) oraz oporności (R) wybranych szczepów bakterii na konkretne antybiotyki użyte w analizie. Drobnoustroje o profilu R często w środowiskach naukowych są nazywane szczepami typu dzikiego, jeśli nie wykazuje on oporności nabytej na antybiotyk. Wykazanie oporności może być pierwszym krokiem do rozpoczęcia badań w kierunku określenia źródła i drogi transferu tych cech [5, 6].

Po wyizolowaniu czystych kultur bakterii, sporządzono z nich zawiesinę w roztworze 0,85% NaCl, której gęstość optyczna wynosiła 0,5 w skali McFarlanda. Wykorzystując jałową wymazówkę, otrzymaną zawiesinę posiewano murawą na zestalonym już podłożu [7]. Na tak przygotowaną hodowlę nakładano dyspenserem krążki bibułowe nasączone antybiotykami o odpowiednich stężeniach i inkubowano [8]. W tej metodzie używano antybiotyków zestawionych w tabeli 5.

Tabela 5. Spis wykorzystywanych antybiotyków, ich stężenie oraz zakresy odczytu wyników wg wytycznych EUCAST

L.p	Nazwa antybiotyku	Skrót	Stężenie [ug]	Poziom antybiogramu	Zakres [mm]	
					≥S	R<
1.	Ceftazydym	CAZ	30	R	22	19
2.	Cefoksytyna	FOX	30	R	19	19
3.	Tezobaktam	TZP	110	R	20	17
4.	Piperacylina	PRL	100	R	20	17
5.	Tikarcylina	TIC	75	R	23	23
6.	Cefepim	FEP	30	R	27	21
7.	Cefotaksym	CTX	30	R	20	17
8.	Netilmicyna	NET	30	R	15	12
9.	Tetracyklina	TE	30	R	15	11

10.	Amikacyna	AK	30	R	18	15
11.	Aztreonam	ATM	30	R	26	21
12.	Tobramycyna	TOB	10	R	17	14
13.	Ciprofloksacyna	CIP	5	R	26	24
14.	Trimetoprim	SXT	25	R	14	11
15.	Cefalotyna	KF	30	P	13	13
16.	Cefazolina	KZ	30	P	23	19
17.	Cefamandol	MA	30	P	18	14
18.	Ampicylina	AMP	10	P	14	14
19.	Gentamicyna	CN	30	P	17	14
20.	Amoksycylina	AMC	30	P	19	19
21.	Klindamycyna	CC	2			
22.	Ofloksacyna	NOR	5			
23.	Erytromycyna	E	15			
24.	Tylozyna	DE	10			
25.	Lowofloksacyna	LVX	5			
26.	Enrofloksacyna	ENR	10			
27.	Doksycylina	TZP	30			
28.	Cefuroksym	CXM	30			

Źródło: [6]

Do wykrywania zdolności wytwarzania β -laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL) przez komórki bakterii *E. coli*, wykorzystano test dwóch krążków. W metodzie tej używano trzech krążków bibułowych nasączonych następującymi antybiotykami: cefotaksymu (30 μ g), ceftazydymu (30 μ g) i amoksycyliny z kwasem klawulanowym (30 μ g), które wykładano na powierzchnię podłoża Mueller-Hinton'a, na którym wysiano murawą badane izolaty *E. coli*. W teście tym największe znaczenie ma ułożenie względem siebie antybiotyków, tzn. krążek z amoksycyliną i kwasem klawulanowym jest oddalony od pozostałych o 2 centymetry. Tak przygotowane szalki inkubowano [5] (tab. 6).

Tabela 6. Warunki inkubacji hodowli w poszczególnych metodach

Analiza	Wykrywane drobnoustroje	Podłoże	Warunki inkubacji (temp [°C]/czas [h])	Atmosfera
Seryjne rozcieńczenia	Bakterie mezofilne	TSA	37/24	tlenowa
	Bakterie psychrofilne	TSA	4/72	tlenowa
	Gronkowce	Chapman	37/24	tlenowa
Filtracja membranowa	Bakterie grupy <i>coli</i>	ENDO	37/24	tlenowa
	Termotolerancyjne <i>Escherichia coli</i>	TBX	44/24	tlenowa
	Enterococcus faecalis	SB	37/24	tlenowa
Redukcyjna	czyste szczepy <i>Escherichia coli</i>	TBX	44/24	tlenowa

Antybiogram	oporne na antybiotyki <i>Escherichia coli</i>	Müeller-Hinton	33-37/16-18	tlenowa
ESBL	oporne na antybiotyki <i>Escherichia coli</i>	Müeller-Hinton	33-37/16-18	tlenowa

Źródło: Opracowanie własne

Tabela 7. Warunki do reakcji PCR

Proces	Temperatura [°C]	Czas [s]	Liczba powtórzeń cyklu
Wstępna denaturacja	94	180	1x
Denaturacja	94	30	34x
Przyłączanie starterów	40-60	30	
Wydłużanie	70-72	60	1x
Końcowe wydłużanie	72	300	

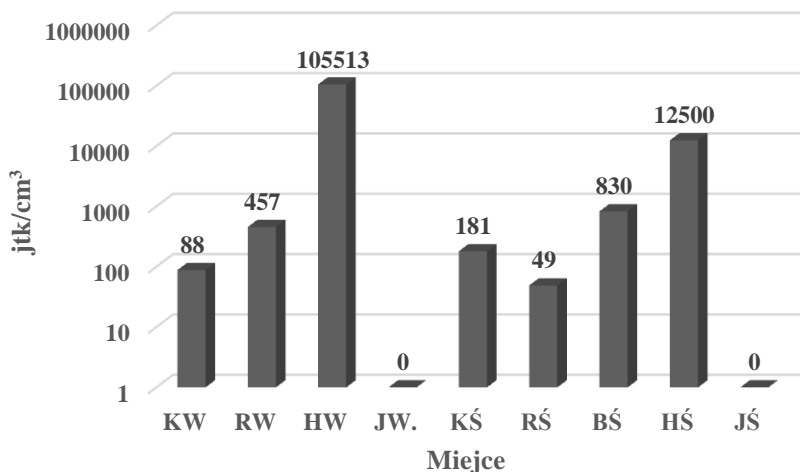
Źródło: Opracowanie własne

Analiza próbek wody do tandemowej spektrometrii masowej z chromatografią cieczową i elektrorozpyleniem (LC – ESI – MS/MS) była oparta na rozszerzonej analizie prób wody pobieranych w trzech terminach na przełomie 2018 i 2019 r. Próbkę uzyskiwane były z dwóch miejsc rzeki Białki tj. U (gdzie pobierana zostaje woda do armatek śnieżnych produkujących śnieg na stoki w ośrodku Kotelnica Białczańska) oraz punktu O (miejsce, w którym następuje zrzut wody z oczyszczonych ścieków z oczyszczalni). Próbkę przefiltrowywano przez filtr bakteriologiczny i otrzymywano zawiesinę bez zanieczyszczeń organicznych. Następnie przygotowywano wkłady OASIS HLB Cartridge poprzez ich kondycjonowanie przy użyciu 10 ml metanolu, a następnie 15 ml ultra czystej wody przy szybkości przepływu 1-2 ml/min. Oczyszczane wcześniej próbki wody ekstrahowano przy szybkości przepływu 1-20 ml/min. Po ekstrakcji wkłady suszono w warunkach próżniowych przez 30 minut. Po tym czasie eluowano za pomocą 10 ml metanolu z szybkością przepływu 1-10 ml/min. Następnie wykonywano rozdział chromatograficzny. Każda badana próbka była analizowana pod kątem 4 odpowiednich jonów, na które rozpadają się poszczególne antybiotyki. Wynik pozytywny dla co najmniej jednego jonu danego antybiotyku potwierdzał jego zawartość w analizowanej próbce

3. Analiza wyników

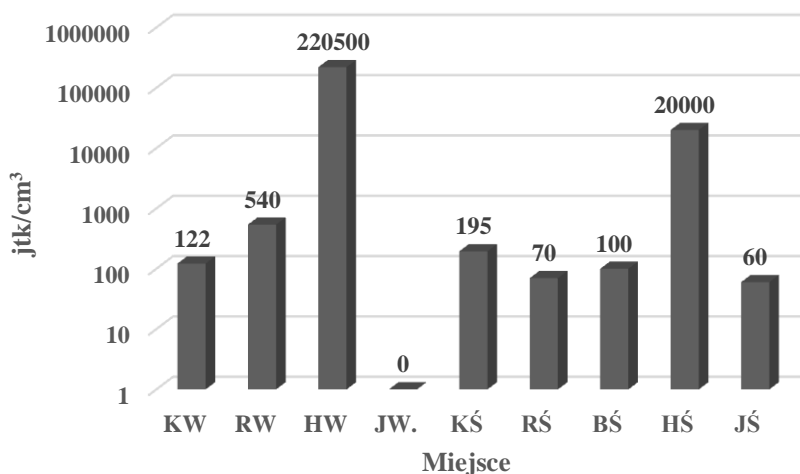
3.1. Zanieczyszczenie mikrobiologiczne

W celu analizy wyników liczebności uzyskanej w trzech terminach zostały one uśrednione dla każdego badanego mikroorganizmu i przedstawione w postaci wykresów logarymicznych, w celu lepszego zobrazowania uzyskanych danych. Dla uzyskania lepszej przejrzystości wykresów, wprowadzono skrót miejsc, z których pobierane były próby środowiskowe i zawarte zostały w tabeli 2.



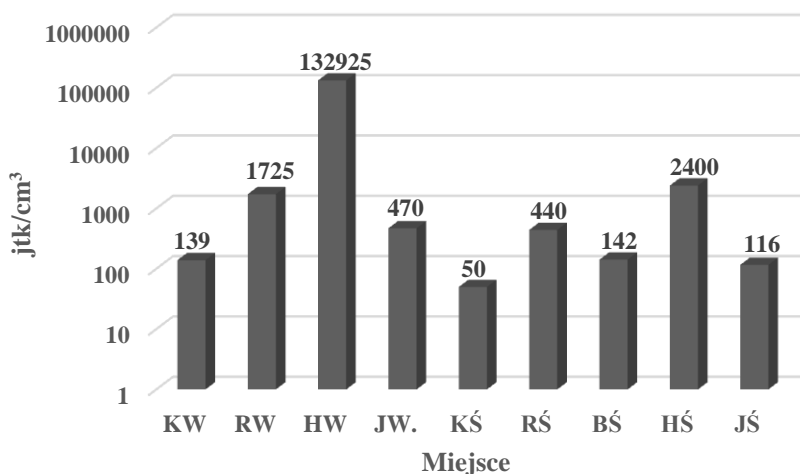
Rysunek 1. Średnia liczebność bakterii *Escherichia coli* w próbach wody i śniegu pobranych z punktów K, R, B, H i J [opracowanie własne]

Podczas porównywania prób wody i śniegu z punktu R (rys. 1), można zauważyć zmniejszenie liczebności bakterii *E. coli* z 457 jtk/cm³ w wodzie do 49 jtk/cm³ w śniegu. Jest to spadek wynoszący ponad 90%. Może to być spowodowane wrażliwością bakterii na mrozenie. Zupełnie odwrotny stan widzimy przy porównywaniu prób wody i śniegu z punktu K gdzie z poziomu 88 jtk/cm³ w wodzie, liczebność wzrasta do 181 jtk/cm³ w śniegu. Jest to wzrost o ponad 50%. Faktem jest, że bakteria *E. coli* jest wrażliwa na mrozenie, ale jej degradacja zależy od temperatury tego procesu oraz jego szybkości, dlatego nie każde zamrażanie jest dla niej szkodliwe [9]. Wzrost liczebności mógł być związany z dopływem zanieczyszczeń z armatki śnieżnej. Potwierdzają to również badania Lenart-Boroń i in. 2017 [10], które wykazały, że nie wszystkie haplotypy bakterii są jednakowo wrażliwe na mrozenie i niektóre łatwiej przeżywają ten proces, stąd może wynikać zwiększona liczba *E. coli* w próbkach śniegu. Spośród badanych prób wody wytopionej ze sztucznego śniegu oraz wody z punktu poboru do śnieżenia, nie stwierdzono obecności *E. coli* w próbach z punktu J. Świadczy to o bardzo dobrej jakości mikrobiologicznej śniegu w tym miejscu. Najmniejszą liczebność bakterii *E. coli* obserwujemy w punkcie R gdzie wyniosła ona 49 jtk/cm³. W kolejnych próbach obserwowany jest już wyraźny wzrost, w punkcie BŚ – 830 jtk/cm³. W wodzie z punktu H wykryto 105513 jtk/cm³ a w śniegu widać już wyraźne obniżenie tego stanu do 12500 jtk/cm³. Wiąże się to ze zwiększonym funkcjonowaniem wyciągów, restauracji, barów i pubów przekładającym się na wzrost ilości produkowanych i odprowadzanych ścieków do wód w sezonie zimowym. Tak dużą liczebność bakterii *E. coli* w punkcie H, w porównaniu do reszty punktów poboru można powiązać z niedaleką odległością od oczyszczalni ścieków. Obecność tych bakterii w badanych próbach świadczy o zanieczyszczeniu kałowym, ściekami, glebą, a także gnijącą roślinnością [11]. W badaniach na próbach rzeki Reby wykazano zmienną liczebność bakterii *E. coli*, która wynosiła 10-200 jtk/cm³ i wiązała się głównie z odpływem i wymywaniem gleby [12].



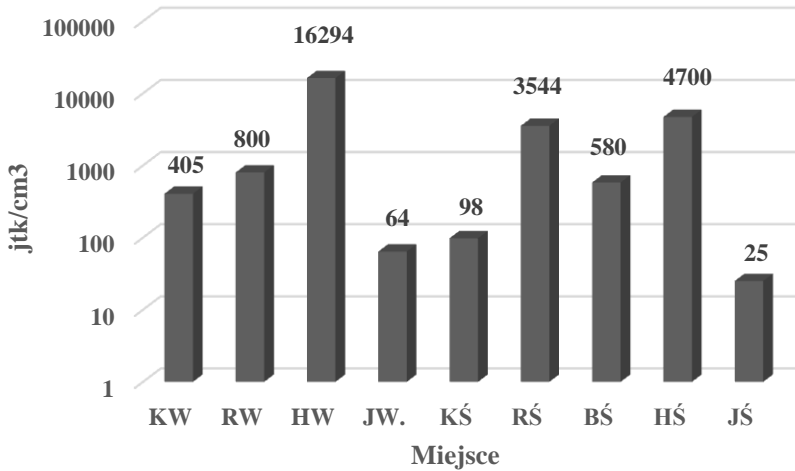
Rysunek 2. Średnia liczebność bakterii grupy *coli* w próbach wody i śniegu pobranych z punktów K, R, B, H i J [opracowanie własne]

W punkcie R (rys. 2) woda charakteryzowała się liczebnością bakterii grupy *coli* na poziomie 540 jtk/cm³, a w śniegu liczba ta spadała do 70 jtk/cm³. Był to spadek odpowiadający punktowi R dla bakterii *E. coli* i mieścił się na poziomie 90%. Może to być spowodowane faktem, że bakterie grupy *coli* są mikroorganizmami źle znoszącymi zamrażanie oraz niskie temperatury, w związku z tym podczas wytwarzania sztucznego śniegu ich liczebność odpowiednio się zmniejsza [13]. W punkcie K liczebność bakterii grupy *coli* w wodzie wynosiła 122 jtk/cm³, a w śniegu 195 jtk/cm³. Podobny poziom tych drobnoustrojów zaobserwowano w próbach śniegu pobranych z punktu J, R i B, odpowiednio 60 jtk/cm³, 70 jtk/cm³ i 100 jtk/cm³. Świadczy to o niewielkim zanieczyszczeniu tych miejsc, a także o dobrej jakości pobieranej wody do naśnieżania. Wyraźny wzrost liczebności bakterii grupy *coli* zaobserwowano w próbach wody (220500 jtk/cm³) oraz śniegu (20000 jtk/cm³) z punktu H. Tak dużą liczebność tych bakterii w tym punkcie można wytłumaczyć, ich niewielką odległością od miejscowej oczyszczalni ścieków. Wyniki otrzymane w niniejszych badaniach dla bakterii z grupy *coli*, są bardzo podobne do tych uzyskanych przez Berleć i in. 2009 [14], którzy wykazali liczebność bakterii grupy *coli* na poziomie 40-9000 jtk/cm³.



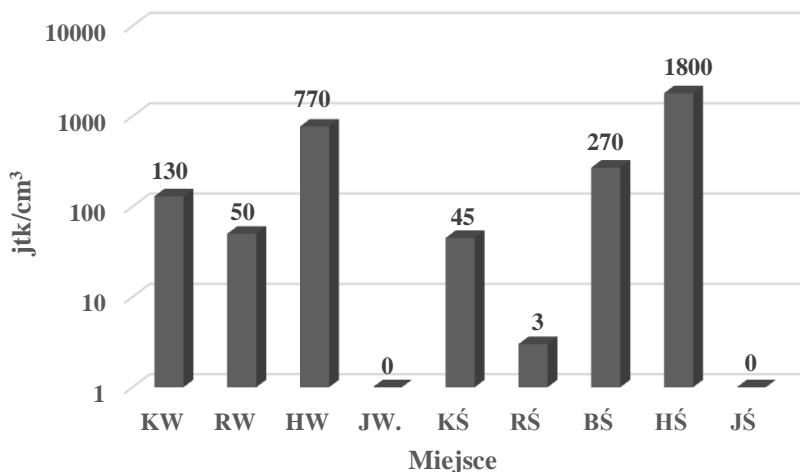
Rysunek 3. Średnia liczebność bakterii psychrofilnych w próbach wody i śniegu pobranych z punktów K, R, B, H i J [opracowanie własne]

Liczebność bakterii psychrofilnych nie jest potencjalnie niebezpieczna, ale silnie skorelowana z obecnością materii organicznej, oraz znacząco wpływa na proces samooczyszczania wód [15, 16]. Próbkę wody z punktu R odznaczają się czterokrotnie większą liczbą bakterii psychrofilnych (1725 jtk/cm³) w porównaniu do prób śniegu (440 jtk/cm³) z tego miejsca (rys. 3). Podobną sytuację obserwujemy w punkcie K, gdzie liczebność tych bakterii w wodzie wynosi 139 jtk/cm³, zaś w śniegu zmniejsza się do 50 jtk/cm³, a w punkcie BŚ wynosi 143 jtk/cm³. Większa ich ilość w wodzie może świadczyć o szybkim przepływie rzeki a co za tym idzie wymywaniu bakterii psychrofilnych z dna [17], natomiast zmniejszenie liczby w śniegu może wiązać się z gwałtownymi spadkami temperatur. Szybkie ochłodzenie mogło niekorzystnie wpłynąć na ich namnażanie [18]. Analiza prób śniegu i wody, wykazała najmniejszą liczebność bakterii psychrofilnych w punkcie J, gdzie wynosiła ona 116 jtk/cm³. W punkcie H w wodzie i śniegu wykazano 1322925 jtk/cm³ i 2400 jtk/cm³, tak dużą zawartość psychrofili w tych próbkach możemy tłumaczyć niedaleką odległością oczyszczalni ścieków od punktu poboru wody do naśnieżania stoku. Obserwując wyniki prób wody i śniegu można zaobserwować wyraźną dominację liczebności bakterii mezofilnych nad psychrofilnymi. Wyniki te są zjawiskiem niepokojącym, które może świadczyć o małej aktywności samooczyszczania wody, słabo zachodzącym procesie mineralizacji związków organicznych, którą wspomagają psychrofile [15].



Rysunek 4. Średnia liczebność bakterii mezofilnych w próbach wody i śniegu pobranych z punktów K, R, B, H i J [opracowanie własne]

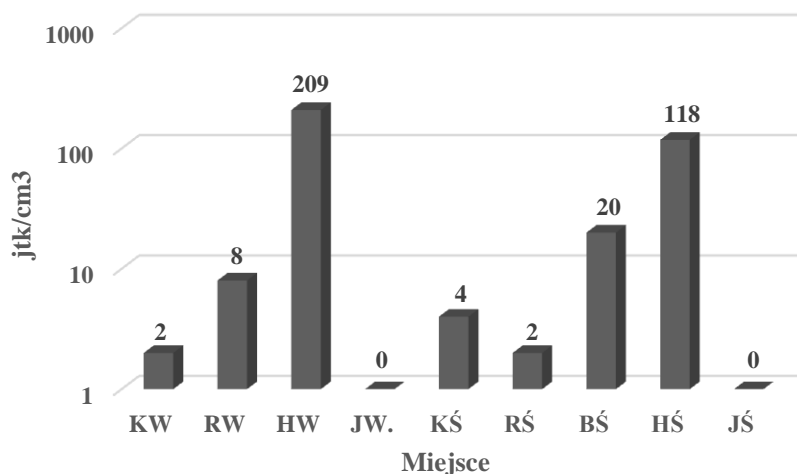
Do grupy mezofilów zaliczamy głównie bakterie grupy *coli* oraz paciorkowce kałowe [15]. Próbkę wody z punktu R charakteryzują się mniejszą liczebnością bakterii mezofilnych (800 jtk/cm³), do odpowiadających prób śniegu (3544 jtk/cm³) w tym punkcie (rys. 4). Zredukowana liczba bakterii mezofilnych w wodzie może być spowodowana rozcieńczaniem wód rzeki przez opady deszczu czy śniegu, ich rozproszenie, ale też preferencjami pokarmowymi zwierząt bytujących w wodzie. Organizmy takie jak orzęski czy wiciowce szybciej wyłapują i zjadają większe komórki bakteryjne, a dopiero później te w rozmiarach mniejszych [14]. W punkcie K liczebność bakterii mezofilnych w wodzie (405 jtk/cm³) jest ponad cztery razy większa od ich liczby w próbach śniegu (98 jtk/cm³). Zwiększona obecność tych bakterii w wodzie może świadczyć o niedawnym zanieczyszczeniu, ze względu na ich brak zdolności do wytwarzania przetrwalników, natomiast mniejsza ilość w śniegu świadczy o zaleganiu pokrywy śnieżnej na stokach przez dłuższy okres czasu [15]. Próby śniegu z punktu J (255 jtk/cm³) oraz B (580 jtk/cm³) charakteryzują się najmniejszą liczebnością mezofili w porównaniu do R (3544 jtk/cm³) i H (4700 jtk/cm³). Wzrost mezofili w śniegu na tych stokach jest efektem także zwiększonej liczebności bakterii Gram-ujemnych oraz przetrwalnikujących [14]. Według badań, Cicha Woda obok stoku Harenda oraz rzeka Białka sąsiadująca ze stokami na Podhalu 2009 r. należały do 2 klasy wód, a w 2010 r. ich jakość przynależała już do 3 klasy [19]. Wyniki te wskazują na wysokie zanieczyszczenie tych wód, a także świadczą o ich wzroście i postępie w czasie. Jednym z powodów takiego stanu śniegu mogą być ścieki odprowadzane z okolicznych gospodarstw, a także wypłukiwanie gleb z pól wcześniej nawożonych nawozem pochodzenia odzwierzęcego.



Rysunek 5. Średnia liczebność bakterii *E. faecalis* w próbkach wody i śniegu pobranych z punktów K, R, B, H i J [opracowanie własne]

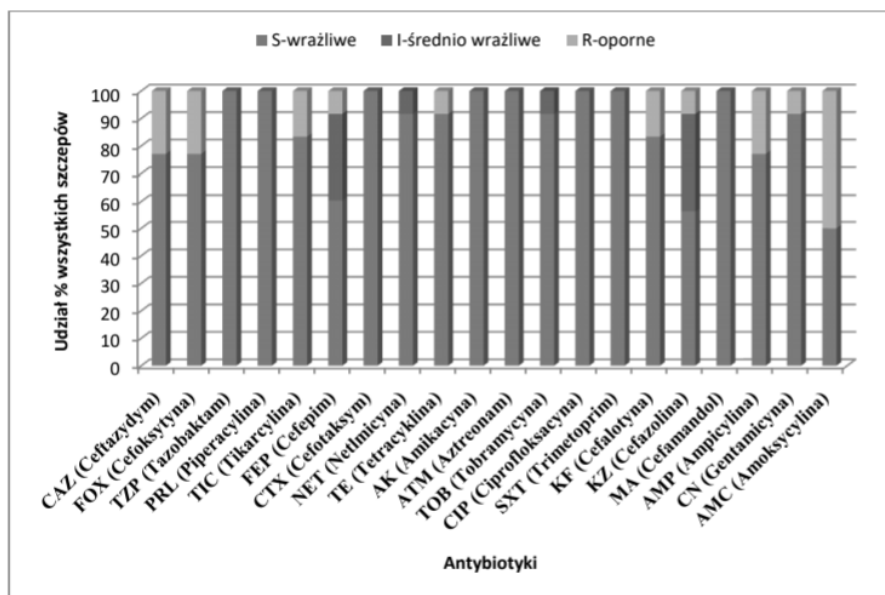
Liczebność bakterii *E. faecalis* w próbkach wody pobranych z K i R wynosi odpowiednio 130 jtk/cm³ i 50 jtk/cm³. Podobne wyniki uzyskali Berleć i in. 2009 [14], wykazując liczebność tych mikroorganizmów w wodzie na poziomie nieprzekraczającym 90 jtk/cm³. Stan ten ulega zmniejszeniu w odpowiadających próbkach śniegu i wynosi dla K – 45 jtk/cm³, a dla R – 3 jtk/cm³ (rys. 5). Taki spadek ich liczebności, może być związany z faktem, że nie rozmnażają się one w środowisku wodnym, ale są efektem niedawnego zanieczyszczenia fekalnego [4]. Bardzo dużo bakterii *E. faecalis* zaobserwowano w próbkach śniegu pobranych z punktu B (270 jtk/cm³) oraz H (1800 jtk/cm³), natomiast nie wykryto w próbkach z J. Nagłe podnoszenie się ilości badanych drobnoustrojów, i pogorszenia stanu wody może wskazywać na dostarczanie sporej ilości ścieków bytowych z pobliskich gospodarstw lub też może być spowodowane sypkami powierzchniowymi z pól uprawnych [14].

Liczebność gronkowców w wodzie i śniegu pobranych z punktów J, R oraz K mieści się w przedziale 0-8 jtk/cm³. Większą ilość tych drobnoustrojów wykazuje punkt B (20 jtk/cm³) oraz H (118 jtk/cm³) (rys. 6). Są to najmniejsze liczebności uzyskane dla poszczególnych miejsc w porównaniu do reszty badanych mikroorganizmów.



Rysunek 6. Średnia liczebność gronkowców w próbach wody i śniegu pobranych z punktów K, R, B, H i J [opracowanie własne]

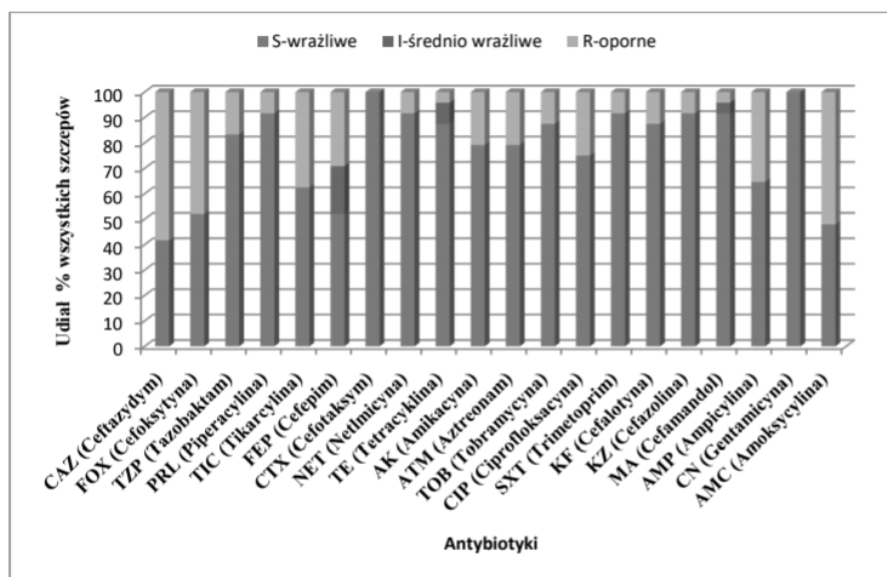
3.2. Antybiogram



Rysunek 7. Wykres obrazujący wyniki określające profil oporności wyizolowanych szczepów *E. coli* z wody na wybrane antybiotyki wg wytycznych EUCAST podane w wartościach procentowych [opracowanie własne]

Badania wykazały (rys. 7), że 100% szczepów z K1 oraz K2 było wrażliwych na tazobaktam, piperacylinę, cefotaksym, amikacyne, aztreonam, ciprofloksacyne, trimetoprim oraz cefamandol (tab. 20). Wynik ten jest pozytywny ze względu na dużą

skuteczność w hamowaniu wzrostu badanych szczepów *E. coli*. Z wyizolowanych szczepów *E. coli* z wód Turcji uzyskano 19,6% izolatów opornych na trimetoprim [20]. W punkcie K1 wykazano oporność 12,5% szczepów na ceftazydym, cefoksytyne i ampicyline, oraz 50% opornych na amoksycyline, pozostała część tych szczepów była wrażliwa na te antybiotyki. Średnią wrażliwość (I) wykazano dla 37,5% szczepów na cefazoline, oraz 12,5% szczepów na cefepim. W punkcie K2 wykazano 50% szczepów opornych na amoksycyline, 33,3% szczepów opornych na ampicyline, cefalotyne, tikarcyline, cefoksytyne, ceftazydym, 16,7% szczepów opornych na cefepim, tetracycline, cefazoline oraz gentamicyne. W badaniach dotyczących rzeki Rada wykazano 16% szczepów *E. coli* opornych na tetracycline co stanowi bardzo podobny wynik do uzyskanych w niniejszych badaniach [12]. Średnią wrażliwość (I) w K2 wykazano dla 33,3% szczepów na cefazoline, oraz 16,7% szczepów na tobramycyne i netilmicyne.



Rysunek 8. Wykres ukazujący wyniki określające profil oporności wyizolowanych szczepów *E. coli* ze śniegu na wybrane antybiotyki wg wytycznych EUCAST podane w wartościach procentowych [opracowanie własne]

We wszystkich badanych próbach (rys. 8), 100% szczepów było wrażliwych na gentamicyne oraz cefalotaksym. W przeciwieństwie do wyników Łuczkiwicz i in. 2011 [12] określili, że 3% szczepów wykazuje oporność na cefalotaksym, a 6% na gentamicynę. W próbach z punktów R, K1 oraz K2 wykazano 100% szczepów wrażliwych na tazobaktam, piperacyline oraz trimetoprim. Trimetopim jest antybiotykiem działającym synergistycznie z sulfametaksazolem przeciwko drobnoustrojom. Najczęściej jest stosowany w leczeniu dróg moczowych, więc wykazana 100% wrażliwość szczepów jest pozytywnym wynikiem dla jego dalszego stosowania. W próbach z punktów R oraz K2 wykazano, że 100% szczepów jest wrażliwych na tetracycline, amikacyne, aztreonam, tobramycyne, ciprofloksacyne, cefazoline oraz cefamandol. W śniegu z R 100% szczepów była wrażliwych na tikercyline. Średnią wrażliwość w tym punkcie wykazano dla 50% szczepów dla cefepimu, a w punkcie K2 25%

szczepów dla tego samego antybiotyku, w K1 16,7% szczepów na cefamandol, w punkcie H 33,3% na tetracyklinę. Oporność w punkcie H wykazało 100% szczepów na ceftazydym, cefepim i cefoksytyna, 66,7% szczepów – na tazobaktam, amikacyna, tobramycyna, ciprofloksacyna oraz tikarcylina, 33,3% szczepów piperacylina, netamicylina, trimetoprim, amoksycylina i ampicylina. 100% oporności szczepów *E. coli* na cefepim jest bardzo niepokojąca ze względu na fakt, że antybiotyk ten należy do IV generacji co oznacza, że jest on stosowany jedynie w warunkach szpitalnych [12]. W badaniach prowadzonych na rzekach Indii spośród 169 izolatów, oporność na cefoksytyne, trimetoprim oraz ciprofloksacyna mieściła się w przedziale 50-81,1% [21], co stanowi bardzo podobne wyniki do tych uzyskanych przez mnie dla punktu H. Oporność w punkcie R wykazało 50% szczepów na ceftazydym, cefoksytyne, 25% na cefalotyna. Oporność na cefalosporyny stwierdzono również w szczepach wyizolowanych z wody Dhaki (Bangladesz) [8]. Oporność w punkcie K1 wykazało 50% szczepów na amoksycylina, 33,3% na ceftazydym, tikarcylina, ciprofloksacyna, cefazolina, ampicylina, 16,7% na cefoksytyne, cefepim, tetracyklinę, amikacyna, aztreonam, tobramycyna oraz cefamandol. W przeciwieństwie do tych wyników w badaniach na próbach wody z Zaria, z których zostały wyizolowane 184 szczepy *E. coli*, aż 83,7% wykazywało oporność na ampicylina, a 15,2% na ciprofloksacyna [22]. Oporność w punkcie K2 wykazało 75% szczepów na amoksycylina, 50% na ceftazydym, ampicylina i tikarcylina, a 25% na cefoksytyne, cefalotyna. Tak wysoką oporność szczepów *E. coli* na amoksycylina stwierdzono również w badaniach Subba i in. 2013 [23], gdzie określono oporność tych bakterii na poziomie 94%.

Tabela 8. Udział procentowy genów oporności typu ESBL u szczepów *E. coli* (n = 34)

Punkt badań	R		K1				K2				H		J	
	ŚNIEG	WODA	ŚNIEG	WODA	ŚNIEG	WODA	ŚNIEG	WODA	ŚNIEG	WODA	ŚNIEG	WODA		
Gen	O	B	O	B	O	B	O	B	O	B	O	B	O	B
^{bla} TEM	50	50	62,5	37,5	25	75	66,7	33,3	100	0	0	100	33,3	66,7
^{bla} OXA	Nie stwierdzono													
^{bla} CTX _M	100	0	62,5	37,5	100	0	66,7	33,3	75	25	100	0	33,3	66,7
^{bla} SHV	Nie stwierdzono													
Legenda: O – obecność genu, B – brak genu														

Źródło: Opracowanie własne

W badaniach przeprowadzonych w 2013 r. [24], 18,4% szczepów *E. coli* wyizolowanych z rzeki było zdolnych do wytwarzania β-laktamaz. Wykazano także obecność w próbach genów ESBL (66,4%). W badaniach własnych (tab. 8) analizowano występowanie genów oporności typu ESBL u 34 szczepów bakterii *E. coli* z prób wody i śniegu z pięciu punktów tj. R, K1 oraz K2, H i J. Z 6 szczepów wyizolowanych ze śniegu z miejsca K1, 100% wykazywało obecność genu ^{bla}CTX-M, a 25% ^{bla}TEM. Ze szczepów z prób śniegu K2, 75% posiadało gen ^{bla}CTX-M, a 100% ^{bla}TEM. Szczepy te pobrane zostały z jednego stoku i wskazują na zróżnicowanie występowania genów oporności w różnych jego miejscach. Jeżeli chodzi o próby wody z tych miejsc to w przeciwieństwie do śniegu charakteryzują się one zbliżonymi wynikami. Z punktu K1 62,5% szczepów, a z K2 66,7% posiadała geny ^{bla}CTX-M oraz ^{bla}TEM. Obecność

genu *bla*CTX-M poza wyżej wymienionymi, posiadało także 100% szczepów wyizolowanych z punktu R oraz Ha, i 33,3% szczepów z punktu J. W badaniach Dhanji i in. 2010 [25], wyizolowano 30 szczepów z rzeki Tamizy opornych na cyprofloksacyne, w tym 30% posiadało gen *bla*CTX_{M14}, a reszta nie wykazywała obecności genów ESBL. Jeżeli chodzi o występowanie genu *bla*TEM to stwierdzono go także u 50% szczepów z R i 33,3% z J. Spośród wszystkich izolatów z punktu H badanych pod kątem obecności genu *bla*TEM, nie uzyskano wyników dodatnich. W badaniach innych autorów 41% izolatów z wody posiadało gen *bla*TEM [8]. W badaniach wykazano największą dominację genu *bla*CTX_M, który posiadało aż 66,3% szczepów (108 – *bla*CTX_{M15}, 4 – *bla*CTX_{M55}), gen *bla*TEM posiadało 43,8%, a gen *bla*OXA 39,6% szczepów [20]. Z wszystkich izolatów badanych pod kątem obecności genu *bla*OXA i *bla*SHV, nie uzyskano wyników pozytywnych. Oznacza to, że najprawdopodobniej wody na badanym obszarze nie zawierają wymienionych genów. W badaniach innych autorów genami dominującymi były również *bla*CTX_M oraz *bla*TEM, ale w przeciwieństwie do moich wyników wykazały one niewielki udział *bla*OXA [26].

3.3. Tandemowa spektrometria masowa z chromatografią cieczerową i elektrorozpyleniem (LC-ESI-MS/MS)

Lek, po podaniu do organizmu człowieka, przechodzi szereg procesów metabolicznych, w których zmienia on swój skład chemiczny. Przemiany te mają też na celu zmianę struktury antybiotyku na hydrofilową oraz polarną. Jednak nasz organizm nie jest w stanie całkowicie zdegradować cząsteczki antybiotyku i są one końcowo wydalane wraz z moczem i transportowane do oczyszczalni, a niekiedy nielegalnie odprowadzane wraz ze ściekami do wód powierzchniowych. Procesy chemiczne, jak i fizyczne stosowane do oczyszczania ścieków w oczyszczalniach również nie usuwają 100% obecnych antybiotyków, przez co wraz z oczyszczonym ściekiem również trafiają one końcowo do wód powierzchniowych. Podczas biodegradacji usuwanych jest jedynie 50-70% obecnych antybiotyków. Skuteczniejszą metodą okazuje się ozonowanie, które niszczy 90-99% farmaceutyków [27]. Badania próbki pobranej w rejonie oczyszczalni (tab. 9) wykazały obecność prawie wszystkich badanych antybiotyków w trzech terminach z wyłączeniem: cefuroksymu, tylozyny w dwóch ostatnich terminach, ceftazydymu w próbie z 6.01.2018 r. oraz lewofloksacyny z próby pobranej w grudniu 2018. Do punktu tego odprowadzane są oczyszczone ścieki z pobliskiej oczyszczalni ścieków. Wyniki te potwierdzają tylko fakt, że procesy stosowane w oczyszczalniach nie są w stanie usunąć 100% obecnych w ściekach antybiotyków. Potwierdzają to również badania na ścieku oczyszczonym z rzeki Hoje w Szwecji, które wykazały obecność sulfametaksazolu oraz trimetoprimu. W tym samym państwie w jeziorze Malaren i Saltsjo wykazano obecność ofloksacyny [28]. W innych badaniach wykazano, że sulfametaksazol i trimetoprim obecny był w wodach Tamagawy (Japonia), Youngsamu (Korea Płd.), Sekwany (Francja) oraz Douro (Portugalia) [29]. W punkcie Ujęcie nie wykazano obecności ampicyliny, sulfametaksazolu, tylozyny oraz ceftazydymu w żadnym z trzech terminów. W poborze z listopada 2018 nie wykazano obecności ofloksacyny, ciprofloksacyny, klindamycyny i erytromycyny, a w grudniu 2018 nie potwierdzono obecności ciprofloksacyny oraz enfloksacyny. Obecność antybiotyków w wodach Ujęcia jest znacznie rzadsza w porównaniu do próbek z Oczyszczalni. Obecność ciprofloksacyny wykazano w wodach powierzchniowych USA, ale także w znacznie większych ilościach w osadach dennych [27].

Stwierdzono także, że obecność w wodach antybiotyków przekłada się na szerzenie oporności bakterii na poszczególne antybiotyki. W niniejszych badaniach wykazano, że obecność ampicyliny, ceftazydymu oraz cefoksytyny w wodach Białki wpływa na występowanie bakterii opornych na te antybiotyki.

Tabela 9. Wyniki tandemowej spektrometrii masowej z chromatografią cieczerową i elektrorozpylianiem dla badanych antybiotyków

Antybiotyk	Jony produk-tów	RT	Masa	Prekur-sor Ion	U					O				
					23.11.2018	20.12.2018	06.01.2019	23.11.2018	20.12.2018	06.01.2019	23.11.2018	20.12.2018	06.01.2019	
Trimetoprim	81,1	1,469	290,2	291,2	-	+	+	+	+	+				
	123,1				-	+	+	+	+	+				
	230,1				+	+	+	+	+	+				
	261,1				+	+	+	+	+	+				
Ofloksacyna	42,2	1,765	351,14	362,2	-	+	-	+	+	+				
	58,2				-	+	+	+	+	+				
	251,1				-	+	+	+	+	+				
	318,1				-	+	+	+	+	+				
Ciprofloksacyna	204,1	1,805	331,13	332,1	-	-	-	-	-	-				
	231				-	-	+	+	+	-				
	245,1				-	-	+	+	+	-				
	314,1				-	-	+	+	+	+				
Klindamycyna	69,3	2,08	424,18	425,2	-	+	-	+	+	-				
	82,2				-	+	+	+	+	+				
	126,2				-	+	+	+	+	+				
	220,8				-	-	-	-	-	-				
Erytromycyna	83,2	2,439	733,46	734,5	-	+	+	+	+	+				
	98,2				-	+	-	+	+	+				
	116,2				-	+	-	+	+	+				
	158,2				-	+	+	+	+	+				
Ampicylina	79,1	1,411	349,11	350,1	-	-	-	-	-	-				
	91,1				-	-	-	-	-	-				
	106,1				-	-	-	-	-	-				
	114				-	-	-	+	+	+				
Sulfametaksazol	39,1	2,277	253,05	254,1	-	-	-	+	+	+				
	65,1				-	-	-	+	+	+				
	92,1				-	-	-	+	+	+				
	108,1				-	-	-	+	+	+				
Tylozyna	101,2	2,527	915,52	916,5	-	-	-	-	-	-				
	132,2				-	-	-	-	-	-				
	174,2				-	-	-	+	-	-				
	772,5				-	-	-	-	-	-				
Lewofloksacyna	-	1,57	361,14	362,2	+	+	+	+	-	+				
Enrofloksacyna	-	1,707	359,16	360,2	+	-	+	+	+	+				
Cefoksytyna	-	2,056	427,05	428,1	+	+	+	+	+	+				
Doksycyclina	-	2,213	444,15	445,2	+	+	+	+	+	+				
Cefuroksym	-	3,557	424,07	425,1	+	+	+	-	-	-				
Ceftazydym	-	1,28	546,1	547,1	-	-	-	+	+	-				

Źródło: Opracowanie własne

W ostatnich latach prowadzi się wiele badań dotyczących jakości wód powierzchniowych, które jednoznacznie potwierdzają ich zanieczyszczenie. W wodzie znajdują się związki organiczne, metale ciężkie, pestycydy, farmaceutyki, a w tym antybiotyki. Związki te kumulowane są w osadach dennych i wodach. Trafiające do wód powierzchniowych antybiotyki oddziałują negatywnie na bytujące w nich zwierzęta, ale również przedostają się do gleb, gdzie człowiek uprawia rośliny, które następnie spożywamy. Takie zanieczyszczenie trafiające do naszych organizmów jest szczególnie niebezpieczne dla osób z dolegliwościami wątroby oraz niewydolnością nerek. Staje się to poważnym problemem na skalę światową. Spowodowane jest to niewłaściwą utylizacją leków w szpitalach, ale także w naszych domach czy gospodarstwach. Trafiające do wód antybiotyki mają stężenia subletalne, co sprzyjająco wpływa na szerzenie zjawiska lekooporności wśród bakterii. Wytwarzanie lekooporności może obejmować tylko bakterie typowe dla środowiska wodnego, jednak niestety najczęściej lekooporność nabywają bakterie chorobotwórcze [28].

4. Wnioski

- 1) Badania w kierunku zanieczyszczenia mikrobiologicznego wód oraz śniegu wskazują na ich znaczne zanieczyszczenie bakteriologiczne, w szczególności bakteriami grupy *coli* oraz mezofilnymi.
- 2) Na liczebność badanych drobnoustrojów w badanych próbkach wód może mieć wpływ niekontrolowany wypływ ścieków z ośrodków wypoczynkowych, co następnie powoduje dalsze zanieczyszczenie mikrobiologiczne sztucznego śniegu.
- 3) Udział szczepów lekoopornych *E. coli* wyizolowanych z prób wody był mniejszy w porównaniu do szczepów wyizolowanych ze śniegu.
- 4) Najczęściej stwierdzano oporność na ceftazydym oraz amoksycylinę.
- 5) Analiza obecności genów warunkujących oporność ESBL wśród wyizolowanych szczepów z wody i śniegu wykazała dominację genów blaCTX-M oraz blaTEM, natomiast nie stwierdzono obecności genów blaOXA i blaSHV.
- 6) Liczba antybiotyków obecnych w wodach Białki w sezonie zimowym zwiększa się wraz z biegiem czasu.
- 7) Wśród badanych punktów, najwięcej antybiotyków stwierdzono przy zrzucie ścieków z oczyszczalni, co sugeruje, że procesy oczyszczania nie eliminują w 100% antybiotyków obecnych w ściekach.
- 8) Badania wykazały, że oporność bakterii na antybiotyki, związana jest z obecnością tych substancji w wodach Białki.

Literatura

1. Guz K., Doroszkiewicz W., *Kontrola i ocena jakości wody w ochronie środowiska*, Ekologia i technika, 11, 2013, s. 22-31.
2. Lenart-Boroń A., Wolanin A., Jelonkiewicz Ł., Żelazny M., *Factors and mechanisms affecting seasonal changes in the prevalence of microbiological indicators of water quality and nutrient concentrations in waters of the Białka river catchment, southern Poland*, Water air soil pollut, 227, 2016, s. 302.
3. Łebkowska M., *Występowanie bakterii antybiotykoopornych w wodzie przeznaczonej do spożycia przez ludzi*, Ochrona środowiska, Polskie Zrzeszenie Inżynierów i Techników Sanitarnych, 31, 2009, s. 11-15.

4. Libudzisz W., Kowal K., Żakowska Z. (red.), *Mikrobiologia techniczna*, PWN, Warszawa 2012.
5. Siedlecka A., Piekarska K., *Metody hodowlane i molekularne w badaniach antybiotyk oporności w wodzie wodociągowej*, Politechnika Wroclawska 2016.
6. Siedlecka A., *Antybiotykkooporność mikroorganizmów w systemach oczyszczania ścieków*, Technical Issues, 1, 2016, s. 74-81.
7. Gniadkowski M., Żabicka D., Hryniewicz W., *Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki*, KORLD, 2009.
8. Hryniewicz W., *Tabele interpretacji wyników oznaczania lekowrażliwości zgodnie z zaleceniami EUCAST*, www.korld.edu.pl/pdf/EUCAST_breakpoints_t%C5%82umaczenie_wersja_8_2018.pdf, 06.12.2018 r.
9. Gao W., Smith W., Li Y., *Natural freezing as a wastewater treatment method: E. coli inactivation capacity*, Water Research, 12, 2006, s. 2321-2326.
10. Lenart-Boroń A., Prajsnar J., Boroń P., *Survival and Antibiotic Resistance of Bacteria in Artificial Snow Produced from Contaminated Water*, Water Environment Research, 89, 2017, s. 2059-2069.
11. Adamowicz-Małecka M., Kubera Ł., Okoniewska A., Donderski W., *Stan sanitarno-bakteriologiczny Stugi Jarcewskiej*, Zeszyty problemowe postępów nauk rolniczych, 567, 2011, s. 189-197.
12. Łuczkiwicz A., Jankowska., Kurlenda J., Oleńczuk-Nayman K., *Identification and Antimicrobial Susceptibility of Fecal Coliforms Isolated from Surface Water*, Polish J. of Environ, 4, 2011, s. 941-950.
13. Parker L.V., Yushak M.L., Martel C.J., Reynolds C.M., *Bacterial survival In snow made from waste water*, US ArmyCorps of Engineers 2000.
14. Berleć K., Jurek A., Michalska M., Traczykowski A., *Mikroflora rekultywowanych zbiorników wodnych na przykładzie Jeziora Rudnickiego Wielkiego*, Rocznik Ochrona Środowiska, 11, 2009, s. 1029-1040.
15. Kukuła E., *Ocena jakości mikrobiologicznej wód Sanu*, II Konferencja Naukowo-Techniczna „Błękitny San”, 2006, s. 125.
16. Frąk M., *Zanieczyszczenia bakteriologiczne w ocenie jakości wód Biebrzy*, Woda-Środowisko-Obszary wiejskie, 2, 2010, s. 73-82.
17. Donderski W., Wilk I., *Bacteriological Studies of Water ant bottom sediments of the Vistula river between Waszygród and Toruń*, Polish journal of environmental studiem, 1, 2001, s. 33-40.
18. Frączek K., Grzyb J., Chmiel M., *Ocena zagrożenia bakteriologicznego w wodach powierzchniowych w rejonie eksploatowanego środowiska odpadów komunalnych*, Woda - Środowisko - Obszary wiejskie, 15, 2014, s. 37-45.
19. Michałowski M., *Analiza zanieczyszczeń związkami fenolowymi górnego dorzecza Raby i Dunajca oraz ustalenie źródeł emisji tych związków*, Inżynieria Mineralna, 1, 2011, s. 19-26.
20. Ozgumus O., Celik-Sevim E., Alpay-Karaoglu S., Sandalli C., Sevim A., *Molecular Characterization of Antibiotic Resistant Escherichia coli Strains Isolated from Tap and Spring Waters in a Coastal Region in Turkey*, The Journal of Microbiology, 5, 2007, s. 379-387.
21. Akiba M., Sekizuka T., Yamashita A., Kuroda M., Fujii Y., Murata M., Lee K., Joshua D., Balakrishna K., Bairy I., Subramanian K., KrishnanP., Munuswamy N., Sinha R., *Distribution and relationships of antimicrobial resistance determinants among extended - spectrum - cephalosporin - resistant or carbapenem - resistant Escherichia coli isolates from rivers and sewage treatment plants in India*, Antimicrobial agents and chemotherapy, 5, 2016, s. 2972-2980.

22. Chigor V., Umoh V., Smith S., Igbinsosa E., Okoh A., *Multidrug resistance and plasmid patterns of Escherichia coli O:157 and other E. coli isolated from diarrhoeal stools and surface waters from some selected sources in Zaria, Nigeria*, International journal of environmental research and public health, 10, 2010, s. 3831-3841.
23. Subba P., Joshi D.R., Bhatta D.R., *Antibiotic resistance pattern and plasmid profiling of thermotolerant Escherichia coli isolates in drinking water*, Journal of nepalhealthresearchcoun - cil, 1, 2013, s. 44-48.
24. Korzeniewska E., Korzeniewska A., Harnisz M., *Antibiotic resistant Escherichia coli in hospital and municipal sewage and their emission to the environment*, Ecotoxicology and Environmental Safety, 91, 2013, s. 96-102.
25. Dhanji H., Murphy N., Akhigbe Ch., Doumith M., Hope R., Livermore, Woodford D., *Isolation of fluoroquinolone – resistant O25b:H4 – ST131 Escherichia coli with CTX – M – 14 extended – spec trum β -Lactamase from UK River water*, Journal of antimicrobialchemotherapy, 3, 2010, s. 512-516.
26. Chandran S., Divan V., Tamhankar A., Joseph B., Rosales-Klintz S., Mundayoor S., Lundborg C., Macaden R., *Detection of carbapenem resistance genes and cephalosporin, and quinolone resistance genes along with oqxAB gene in Escherichia coli in hospital wastewater: a matter of concern*, Journal applied microbiology, 117, 2014, s. 984-995.
27. Szymonik A., Lach J., *Obecność farmaceutyków w wodach powierzchniowych i przeznaczonych do spożycia*, Proceedings of ECOpole, 7, 2013, s. 2.
28. Szymonik A., Lach J., *Zagrożenie środowiska wodnego obecnością środków farmaceutycznych*, Inżynieria i Ochrona Środowiska, 15, 2012, s. 249-263.
29. Monteiro SC., Boxall AB., *Occurrence and fate of human pharmaceuticals in the environment*, Rev Environ Contam Toxicol, 202, 2010, s. 53-154.

Zanieczyszczenie mikrobiologiczne, lekooporność *Escherichia coli* i obecność antybiotyków w sztucznym śniegu oraz wodzie

Streszczenie

Ciągle rozwijająca się infrastruktura narciarska i napływ turystów na południu Polski, niesie za sobą pogorszenie stanu jakości wód powierzchniowych. Przeprowadzono badania stanu mikrobiologicznego wód i śniegu, lekooporności bakterii, występowania genów oporności oraz obecności antybiotyków w wodach w miejscowości Białka Tatrzańska, Jurgów oraz Zakopane. Celem analiz było określenie czy stale rozwijająca się turystyka i sztuczne naśnieżanie stoków wpływają na jakość wód powierzchniowych oraz na szerzenie lekooporności wśród bakterii. Celem badań było także wykazanie czy obecność antybiotyków w wodach ma odzwierciedlenie w lekooporności u bakterii na te antybiotyki. Analizy obejmowały trzy pobory na przełomie 2018 i 2019 roku. Pobierane były próby wody z rzeki Białki oraz potoku Remiaszów, a także śnieg ze stoków Kotelnica, Remiaszów, Bania, Harenda oraz Jurgów. Stan wód określono na podstawie liczebności bakterii wskaźnikowych metodą seryjnych rozcieńczeń oraz filtracji membranowej. Obecność wybranych antybiotyków oznaczono za pomocą tandemowej spektrometrii masowej z chromatografią ciecząową i elektrorozpylaniem. Lekooporność bakterii wyznaczono za pomocą antybiogramu podstawowego oraz rozszerzonego, metodą dyfuzji krążkowej, a wyniki obecności genów oporności uzyskano metodą PCR i elektroforezą w żelu agarozowym. Uzyskane wyniki wykazały znaczne zanieczyszczenie bakteriologiczne, głównie bakteriami grupy *coli*. Na liczebność badanych drobnoustrojów może mieć wpływ niekontrolowany wpływ ścieków z ośrodków wypoczynkowych. Badania wyizolowanych szczepów z prób wody wykazały mniejszą antybiotykooporność w porównaniu do szczepów izolowanych ze śniegu. Analiza występowania genów oporności typu ESBL wśród wyizolowanych szczepów wykazała dominację genów *bla*CTX oraz *bla*TEM, natomiast nie wykazała obecności genów *bla*OXA i *bla*SHV. Badania wykazały, że procesy oczyszczania nie eliminują 100% antybiotyków obecnych w ściekach, a ich wprowadzanie do wód powierzchniowych, może przyczyniać się do nabywania przez bakterie lekooporności. Słowa kluczowe: lekooporność, wody powierzchniowe, zanieczyszczenie mikrobiologiczne

Microbial contamination, drug resistance of *Escherichia coli* and the presence of antibiotics in artificial snow and water

Abstract

Constantly developing ski infrastructure and tourism in southern Poland result in deterioration of the surface water quality. The analyzes involving the microbiological quality of water and snow, bacterial drug resistance, the presence of bacterial resistance genes and the presence of antibiotics in these waters were carried out in Białka Tatrzańska, Jurgów and Zakopane. The aim of the analyzes was to determine whether constantly growing tourism and artificially snowed ski slopes affect the quality of surface waters, and the spread of drug resistance among bacteria. The aim of the study was also to show whether the presence of antibiotics in waters is reflected in the occurrence of drug resistance in bacteria. At the turn of 2018 and 2019 water samples were collected from the Białka River and the Remiaszów Stream, while snow samples were collected from the slopes of Kotelnica, Remiaszów, Bania, Harenda and Jurgów ski stations. The quality of water was determined based on the number of indicator bacteria using the serial dilution and membrane filtration methods. The presence of selected antibiotics was determined by tandem mass spectrometry with liquid chromatography and electrospraying. Bacterial drug resistance was determined using a basic and extended antibiogram, with the disk diffusion method while the presence of resistance genes was assessed by PCR and agarose gel electrophoresis. The obtained results showed significant bacteriological contamination, mainly with coliforms. The number of tested microorganisms may be affected by the uncontrolled sewage outflow from leisure centers. Studies of strains isolated from water samples have shown lower antibiotic resistance compared to snow-derived strains. Analysis of the presence of resistance genes among isolated strains showed the dominance of *bla*^{CTX-M} and *bla*^{TEM} genes, while the *bla*^{OXA} and *bla*^{SHV} genes were not found. Studies have shown that the sewage treatment processes does not eliminate 100% of antibiotics present in the wastewater, and its introduction into surface waters can contribute to the acquisition of drug resistance by bacteria.

Keywords: antibiotic resistance, microbiological contamination, surface water

Pionierskie grzyby zlichenizowane, czyli porosty jako samowystarczalne źródło unikalnych metabolitów wtórnych

1. Wprowadzenie

1.1. Systematyka

Porosty (*Lichens*) stanowią polifiletyczną grupę plechowych organizmów symbiotycznych zajmujących niemal wszystkie typy środowisk lądowych. Wykazują wielokomponentową strukturę złożoną z przedstawicieli królestwa grzybów (*Fungi*), roślin (*Plantae*) i bakterii (*Bacteria*), przez co nie tworzą odrębnej jednostki taksonomicznej. W zamian określa się je mianem grupy ekologicznej [1, 2]. Należy do niej ponad 18 800 gatunków klasyfikowanych na podstawie przynależności taksonomicznej komponentu grzybowego [3], przy czym szacuje się istnienie około 28 000 gatunków [4]. W Polsce zaś opisano 1642 gatunki [5].

Wyróżnia się dwie kategorie partnerów współtworzących plechę porosta. Główny element budowy plechy stanowi układ strzępek grzybni pochodzący od mykobionta, komponentu grzybowego, będącego u większości gatunków przedstawicielem gromady workowców *Ascomycota*. Do tej gromady należy 114 spośród 125 opisanych rodzin porostów. W pozostałych przypadkach, a więc zaledwie u 5% gatunków, rolę tę pełnią podstawczaki *Basidiomycota* [1].

Strzępki grzybni oplatają pojedyncze komórki autotroficznych organizmów zdolnych do przeprowadzania fotosyntezy określanymi mianem fotobionta. W roli tego komponenta najczęściej, a więc dla około 92% gatunków porostów, opisuje się zielenice właściwe *Chlorophyceae* należące głównie do rodzajów *Trebouxia* i *Trentepohlia*, a oprócz nich także sinice *Cyanobacteria*. Ze względu na przeważający udział mykobionta w tworzeniu plechy, porosty nazywa się także grzybami zlichenizowanymi. Można byłoby zatem uznać, że są to grzyby, które przyjęły strategię życiową polegającą na wchodzeniu w symbiotyczne związki z organizmami autotroficznymi, by zdobyć stabilne i łatwo dostępne źródło prostych związków organicznych, podobnie jak chociażby grzyby mikoryzujące z roślinami naczyniowymi. Stwierdzenie to byłoby jednak zbyt dużym uproszczeniem, jako że powstały organizm porosta charakteryzuje się odmienną fizjologią, diametralnie różnymi cechami morfologicznymi, a także całkiem przekształconym metabolizmem. Komponenty plechy porostów nie zachowują odrębności, a ich relacja jest bardzo skomplikowana, jako że obserwuje się wyraźne cechy co najmniej trzech typów interakcji międzygatunkowych: mutualizmu, pasożytnictwa i helotyizmu [1, 6].

¹ kj.staskiewicz@student.uw.edu.pl, Zakład Biochemii Roślin, Instytut Biochemii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, <http://zbr.uw.edu.pl>.

² szakal@biol.uw.edu.pl, Zakład Biochemii Roślin, Instytut Biochemii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, <http://zbr.uw.edu.pl>.

1.2. Morfologia

W zależności od gatunku plecha przyjmuje rozmaite kształty, które przyporządkować można do kilku typów. Najczęściej wyróżnia się plechę skorupiastą, listkową (rys. 1) i krzaczkową, które zostały wymienione w kolejności wzrastającego stopnia zaawansowania plechy. Oprócz tego niektóre źródła opisują także plechę plakodiową, łuseczkową, nitkową i wielopostaciową (rys. 2), które są kombinacjami lub wariantami wcześniej wymienionych trzech typów.



Rysunek 1. Listkowa plecha złotorosta ściennego *Xanthoria parietina* [zdjęcie własne]

W obrębie plechy występują rozmaite struktury. Obecność części z nich wynika z przynależności porostów do królestwa grzybów, a niektóre są charakterystyczne tylko dla nich. Strukturami typowo grzybowymi są owocniki: miseczkowate apotecja i butelkowate perytecja występujące powszechnie u workowców *Ascomycota*, do których należy znaczna większość porostów. Apotecja u niektórych gatunków unoszone są na nóżkach – podecjach. Wewnątrz obu typów owocników znajduje się zarodniotwórcza warstwa hymenialna, gdzie wytwarzane są zarodniki – askospory służące do rozmnażania płciowego. Oprócz tego wiele porostów produkuje zarodniki typu konidialnego.

Porosty wykształciły także skuteczne ścieżki rozmnażania bezpłciowego. Przewagą tej drogi reprodukcji jest zjednoczenie strzępek mykobionta i komórek fotobionta w strukturach zapewniających ciągłość kontaktu komponentów: sorediach i izydiach, charakterystycznych tylko dla tych organizmów. Soredia są urwiskami składającymi się z kilkunastu komórek fotobionta osnutych strzępkami grzyba i wypadają z plechy w miejscach zwanych soroliami. Izydia stanowią odłamujące się od plechy wyrostki o identycznej jak ona budowie.

Ponadto plecha tworzy też struktury niesłużące rozmnażaniu. Należą do nich cefalodia i pseudocyfele. Cefalodia to niewielkie wewnętrzne obszary lub powierzchniowe brodawki, w których znajdują się komórki autotroficznych partnerów innych niż typowy dla danej plechy fotobiont. Najczęściej są to sinice *Cyanobacteria*. Pseudocyfele są zaś rozluźnionymi obszarami plechy, gdzie strzępki są mniej skupione, dzięki czemu skutecznej zachodzi wymiana gazowa [1].



Rysunek 2. Wielopostaciowa plecha chrobotka strzępiastego *Cladonia fimbriata* na omszonej korze sosny. Z łuskowatej plechy pierwotnej wyrastają krzaczkowate struktury będące apotecjami uniesionymi na podcecjach [zdjęcie własne]

1.3. Występowanie

Porosty to organizmy kosmopolityczne, występujące na wszystkich kontynentach kuli ziemskiej. Są obecne we wszystkich strefach klimatycznych, w zdecydowanej większości siedlisk, przy czym rzadziej zasiedlają pola, łąki, czy torfowiska. Ze względu na przystosowania do trudnych warunków jako pierwsze zajmują surowe środowiska o znikomym stopniu konkurencji, czyniąc je bardziej dostępnymi dla kolejnych organizmów na ścieżce sukcesji ekologicznej. Z tego powodu nazywane są organizmami pionierskimi.

Główne podłoża, na których rozwijają się plechy to pnie i gałęzie drzew, murszejące drewno, skały i gleba. Występowanie porostów na korze zależy w dużej mierze od jej pH, które zróżnicowane jest między gatunkami drzew. Ze względu na niedużą konkurencję ze strony innych epifitów, częściej spotyka się je na korze obojętnej i zasadowej, ale są też gatunki kwasolubne, takie jak *Hypogymnia physodes*. Murszejące drewno jest doskonałym siedliskiem zajmowanym przez ziarniaki *Placynthiella* i liczne gatunki chrobotków *Cladonia* [1]. W warunkach niskiej wilgotności i odpowiedniego oświetlenia są one w stanie wypierać obecne tam mszaki [6-8]. Epility, porosty naskalne, są w stanie penetrować twarde podłoże nawet na głębokość jednego centymetra. Istnieją wręcz gatunki endolityczne, które na powierzchnię zajmowanej skały uwalniają wyłącznie owocniki. Wyróżnia się także porosty epigeiczne, naziemne, których reprezentację stanowi płucnica *Cetraria*, przede wszystkim zaś chrobotki *Cladonia*, spotykane na glebach kwaśnych, ubogich i suchych. Tworzą one rozległe połacie borów chrobotkowych. W warunkach żyzniejszych i o większej wilgotności, porosty naziemne ustępują niszy konkurującym z nimi mszakom i roślinom wyższym [1]. Niektóre z nich na drodze „wyścigu zbrojeń” wykształciły zdolność do hamowania kiełkowania nasion w bezpośrednim otoczeniu [6, 8, 9].

Oprócz tego porosty przystosowały się do zajmowania podłoży nietypowych, w tym antropogenicznych, takich jak metalowe blachy, dachówki, betonowe i ceramiczne mury, tworzywa sztuczne, skóra, szkło i inne materiały niedostępne dla pozostałych organizmów. Znaleźć można je również na liściach drzew klimatu międzyzwrotnikowego i igieł drzew klimatu umiarkowanego [1].

1.4. Zagrożenia

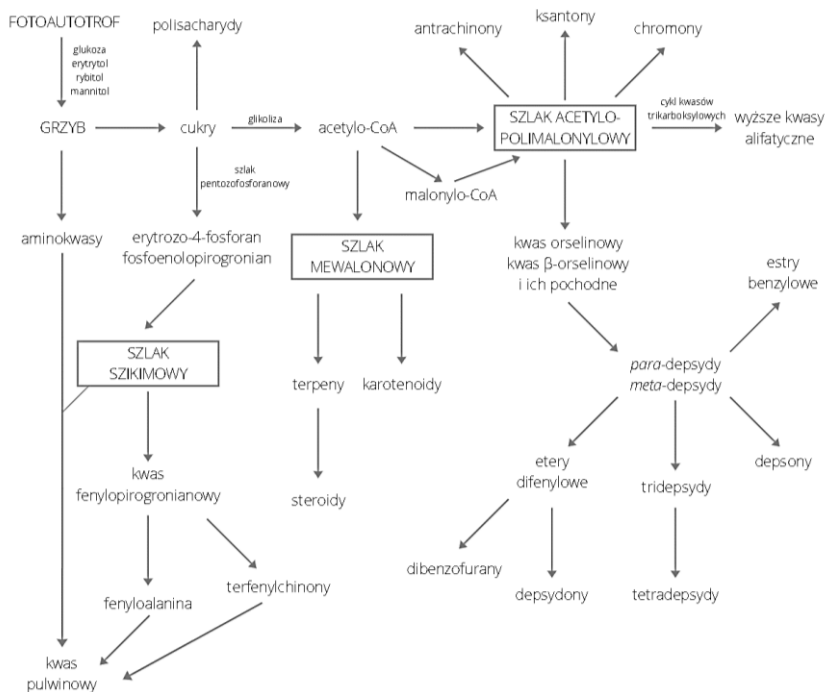
Pomimo szerokiego zasięgu występowania organizmów z grupy porostów oraz ich charakteru pionierskiego, niektóre czynniki środowiska są dla nich szkodliwe. Przede wszystkim plechy są szczególnie wrażliwe na zanieczyszczenie powietrza tlenkiem siarki SO₂, azotu NO, NO₂, pyłami zawieszonymi PM_{2,5}, PM₁₀, a także benzopirenem. Tolerancja poszczególnych gatunków na obecność tych związków w powietrzu różni się w zależności od gatunku, co czyni porosty bioindykatorami czystości powietrza. Na podstawie różnic wytrzymałości wybranych grup porostów wobec stężenia tlenu siarki (IV) w powietrzu wyróżniono siedem stref czystości powietrza, których układ powszechnie nazywany jest skalą porostową. Obecnie w Polsce stężenie tego gazu zostało zredukowane i nie stanowi większego zagrożenia, jednak pozostałe gazy wywierają silny wpływ na porosty powodując zniekształcenie i obumieranie plech na obszarach dotkniętych zanieczyszczeniem.

Porosty narażone są również na szkodliwe skutki innych działań człowieka. Wycinka drzew bezpośrednio zagraża porostom epifitycznym takim jak objęty w Polsce ochroną ścisłą granicznik płucnik *Lobaria pulmonaria*, którego stanowisko znajduje się w Puszczy Białowieskiej. Usuwanie martwego drewna z obszarów leśnych jest natomiast zagrożeniem dla porostów epiksylicznych zajmujących murszejące drewno. W Polsce ochroną objętych jest 205 gatunków grzybów zlichenizowanych, w tym ochroną ścisłą 178, a częściową 27 gatunków [10]. Polska Czerwona Lista roślin i grzybów obejmuje 886 gatunków porostów, co stanowi nieco ponad połowę polskiej lichenobioty [11]. Plechy porostów rosną bardzo powoli, przez co ich populacje odnawiają się wolniej niż w przypadku innych organizmów. Promień wzorca geograficznego *Rhizocarpon geographicum* przyrasta w tempie 0,1-2,4 mm rocznie w zależności od warunków, co czyni go jednym z najwolniej rosnących organizmów. Ta cecha została wykorzystana w lichenometrii zajmującej się datowaniem skał [12]. Wiek arktycznych plech tego gatunku oszacowano na około 5000 lat, istnieje więc przesłanka, że mogą to być najstarsze organizmy na Ziemi [13].

2. Metabolity wtórne

Wyróżnia się dwie grupy związków chemicznych syntezowanych przez porosty, metabolity pierwotne oraz wtórne. Pierwsze z nich są produktami metabolizmu podstawowego wytwarzanymi niespecyficznie wewnątrz komórek obu partnerów, ale też w organizmach niebędących porostami. Do tej grupy związków należą białka, aminokwasy, polisacharydy, polialkohole i witaminy. Niemniej jednak znaczna większość związków organicznych znalezionych w obrębie plech porostów należy do drugiej grupy związków, metabolitów wtórnych wytwarzanych przez komponent grzybowy. Rozmieszczone są przeważnie na powierzchni strzępek grzyba i mają hydrofobowy charakter. Mogą stanowić nawet 30% suchej masy plechy [14]. Dotychczas opisano już ponad 1000 tych związków. Pomimo ich grzybowego pochodzenia, zaledwie 100 z nich zostało zidentyfikowanych w grzybach niezlichenizowanych [15, 16].

Większość metabolitów wtórnych, zarówno roślin, jak i grzybów, powstaje jako produkty kilku charakterystycznych szlaków (rys. 3). Jednym z nich jest szlak poliketydowy, zwany również acetylo-polimalonylowym ze względu na rolę acetylo-CoA oraz malonylo-CoA jako głównych prekursorów syntezy. Innymi ważnymi szlakami, na których powstają metabolity wtórne, to szlaki szikimowy i mewalonowy [2].



Rysunek 3. Schemat ścieżek metabolizmu wtórnego prowadzących do poszczególnych klas związków [opracowanie własne]

2.1. Produkty szlaku poliketydowego

Związki będące produktami szlaku poliketydowego są powszechne u różnych grup organizmów, w tym bakterii, grzybów, roślin wyższych, a także przedstawicieli królestwa zwierząt, takich jak gąbki, owady i mięczaki. Powstają w obecności dużych kompleksów enzymatycznych z grupy syntaz poliketydowych PKS (*polikethide synthase*). Te kompleksy posiadają dwa miejsca wiążące: kwas fosfopantoteinowy i resztę cystyny. Synteza polega na wydłużaniu łańcucha powstającego z jednostek acylo-CoA, którymi mogą być acetylo-CoA, propionilo-CoA oraz malonylo-CoA i jego pochodne. Proces zachodzi na drodze dekarboksylacyjnej kondensacji i przypomina biosyntezę kwasów tłuszczowych. Zasadniczą różnicę stanowi różnorodność jednostek inicjujących reakcję oraz wydłużających łańcuch w szlaku poliketydowym. Dla biosyntezy kwasów tłuszczowych te dwie funkcje pełni odpowiednio acetylo-CoA i malonylo-CoA. W końcowym etapie syntezy poliketydów łańcuch ulega licznym modyfikacjom, w tym cyklizacji, utlenianiu, redukcji i wprowadzaniu rozmaitych podstawników [2].

2.1.1. Alifatyczne kwasy tłuszczowe i ich pochodne

Niektóre produkty szlaku poliketydowego ulegają przekształceniom na drodze cyklu kwasów trikarboksylowych dając wyższe kwasy karboksylowe. Reprezentacja tych związków w porostach nie jest szczególnie liczna. Pojawiają się w obrębie plechy rzadko, w stosunku do częstości występowania u innych grup organizmów. Do przykładów alifatycznych metabolitów wtórnych należy: aspicylina, kwas akarenowy, kwas kaperatowy, kwas protolichesterinowy, czy kwas rokcellowy [2, 17].

2.1.2. Aromatyczne pochodne jednego łańcucha poliketydowego

Znaczną większość metabolitów wtórnych stanowią związki aromatyczne. Spośród nich wyróżnić można grupę związków powstałych w wyniku modyfikacji pojedynczego łańcucha poliketydowego. Najczęściej ulega on wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji, utlenianiu, redukcji, dehydratacji i przyłączaniu różnych podstawników. Otrzymane w ten sposób substancje nie są specyficzne wyłącznie dla porostów, a ich analogi lub związki identyczne spotyka się powszechnie u grzybów niezlichenizowanych i roślin wyższych [2, 17]. Należą do nich:

- antrachinony;
- naftachinony;
- ksantony;
- kromony.

Antrachinony, czyli pochodne antracenu o szkielecie 9,10-antrachinonu o rozmaitych podstawnikach, takich jak grupy hydroksylowe, aminowe, sulfonowe, alkilowe, czy eterowe. Większość antrachinonów to żółte kryształy słabo rozpuszczalne w wodzie o właściwościach przeczyszczających i toksycznych. Wśród nich stwierdzono również wiele substancji o działaniu farmakologicznym. Jednym z najlepiej opisanych antrachinonów występujących w porostach jest parietyna znajdująca się w górnych warstwach plechy porostów o żółtym zabarwieniu, przede wszystkim zaś w złotoroście ściennym *Xanthoria parietina* (rys. 1), od którego nazwy gatunkowej wywodzi się nazwa tej substancji. Innymi związkami z tej grupy znajduwanymi w plechach porostów są chryzofanol, emodyna, endokrokina, fallacynal, ksantoryna, kwas parietynowy, teloschistyna i wiele innych [2, 17, 18].

Nieco podobne do antrachinonów, lecz pozbawione jednego z pierścieni aromatycznych są naftachinony, pochodne naftalenu o szkielecie 1,2-naftachinonu lub 1,4-naftachinonu. Reprezentacja tej grupy związków jest niewielka, jednak w ostatnim czasie identyfikuje się ich coraz więcej. Do przykładów należą: trypetelon, trypetelonamid, metoksytrypetelon, fenalenon i ich pochodne [19-21].

Liczej występują ksantony, które od antrachinonów różnią się atomem tlenu zastępującym atom węgla naprzeciwko grupy ketonowej w szkielecie. W przeciwieństwie do ksantonów obecnych w grzybach niezlichenizowanych, te znajdujące się w porostach często posiadają w cząsteczce atomy chloru jako podstawniki, przykładem jest artotelina. Do lepiej poznanych ksantonów należy licheksanton, norlicheksanton i winetoryna [17].

Inną, nielicznie reprezentowaną wśród porostów grupę typu metabolitów stanowią kromony, czyli pochodne benzopirany o szkielecie benzopiran-4-onu, izomeru kumaryny. Jako przykłady podaje się syfulinę i kwas leparowy. Związki z tej grupy często występują w postaci glikozydów, jest tak w przypadku rokcelliny, czy galapaginy. Kromony to substancje o stwierdzonych bardzo wielu aktywnościach biologicznych [22, 23].

2.1.3. Aromatyczne pochodne więcej niż jednego łańcucha poliketydowego

Inną grupą metabolitów wtórnych są związki aromatyczne powstałe w wyniku modyfikacji i połączenia więcej niż jednego łańcucha poliketydowego. Ich budowa opiera się na jednostkach pochodnych kwasów fenolowych połączonych w dwu- lub

trójczłonowe struktury wiązaniami estrowymi, eterowymi i węgiel-węgiel. Jednostkami są głównie cząsteczki kwasu orselinowego i β -orselinowego powstałych na drodze szlaku poliketydowego i następującej po nim kondensacji, często aldolowej lub Claisena. W wyniku łączenia tych struktur powstaje szeroka gama związków złożonych z więcej niż jednego łańcucha poliketydowego, których część charakterystyczna jest wyłącznie dla porostów. Należą do nich depsydy, tridepsydy, depsony, depsydony, estry benzylowe, etery difenylowe, dibenzofurany oraz kwas usninowy i jego pochodne. Przykładami najintensywniej badanych substancji są: atranoryna, kwas barbatowy (para-depsydy), kwas gyroforowy (tridepsyd), kwas fizodowy i kwas norstiktowy (depsydony) oraz kwas usninowy. Ten ostatni jest jednocześnie najlepiej poznanym i najbardziej charakterystycznym dla porostów metabolitem wtórnym [17].

2.2. Produkty szlaku mewalonowego

Metabolity wtórne będące produktami szlaku mewalonowego zbiorczo nazywa się izoprenoidami, jako że są one zbudowane z jednostek pięciowęglowego związku dwunienasyconego, izoprenu ($-C_5H_8$). Oprócz tego izoprenoidy mogą powstawać też w wyniku innych przemian metabolicznych, głównie na drodze szlaku metyloerytrytolu fosforanu (MEP) zwanego też szlakiem Rohmera. Nie stwierdzono go dotychczas u porostów [24]. Przebieg obu tych szlaków prowadzi do powstania difosforanu izopentynyli (IPP) i jego izomeru difosforanu dimetyloallilu (DMAPP). W przypadku szlaku mewalonowego jako substrat wykorzystywany jest acetylo-CoA. Powstaje z niego 3-hydrokso-3-metyloglutarylo-CoA, który następnie zredukowany jest do kwasu mewalonowego. Ten ulega podwójnej fosforylacji, dekarboksylacji i redukcji dając IPP. W wyniku dalszych przemian tego prekursora, mianowicie kondensacji jednostek na sposób głowa-ogon lub ogon-ogon, powstaje szeroka różnorodność związków izoprenoidowych o liczbie atomów węgla będącą wielokrotnością 5, są to zatem związki C_5 , C_{10} , C_{15} , a nawet C_{20000} w przypadku kauczuku. Często produkty szlaku mewalonowego są dzielone na trzy grupy: terpeny, karoteny i sterole. Ostatnim wspólnym etapem syntezy jest utlenianie skwalenu do 2,3-oksydoskwalenu [17, 25, 26].

2.2.1. Terpenoidy

Najliczniej reprezentowaną kategorią naturalnie występujących u żywych organizmów związków organicznych określane są terpeny i ich pochodne zawierające dodatkowe grupy hydroksylowe, karbonylowe i karboksylowe, terpenoidy. Do tej pory opisano ponad 40 000 tych struktur [26]. Ze względu na liczbę atomów węgla w cząsteczce dzieli się je na hemiterpeny (C_5), monoterpeny (C_{10}), seskwiterpeny (C_{15}), diterpeny (C_{20}), triterpeny (C_{30}), tetraterpeny (C_{40}), pentaterpeny (C_{50}) i politerpeny (C_{5n}). Często terpenoidy występują w postaci glikozydów. W porostach znaleziono diterpeny, triterpeny i tetraterpeny, przy czym te ostatnie znane są jako **karoteny** i stanowią produkty metabolizmu pierwotnego [27, 28]. Kolejne badania wykazały również obecność monoterpenów, seskwiterpenów [29], a nawet rzadko spotykanych sesterterpenów (C_{25}) w obrębie plech niektórych gatunków porostów [30]. Dotychczas opisano ponad 70 tych substancji wśród porostów [17, 29- 32], przy czym przewiduje się istnienie znacznie większej ich liczby, ze względu na rozmaite profile enzymatyczne odpowiadające za syntezę niewykrytych jeszcze związków, co ukazują ostatnie badania obejmujące sekwencjonowanie genomu *Cladonia uncialis* w celu analizy

metabolomu tego gatunku porosta [33]. Wiele terpenoidów opisanych dla porostów są dla nich specyficzne, przykładowo permelabdon u *Parmelia perlata* [31]. Inne występują powszechnie u roślin wyższych, grzybów niezlichenizowanych, czy zwierząt, jak w przypadku bufotaliny znalezionej u porosta *Brachythecium velutinum* [32] i w skórze ropuchy *Bufo bufo*, a także kwasu ursolowego, który wyekstrahować można zarówno z plechy *Ramalina hierrensis*, jak i z roślin wyższych, przykładowo z owoców borówki brusznicy *Vaccinium vitis-idaea* [34]. Najpowszechniejszym i najlepiej poznanym terpenoidem typowym dla świata porostów jest zeoryna [14, 27].

2.2.2. Steroidy

Podobnie jak terpenoidy, steroidy są bardzo powszechnymi i aktywnymi biologicznie metabolitami porostów, choć nie stanowią tak licznej grupy związków jak poprzednio omówiona. Często uznaje się za metabolity pierwotne ze względu na ich obecność w błonach komórkowych obu komponentów, jednak w wielu opracowaniach podawane są jako produkty metabolizmu wtórnego. Powstają w wyniku cyklizacji 2,3-oksydoskwalenu. W plechach najczęściej stwierdza się obecność ergosterolu, fungisterolu, lichesterolu, β -sitosterolu i brassikasterolu. Ergosterol stanowi główną barierę między grzybową błoną komórkową a otoczeniem [17, 35].

2.3. Produkty szlaku szikimowego

Szlak szikimowy jest jedyną znaną drogą biosyntezy aminokwasów aromatycznych: fenyloalaniny, tyrozyny i tryptofanu. Biosynteza rozpoczyna się od dwóch substratów, fosfoenolpirogonianu (PEP) uzyskanego z glikolizy oraz erytrozo-4-fosforanu, jednego z produktów szlaku pentozofosforanowego. Są one przekształcane w siedmiu etapach, z kwasem szikimowym jako produktem pośrednim, do choryzmianu będącego prekursorem zarówno aminokwasów aromatycznych, jak i wielu metabolitów wtórnych. Te powstające w porostach syntezowane są w wyniku przekształcenia choryzmianu do fenylopirogonianu, który następnie jest przekształcany w terfenylchinony lub fenyloalaninę, a z nich powstaje kwas pulwinowy i jego pochodne [36].

Zaobserwowano, że wśród rodzajów porostów zawierających w obrębie plechy przedstawicieli *Cyanobacteria* częściej zachodzi biosynteza kwasu pulwinowego i jego pochodnych. Najprawdopodobniej jest to związane z ich lepszym dostępem do przyswajalnego źródła azotu za sprawą wiążących ten gaz sinic. Pomimo że końcowe produkty często nie zawierają atomu azotu w cząsteczce, jest on niezbędny do przeprowadzenia etapów pośrednich biosyntezy [17].

Szeroko rozpowszechnionymi wśród porostów produktami szlaku szikimowego są terfenylchinony powstające w wyniku kondensacji dwóch cząsteczek fenylopirogonianu. Poznano jedynie dwa związki z tej grupy: kwas poliporowy i teleforowy. Oba spotykane są w grzybach niezlichenizowanych, nie są zatem charakterystyczne wyłącznie dla porostów [35].

Również powszechne i nieco bardziej liczne wśród porostów są pochodne kwasu pulwinowego. Powstają one w wyniku przekształceń fenyloalaniny bądź terfenylchinonów, także w grzybach niezlichenizowanych. Do przykładów oprócz samego kwasu pulwinowego należy kwas wulpinowy i kwas ryzokarpowy [17, 35].

3. Aktywności biologiczne

Porosty od wieków były wykorzystywane przez człowieka w celach leczniczych, czego sztandarowym przykładem jest płucnica islandzka *Cetraria islandica* używana między innymi do kuracji nieżytów górnych dróg oddechowych. Płucnica islandzka także współcześnie jest surowcem zamieszczonym w Farmakopei Europejskiej i Farmakopei Polskiej. Wykazywane przez porosty właściwości lecznicze wskazywały na zawartość substancji biologicznie czynnych. Istotnie, w przypadku większości związków przedstawionych w poprzednim rozdziale opisano rozmaite działania wysoce użyteczne w farmakologii. Przede wszystkim jednak, zdolność do ich syntezy jest kluczowym czynnikiem adaptacji porostów do trudnych warunków środowiska. Wiąże się to z faktem, że w świecie organizmów niezdolnych do typowych np. dla zwierząt metod obrony na drodze agresji lub ucieczki, istnieją rozmaite strategie przystosowawcze, które sprowadzają się do dwóch postaw: „rośnij” lub „broń się”. Te określenia charakteryzują dwie ekstremalne strategie życiowe: inwestowanie energii w szybki wzrost i wydajną reprodukcję lub wykształcenie mechanizmów obrony przed warunkami środowiska i konkurencją, głównie poprzez biosyntezę wyspecjalizowanych metabolitów obronnych. Poszczególne organizmy zajmują różne pozycje między tymi dwoma ekstremalnymi postawami. Biorąc pod uwagę skrajnie powolny wzrost plech porostów, zajmowanie przez nie trudno dostępnych siedlisk oraz fakt, że jednym z powszechniejszych mechanizmów adaptacyjnych jest kosztowna synteza metabolitów wtórnych, nietrudno wysnuć wniosek, że porosty stanowią wyraźny przykład strategii typu „broń się”.

3.1. Odporność na skrajne odwodnienie

Jedną z unikalnych cech porostów na tle reszty organizmów jest ich nietypowa gospodarka wodna – są one poikilohydryczne. To pojęcie oznacza brak zdolności organizmu do regulacji własnego stopnia uwodnienia, który ulega fluktuacjom w zależności od wilgotności otoczenia, wobec czego ustanawia się równowaga potencjału wodnego między organizmem a otoczeniem. Przyjmuje się zatem, że porosty są higroskopijne, a więc pobierają wodę całą powierzchnią plechy z otoczenia w postaci pary wodnej. Wiąże się z tym ich zdolność do przetrwania długich okresów w stanie anhydrobiozy [37, 38]. Stwierdzono, że mszaki, inne poikilohydryczne organizmy, są zdolne do przetrwania jeszcze dłuższych okresów z ograniczonym dostępem do wody, jednak w przypadku porostów kluczowa jest większa odporność na wystąpienie więcej niż jednego czynnika stresowego, przykładowo bez szkód znoszą one suszę w obliczu silnego nasłonecznienia i wysokich temperatur dochodzących nawet do 70°C. Ta kwestia zostanie omówiona w podrozdziale 3.2. Ogół porostów jest więc najlepiej przystosowany do krótkich lub umiarkowanie długich, ale też bardziej surowych susz. Dodatkowo czas, jaki są zdolne znieść w odwodnieniu bardzo różni się w zależności od gatunku. Przykładowo porost *Pseudocyphellaria dissimilis* nie jest w stanie przeżyć nawet 20 godzin przy wilgotności nie wyższej niż 12%, podczas gdy *Ramalina maciformis* może przetrwać rok przy stopniu uwodnienia plechy 1%, a *Umbiliaria spp.* 10 lat w temperaturze -20°C [38].

Ten system jest atutem w warunkach suszy, lecz aby działał w pełni sprawnie musi także zapobiegać zalaniu komórek w warunkach bardzo wysokiej wilgotności otoczenia wobec braku kontroli stopnia uwodnienia, co stanowi potencjalne zagrożenie dla

wydajności fotosyntezy. Okazuje się, że niektóre porosty są w stanie pomieścić bez szkód dużą ilość wody. Maksymalny stopień uwodnienia jest wysoce zróżnicowany w zależności od typu fotobionta, struktury plechy i gatunku. Oszacowano, że może stanowić dziesięciokrotność suchej masy dla porostów z obecnymi w plesze zielonicami oraz nawet dwudziestokrotność suchej masy dla tych zawierających sinice. Za zapobieganie zatopieniu struktur komórkowych na skutek wysokiego potencjału wody dostającej się między strzępki, odpowiada zestaw hydrofobowych metabolitów okalających zarówno komórki fotobionta, jak i strzępki grzyba [38]. Uwzględniając wewnątrzkomórkową lokalizację metabolitów pierwotnych, funkcję te pełnią metabolity wtórne. Dzięki temu oprócz suchych stanowisk porosty zajmują także wilgotne lasy. Hydrofobowy efekt tych metabolitów zilustrowano na rysunku 4.



Rysunek 4. Kropla wody destylowanej utrzymująca się na hydrofobowej powierzchni plechy *X. parietina* [zdjęcie własne]

3.2. Odporność na promieniowanie

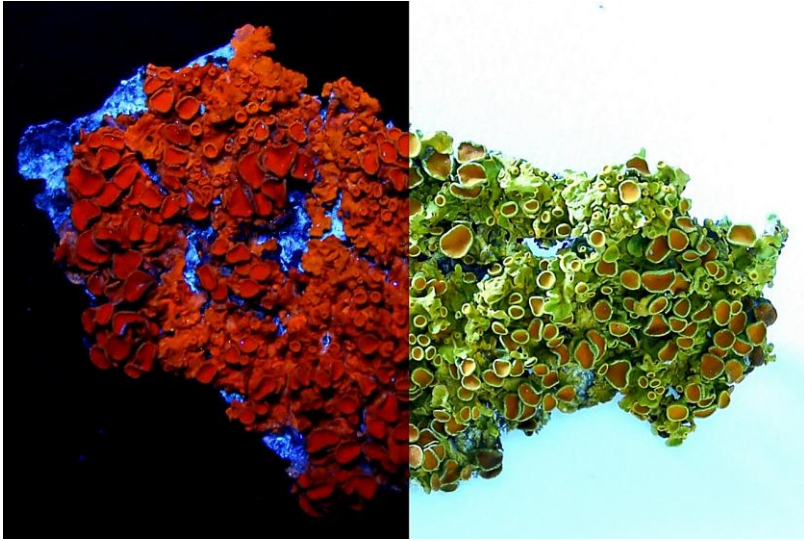
Czynnikiem środowiska, który w znaczącym stopniu zagraża poprawnemu funkcjonowaniu fotosystemów w komórkach fotobionta, jest promieniowanie. Porosty odniosły sukces adaptacyjny wykształcając szereg przystosowań, które w dużej mierze odpowiadają za ich pionierski i ubikwityczny charakter umożliwiając wzrost na skałach górskich szczytów, wśród żaru pustyni, czy w strefie okołobiegunowej. Wspólną cechą wymienionych środowisk jest wysoka ekspozycja na promieniowanie UV. Za jedną z istotniejszych strategii obrony przed stresem radiacyjnym uważa się biosyntezę fotoprotekcyjnych pigmentów rozmieszczonych w korze górnej i na powierzchni plechy. W stanie anhydrobiozy wyschnięta plecha kurczy się zwiększając tym samym gęstość pokrywających ją substancji. Wśród metabolitów wtórnych opisanych w rozdziale 3. wyróżnić można szeroką gamę substancji zdolnych do pochłaniania lub rozpraszania światła ze spektrum UV-VIS. Należy do nich większość produktów szlaku poliketydowego, w tym atranoryna (depsyd), kwas lobarowy (depsydon), kwas gyroforowy (tridepsyd), kwas usninowy, parietyna (antrachinon) oraz szikimowego, głównie kwas pulwinowy i wulpinowy. Duża część tych związków posiada jasną, najczęściej żółto-pomarańczową barwę, co umożliwia efektywną absorpcję promienio-

wania z zakresu UV-VIS. Nie inaczej jest w przypadku najlepiej opisanych substancji z tej grupy, parietyny i kwasu usninowego. Parietyna posiada dwa maksima absorpcji: 288 nm i 431 nm, co czyni ją zdolną do pochłaniania promieniowania odpowiednio w zakresie UV-B oraz światła niebieskiego [37], a efektem, który temu towarzyszy jest zjawisko fluorescencji (rys. 5).

Konsekwencją absorpcji fal światła z zakresu UV jest niedopuszczenie szkodliwego promieniowania do głębszych warstw plechy. Opisana zdolność stanowi zatem ochronę przed destabilizacją i zniszczeniem fotosystemów komórek fotobionta i zapobiega mutacjom w obrębie plechy. Skuteczność absorpcji jest tak duża, że oprócz funkcjonowania w ziemskich środowiskach skrajnie narażonych na promieniowanie, wybrane gatunki porostów są zdolne do wznowienia funkcji życiowych także po długotrwałej ekspozycji na promieniowanie kosmiczne. Gatunek modelowy złotorost pyszny *Xanthoria elegans* został wysłany na niższą ziemską orbitę (LEO) na czas 18 miesięcy, gdzie jego plecha została poddana dwóm wariantom badawczym. Jednym z nich była ekspozycja na realne warunki odwodnienia, promieniowania, temperatury i ciśnienia panujące w przestrzeni kosmicznej, drugim zaś imitacja warunków panujących na Marsie. Po upływie 559 dni porównano przeżywalność komórek partnerów plechy wykorzystując analizę LIVE/ DEAD. Oszacowano, że po powrocie funkcje życiowe wznowiło około 71% komórek fotobionta oraz 84% komórek mykobionta. Nie stwierdzono znaczących różnic między przeżywalnością komponentów plechy dla obu wariantów badawczych [37]. Na podstawie wykazanej zdolności *X. elegans* do przetrwania tak długiego okresu w warunkach panujących na Marsie można sformułować przesłankę, że porosty stanowią cenną grupę organizmów o potencjale do kolonizacji tej planety, a nawet dyskutować o roli porostów w teorii litopanspermii. Istnieją ku temu również przeszkody, jak chociażby brak zdolności ekstremofilnych porostów na przykładzie *Circinaria gyrosa* do fotosyntezy w tych warunkach [39]. Inne badania z udziałem gatunków: *Rhizocarpon geographicum*, *C. gyrosa*, *Pleopsidium chlorophanum* i *X. elegans* sugerują jednak, że na tle innych organizmów ekstremofilnych, w tym halofilnych archeonów i sinic, wspomniane porosty lepiej znoszą ekstremalne warunki [40]. Zidentyfikowano niewiele organizmów o tak wysokim stopniu adaptacji do warunków panujących w przestrzeni kosmicznej, między innymi bakterie *Deinococcus radiodurans* i przetrwalniki bakterii *Bacillus subtilis* [40, 41].

Innym czynnikiem kluczowym dla przetrwania w warunkach ekspozycji na szkodliwe promieniowanie, są właściwości antyoksydacyjne znacznej części substancji syntezowanych przez plechę. Promieniowanie zostaje zaabsorbowane przez warstwę pigmentu i przekształcone w energię, która jest zaangażowana we wzmożone tworzenie rodników, głównie reaktywnych form tlenu (ROS, *reactive oxygen species*). Rolą antyoksydantów jest redukcja reaktywnych form i zapobieganie utlenianiu związków istotnych dla funkcjonowania komórek. Właściwości antyoksydacyjne stwierdza się na podstawie testów wychwytywania DDPH (rodnik 1,1'-difenylo-2-pikrylohydrazylowy) oraz zdolności do redukcji anionu nadtlenku O_2^- przez badane związki chemiczne. Takie właściwości zidentyfikowano wśród wielu metabolitów wtórnych porostów, w tym u produktów szlaku szikimowego: kwasu pinastrowego i wulpinowego oraz szlaku poliketydowego: atranoriny, pannariny, kwasu barbatowego, fyzodowego, lekanorowego, lobarowego, sekikainowego, usninowego, gyroforowego i salazynowego.

U ostatniego wymienionego stwierdzono wyższą aktywność antyoksydacyjną niż u kwasu askorbinowego, jako że stężenie kwasu salazynowego odpowiadające IC_{50} było mniejsze niż dla kwasu askorbinowego stanowiącego kontrolę pozytywną [14, 42-44].



Rysunek 5. Fluorescencja widzialna indukowana światłem UV (254 nm) wobec plechy *X. parietina* (z lewej) i ten sam okaz w świetle widzialnym (z prawej) [zdjęcie własne]

3.3. Zdolność obrony przed mikroorganizmami

Porosty jako organizmy pionierskie tworzą nisze zdadne do zasiedlenia przez liczne mikroorganizmy. Z wieloma z nich współistnieją w relacji opisywanej jako komen-salizm, istnieje jednak duża grupa mikroorganizmów konkurencyjnych i pasoży-tnicznych, których pojawienie się skutkowałoby obumarciem plechy. Większość pozna-nych metabolitów wtórnych porostów wykazuje jednak wyraźną aktywność przeciw-bakteryjną, przeciwgrzybową i przeciwwirusową, co stanowi istotną dla przetrwania porostów adaptację [6].

Substancje o działaniu inhibitorów wzrostu mikroorganizmów wyróżnić można wśród produktów wszystkich trzech szlaków metabolizmu wtórnego. Przede wszystkim są to: kwas usninowy, depsydy, depsydony i inne związki fenolowe, większość triterpe-noidów, w tym zeoryna i kwas ursolowy, a także steroidy i kwas wulpinowy. Ich działanie opiera się o inhibicję syntezy ściany komórkowej, zaburzenie translacji białek i syntezy kwasów nukleinowych, destabilizację błon komórkowych i inhibicję aktywności enzymatycznej patogenu. Skuteczność poszczególnych związków jest różna dla bakterii i grzybów, zależy także od cech budowy i gatunku patogenu [14, 17, 27]. Na podstawie minimalnego stężenia substancji (MIC, *minimal inhibitory concentration*) określono, że kwas fumaroprotocetrarowy wykazuje silniejszą aktywność przeciw-bakteryjną niż przeciwgrzybową, zaś w przypadku kwasu gyroforowego obie te aktywności są porównywalne [45]. Spośród metabolitów wtórnych porostów najlepiej poznano działanie przeciwdrobnoustrojowe kwasu usninowego. Wykorzystywano go jako antybiotyk oraz środek antyseptyczny w niektórych farmaceutykach. Określono,

że wrażliwe na ten związek są niektóre patogenne bakterie odporne na wankomycynę, szczep *Staphylococcus aureus* odporny na metycylinę, mykobakterie, a także *Listeria monocytogenes* [17].

Część wtórnych metabolitów hamuje również aktywność wirusów. Choć liczba badań na ten temat jest ograniczona, to wiadomo, że do tych substancji należą: parietyna, hypercyna, kwas usninowy, atranoryna i kwas sekikainowy. Hamują rozwój odpowiednio: arenawirusów Junina i Tacaribe, cytomegalowirusa, HSV-1 i polio typu 1, wirusowego zapalenia wątroby typu C, wirusa RSV. Wiele z tych metabolitów wykazuje zarówno właściwości przeciwbakteryjne lub przeciwgrzybicze, jak i przeciwwirusowe, co można powiązać z inhibicją biosyntezy kwasów nukleinowych atakującego porost patogenu [14, 17].

3.4. Mechanizmy zapobiegania skutkom mutacji

W obliczu warunków panujących w środowiskach zajmowanych przez porosty (wysokie temperatury, niestały dostęp do wody, szkodliwe promieniowanie, konkurencja ze strony innych grzybów) musiały one wykształcić także umiejętność zapobiegania mutacjom i usuwania ich skutków. U większości badanych porostów wykryto właściwości antygenotoksyczne. Uważa się, że działanie substancji o tych właściwościach opiera się na ochronie nukleofilowych rejonów kwasów nukleinowych przed atakiem wolnych rodników i innych silnie elektrofilowych cząsteczek. Mechanizm jest więc zbliżony do działania antyoksydantów i w wielu przypadkach te właściwości mogą się uzupełniać. Dotychczas obiektem badań były ekstrakty, głównie metanolowe, wybranych gatunków porostów, w tym *Cetraria aculeata*, *Cetraria islandica*, *Cladonia rangiformis*, *Usnea longissima*, *Xanthoria elegans*, *Rhizoplaca chrysoleuca*. Dla wszystkich wymienionych ograniczony został efekt mutagenny, jednak by wskazać konkretne metabolity odpowiedzialne za opisane właściwości ekstraktów, należy przeprowadzić dalsze badania. Wykonano je dla kwasu usninowego, który w obecności mutagenu (MMS) w niektórych tylko testach oprócz właściwości antygenotoksycznych wykazywał także aktywność genotoksyczną [14, 17]. To zjawisko nie zostało całkiem wyjaśnione, lecz aktywność genotoksyczna może stanowić strategię obrony przed patogenami i roślinożercami.

Dodatkową, a zarazem bardzo istotną adaptacją jest zdolność usuwania komórek patogenów oraz własnych uszkodzonych komórek, która wynika z aktywności antyproliferacyjnej licznych metabolitów wtórnych porostów. Wśród nich można wymienić produkty szlaku poliketydowego: atranorynę, wikanicynę, emodynę, kwas usninowy, gyroforowy, lobarowy, protolichesterynowy, oliwetolowy, sekalonowy D; szikimowego: kwas wulpinowy oraz mewalonowego: kwas retigerowy B (triterpenoid), kwas ursolowy (triterpenoid), 16 α -hydroksyykauran (diterpenoid) [14, 27]. Również w tej kwestii kwas usninowy jest uważany za metabolit wtórny o najciekawszym potencjale, jako że wykazuje aktywność cytotoksyczną i antyproliferacyjną wobec licznych nowotworowych linii komórkowych, mysich oraz ludzkich [17].

Niewykluczone, że oprócz obrony przed patogenami, zgryzaniem i surowymi warunkami środowiska wyżej wymienione aktywności biologiczne służą również zapobieganiu skutkom ubocznym lichenizacji, w obliczu której całkowicie zmienia się profil ekspresji genów. Te zmiany mogą prowadzić do zwiększonej liczby mutacji komórek partnerów.

3.5. Tolerancja na obecność metali ciężkich w otoczeniu

Zaobserwowano, że stężenie metabolitów wtórnych porostów koreluje ze stężeniem metali ciężkich w podłożu. Przykładowo, depsydy i depsydony syntezowane przez szeroko rozpowszechnioną pustułkę pęcherzykową *Hypogymnia physodes* zaangażowane są w pobieranie z podłoża jonów miedzi Cu^{2+} i manganu Mn^{2+} , przy czym najwyższą korelację stężenia metalu i metabolitu określono dla depsydonu, kwasu fyzodalowego [46]. Wiadomo także, że niektóre pochodne kwasów fenolowych, w tym kwas norstiktowy, psoromowy i usninowy tworzą kompleksy z jonami miedzi. Oprócz tego, dla porosta *X. parietina* wykazano wzrastającą toksyczność metali: Zn, Ni, Cu, Cd. Mimo tego określono, że ten sam gatunek jest zdolny do bioakumulacji metali: Fe, Al, Mn, Zn, Sb, Pb, Cu, Cd [47]. Stwierdzono także, że obecność parietyny istotnie wpływa na skuteczność neutralizacji jonów kadmu przez niebiałkowe związki tiolowe takie jak cysteina, czy glutation [48, 49].

Biorąc pod uwagę stopień zanieczyszczenia powietrza i gruntów metalami ciężkimi, jak i naturalną ich zawartość w środowisku, należy uznać udział metabolitów wtórnych w zwiększeniu tolerancji na obecność metali ciężkich, jako kolejną adaptację porostów.

3.6. Czy porost może funkcjonować bez metabolitów wtórnych?

Depsydy i depsydony występujące w chwytниках porostów, a także pozostałe związki organiczne posiadające polarne ugrupowania, takie jak -OH, -CHO, -COOH, w pozycjach orto cząsteczek, wykazują właściwości chelatujące wobec metali. Przypuszcza się, że obok biodeterioracji skał kwasem szczawiowym, ten efekt odpowiada za uwalnianie jonów metali z minerałów i tym samym miejscowy rozkład skały, któremu towarzyszy wrastanie plech porostów epilitycznych [50]. Dotyczy to jednak nie tylko skał, lecz także nietypowych powierzchni zajmowanych przez porosty, między innymi starych, blaszanych dachów i aut, a także pni drzew. Stwierdzono także, że obecność porostów na powierzchni gruntu istotnie wpływa na kiełkowanie sąsiadujących nasion roślin. Badania angażujące dwa gatunki traw pokazały, że na próbie gleby zawierającej porosty wyrosło 3 razy mniej sadzonek niż w przypadku kontroli, co również sugeruje udział metabolitów wtórnych i może stanowić czynnik kluczowy dla sukcesu porostów epigeicznych [51].

Wyrażono również przesłankę, że niektóre pochodne fenolowe mają wpływ fitotoksyczny na komórki roślinne. Udało się pokazać, że spośród tych związków atranoryna istotnie wykazuje działanie allelochemiczne i umożliwia strzępkom grzyba sprawowanie kontroli nad podziałami komórek fotobionta, a tym samym utrzymywanie równowagi między partnerami [52].

Istnieją nieliczne organizmy z grupy porostów, u których nie stwierdzono obecności żadnych metabolitów wtórnych. Należy do nich porost endolityczny *Verrucaria rubrocincta*, którego strategią jest wrośnięcie w skałę wapienną za sprawą aktywności wspomnianego kwasu szczawiowego [53]. Taki organizm nie przetrwałby intensywnego promieniowania, ani konkurencji ze strony innych organizmów. Porosty zatem są w stanie funkcjonować bez metabolitów wtórnych, jednak wyłącznie w obliczu rozwinięcia alternatywnej, skutecznej strategii chroniącej je przed niekorzystnymi warunkami środowiska. Dowodzi to istotnej roli metabolitów wtórnych jako przystosowań wykształconych przez porosty.

4. Podsumowanie

Porosty to organizmy szczególnie interesujące pod względem fizjologii, biochemii i biologii molekularnej o zastosowaniu w farmakologii, medycynie i przemyśle, a w ostatnim czasie również w biotechnologii, czy astrobiologii. Są naturalnym źródłem wartościowych związków chemicznych z grupy terpenoidów, steroidów, kwasów pulwinowych, depsydów, depsydonów, antrachinonów, ksantonów i wielu innych pochodnych fenolowych o interesujących aktywnościach biologicznych odpowiadających za charakter pionierski tych organizmów. Należy spodziewać się, że oprócz odkrytych dotychczas metabolitów i ich aktywności, porosty mogą okazać się także źródłem związków chemicznych o jeszcze niezidentyfikowanych strukturach. Najnowsze technologie pozwalają na ich skuteczną analizę biochemiczną, a metody biologii molekularnej dostarczają informacji o nieznanych dotychczas ścieżkach metabolicznych i profilach enzymatycznych powstałych na drodze połączenia dwóch niezależnych organizmów w jeden. Zidentyfikowanie tych zależności i określenie zastosowania metabolitów wtórnych porostów dla człowieka może stanowić istotny czynnik rozwoju biotechnologii i dziedzin pokrewnych.

Literatura

1. Fałtynowicz W., *Porosty w lasach. Przewodnik terenowy dla leśników i taksatorów*, Centrum informacyjne Lasów Państwowych, Warszawa 2012.
2. Nash III T.H. (red.), *Lichen Biology*, Cambridge University Press, Cambridge 2008.
3. Feurer T., Hawksworth D., *Biodiversity of lichens, including a world-wide analysis of checklist data based on Takhtajan's floristic regions*, Biodiversity and Conservation, 16, 2007, s. 85-98.
4. Zedda L., Rambold G., *The Diversity of Lichenised Fungi: Ecosystem Functions and Ecosystem Services*, Recent Advances in Lichenology, 2015, s. 121-145.
5. Fałtynowicz W., Kossowska M., *The lichens of Poland. A fourth checklist*, Uniwersytet Wrocławski, Wrocław 2016.
6. Richardson D.H.S., *War in the world of lichens: parasitism and symbiosis as exemplified by lichens and lichenicolous fungi*, Mycological Research, 103(6), 1999, s. 641-650.
7. Hawksworth D.L., *The variety of fungal-algal symbioses, their evolutionary significance, and the nature of lichens*, Botanical Journal of the Linnean Society, 96, 1988, s. 3-20.
8. Lawrey J.D., *Lichen allelopathy: a review*, Allelopathy, 1995, 26-38, American Chemical Society: Washington.
9. Lawrey J.D., *The Biology of Lichenized Fungi*, New York: Praeger Scientific, 1984, s. 408.
10. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 października 2014 r. w sprawie ochrony gatunkowej grzybów.
11. Wójciak H., *Porosty, mszaki, paprotniki*, Flora Polski, MULTICO Oficyna Wydawnicza, Warszawa 2010.
12. Armstrong R.A., *Seasonal growth of the crustose lichen *Rhizocarpon geographicum* (L.) DC. in South Gwynedd, Wales*, SYMBIOSIS 41, 2006, s. 97-102.
13. Armstrong R., *Lichens, lichenometry and global warming*, Microbiologist, 2004, s. 32-35.
14. Varol, M., *Lichens as a Promising Source of Unique and Functional Small Molecules for Human Health and Well-Being*, Studies in Natural Products Chemistry, (2018), 425-458.
15. Stocker-Wörgötter E., *Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes*, Nat. Prod. Rep., 25(1), 2008, s. 188-200.

16. Furmanek Ł., *Metabolizm wtórny porostów jako potencjalne źródło związków przeciwnadciężniczych*, AURA, 2019, s. 8-11.
17. Ranković B., Kosanić M., *Lichens as a Potential Source of Bioactive Secondary Metabolites*, Lichen Secondary Metabolites, 2019, s. 1-29.
18. Sobotta Ł., Mielcarek J., Sobiak S., Wierzchowski M., *Antrachinony – male cząsteczki, duże nadzieje*, Farm Pol, 66(3), 2010, s. 162-167.
19. Sun L.Y., Liu Z.L., Zhang T., Niu S.B., Zhao Z.T., *Three antibacterial naphthoquinone analogues from cultured mycobiont of lichen Astrothelium sp.*, Chinese Chemical Letters, 21(7), 2010, s. 842-845.
20. Basnet B.B., Liu L., Zhao W., Liu R., Ma K., Bao L., Ren J., Wei X., Yu H., Wei J., Liu H., *New 1, 2-naphthoquinone-derived pigments from the mycobiont of lichen Trypethelium eluteriae Sprengel*, Natural Product Research, 2018, s. 1-7.
21. Srinivasan M., Shanmugam K., Kedike B., Narayanan S., Shanmugam S., & Gopalamudram Neelakantan H., *Trypethelone and phenalenone derivatives isolated from the mycobiont culture of Trypethelium eluteriae Spreng. and their anti-mycobacterial properties*, Natural Product Research, 2019, s. 1-8.
22. Huneck S., *Nature of lichen substances*, The Lichens, 1973, s. 495-522.
23. Semwal R.B., Semwal D.K., Combrinck S., Viljoen A., *Health benefits of chromones: common ingredients of our daily diet*, Phytochemistry Reviews, 2020.
24. Chappell J., *The genetics and molecular genetics of terpene and sterol origami*, Current Opinion in Plant Biology, 5(2), 2002, s. 151-157.
25. Buhaescu I., Izzedine H., *Mevalonate pathway: A review of clinical and therapeutical implications*, Clinical Biochemistry, 40(9-10), 2007, s. 575-584.
26. Cho K.S., Lim Y., Lee K., Lee J., Lee J. H., & Lee I.S., *Terpenes from Forests and Human Health*, Toxicological Research, 33(2), 2017, s. 97-106.
27. Dayan F., Romagni J., *Lichens a potential source of pesticides*, Pesticide Outlook 12(6), 2001, s. 229-232.
28. Shukla V., Joshi G.P., Rawat M.S.M., *Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: a review*, Phytochemistry Reviews, 9(2), 2010, s. 303-314.
29. Kahrman N., Yazici K., Arslan T., Aslan A., Karaoglu S.A., Yayli N., *Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from Evernia prunastri (L.) ach. and Evernia divaricata (L.) ach.*, Asian J Chem, 23, 2011, s. 1937-1939.
30. Millot M., Martin-de-Lassalle M., Chollet-Krugler M., Champavier Y., Mambu L., Chulia J.-A., Lacaillle-Dubois M.-A., *Two New Retigerane-Type Sesterterpenoids from the Lichen Leprocaulon microscopicum*, Helvetica Chimica Acta, 99(2), 2016, s. 169-173.
31. Abdullah S.T., Hamid H., Ali M., Ansari S.H., Alam M.S., *Two new terpenes from the lichen Parmelia perlata*, Indian Journal of Chemistry, Vol. 46B, 2007, s. 173-176.
32. Ahmed E.F., Elkhateeb W.A., Taie H.A.A., Rateb M.E., Fayad W., *Biological capacity and chemical composition of secondary metabolites from representatives Japanese Lichens*, J App Pharm Sci, 7 (01), 2017, s. 98-103.
33. Bertrand R.L., Abdel-Hameed M., Sorensen J.L., *Lichen Biosynthetic Gene Clusters. Part I. Genome Sequencing Reveals a Rich Biosynthetic Potential*, Journal of Natural Products, 81(4), 2018, s. 723-731.
34. Szakiel A., Mroczek A., *Distribution of triterpene acids and their derivatives in organs of cowberry (Vaccinium vitis-idaea L.) plant*, Acta Biochimica Polonica, 54(4), 2007, s. 733-740.
35. Goga M., Elečko J., Marcincinova M., Ručová D., Bačkorová M., Backor M., *Lichen Metabolites: An Overview of Some Secondary Metabolites and Their Biological Potential*, Co-Evolution of Secondary Metabolites, 2020, s. 175-209.
36. Tzin V., Galili G., Aharoni A., *Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis*, eLS, 2012.

37. Brandt A., de Vera J.-P., Onofri S., Ott S., *Viability of the lichen Xanthoria elegans and its symbionts after 18 months of space exposure and simulated Mars conditions on the ISS*, International Journal of Astrobiology, 14(03), 2014, s. 411-425.
38. Green T.G.A., Sancho L.G., Pintado A., *Ecophysiology of Desiccation/Rehydration Cycles in Mosses and Lichens*, Ecological Studies, 2011, s. 89-120.
39. De la Torre Noetzel R., Miller A.Z., de la Rosa J.M., Pacelli C., Onofri S., García Sancho L., Cubero B., Lorek A., Wolter D., de Vera J.P., *Cellular Responses of the Lichen Circinaria gyrosa in Mars-Like Conditions*, Frontiers in microbiology, 9, 2018, s. 308.
40. Sancho L.G., de la Torre R., Horneck G., Ascaso C., de los Rios A., Pintado A., Wierchos J., Schuster M., *Lichens Survive in Space: Results from the 2005 LICHENS Experiment*. Astrobiology, 7(3), 2007, s. 443-454.
41. Ott E., Kawaguchi Y., Kölbl D., Chaturvedi P., Nakagawa K., Yamagishi A., Weckwerth W., Milojevic T., *Proteometabolomic response of Deinococcus radiodurans exposed to UV-C and vacuum conditions: Initial studies prior to the Tanpopo space mission*, PLOS ONE, 12(12), 2017.
42. Lohézic-Le Dévéhat F., Legouin B., Couteau C., Boustie J., Coiffard L., *Lichenic extracts and metabolites as UV filters*, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 120, 2013, s. 17-28.
43. Nguyen K.-H., Chollet-Krugler M., Gouault N., Tomasi S., *UV-protectant metabolites from lichens and their symbiotic partners*, Natural Product Reports, 30(12), 2013, s. 1490.
44. Legouin B., Lohézic-Le Dévéhat F., Ferron S., Rouaud I., Le Pogam P., Cornevin L., Boustie J., *Specialized Metabolites of the Lichen Vulpicida pinastri Act as Photoprotective Agents*, Molecules, 22(7), 2017, s. 1162.
45. Kosanić M., Ranković B., *Antioxidant and Antimicrobial Properties of Some Lichens and Their Constituents*, Journal of Medicinal Food, 14(12), 2011, s. 1624-1630.
46. Hauck M., Böning J., Jacob M., Dittrich S., Feussner I., Leuschner C., *Lichen substance concentrations in the lichen Hypogymnia physodes are correlated with heavy metal concentrations in the substratum*, Environmental and Experimental Botany, 85, 2013, s. 58-63.
47. Dzubaj A., Bačkor M., Tomko J., Peli E., Tuba Z., *Tolerance of the lichen Xanthoria parietina (L.) Th. Fr. to metal stress*, Ecotoxicology and Environmental Safety, 70(2), 2008, s. 319-326.
48. Kalinowska R., Bačkor M., Pawlik-Skowrońska B., *Parietin in the tolerant lichen Xanthoria parietina (L.) Th. Fr. increases protection of Trebouxia photobionts from cadmium excess*, Ecological Indicators, 58, 2015, s. 132-138.
49. Piovár J., Weidinger M., Bačkor M., Bačkorová M., Lichtscheidl I., *Short-term influence of Cu, Zn, Ni and Cd excess on metabolism, ultrastructure and distribution of elements in lichen Xanthoria parietina (L.) Th. Fr.* Ecotoxicology and Environmental Safety, 145, 2017, s. 408-419.
50. Chen J., Blume H.-P., Beyer L., *Weathering of rocks induced by lichen colonization – a review*, CATENA, 39(2), 2000, s. 121-146.
51. Deines L., Rosentreter R., Eldridge D.J., Serpe M.D., *Germination and seedling establishment of two annual grasses on lichen-dominated biological soil crusts*, Plant and Soil, 295(1-2), 2007, s. 23-35.
52. Lokajová V., Bačkorová M., Bačkor M., *Allelopathic effects of lichen secondary metabolites and their naturally occurring mixtures on cultures of aposymbiotically grown lichen photobiont Trebouxia erici (Chlorophyta)*, South African Journal of Botany, 93, 2014, s. 86-91.
53. Bungartz F., Garvie L.A.J., Nash T.H., *Anatomy of the endolithic Sonoran Desert lichen Verrucaria rubrocincta Breuss: implications for biodeterioration and biomineralization*, The Lichenologist, 36(1), 2004, s. 55-73.

Pionierskie grzyby fotosyntezujące, czyli porosty jako samowystarczalne źródło unikalnych metabolitów wtórnych

Streszczenie

Porosty (*Lichens*), określane również jako grzyby zlichenizowane, stanowią grupę pionierskich organizmów symbiotycznych wykazujących wielokomponentową strukturę opartą na strzępkach partnera grzybowego (*Fungi*) oplatających pojedyncze komórki fotoautotroficznych przedstawicieli zielenic (*Chlorophyceae*) lub sinic (*Cyanobacteria*). Zidentyfikowano dotychczas ponad 18800 gatunków należących do tej grupy, a szacuje się istnienie nawet 28000. Organizmy powstałe na drodze lichenizacji charakteryzują się przekształconą morfologią, fizjologią i metabolizmem. Stwierdzono u nich występowanie ponad 1000 metabolitów wtórnych, spośród których zaledwie 100 zidentyfikowano w grzybach niezlichenizowanych i roślinach wyższych.

Podobnie jak u roślin i grzybów niezlichenizowanych, metabolity wtórne porostów powstają głównie na szlakach poliketowym, mewalonowym i szikimowym. W pracy zaprezentowano przegląd najważniejszych produktów tych szlaków, w tym terpenoidy, pochodne kwasów fenolowych, antrachinony (np. wykazująca zjawisko fluorescencji parietyna) i kwasy pulwinowe. Wskazano ich aktywności biologiczne, w tym antyoksydacyjne, antybakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwwirusowe, cytotoksyczne oraz zdolność absorpcji promieniowania z zakresu UV-A oraz UV-B. Na przykładzie złotorosta ściennego (*Xanthoria parietina*) opisano wpływ syntezowanych metabolitów wtórnych i ich aktywności biologicznych na sukces adaptacyjny porostów w warunkach panujących w środowiskach trudnych do skolonizowania dla innych organizmów (np. przy długotrwałym odwodnieniu, intensywnym promieniowaniu, konkurencji, w warunkach stresu chemicznego), co nadaje porostom pionierski charakter. Określono perspektywy poszukiwań nowych metabolitów wtórnych porostów. Związki te mogą znaleźć szerokie zastosowanie w farmakologii, medycynie, bioidentyfikacji, przemyśle, a nawet astrobiologii.

Słowa kluczowe: porosty, metabolity wtórne, terpenoidy, polifenole

Pioneer photosynthesizing fungi: lichens as a self-sufficient source of unique secondary metabolites

Abstract

Lichens (lichenized fungi) are a group of pioneer symbiotic organisms of multi-component structure based on the hyphae of the fungi partner entwining single green algae cells or cyanobacteria cells. So far over 18 800 species have been identified and even 28 000 are estimated. Organisms shaped as a result of lichenization are characterized with unique morphology, physiology, and metabolism. The occurrence of more than 1000 secondarymetabolites have been found in lichens, less than 100 of which are common for higher plants and non-lichenized fungi.

Similarly to plants and other fungi, lichen secondary metabolites are synthesized on three main pathways: polyketide, mewalonic and shikimic. In this work, the main secondary metabolites have been characterised: terpenes, phenol acids derivatives, antrachinones (for example parietin that shows fluorescence) and pulvinic acids. Their biological activities have been presented: antioxidative, antibacterial, antifungal, antiviral, cytotoxic, ability to absorb UV-A and UV-B light. It has been shown on the case of *Xanthoria parietina* example that the secondary metabolites are crucial for a pioneer character and adaptation success in environments hard to colonise for other organisms (long lasting drought, intense radiation, concurrence, chemical stress). Current and possible uses of lichen secondary metabolites have been defined: in industry, pharmacology, medicine, bioidentification and even astrobiology.

Keywords: lichens, secondary metabolites, terpenoids, poliphenols

Wykorzystanie technik biologii molekularnej w diagnostyce *Pseudomonas syringae* na malinie

Wykrycie nowego patogenu i choroby na plantacji malin w sezonie wiosennym 2020

1. Wstęp

Malina jest jednym z najczęściej obecnie uprawianym gatunkiem roślin jagodowych w Polsce. Roczna produkcja w naszym kraju wynosi około 120 tys. o ile nie wystąpią niekorzystne warunki pogodowe, które wpływają na ilość i jakość plonu. Nasz kraj jest liderem, który jedynie pod względem powierzchni upraw oraz wielkości plonów rywalizuje z Serbią. Owoce malin mają głównie zastosowanie deserowe oraz przemysłowe. Około 20 tys. ton malin trafia na eksport jest to możliwe dzięki bardzo szerokiej palecie odmian malin oraz coraz bardziej zaawansowanym procesie technologicznej uprawy. Jednak mimo rozwoju technologicznego uprawy, nie jest możliwe wyeliminowanie zagrożenia, jakie stanowią choroby malin. Na plantacjach z roku na rok wzrasta ich ilość. Obecnie na plantacjach malin diagnozuje się ponad 20 chorób pochodzenia bakteryjnego i grzybowego. Dodatkowym zagrożeniem są choroby powodowane przez wirusy. Ze względu na zmiany warunków klimatycznych, zwiększenie powierzchni upraw oraz wprowadzanie nowych odmian, odnotowuje się obecność na plantacjach nowych patogenów dotychczas niediagnozowanych. Te patogeny stanowią największe zagrożenie dla upraw towarowych, gdzie jakość plonu oraz jego ilość decydują o kierunku sprzedaży. Bez odpowiedniego zabezpieczenia roślin oraz owoców w trakcie owocowania nie jest możliwe osiągnięcie wysokich plonów w dobrej jakości. Dlatego też tak ważna jest diagnostyka chorób na plantacji w celu ograniczenia strat, jakie mogą być spowodowane wystąpieniem patogenów.

2. Choroby malin

Na plantacjach malin odnotowywane są choroby pochodzenia bakteryjnego, jak i grzybowego oraz choroby wirusowe. Potencjał czynników biologicznych na plantacjach jest zależny od kilku czynników m.in.: warunków pogodowych, technologii uprawy, zmianowania, odporności, a także podatności odmian na choroby. Do rozprzestrzeniania chorób malin przyczynia się także niekontrolowany obrót materiałem nasadzeniowym. Te czynniki mają również znaczny wpływ na zachowalność roślin. W tabeli pierwszej zostały przedstawione najważniejsze pod względem gospodarczym choroby malin [2]. Na plantacjach malin z roku na rok wzrasta zagrożenie ze strony chorób grzybowych. Aktualnie największym problemem jest rdza maliny, zamieranie

¹ Fertico Sp. z o.o., Laboratorium Fertico Sp. z o.o.

² Fertico Sp. z o.o., Laboratorium Fertico Sp. z o.o.

pędów oraz szara pleśń, a także zgnilizna korzeni maliny. W zależności od warunków pogodowych w danym sezonie wegetacyjnym presja wymienionych chorób jest różna. Kluczem do ochrony przed tymi chorobami oraz innymi, które mogą ujawnić się na plantacjach jest prawidłowa diagnostyka [1]. Dotychczas najgroźniejszym na plantacjach patogenem jest *Phytophthora fragariae* var. *rubi*. Choroba jest szczególnie groźna i szkodliwa na glebach źle zdrenowanych, wilgotnych i ciężkich. Charakterystyczne, a zarazem główne objawy zgnilizny korzeni maliny to przede wszystkim porażone pędy, które więdną, zamierają, wyginają się na kształt pastorału. Krzewy zainfekowane nie wytwarzają odrostów na porażonych roślinach. Jednym z typowych objawów obserwowanym na roślinach jest zmiana koloru liści, które żółkną, więdną i zwijają się ku górze. Starsze liście usychają, wyglądają jak spalone pozostają na pędach, nie opadają [1].

Na plantację malin patogen ten zwykle dostaje się głównie z porażonymi sadzonkami. *Phytophthora fragariae* var. *rubi* może także rozprzestrzeniać się wraz z wodą powierzchniową i sączkach drenarskich. Może przenosić się także z glebą na narzędziach i innym używanym sprzęcie [1]. To jeden z patogenów, którego obecność na plantacjach towarowych jeszcze kilka lat temu nie była odnotowywana. Jednak wraz z intensyfikacją upraw zaczął być jednym z najpowszechniejszych i najczęściej odnotowywanych, sprawiających duże zagrożenie i problemy w diagnostyce [2].

Tabela 1. Główne choroby malin, ważne w aspekcie gospodarczym. Legenda: „+” choroba o znaczeniu lokalnym; „++” choroba ważna; „+++” choroba bardzo ważna

Choroba	Sprawca	Znaczenie
Antraknoza maliny	<i>Elsinoë veneta</i>	++
Biała plamistość liści maliny	<i>Sphaerulina rubi</i>	++
Chloroza nerwów liści maliny	Wirus chlorozy nerwów liści maliny (<i>Raspberry vein chlorosis virus</i>)	++
Guzowatość korzeni pędów tumorogenne	<i>Agrobacterium Rhizobium</i> , <i>Agrobacterium rubi</i>	++
Krzaczasta karłowatość maliny	<i>Raspberry bushy dwarf virus</i>	++
Karłowatość maliny fitoplazma	<i>Rubus stunt phytoplasma</i>	+++
Mączniak prawdziwy maliny	<i>Podosphaera macularis</i>	+
Mozaika maliny	Wirus cętkowanej plamistości liści maliny (<i>Raspberry leaf mottle virus</i>) i żółtej plamistości liści maliny (<i>Rubus yellow net virus</i>)	++
Przypąkowe zamieranie pędów maliny	<i>Didymella applanata</i>	+++
Rdza maliny	<i>Phragmidium rubi-idaei</i>	++
Szara pleśń	<i>Botrytis cinerea</i>	+++
Wertycylioza maliny	<i>Verticillium dahliae</i>	+++
Zamieranie podstawy pędów maliny	<i>Leptosphaeria coniothyrium</i>	+++
Zgnilizna korzeni maliny	<i>Phytophthora fragariae</i> var. <i>rubi</i>	+++

Źródło: [2]

3. Rak bakteryjny na malinie

Bakterie patogeniczne dla roślin dzielone są na dwie grupy: bakterie właściwe posiadające ścianę komórkową, które mogą być hodowane na pożywkach oraz bakterie, których ściany otoczone są trójwarstwową błoną. Obecnie ponad 100 gatunków bakterii powoduje choroby roślin. Pod względem epidemiologicznym bakterie chorobotwórcze dla roślin są niezdolne do aktywnej penetracji bezpośrednio przez tkankę okrywającą. Do infekcji najczęściej dochodzi przez niepokryte kutykulą części roślin, zranienia lub też naturalne otwory roślin, a także ślady liściowe. Porażeniu większości gatunków roślin sprzyja wysoka temperatura, a przede wszystkim wysoka wilgotność powietrza. Bakterie fitopatogeniczne rozwijają się w roślinach będących ich gospodarzami jako pasożyty, ale niekiedy też mogą przeżywać na powierzchni roślin bez ich zakażenia jako epifity. Do najważniejszych objawów powodowanych przez bakteryjne choroby roślin zalicza się: nekrotyczne plamistości, zgorzele, zrakowacenia, wędnięcia, miękkie i mokre zgnilizny oraz narośla. Każdy z tych objawów może być powodowany przez bakterie, które reprezentują różne rodzaje taksonomiczne [3].

Rak bakteryjny – *Pseudomonas syringae* powodowany jest przez bakterię zaliczaną jako gatunek bakterii właściwych, tlenowych, Gram-ujemnych, nie tworzących endospor. Bakterie, przyjmują kształt prostych lub wygiętych pałeczek o wymiarach $0,8 \times 1-2 \mu\text{m}$. Według ankiety przeprowadzonej w 2012 r. wśród fitopatologów przez czasopismo „Molecular Plant Pathology” zajmuje pierwsze miejsce na liście najgroźniejszych bakteryjnych patogenów roślin. *P. syringae* jest patogenem wywołującym plamistości i nekrozy liści, pędów i owoców wielu gatunków roślin. Infekuje rośliny wnikając przez rany powstałe w wyniku uszkodzeń mechanicznych jak i również spowodowane przez szkodniki [4, 5].

Pseudomonas syringae po raz pierwszy został wyizolowany i opisany w 1902 roku przez Van Halla. Rośliną, z której wyizolowano patogen był lilak pospolity (*Syringa vulgaris*). Pierwsze doniesienia dotyczące *P. syringae* na malinie na kontynencie Europejskim pochodzą z 2002-2004 roku z Serbii [6], natomiast w 2013, po raz pierwszy, opisano wystąpienie *P. syringae* na malinie na kontynencie amerykańskim.

W rejonie grójeckim w miejscowości Stare Załęże podczas lustracji jednej z plantacji zaobserwowano objawy specyficzne dla infekcji bakteryjnej powodowanej przez bakterie z rodzaju *Pseudomonas spp.* Były to charakterystyczne nekrotyczne plamistości, zrakowacenie i zgorzele na pędach. Ponadto też obserwowana charakterystyczne ciemnienie nerwów na liściach, które potwierdzało infekcję bakteryjną.

Charakterystycznym symptomem porażenia przez *P. syringae* są objawy w postaci brązowych kanciastych, nasączonych wodą plam rozwijające się na pędach roślin oraz liściach, a niekiedy i ogonkach liściowych. Na pędach dodatkowo zaobserwowano charakterystyczne zrakowacenia i pęknięcie pędów. Według danych literaturowych w miarę rozwoju plamy powiększają się i łączą, powodują znaczące ciemnobrązowe lub czarne zabarwienie liści. Na liściach dodatkowo obserwowane jest charakterystyczne ciemnienie nerwów i wiązek przewodzących, które potwierdza obecność zakażenia rośliny bakterią. Liście silnie dotknięte chorobą zwykle nie rozwijają się oraz usychają, a porażona roślina może całkowicie uschnąć [7]. Objawy typowe dla porażenia przez

bakterie *P. syringae* zostały udokumentowane na fotografiach 1-4. Podobne objawy zostały omówione i wskazane na plantacjach malin porażonych przez *P. syringae* w Serbii przez Žarko i współautorów [8].



Fotografia 1. Charakterystyczne wodniste ciemnobrązowe plamy na pędach malin powodowane przez *P. syringae* (K. Felczak-Konarska)



Fotografia 2. Ciemnienie nerwów i wiązek – wskazujące na porażenie systemiczne przez bakterię (K. Felczak-Konarska)



Fotografia 3. Zamieranie pędów i zrakowacenia na pędach typowe dla porażenia przez bakterię z rodzaju *P. syringae* (K. Felczak-Konarska)



Fotografia 4. Typowe zrakowacenia pędów obserwowane na zainfekowanych pędach malin przez *P. syringae* (K. Felczak-Konarska)

4. Diagnostyka molekularna

Diagnostyka patogenów roślinnych przeprowadzana na podstawie cech morfologicznych, fizjologicznych czy biochemicznych, chociaż w odniesieniu do wielu patogenów wystarczająca, stanowi metodę czasochłonną, trudną i jest obciążona wysokimi kosztami. Do postawienia poprawnej diagnozy, wymaga również wieloletniego doświadczenia diagnosty. Co więcej, w wypadku patogenów nierozmnażających się generatywnie, pula cech możliwych do oceny jest bardzo ograniczona, gdzie na wartość ocenianych cech wpływają również warunki środowiskowe [9].

Techniki biologii molekularnej umożliwiają przeprowadzenie precyzyjnej diagnozy na roślinach z widocznymi symptomami chorobowymi (w późnym stadium infekcji), ale przede wszystkim na etapie bezobjawowym, umożliwiając tym samym minimalizację strat spowodowanych przez patogeny w jakości i ilości plonu.

Badania molekularne, specyficzne dla danego organizmu/patogena, są oparte o technikę cyklicznej amplifikacji kwasu deoksyrybonukleinowego z wykorzystaniem polimerazy tzw. PCR (oraz jej modyfikację).

Reakcja łańcuchowa polimerazy polega na wielokrotnej amplifikacji konkretnego odcinka materiału genetycznego [10]. Amplifikacja odbywa się z wykorzystaniem:

- „Starterów”, które stanowią – krótkie, syntetyczne, polinukleotydy zaprojektowane zgodnie z zasadami komplementarności, które nadają specyficzność testom molekularnym przyłączając się tylko do regionów, o określonej sekwencji komplementarnej;
- Termostabilnego enzymu polimerazy, przeprowadzającego reakcję powielania materiału genetycznego w zmieniających się cyklach temperaturowych;
- Mieszaniny reakcyjnej, zapewniającej optymalne warunki oraz składniki do przeprowadzenia reakcji dla enzymu – polimerazy [11].

Etapy jednego cyklu reakcji PCR obejmują:

- Denaturacja – przeprowadzana w temperaturze $\sim 95^{\circ}\text{C}$ mająca na celu rozplecenie podwójnej helisy DNA pod wpływem pęknięcia wiązań wodorowych.
- Przyłączanie się starterów – przeprowadzane w temperaturze, która jest zależna od sekwencji wykorzystywanych starterów, na tym etapie polinukleotydy przyłączają się zgodnie z zasadą komplementarności do konkretnych odcinków materiału genetycznego.
- Elongacja – przeprowadzana w temperaturze $\sim 72^{\circ}\text{C}$, w której zachodzi synteza odcinka DNA, oflankowanego przez startery, przez polimerazę [12].

5. Materiały i metody

W badaniach molekularnych na obecność *Pseudomonas syringae* wykorzystano odmianę reakcji PCR – Direct PCR, która umożliwia przeprowadzenie amplifikacji kwasów nukleinowych, bezpośrednio na tkance porażonej rośliny, bez potrzeby izolacji materiału genetycznego.

Przygotowanie materiału do badań oraz reakcja Direct PCR zostały przeprowadzone z wykorzystaniem komercyjnego zestawu „Thermo Scientific Phire Plant Direct PCR Master Mix” firmy Thermo Scientific [13].

5.1. Startery

Sekwencje starterów Psy F, Psy R użytych w badaniach molekularnych na obecność *Pseudomonas syringae*, zostały zastosowane z dostępnej publikacji: [14].

Tabela 2. Sekwencje starterów Psy F, Psy R użytych w testach molekularnych na obecność *Pseudomonas syringae*

Nazwa	Sekwencja (5'- 3')
Psy F	ATGATCGGAGCGGACAAG
Psy R	GCTCTTGAGGCAAGCACT

Źródło: Opracowanie własne

Sekwencje starterów Pse16S_F, Pse23S_R użytych w reakcji Direct PCR na obecność *Pseudomonas* spp., w celu korelacji wyników, zostały zastosowane z dostępnej publikacji [15].

Tabela 3. Sekwencje starterów Pse16S_F, Pse23S_R użytych w testach molekularnych na obecność *Pseudomonas* spp

Nazwa	Sekwencja (5'- 3')
Pse16S_F	ACTGACACTGAGGTGCGAAAGCG
Pse23S_R	ACCGTATGCGCTTCTTCACTTGACC

Źródło: Opracowanie własne

5.2. Przebieg temperaturowy

Przebieg temperaturowy został opracowany na podstawie zaleceń opisanych w instrukcji zestawu „Thermo Scientific Phire Plant Plant Direct PCR Master Mix” firmy Thermo Scientific”. Temperatura annealingu dla obu par starterów, została określona z wykorzystaniem kalkulatora sugerowanego przez producenta zestawu „Thermo Scientific Phire Plant Plant Direct PCR Master Mix” firmy Thermo Scientific”: Tm Calculator.

Tabela 4. Przebieg temperaturowy dla reakcji Direct PCR z wykorzystaniem starterów Psy F, Psy R

Etap cyklu	Temperatura	Czas	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	98°C	5 min	x1
Denaturacja	98°C	5 s	x40
Annealing	62,2°C	5 s	
Elongacja	72°C	20 s	
Elongacja końcowa	72°C	1 in	x1

Źródło: Opracowanie własne

Tabela 5. Przebieg temperaturowy dla reakcji Direct PCR z wykorzystaniem starterów Pse16S_F, Pse23S_R

Etap cyklu	Temperatura	Czas	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	98 °C	5 min	x1
Denaturacja	98 °C	5 s	x40
Annealing	69.8°C*	5 s	
Elongacja	72°C	40 s	
Elongacja końcowa	72°C	1 in	x1

Źródło: Opracowanie własne

6. Metodyka

6.1. Przygotowanie próbki

Materiał roślinny o wymiarach: 0,35-0,5 mm, pobrano za pomocą skalpela w warunkach sterylnych i umieszczono w 50 µl „Dilution Buffer”. Próbkę poddano inkubacji w temperaturze pokojowej przez 3 minuty. Na końcu próbkę poddano wirowaniu w 17 000 x g przez 5 minut.

6.2. Reakcja Direct PCR

Reakcja Direct PCR została wykonana z wykorzystaniem komercyjnego zestawu „Thermo Scientific Phire Plant Plant Direct PCR Master Mix” firmy Thermo Scientific [13].

Przed rozpoczęciem reakcji, wszystkie odczynniki zostały poddane mieszanemu przez wortexowanie. Skład mieszaniny reakcyjnej dla reakcji Direct PCR został opracowany na podstawie zaleceń opisanych w instrukcji zestawu „Thermo Scientific Phire Plant Plant Direct PCR Master Mix” firmy Thermo Scientific”.

W reakcji wykorzystano startery, o stężeniu wyjściowym 10 µM, specyficzne dla *Pseudomonas syringae* o sekwencji podanej w tabeli 2, dostępnej w rozdziale Materiały i Metody.

W celu korelacji wyników dokonano dodatkowej analizy z wykorzystaniem starterów specyficznych dla *Pseudomonas spp.*, o stężeniu wyjściowym 10 µM, o sekwencji podanej w tabeli 3, dostępnej w rozdziale Materiały i Metody.

Reakcja Direct PCR przebiegała z wykorzystaniem termocyklera Simply Amp (Applied Biosystems). Przebieg temperaturowy dla reakcji Direct PCR z wykorzystaniem starterów Psy F, Psy R podano w tabeli 4, dostępnej w rozdziale Materiały i Metody. Przebieg temperaturowy dla reakcji Direct PCR z wykorzystaniem starterów Pse16S_F, Pse23S_R podano w tabeli 5, dostępnej w rozdziale Materiały i Metody

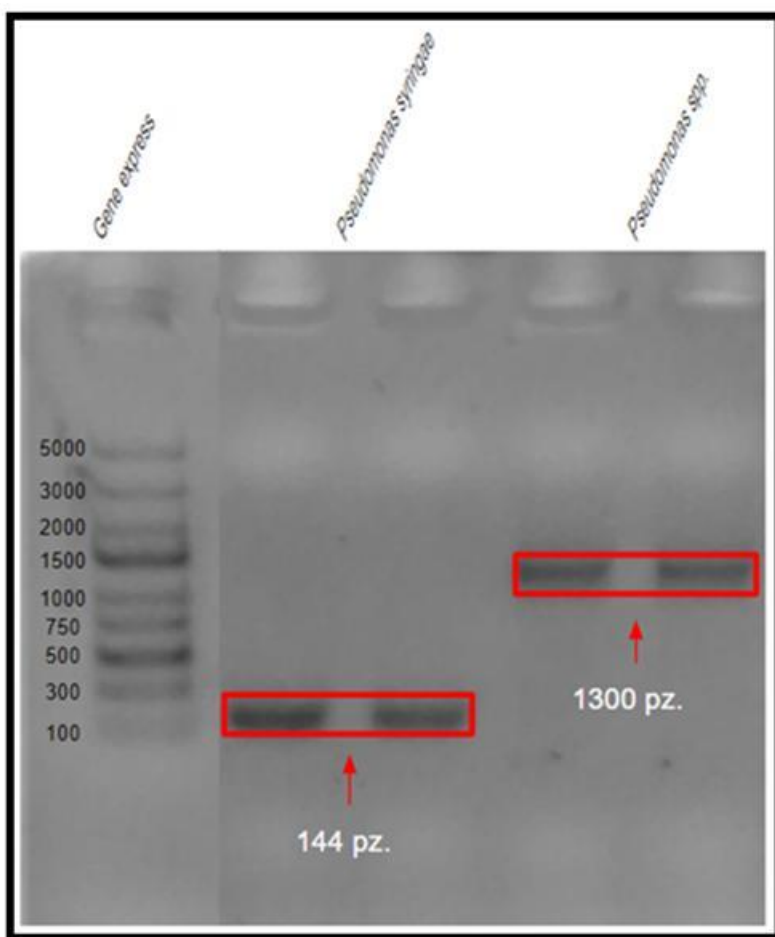
6.3. Rozdział i wizualizacja wyników reakcji

Rozdział produktów reakcji PCR przeprowadzono w procesie rozdzielania elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym w warunkach: 135 V przez 30 minut. Reakcja przebiegała z wykorzystaniem urządzenia Mupid-One.

Zdjęcie żelu agarozowego po rozdziale elektroforetycznym wykonano za pomocą systemu do dokumentacji żeli omniDOC Gel Documentation System przy ekspozycji żelu na światło UV przez 15 sekund.

7. Wyniki

W wyniku reakcji Direct PCR z wykorzystaniem starterów specyficznych dla *Pseudomonas syringae* wykonanej na próbce maliny z pola na jednej z plantacji malin letnich otrzymano specyficzny produkt o wielkości 144 pz. widoczny na zdjęciu żelu agarozowego. W celu korelacji wyników dokonano dodatkowej reakcji Direct PCR z wykorzystaniem starterów specyficznych dla *Pseudomonas* spp. wykonanej na tej samej próbce maliny z pola niedaleko Grójca, otrzymano produkt o wielkości 1300 pz. widoczny na zdjęciu żelu agarozowego (fot. 5).



Fotografia 5. Zdjęcie żelu agarozowego, ukazującego specyficzne produkty powstałe w reakcji Direct PCR dla *Pseudomonas syringae* – 144 pz. oraz *Pseudomonas* spp. – 1300 pz. (M. Lechowski)

8. Podsumowanie

Choroba powodowana przez patogeny bakteryjne niewątpliwie jest dużym zagrożeniem na plantacjach uprawowych, szczególnie malin ze względu na brak obecnie zarejestrowanego produktu do zwalczania oraz poprawności identyfikacji czynnika biotycznego. Co więcej, patogeny do momentu ukazania się objawów chorobowych – możliwych do identyfikacji wizualnej, znajdują się w zaawansowanym stadium infekcji. Powoduje to niemożliwość eliminacji negatywnego wpływu patogena zarówno na jakość, jak i ilość plonu. Dlatego w celu precyzyjnej i dokładnej identyfikacji wykorzystywane są metody molekularne, które dają znacznie większe możliwości diagnostyczne w porównaniu do metod tradycyjnych. W przypadku identyfikacji *Pseudomonas syringae* w badaniach wykorzystane zostały opracowane procedury amplifikacji DNA przy użyciu techniki DIRECT PCR. W wyniku przeprowadzonej weryfikacji molekularnej z wykorzystaniem techniki PCR, uzyskano szczegółową informację na temat identyfikacji patogena bakteryjnego na plantacji maliny. Prace z tym patogenem, a także z dalszą diagnostyką opartą na metodach molekularnych będą kontynuowane, ponieważ było to pierwsze doniesienie o obecności tego patogena na plantacjach towarowych.

Literatura

1. Felczak-Konarska K., *Choroby pędów malin. Jak im zaradzić w nowym sezonie?*, Truskawka, malina, jagoda, 4/2019, s. 50-53.
2. Łabanowska B., Cieślińska M., Doruchowski G., Meszka B., Iseck J., Sekrecka M., Tartanus M., Treder W., Wójcik-Seliga J., Wójcik P., Michalecka M., Poniatowska A., *Metodyka Integrowanej produkcji Malin (materiały dla producentów)*, Instytut Ogrodnictwa, Skierniewice 2013, aktualizacja 2017, s. 14-22.
3. Sobiczewski P., Schollenberger M., *Bakteryjne choroby roślin ogrodniczych*, Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, ISBN 83-09-01761-8: 6-14, Warszawa 2002.
4. Olczak-Woltman H., Schollenberger M., Niemirowicz-Szczytt K., *Charakterystyka i metody identyfikacji patogenicznych dla roślin bakterii na przykładzie Pseudomonas syringae pv. Lachrymans*, Katedra Genetyki, Sggw, Roślin, 2008.
5. Mansfield J., Genin S., Magori S., Citovsky V., Sriariyanum M., Ronald P., Dow M., Verdier V., Beer S.V., Machado M.A., Toth I., Salmond G., Foster Gary D., *Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology*, „Mol. Plant Pathol.” 6 (13) 2012, s. 614-629, DOI: 10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x, PMID: 22672649 (ang.).
6. Milijašević-Marčić S., Rekanović, E. and Gavrilović V., *Bacterial diseases of raspberry in serbia*, Acta Hort 946, 267-270, <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.946.43>.
7. Koike S.T., Bolda M.P., Bull C.T., *Pseudomonas blight caused by Pseudomonas syringae on raspberry in California*, Plant Disease, 2014, 98:1151.
8. Žarko I., Slaviša S., Svetlana Ž., Veljko G., Milan K., Djordje F., *Molecular characterization of Pseudomonas syringae isolates from fruit trees and raspberry in Serbia*, European Journal of Plant Pathology 134, 2012, s. 191-203.
9. Irzykowska L., *Markery molekularne w diagnostyce chorób podstawy źdźbła i korzeni zbóż*, Post. Nauk Rol., 2006, s. 31-40.
10. Johnson W.M., *The polymerase chain reaction: An overview and development of diagnostic PCR protocols at the LCDC*, Can J Infect. Dis. 1991, 2(2), s. 89-91, doi:10.1155/1991/580478.

11. Chien A., Edgar D.B., Trela J.M., *Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile Thermus aquaticus*, J. Bacteriol. 12, (3), 1976, s. 1550-1557, doi:10.1128/jb.127.3.1550-1557.1976. PMC 232952. PMID 8432.
12. Lorenz T.C., *Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies*, J Vis Exp. 2012, (63):e3998, Published 2012 May 22, doi:10.3791/3998.
13. Bellstedt D.U., Pirie M.D., Visser J.C., de Villiers M.J., Gehrke B., *A rapid and inexpensive method for the direct PCR amplification of DNA from plants*, Am J Bot. 2010, 97(7):e65-e68, doi:10.3732/ajb.1000181.
14. Guilbaud C., Morris C.E., Barakat M., Ortet P., Berge O., *Isolation and identification of Pseudomonas syringae facilitated by a PCR targeting the whole P. syringae group*, FEMS Microbiol Ecol. 2016, 92(1):fiv146, doi:10.1093/femsec/fiv146.
15. Locatelli L., Tarnawski S., Hamelin J., Rossi P., Aragno M., Fromin N., *Specific PCR amplification for the genus Pseudomonas targeting the 3' half of 16S rDNA and the whole 16S-23S rDNA spacer*, Syst Appl Microbiol. 2002, 25(2), s. 220-227, doi:10.1078/0723-2020-00110.

Wykorzystanie technik biologii molekularnej w diagnostyce *Pseudomonas syringae* na malinie

Streszczenie

Malina stanowi jedną z najważniejszych upraw roślin jagodowych w Polsce. Zmiany warunków klimatycznych, zwiększenie powierzchni upraw oraz wprowadzanie nowych odmian roślin uprawnych spowodowało, że odnotowuje się występowanie dotychczas niediagnozowanych patogenów, stanowiących wielkie zagrożenie dla upraw towarowych, mogąc znacząco obniżyć jakość oraz ilość plonu danej rośliny. Diagnoza chorób roślinnych stanowi jeden z najważniejszych elementów rozwoju rolnictwa XXI wieku. Wykorzystanie diagnostyki molekularnej do specyficznej detekcji patogenów daje możliwość minimalizacji strat do tej pory nieosiągalnej przez metody konwencjonalne.

W okresie sezonu wiosennego na plantacji maliny niedaleko Grójca zaobserwowano objawy korespondujące z charakterystyką objawów wywoływanych przez *Pseudomonas syringae*. W celu potwierdzenia diagnozy oględzinowej wykonano diagnostykę molekularną z wykorzystaniem reakcji Direct PCR oraz elektroforezy w żelu agarozowym. W reakcji wykorzystano specyficzne startery dla *Pseudomonas syringae* pozyskane z literatury naukowej. Wyniki reakcji potwierdziły przypadek wystąpienia *Pseudomonas syringae* na malinie.

Słowa kluczowe: malina, biologia molekularna, *Pseudomonas syringae*

The use of molecular biology techniques in plant diagnostics of *Pseudomonas syringae* on raspberry

Abstract

Raspberry is one of the most important berry crops in Poland. Climate change, the constant increase in the cultivation area, and the introduction of new plant varieties results in the occurrence of undiagnosed pathogens, which pose a great threat to commercial crops and may significantly reduce the quality and quantity of a given plant's yield. The diagnostics of plant diseases is one of the most important elements in the development of 21st century agriculture. The use of molecular diagnostics for the specific detection of pathogens gives the possibility to minimize losses so far not achievable by conventional methods.

During the spring season, on a raspberry plantation near Grójec, symptoms corresponding to the characteristics of the ones caused by *Pseudomonas syringae* were observed. To confirm the visual diagnosis, a molecular diagnostics test was performed with the use of Direct PCR and electrophoresis in agarose gel. During the procedure, specific primers for *Pseudomonas syringae* obtained from the scientific literature were used. The results of the reaction confirmed the case of *Pseudomonas syringae* on raspberry.

Keywords: raspberry, molecular biology, *Pseudomonas syringae*

Próby adsorpcji gamma-dekalaktonu z modelowych roztworów wodnych

1. Wprowadzenie

Gamma-dekalakton to wewnątrzcząsteczkowy ester kwasu 4-hydroksydekanowego, o wzorze sumarycznym $C_{10}H_{18}O_2$. Lakton ten ma postać bezbarwnej, oleistej cieczy o silnym zapachu brzoskwini, który wyczuć można nawet przy niskim stężeniu – ok. 0,088 ppm w roztworach wodnych. Stanowi ważny komponent zapachowy przy wytwarzaniu aromatów brzoskwini, moreli lub truskawki [1-3].

Gamma-dekalakton występuje naturalnie w bardzo małych ilościach w roślinach, w szczególności w owocach, ale ze względu na minimalną zawartość ekstrakcja z naturalnych surowców jest nieopłacalna. Lakton produkowany jest aktualnie przemysłowo na drodze chemicznej lub chemiczno-biotechnologicznej. Chemiczna synteza tego związku zapachowego opierać się może m.in. na ozonolizie kwasu rycynolowego, bądź jego estrów metylowych lub etylowych w środowisku alkoholu alifatycznego [4, 5]. W metodzie chemiczno-mikrobiologicznej etap enzymatyczny jest stadium kluczowym, prowadzącym do otrzymania optycznie czystego półproduktu, który następnie przeprowadza się w toku dalszych reakcji chemicznych w pożądaną enancjomer laktonu.

Przez ostatnie lata zaproponowano także wiele rozwiązań biotechnologicznej syntezy gamma-dekalaktonu z udziałem mikroorganizmów [6-10]. Produkcja tego związku na drodze czysto biotechnologicznej bazuje na procesie oksydacyjnej degradacji kwasów tłuszczowych. Najlepiej poznanym szlakiem tych procesów jest β -oksydacja, zachodząca u drożdży w peroksysomach [11]. Najczęściej przy wytwarzaniu gamma-dekalaktonu stosuje się kwas rycynolowy (kwas (*R*)-12-hydroksy-*cis*-9-oktadekenowy), który w swojej zestryfikowanej formie stanowi około 86-90% oleju rycynowego [12]. Alternatywnie, zamiast czystego kwasu rycynolowego stosowane są również w podłożach biotransformacyjnych estry metylowe tego kwasu (rycynooleinian metylu) bądź olej rycynowy [13]. Istotny jest fakt, iż stosowanie w formie substratu czystego kwasu rycynolowego nie wymaga dodatkowej aktywności enzymatycznej, zaś przy wykorzystaniu pozostałych wyżej wymienionych związków, jako źródła tego kwasu, konieczna jest wstępna hydroliza enzymatyczna [14].

Przekształcanie kwasu rycynolowego do γ -dekalaktonu polega na odszczepieniu od karboksylowego końca ośmiowęglowego fragmentu, które następuje w wyniku czterech cykli β -oksydacji. Z łańcucha 18-węglowego, finalnie uzyskuje się związek 10-węglowy (kwas 4-hydroksydekanowy), który ulega następnie w środowisku kwaśnym cyklizacji do γ -dekalaktonu [15, 16].

¹ wawrzyniecwaclawek@gmail.com, Wydział Ogrodnictwa i Biotechnologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

² jolanta_malajowicz@sggw.edu.pl, Katedra Chemii, Instytut Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

³ agnieszka_gorska@sggw.edu.pl, Katedra Chemii, Instytut Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

Trudnością wspomnianej reakcji biotransformacji jest wydzielenie gamma-dekalaktonu z mieszaniny reakcyjnej. Wynika to z dobrej rozpuszczalności laktonu w fazie tłuszczowej, którą stanowi nieprzereagowana część oleju rycynowego czy kwasu rycynolowego. Badania laboratoryjne wielu naukowców, obrazujące możliwość biosyntezy kilku gramów gamma-dekalaktonu na litr podłoża, oparte są w głównej mierze na analizie chromatograficznej, bez wydzielenia laktonu z podłoża [12, 17-19]. W skali światowej prowadzone są nieliczne prace badawcze nad wydzieleniem związku z pożywki hodowlanej. Dotyczą one głównie zastosowania destylacji z parą wodną bądź adsorpcji na odpowiednio dobranych adsorbentach [20-22].

Materiały porowate są powszechnie i chętnie stosowane przy wydzieleniu związków, z uwagi na ich właściwości, w tym głównie ich dużą powierzchnię właściwą, dużą porowatość, chłonność, nieznaczną aktywność chemiczną oraz dużą wytrzymałość mechaniczną i możliwość regeneracji. Należy jednak pamiętać, iż adsorpcja w fazie ciekłej jest stosunkowo złożonym zjawiskiem. Na wydajność adsorpcji składnika z fazy ciekłej wpływają bowiem m.in. takie czynniki jak: pH roztworu, rozpuszczalność adsorbowanego składnika w stosowanym rozpuszczalniku, temperatura, w której prowadzony jest proces czy samo stężenie adsorbenta [23, 24]. Wobec powyższego dobranie właściwego adsorbenta i warunków adsorpcji laktonu z wodnego podłoża biotransformacyjnego wymaga w początkowym etapie przeprowadzenia szeregu analiz umożliwiających opis i porównanie izoterm adsorpcji, a następnie określenia również właściwych warunków desorpcji gamma-dekalaktonu.

W niniejszej pracy badawczej podjęto próby wyodrębnienia laktonu z modelowych roztworów wodnych poprzez adsorpcję, wykorzystując w tym celu trzy wybrane adsorbenty: Amberlit XAD-4 (syntetyczny kopolimer styrenu i diwinylobenzenu), Zeolit ZSM-5 (syntetyczny wysokokrzemowy glinokrzemian) oraz Vermikulit (naturalny krzemian warstwowy).

2. Materiał doświadczalny i metodyka badań

2.1. Materiał badawczy

Materiał badawczy stanowiły trzy rodzaje adsorbentów: Amberlit XAD-4, Zeolit ZSM-5 i Vermikulit oraz handlowy gamma-dekalakton, o czystości > 98% (Sigma-Aldrich).

2.2. Dobór właściwego składu modelowych roztworów gamma-dekalaktonu

Przygotowano trzy rodzaje roztworów (tab. 1), zawierających stałe stężenie gamma-dekalaktonu (10 g/dm^3), a różną zawartość wody i etanolu (96%, Avantor), w celu znalezienia roztworu o równowadze fazowej, który umożliwiłby uzyskanie najlepszego modelowego układu do badań nad adsorpcją gamma-dekalaktonu.

Z wykonanych roztworów do dalszych badań wybrano roztwór nr 3, odznaczający się największą klarownością, co oznaczało osiągnięcie równowagi w roztworze.

Tabela 1. Modelowe roztwory do badań nad adsorpcją gamma-dekalaktonu

Roztwór 1	Roztwór 2	Roztwór 3
0,25g gamma-dekalaktonu 2,5 cm ³ etanolu 22,5 cm ³ H ₂ O	0,25 g gamma-dekalaktonu 5 cm ³ etanolu 20 cm ³ H ₂ O	0,25 g gamma-dekalaktonu 10 cm ³ etanolu 15 cm ³ H ₂ O
bardzo mętny roztwór, układ niejednorodny	bardzo mętny roztwór, układ niejednorodny	klarowny roztwór, układ jednorodny

2.3. Adsorpcja gamma-dekalaktonu z modelowych roztworów

Celem oznaczenia poziomu adsorpcji gamma-dekalaktonu w układach modelowych, do kolb stożkowych na 100 cm³ wprowadzano 10 cm³ etanolu, 15 cm³ H₂O de stylowanej oraz gamma-dekalakton, w stężeniu od 0,1 g do 10 g/dm³. Kolby wstawiano na mieszadło magnetyczne celem dobrego wymieszania składników roztworu. Po 5 min mieszania, z roztworu pobierano próbkę kontrolną. Następnie do roztworów wprowadzano wybrany adsorbent w stężeniu 30 g/dm³ roztworu.

Po dodaniu adsorbentów kolby wstawiano na wytrząsarke i w odstępach 10-minutowych przez 60 min z roztworu pobierano próbki właściwe (1,5 cm³), celem oznaczenia chromatograficznego.

Do analiz chromatograficznych, próbki zawierające 1,5 cm³ mieszaniny reakcyjnej, oraz 20 µl standardu wewnętrznego (undekalaktonu) ekstrahowano za pomocą 1,5 cm³ chlorku metylenu.

2.4. Oznaczanie ilości zaadsorbowanego gamma-dekalaktonu – analiza GC

Próbki analizowano za pomocą chromatografii gazowej. Analizę prowadzono z wykorzystaniem aparatu YL 6100 Young Lin Instrument, wyposażonego w kolumnę kapilarną BPX70 (60 m x 0,25 mm), stosując następujący program temperaturowy: przetrzymanie przez 1 minutę w temperaturze 165°C, kolejno przyrost temperatury od 165°C do 180°C w tempie 3°C/min i ostateczny wzrost temperatury od 180°C do 205°C w tempie 5°C/min. Analizę prowadzono przez okres 14 min.

Gazem nośnym w analizach był azot, temperatura detektora wynosiła 280°C, zaś przepływ ustalono na poziomie 1,1 cm³.

2.5. Desorpcja gamma-dekalaktonu z adsorbentów

Celem oddzielenia adsorbentów od roztworów, wykonano sączenie na bibułce filtracyjnej, a następnie oddzielone adsorbenty suszono w temperaturze pokojowej. Wyszuszone adsorbenty przenoszono do gilz ekstrakcyjnych o pojemności 50 cm³ i ekstrahowano mieszaniną 20 cm³ tzw. eterówki, czyli 96% etanolu z dodatkiem eteru dietylowego i eteru *tert*-butylowo metyloвого oraz 5 cm³ wody destylowanej. Z mieszaniny pobierano 1,5 cm³ celem oznaczeń chromatograficznych (po dodaniu standardu wewnętrznego i 1,5 cm³ chlorku metylenu powtórnie ekstrahowano próbkę, a następnie analizowano na GC).

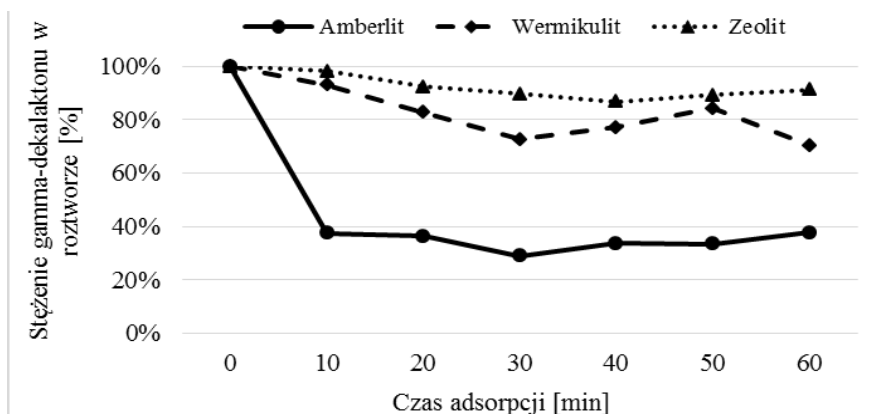
Po pierwszym cyklu desorpcji, adsorbent ponownie odsączano na bibułce filtracyjnej, by kolejno poddać go ekstrakcji, powtarzając ten cykl 5-krotnie.

3. Omówienie i dyskusja wyników

3.1. Badanie efektywności adsorpcji γ -dekalaktonu z roztworów modelowych

Dla trzech wybranych adsorbentów: Amberlitu XAD-4, Zeolitu ZSN 5 oraz Vermikulitu przeanalizowano efektywność adsorpcji gamma-dekalaktonu. Wyniki tego doświadczenia zamieszczono na rysunku nr 1.

Spadek poziomu gamma-dekalaktonu w roztworze wodnym analizowano przez okres 60 min, pobierając próbkę co 10 min. Przy zastosowanym stężeniu γ -dekalaktonu, na poziomie 5 g/dm^3 wyraźnie widać, że najefektywniej lakton adsorbował się na Amberlicie XAD-4. Uśredniona ilość zaadsorbowanego związku wyniosła ok. 65,4%, co w przeliczeniu na masę stanowiło ok. $3,83 \text{ g/dm}^3$. Poprzez ilość zaadsorbowanego laktonu rozumie się różnicę pomiędzy początkowym stężeniem związku w roztworze, a jego zawartością finalną. Dla dwóch pozostałych adsorbentów, wartości te stanowiły odpowiednio ok. 20,0% dla wermikulitu i 8,8% dla zeolitu, czyli były od ok. 3 do 7,5-krotnie niższe. Niezależnie od zastosowanego rodzaju adsorbenta, po ok. 30 minutach kontaktu we wszystkich roztworach osiągnięto równowagę.



Rysunek 1. Kinetyka adsorpcji gamma-dekalaktonu z roztworów wodnych na trzech wybranych adsorbentach, w temperaturze 25°C . Stężenie gamma-dekalaktonu 5 g/dm^3 ; stężenie adsorbentów 30 g/dm^3 , [opracowanie własne]

W ramach badań określono również kinetykę adsorpcji gamma-dekalaktonu z roztworów. Zastosowano sześć różnych stężeń gamma-dekalaktonu – od $0,1$ do 10 g/dm^3 oraz stałe stężenie adsorbentów, wynoszące 30 g/dm^3 . Początkowe szybkości adsorpcji, oszacowane na podstawie pierwszych 10 min reakcji, zestawiono w tabeli nr 2.

Zebrane wyniki wskazują, iż początkowe tempo adsorpcji było najwyższe dla Amberlitu XAD-4, przy stężeniu laktonu na poziomie 10 g/dm^3 i sięgało poziomu ok. $17,1 \times 10^{-3}$ w 10 minucie reakcji. W przypadku wermikulitu wartość ta była ok. 2,5-krotnie niższa ($6,83 \times 10^{-3}$), zaś w przypadku zeolitu ok. 28,5-krotnie niższa ($0,6 \times 10^{-3}$). Ilość zaadsorbowanego gamma-dekalaktonu z roztworu z amberlitem wahała się w granicach od 50,2% do 78,6%, w zależności od stężenia laktonu. Szybsze tempo adsorpcji na Amberlicie XAD-4 przypisuje się oddziaływaniom hydrofobowym, które są istotne z uwagi na słabą rozpuszczalność gamma-dekalaktonu w wodzie, strukturze chemicznej tego adsorbenta i wysokiej powierzchni właściwej – $750 \text{ m}^2/\text{g}$ [25].

Tabela 2. Początkowa szybkość adsorpcji γ -dekalaktonu na trzech badanych adsorbentach po 10 minutach reakcji

Zakładane stężenie gamma-dekalaktonu [g/dm^3] w roztworze	10 g/dm^3	5 g/dm^3	3 g/dm^3	1 g/dm^3	0,5 g/dm^3	0,1 g/dm^3
Amberlit XAD-4 [30 g/dm^3]						
Początkowe stężenie gamma-dekalaktonu (g/dm^3) – analiza GC	10,23	5,85	3,14	1,14	0,56	0,187
Zaabsorbowana ilość gamma-dekalaktonu (g/dm^3) po 10 minutach	5,13	3,66	2,15	0,76	0,44	0,141
Początkowa szybkość adsorpcji (γ -dekalakton [$\text{g}/(\text{adsorbent} [\text{g}] \times \text{minuta})$)	17,1 $\times 10^{-3}$	12,2 $\times 10^{-3}$	7,17 $\times 10^{-3}$	2,53 $\times 10^{-3}$	1,47 $\times 10^{-3}$	0,47 $\times 10^{-3}$
Wermikulit [30 g/dm^3]						
Początkowe stężenie gamma-dekalaktonu (g/dm^3) – analiza GC	9,74	5,8	3,33	1,25	0,51	0,126
Zaabsorbowana ilość gamma-dekalaktonu (g/dm^3) po 10 minutach	2,05	0,4	0,26	0,06	0,04	0,016
Początkowa szybkość adsorpcji (γ -dekalakton [$\text{g}/(\text{adsorbent} [\text{g}] \times \text{minuta})$)	6,83 $\times 10^{-3}$	1,33 $\times 10^{-3}$	0,87 $\times 10^{-3}$	0,2 $\times 10^{-3}$	0,13 $\times 10^{-3}$	0,053 $\times 10^{-3}$
Zeolit ZSM-5 [30 g/dm^3]						
Początkowe stężenie gamma-dekalaktonu (g/dm^3) – analiza GC	10,33	5,71	3	1,08	0,54	0,124
Zaabsorbowana ilość gamma-dekalaktonu (g/dm^3) po 10 minutach	0,18	0,1	0,05	0,1	0,02	0,01
Początkowa szybkość adsorpcji (γ -dekalakton [$\text{g}/(\text{adsorbent} [\text{g}] \times \text{minuta})$)	0,6 $\times 10^{-3}$	0,333 $\times 10^{-3}$	0,167 $\times 10^{-3}$	0,333 $\times 10^{-3}$	0,067 $\times 10^{-3}$	0,033 $\times 10^{-3}$

Warto zauważyć, iż wraz ze wzrostem stężenia laktonu w roztworze wodnym, tempo adsorpcji wzrastało, niezależnie od zastosowanego rodzaju adsorbenta. Ponadto, szybkość adsorpcji była odwrotnie proporcjonalna do wydajności adsorpcji. Im niższe było tempo adsorpcji, tym więcej laktonu zaadsorbowało się na adsorbencie, w każdym z trzech zastosowanych rodzajów.

3.2. Izotermy adsorpcji gamma-dekalaktonu

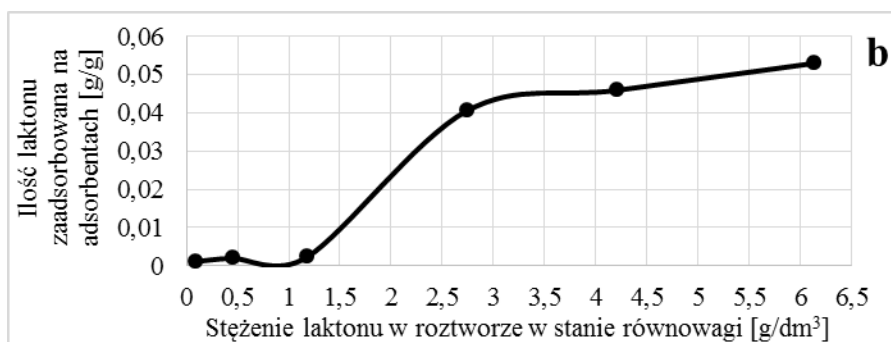
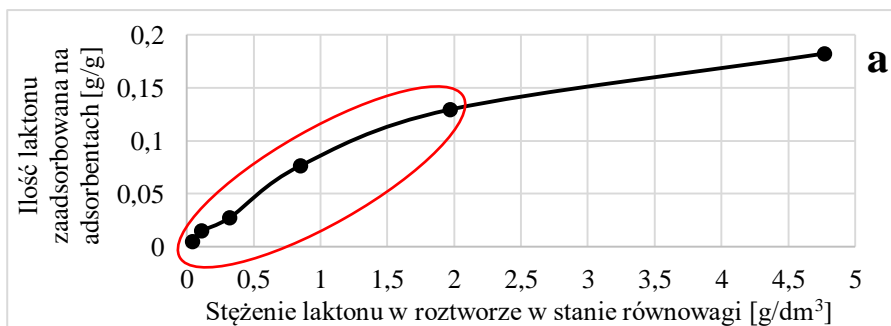
Wstępnej charakterystyki sorbentów dokonano poprzez badanie izoterm adsorpcji w modelowych roztworach wodnych.

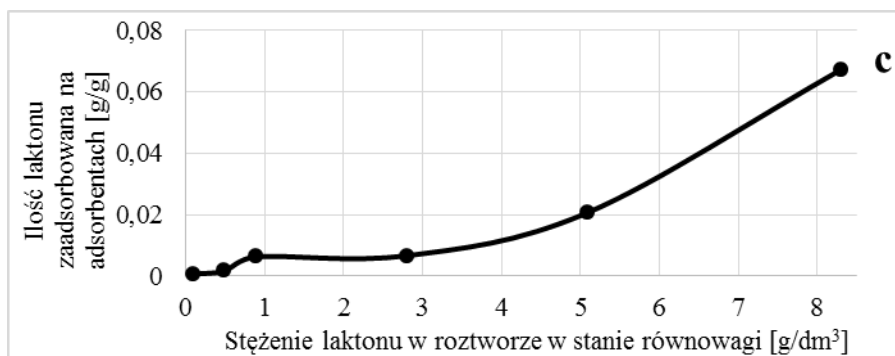
Izotermy adsorpcji gamma-dekalaktonu, przedstawione na rysunku nr 2 można podzielić na dwie grupy: pierwszy typ izoterm z osiąganym poziomem nasycenia widoczny jest na rysunku 2a – jest to izoterma adsorpcji gamma-dekalaktonu na amberlicie XAD-4. Drugi typ izoterm, przybierających formę sigmoidalną obrazuje rysunek 2 b i c (odpowiednio wermikulit i zeolit). Ogólnie uważa się, iż izotermy typu 1 są charakterystyczne dla takich sorbentów jak węgiel aktywny, czy amberlit. Otrzymuje się je głównie w przypadku sorbentów stałych, w których sorpcja jest ograniczona efektem sterycznym do jednej lub dwóch warstw molekularnych. Izotermy typu 2

ukazują adsorbowane ilości laktonu, które szybko wzrastają po osiągnięciu stanu nasycenia monowarstwy. Ten typ izoterm jest charakterystyczny dla adsorpcji, w których liczba stałych warstw molekularnych nie jest ograniczona do monowarstwy [26].

Wykresy na rysunku nr 2 wskazują, iż przy niskim stężeniu laktonu w wodzie w stanie równowagi ($< 1 \text{ g/dm}^3$) Amberlit XAD-4 jest najbardziej wydajnym sorbentem. Przy wyższych stężeniach związku zapachowego, pozostałe dwa sorbenty: wermikulit i zeolit stawały się bardziej podatne na adsorbowanie gamma-dekalaktonu, nie mniej jednak ich zdolności sorpcyjne były znacznie niższe względem amberlitu, w całym okresie przebiegu procesu.

Analizując wykres można zauważyć, iż biorąc pod uwagę niższe stężenia laktonu w roztworze – do 5 g/dm^3 (stężenie przed adsorpcją), przy wykreślaniu izoterm adsorpcji można byłoby uzyskać zależność liniową (punkty zakreślone czerwoną linią na rysunku 2a). Wspominają o tym w swych badaniach Alchihab i wsp. [21], którzy prowadzili adsorpcję gamma-dekalaktonu na żywicach MN-100, MN-102 i MN-202. Dla każdego z tych sorbentów naukowcy uzyskali zależność liniową, którą przypisywali niskiej rozpuszczalności laktonu w wodzie ($0,6 \text{ g/dm}^3$). Naukowcy uważają, iż sposób adsorpcji związku zapachowego jest ściśle związany z jego rozpuszczalnością.





Rysunek 2. Izotermę adsorpcji γ -dekalaktonu na adsorbentach – litery oznaczają odpowiednio: a. amberlit, b. wermikulit c. zeolit, w środowisku wodnym w temperaturze 25°C. Równowagowe stężenie laktonu mierzono w zakresie 0,1-10 g/dm³ przy użyciu 30 g/dm³ każdego z adsorbentów, [opracowanie własne]

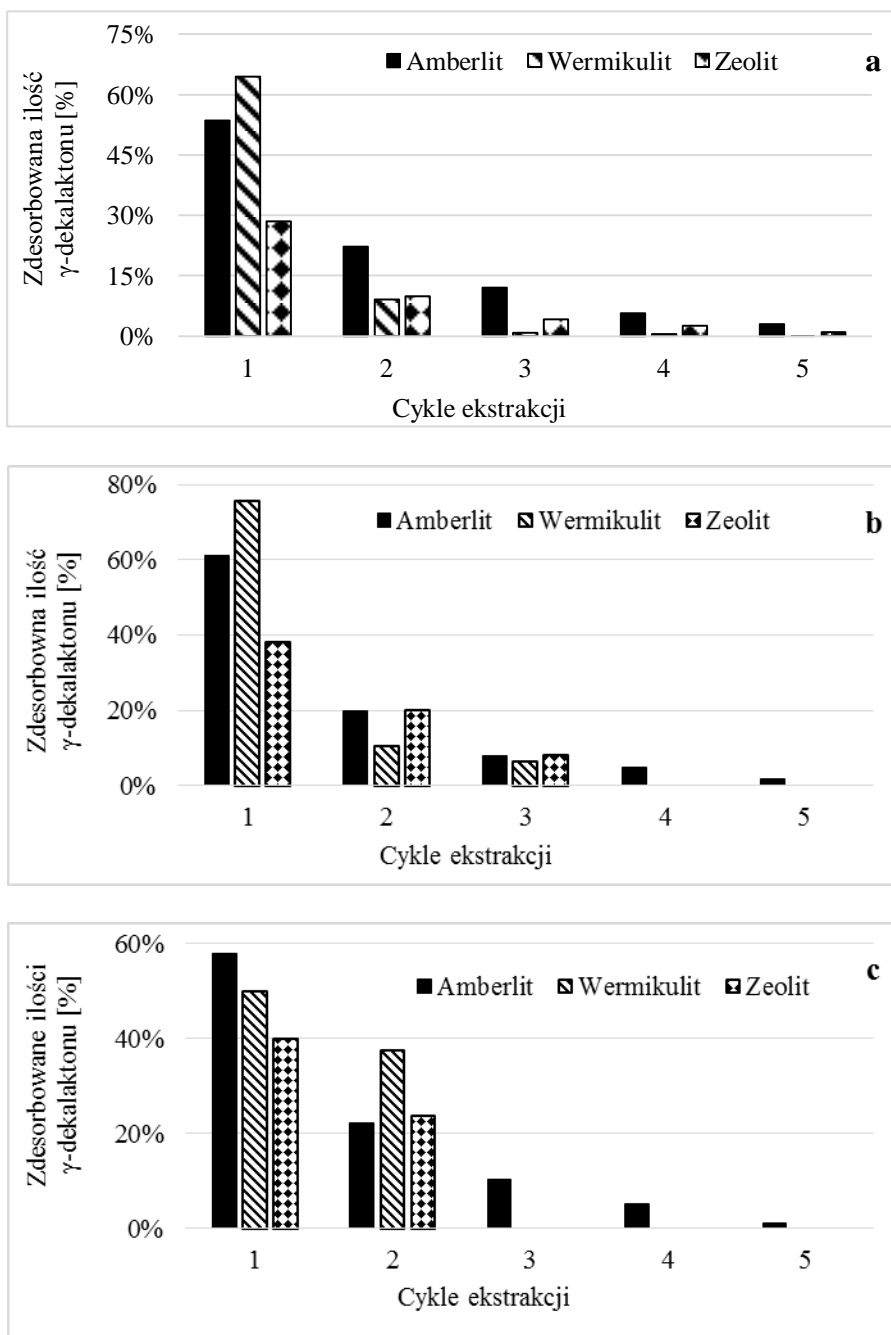
3.3. Desorpcja gamma-dekalaktonu

Po przeprowadzonych doświadczeniach adsorpcji gamma-dekalaktonu, przeanalizowano również jego desorpcję, ze wszystkich trzech stosowanych adsorbentów. Do analiz wybrano adsorbenty z roztworów o stężeniu związku zapachowego na poziomie: 10 g/dm³, 5 g/dm³ i 1 g/dm³. Do uwolnienia gamma-dekalaktonu z adsorbentów wykorzystano mieszaninę etanolu i wody. Do desorpcji zastosowano 33,3 ml etanolu na gram adsorbentu. Wyniki z doświadczenia przedstawiono na rysunku nr 3.

Stosowane adsorbenty wykazywały dobre zdolności desorpcji. Z adsorbentów, stosowanych w roztworach wodnych o początkowym stężeniu laktonu na poziomie 10 g/dm³, na pierwszym etapie ekstrakcji udało się desorbować ok. 53,5% laktonu z Amberlitu XAD-4, ok. 64,5%, z wermikulitu oraz ok. 28,5% z Zeolitu ZSM-5. Pięć cykli ekstrakcji z tego adsorbenta, pozwoliło na wydzielenie ok. 96,5% zaadsorbowanego laktonu. W przypadku wermikulitu ilość zdesorbowanego gamma-dekalaktonu wyniosła ok. 75,1%, zaś dla zeolitu ok. 46,1%.

Desorpcja z adsorbentów użytych w roztworach wodnych o stężeniu laktonu 5 g/dm³ i 1 g/dm³ była równie skuteczna. Pięciokrotna ekstrakcja eterówką Amberlitu XAD-4 skutkowała wydzieleniem prawie 100% laktonu. W każdym z dwóch omawianych roztworów, wydajność desorpcji była najniższa dla zeolitu i wynosiła odpowiednio ok. 65,8% (przy stężeniu laktonu na poziomie 5 g/dm³) oraz ok. 63,8% (przy stężeniu laktonu na poziomie 1 g/dm³).

Porównując dane z poszczególnych wykresów można zauważyć, iż niezależnie od stężenia laktonu zaadsorbowanego na Amberlicie XAD-4, wymagane jest 5 cykli ekstrakcyjnych celem całkowitej jego desorpcji. W przypadku wermikulitu, przy niższych stężeniach gamma-dekalaktonu wystarczyły 2-3 cykle desorpcji (odpowiednio dla stężenia 5 g/dm³ oraz 1 g/dm³), by całkowicie odzyskać związek zapachowy.



Rysunek 3. Desorpcja gamma-dekalaktonu z trzech badanych adsorbentów: Amberlitu XAD-4, Wermikulitu i Zeolitu ZSM-5, w pięciu cyklach ekstrakcji. Rysunek 12a odpowiada wynikom desorpcji z adsorbentów, stosowanych w roztworach o początkowym stężeniu gamma-dekalaktonu na poziomie 10g/dm^3 , rys. 12b – 5 g/dm^3 zaś rys. 12c – 1 g/dm^3 , [opracowanie własne]

4. Wnioski

Na podstawie prowadzonych doświadczeń sformułowano następujące spostrzeżenia i wnioski:

- gamma-dekalakton można skutecznie usuwać z roztworów wodnych bazując na zjawisku adsorpcji;
- spośród trzech badanych adsorbentów najskuteczniejszym przy adsorpcji laktonu (niezależnie od jego stężenia w roztworze 0,1-10 g/dm³) jest Amberlit XAD-4. Związane może być to z jego porowatą budową i dużą powierzchnią właściwą, a także lipofilowym charakterem laktonu i znacznie mniejszą polarnością Amberlitu względem pozostałych adsorbentów;
- najefektywniej adsorpcja przebiega w ciągu pierwszych 10 minut reakcji;
- wraz ze wzrostem stężenia laktonu w roztworze wodnym, początkowe tempo adsorpcji wzrasta, niezależnie od zastosowanego rodzaju adsorbenta;
- izoterma adsorpcji gamma-dekalaktonu na Amberlicie XAD-4 znacząco różni się od izoterm adsorpcji na dwóch pozostałych testowanych sorbentach. W przypadku Amberlitu izoterma osiąga widoczny poziom nasycenia, w przypadku pozostałych adsorbentów kształt izotermy jest sigmoidalny;
- Stosowane adsorbenty wykazują dobre zdolności desorpcyjne. Pięć cykli ekstrakcji, za pomocą mieszaniny alkoholu etylowego i eterów dietylowego i *tert*-butylo-wometylowego, pozwala na wydzielenie ok. 96,5% zaadsorbowanego na Amberlicie XAD-4 laktonu.

Uwagi

Badania prezentowane w niniejszym artykule są częścią doświadczeń przeprowadzonych w ramach pracy magisterskiej pt.: „Efektywność adsorpcji gamma-dekalaktonu na wybranych adsorbentach”.

Literatura

1. Aguedo M., Ly M.H., Belo I., Teixeira J.A., Belin J.M., Wache Y., *The Use of Enzymes and Microorganisms for the production of Aroma Compounds from Lipids*, Food Technology and Biotechnology, 42 (4), 2004, s. 327-336.
2. Waché Y., Husson F., Feron G., Belin J.M., *Yeast as an efficient biocatalyst for the production of lipid-derived flavours and fragrances*, Kluwer Academic Publishers, 89, 2006, s. 405-416.
3. Braga A., Belo I., *Biotechnological production of γ -decalactone, a peach like aroma, by *Yarrowia lipolytica**, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 32 (169), 2016.
4. Kula J., Sikora M., Sadowska H., Biuletyn Urzędu Patentowego, 21, 1997.
5. Kula J., Sikora M., Sadowska H., Piwowarski J., *Short Synthetic Route to the Enantiomerically Pure (R)-(+)- γ -Decalactone*, Tetrahedron, 52 (34), 1996, s. 11321-11324.
6. Dufossé L., Souchon I., Latrasse A., Piffaut-Juffard C., Voilley A., Delest P., Patent FR 2.705.971-A1, *Production de gamma-décalactone par bioconversion*, 1993.
7. Zucca J., Mane J., Patent PL/EP 1806978, *Stereoselektywne wytwarzanie gamma-laktonów*, 2005.
8. Labows J.N., Webster Guy Jr., McGinley K., Patent US 4396715A, *Production of gamma-lactone rich flavor additives by pityrosporum species cultured on lipid rich substrates*, 1980.
9. Farbood M.I., Willis B.J., Patent US 4560656A, *Production of γ -decalactone*, 1982.

10. Cheetham P.S.J., Maume K.A., De Rooij J.F.M., Patent US 5219742A, *Method of producing gamma-hydroxydecanoic acid or its lactone by feeding a ricinoleic acid source to Sp. odoros or Rh. glutinis*, 1990.
11. Fickers P., Benetti P.H., Waché Y., Marty A., Mauersberger S., Smit M.S., Nicaud J.M., *Hydrophobic substrate utilization by the yeast Yarrowia lipolytica, and its potential applications*, FEMS Yeast Research, 5 (6-7), 2005, s. 527-543.
12. Gomes N., Braga A., Teixeira J.A., Belo I., *Impact of lipase-mediated hydrolysis of castor oil on γ -decalactone production by Yarrowia lipolytica*, Journal of the American Oil Chemists' Society, 90, 2013, s. 1131-1137.
13. Wache Y., Laroche C., Bergmark K., Moller-Andersen C., Aguedo M., Dall M.T., Wang H., Nicaud J.M., Belini J.M., *Involvement of Acyl Coenzyme A Oxidase Isozymes in Biotransformation of Methyl Ricinoleate into γ -Decalactone by Yarrowia lipolytica*, Applied and Environmental Microbiology, 66 (3), 2000, s. 1233-1236.
14. Wache Y., Aguedo M., Nicaud J.-M., Belin J.-M., *Catabolism of hydroxyacids and biotechnological production of lactones by Yarrowia lipolytica*, Applied Microbiology and Biotechnology, 61, 2003, s. 393-404.
15. Aguedo M., Ly M.H., Belo I., Teixeira J.A., Belin J.M., Wache Y., *The Use of Enzymes and Microorganisms for the Production of Aroma Compounds from Lipids*, Food Technology and Biotechnology, 42 (4), 2004, s. 327-336.
16. Gophinath M., Vijayakumar L., Dhanasekar R, Viruthagiri T., *Microbial biosynthesis of γ -decalactone and its applications – A review*, Global Journal of Biotechnology and Biochemistry, 3 (2), 2008, s. 60-68.
17. Pereira de Andrade D., Carvalho B.F., Schwan R.F., Dias D.R., *Production of γ -decalactone by yeast strains under different conditions*, Food Technology and Biotechnology, 55 (2), 2017, s. 225-230.
18. Gomes N., Teixeira J.A., Belo I., *Fed-batch versus batch cultures of Yarrowia lipolytica for γ -decalactone production from methyl ricinoleate*, Biotechnology Letters, 34, 2012, s. 649-654.
19. Moradi H., Asadollahi M.A., Nahvi I., *Improved γ -decalactone production from castor oil by fed-batch cultivation of Yarrowia lipolytica*, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2, 2013, s. 64-68.
20. Souchon I., Spinnler H.E., Dufosse L., Voilley A., *Trapping of gamma-decalactone by adsorption on hydrophobic sorbents: application to the bioconversion of methyl ricinoleate by the yeast Sporidiobolus salmonicolor*, Biotechnology Techniques, 12 (2), 1998, s. 109-113.
21. Alchihab M., Aldic J.M., Aguedo M., Destain J., Wathelet J.P., Thonart P., *The use of Macronet resin to recover γ -decalactone produced by Rhodotorula aurantiaca from the culture broth*, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 37, 2010, s. 167-172.
22. Guan S., Rong S., Wang M., Cai B., Li Q., Zhang S., *Enhanced biotransformation productivity of gamma-decalactone from ricinoleic acid based on the expanded vermiculite delivery system*, Journal of Microbiology and Biotechnology, 29 (7), 2019, s. 1071-1077.
23. Sarbak Z., *Adsorpcja i adsorbenty. Teoria i zastosowanie*, Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań 2000.
24. Paderewski M.L., *Procesy adsorpcyjne w inżynierii chemicznej*, WNT, Warszawa 1999.
25. Souchon I., Rojas J.A., Voilley A., Grevillot G., *Separation science and technology trapping of aromatic compounds by adsorption on hydrophobic sorbents*, Separation Science and Technology, 31 (18), 1996, s. 2473-2491.
26. Souchon I., Spinnler H.E., Dufosse L., Voilley A., *Trapping of γ -decalactone by adsorption on hydrophobic sorbents: Application to the bioconversion of methyl ricinoleate by the yeast Sporidiobolus salmonicolor*, Biotechnology Techniques, 12 (2), 1998, s. 109-113.

Próby adsorpcji gamma-dekalaktonu z modelowych roztworów wodnych

Streszczenie

Adsorpcja to zjawisko, które polega na gromadzeniu się substancji rozpuszczonych w cieczy lub obecnych w fazie gazowej na powierzchni ciała stałego. Procesy adsorpcji mają ogromne znaczenie praktyczne. Stosuje się je głównie w procesach oczyszczania i rozdzielania mieszanin ciekłych i gazowych.

Celem badań była próba wykorzystania adsorpcji przy wydzielaniu gamma-dekalaktonu (cyklicznego estru o zapachu brzoskwiniowym) z roztworów wodnych. W badaniach zastosowano trzy różne adsorbenty: Amberlit XAD-4, Zeolit ZSM-5 oraz Vermikulit. Badania obejmowały analizę kinetyki adsorpcji gamma-dekalaktonu w układach modelowych na wyżej wspomnianych adsorbentach oraz określenie wpływu stężenia gamma-dekalaktonu w roztworze na efektywność procesu adsorpcji. Przeprowadzono także proces desorpcji gamma-dekalaktonu.

Porównując wydajność adsorpcji gamma-dekalaktonu z wodnych roztworów, na trzech badanych adsorbentach wykazano, iż najskuteczniejszym adsorbentem był Amberlit XAD-4. Wydajność adsorpcji z jego udziałem mieściła się w przedziale od ok. 52% do 80%. Największe ilości laktonu adsorbowały się w ciągu pierwszych 10 min reakcji. Im wyższe było stężenie laktonu w roztworze, tym odnotowywano większą szybkość początkową adsorpcji

Słowa kluczowe: gamma-dekalakton, adsorpcja, Amberlite XAD-4, desorpcja

Attempts to adsorption of gamma-decalactone from model water solutions

Abstract

Adsorption is a phenomenon where substances dissolved in a liquid or present in a gas phase accumulate on the surface of a solid. The adsorption processes are of great practical importance. They are mainly used in the purification and separation of liquid and gas mixtures.

The aim of research of this article was an attempt to use adsorption in the separation of gamma-decalactone (cyclic ester with a peach smell) from aqueous solutions. Three different adsorbents were used in the research: Amberlite XAD-4, Zeolite ZSM-5 and Vermiculite. The research included the analysis of the kinetics of gamma-decalactone adsorption in model systems, on the above-mentioned adsorbents, and determination of the effect of gamma-decalactone concentration in the solution on the effectiveness of the adsorption process. The gamma-decalactone desorption process was also carried out.

Comparing the adsorption efficiency of gamma-decalactone from aqueous solutions, has shown that from the three tested adsorbents Amberlite XAD-4 was the most effective adsorbent. The adsorption efficiency with its participation ranged from about 52% to 80%. The greatest amounts of lactone were adsorbed during the first 10 minutes of the reaction. The higher the concentration of lactone in the solution, the faster the initial adsorption rate was recorded.

Keywords: gamma-decalactone, adsorption, Amberlite XAD-4, desorption

Olej mikrobiologiczny jako alternatywny suplement wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w diecie człowieka – analiza rynku

1. Wprowadzenie

Ważnymi i często suplementowanymi składnikami żywności są niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe (NNKT, ang. *essential fatty acids*, EFA) pozyskiwane z materiału roślinnego lub zwierzęcego. Są kwasami egzogennymi, co oznacza, że ich synteza nie zachodzi w organizmie ludzkim lub odbywa się na niskim poziomie, dlatego też dla prawidłowego funkcjonowania powinno się przyjmować te kwasy wraz z pożywieniem [1]. Wielonienasycone kwasy tłuszczowe (ang. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA) nazywane również polienowymi (ang. *polyenoic fatty acids*, PEFA) można podzielić na kwasy omega-3 (ω -3) i omega-6 (ω -6). Podział zależy od położenia ostatniego podwójnego wiązania w łańcuchu węglowym kwasu, które może znajdować się przy trzecim lub szóstym atomie węgla licząc od końca łańcucha węglowodorowego [2]. Do kwasów omega-3 zalicza się m.in. kwas α -linolenowy (ALA), kwas eikozapentaenowy (EPA) i kwas dokozaheksaenowy (DHA) [1].

Alternatywnym źródłem tych związków, choć nadal rzadko wykorzystywanym, są mikroorganizmy olejogenne. Olej mikrobiologiczny (ang. SCO – *single cell oil*) syntetyzowany wewnątrzkomórkowo przez mikroorganizmy ma skład zbliżony do wysokiej jakości olejów roślinnych. Łatwość zwiększania skali produkcji, a także krótki cykl życiowy mikroorganizmów produkujących tłuszcz wewnątrzkomórkowy oraz niezależność ich wzrostu od warunków klimatu i pór roku może zadecydować o jego powszechnym wykorzystaniu w niedługim czasie. Ponadto skład oleju wytwarzanego metodami mikrobiologicznymi można różnorodnie modyfikować [3].

Obecnie większość dostępnych na rynku suplementów olejowych stale pozyskiwana jest ze źródeł zwierzęcych. Jednak rosnące zapotrzebowanie na suplementy odpowiednie dla osób z alergiami pokarmowymi bądź na diecie wegetariańskiej lub wegańskiej wpłynęło znacznie na rozwój rynku w kierunku alternatywnych źródeł wielonienasyconych kwasów tłuszczowych.

2. Olej mikrobiologiczny i jego biosynteza

Wszystkie znane mikroorganizmy są zdolne do syntezy tłuszczów, jednak tylko niektóre gatunki mikroalg, drożdży, grzybów strzępkowych oraz bakterii są zdolne do ich kumulacji powyżej 20% suchej biomasy. Te gatunki nazywane są olejogennymi,

¹ dominikadmowska99@gmail.com, Koło Naukowe Biotechnologów „KNBiotech”, Wydział Ogrodnictwa i Biotechnologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

² agata_fabiszewska@sggw.edu.pl, Katedra Chemii, Instytut Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

³ bartlomiej_zieniuk@sggw.edu.pl, Katedra Chemii, Instytut Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

a ich biomasa stanowi źródło SCO magazynowanego w ciałkach lipidowych [4]. Olej mikrobiologiczny wybranych gatunków drobnoustrojów jest bogaty w kwas dokozaheksaenowy (DHA) i eikozapentaenowy (EPA); oba kwasy tłuszczowe pełnią ważną funkcję w rozwoju układu nerwowego oraz narządu wzroku u noworodków oraz przyczyniają się do prawidłowej pracy układu krążenia [5].

Głównym źródłem SCO na rynku suplementów diety są mikroalgi z rodzaju *Schizochytrium*, w których procentowa zawartość oleju waha się od 20% do 60%. Ilość oleju mikrobiologicznego w suchej masie jest odmienna dla każdego gatunku. Bardzo wysoką zawartością tłuszczów w biomacie charakteryzują się drożdże, takie jak *Rhodotorula mucilaginosa* (69,5%) oraz *Yarrowia lipolytica* (59,9%) [6]. Ponadto, wśród gatunków olejogennych wyróżniamy grzyby strzępkowe, takie jak *Mortierella alpina*, *Aspergillus terreus* czy *Tolyposporidium* sp., inne drożdże z rodzajów *Candida*, *Cryptococcus*, *Lipomyces* oraz bakterie z rodzajów *Gordonia*, *Nocardia* czy *Acinetobacter* [7-9].

Biosynteza oleju mikrobiologicznego w komórkach drożdży olejogennych może przebiegać w dwóch różnych szlakach biochemicznych. W zależności od zastosowanych substratów dochodzi do syntezy „*de novo*” (synteza prekursorów kwasów tłuszczowych i ich włączenie w tzw. szlak Kennedy'ego, czyli szlak syntezy lipidów zapasowych) lub „*ex novo*” (pobieranie lipidów ze środowiska i ich kumulacja w ciałkach lipidowych). Na syntezę lipidów oprócz rodzaju i zawartości źródła węgla wpływają inne czynniki, takie jak: obecność mikro- i makroelementów oraz zawartość azotu w podłożu, stosunek ilościowy źródła węgla do azotu (C:N), temperatura, pH i stopień natlenienia hodowli [4, 10].

3. *Yarrowia lipolytica* – modelowy organizm drożdży olejogennych w badaniach metabolizmu lipidów

Synteza oleju mikrobiologicznego została najlepiej poznana dla *Y. lipolytica*. Jest to gatunek uznawany za modelowy organizm do badania metabolizmu lipidów w komórkach grzybów olejogennych [7]. Drożdże te charakteryzuje wysoka zdolność do gromadzenia lipidów, niepatogenność oraz dokładnie poznana fizjologia i genetyka. Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, FDA) nadała drożdżom *Y. lipolytica* status GRAS (ang. *Generally Recognized as Safe*). Oznacza to, że ten gatunek, jak i jego metabolity są bezpieczne i mogą być stosowane w żywności i farmaceutykach. Na mocy rozporządzenia wykonawczego Komisji (UE) 2019/760 z dnia 13 maja 2019 r. możliwym stało się wprowadzenie na rynek biomasy drożdży *Y. lipolytica* jako nowej żywności zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2015/2283 [11].

Wykorzystanie drożdży *Y. lipolytica* w przemyśle zapoczątkowała firma British Petroleum (BP). Powstała w 1957 roku firma opracowała metodę produkcji wysokiej jakości białka tzw. SCP (ang. *single cell protein*) z wykorzystaniem mikroorganizmów hodowanych w podłożach zawierających odpady w postaci *n*-parafin [12]. Od 2009 roku polska firma Skotan S.A. we współpracy z Uniwersytetem Przyrodniczym we Wrocławiu produkuje biomasę drożdży *Y. lipolytica* o wysokiej zawartości białka (od 41 do 45%) z wykorzystaniem odpadowego glicerolu po produkcji biodiesla jako głównego źródła węgla. Biomasa drożdży służy jako dodatek do pasz dla zwierząt gospodarskich, a ilość niezbędnych aminokwasów egzogennych w tym produkcie jest

wyższa niż podają regulacje FAO (ang. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) dla drożdży paszowych [13].

Pomimo wielu zalet drożdży olejogennych na rynku dostępne są tylko suplementy wykorzystujące olej pochodzący z komórek autotrofów olejogennych. W 2010 roku amerykański producent DuPont wypuścił produkt, który był suplementem diety bazującym na oleju mikrobiologicznym uzyskiwanym z wykorzystaniem drożdży *Y. lipolytica*. Produkt był dostępny tylko na rynku amerykańskim i reklamowano go jako pierwszy wegetariański suplement diety bogaty w kwasy omega-3 do kupienia w Stanach Zjednoczonych. Amerykańska firma DuPont produkowała olej mikrobiologiczny przy użyciu rekombinowanego szczepu drożdży *Y. lipolytica* do roku 2012 [14]. Prowadziła hodowlę z cukrem kukurydzianym jako głównym źródłem węgla w podłożu. Znaczną część kwasów tłuszczowych w oleju pozyskanym z komórek drożdży stanowił kwas eikozapentaenowy (EPA). Produkt sprzedawany był jako suplement diety w formie kapsułek pod nazwą handlową New Harvest. Jego zaletami oprócz wysokiej zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych był brak zawartości cholesterolu i metali ciężkich oraz brak nieprzyjemnego smaku i zapachu. Mógł być również spożywany przez wegetarian i wegan, gdyż kwasy tłuszczowe nie pochodziły z ryb, zaś sama kapsułka nie była wykonana z żelatyny [15].

4. Suplementy diety człowieka dostępne na rynku polskim wykorzystujące SCO

Obecnie wszystkie dostępne na rynku polskim wegańskie suplementy diety i produkty spożywcze bogate w kwasy DHA i EPA bazują na oleju mikrobiologicznym mikroalg *Schizochytrium* sp. (tab. 1). Wynika to prawdopodobnie z kilku czynników takich jak wysoka zawartość kwasów tłuszczowych oraz łatwa hodowla i namnażanie organizmów autotroficznych. Na polskim rynku obecna jest dla przykładu margaryna półtłusta Optima DHA (Bunge Polska), w której skład wchodzi kwas dokozaheksaenowy syntetyzowany przez mikroalgi *Schizochytrium* sp.

Przykładem preparatu przeznaczonego dla niemowląt zawierającego olej mikrobiologiczny z innych mikroorganizmów niż wspomniane algi jest mleko zastępcze Enfamil Premium (Mead Johnson Nutrition), w którego składzie można znaleźć kwas arachidonowy (ARA) pozyskiwany z hodowli *Mortierella alpina* oraz DHA otrzymany z alg *Cryptocodinium cohnii*.

Produkty z użyciem SCO znajdują wykorzystanie w suplementacji osób dorosłych, sportowców, jak i kobiet w ciąży, niemowląt oraz dzieci. Wahania zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych są znaczne, jednak wszystkie produkty w jednej dawce zawierają co najmniej 100 mg kwasu DHA. Ponadto wiele suplementów jest wzbogaćonych dodatkami, takimi jak oleje roślinne (głównie słonecznikowy), oliwa z oliwek witamina D₃ oraz ekstrakty roślinne.

Wahania cen rynkowych suplementów wykorzystujące SCO są znaczne. Cena za zbliżoną dawkę suplementów z kwasami tłuszczowymi może zaczynać się od 16 zł kończąc na ponad 100 zł. Suplementy w formie płynnej często zawierają więcej kwasów tłuszczowych w dawce, przez co też cena jest wyższa. Na cenę rynkową wpływają też dodatki bądź ich brak oraz przeznaczenie danego suplementu.

Tabela 1. Dostępne na rynku suplementy diety wykorzystujące SCO z alg z rodzaju *Schizochytrium*

Producent	Nazwa produktu	Dawka mg DHA/ 1 kapsułkę)	Dodatki
Elantis Farma S.R.L. (Rumunia)	Bobik DHA, dla niemowląt i dzieci	150	oliwa z oliwek, witamina D ₃
Oleofarm (Polska)	DHA-Vitum dla noworodków, niemowląt i dzieci	100	brak
Polski Lek (Polska)	Omegamed Pregna DHA z alg	150	olej słonecznikowy wysokooleinowy
Walmart (Czechy)	Marsjanki Futura Zdrowy Wzrost i Rozwój, tubki z żelem od 6 roku życia	150	zagęszczony przecier jabłkowy, aromat brzoskwinowy, kwas L-askorbinowy
Avetpharma (Polska)	Sport Activ DHA	100	olej sojowy, ekstrakt z guarany
Hepatica (Polska)	Olej z mikroalg Schizochytrium Pure Veg	200	wysokooleinowy olej słonecznikowy
Dr. Jacob's (Niemcy)	Dr. Jacob's, DHA-EPA olej z mikroalg	250	brak
Flora (USA)	Flora, DHA Vegetarian Algae	250	olej słonecznikowy
Norsan (Niemcy)	Omega-3 Vegan	(ok. 5 ml) 1160	oliwa z oliwek, olej słonecznikowy, ekstrakt z rozmarynu, witamina D ₃
Nordic Naturals (USA)	Nordic Naturals, Algae DHA	500	olej słonecznikowy
Swanson (USA)	Viridian Vegan Omega 3 EPA i DHA	(w 0,5 ml) 75	olej z nasion szałwii hiszpańskiej, aromat pomarańczowy

Źródło: Opracowanie własne

5. Inne produkty zawierające olej mikrobiologiczny

Oprócz suplementów diety olej mikrobiologiczny odnalazł zastosowanie w mleku modyfikowanym dla niemowląt jako źródło cennych kwasów tłuszczowych, koniecznych do rozwoju dziecka. W przypadku tego produktu, oprócz alg z rodzaju *Schizochytrium*, wykorzystuje się często również olej pozyskiwany z grzybów z rodzaju *Mortierella*.

SCO znalazło też praktyczne zastosowanie w żywieniu zwierząt towarzyszących i sportowych. Na rynku pasz zwierzęcych widnieje wiele pozycji zawierających olej mikrobiologiczny bądź nawet bazujące na nim. Najczęściej wykorzystywanym gatunkiem olejogennym jest *Y. lipolytica*, z której nie produkuje się obecnie suplementów diety człowieka.

Ceny suplementów diety zwierząt, zwłaszcza tych przeznaczonych dla koni, są stosunkowo wysokie. Wśród produktów z olejem mikrobiologicznym znajdują się

suplementy na poprawę kondycji sierści oraz skóry, na wzmocnienie ścięgien i stawów, a w przypadku psów i kotów są to również mieszanki na uspokojenie oraz poprawę pracy układu pokarmowego.

Tabela 2. Lista pozostałych produktów bazujących na oleju mikrobiologicznym

Producent	Produkt	Gatunek olejogenny	Przeznaczenie
Enfamil (USA)	Mleko początkowe modyfikowane w proszku	<i>Mortierella alpina</i> , <i>Schizochytrium</i> sp. <i>Crypthecodinium cohnii</i>	Niemowlęta
Yarrowia Equinox (Polska)	Olej z kwasów tłuszczowych dla koni z problemami skórnymi	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Konie
Yarrowia canifelix (Polska)	Suplementy wspierające trawienie, wygląd skóry oraz samopoczucie		Psy i koty
Yarrowia animal (Polska)	Suplementy wspierające ścięgna oraz skórę, elektrolity		Konie

Źródło: Opracowanie własne

Biomasa mikroorganizmów olejogennych może być stosowana jako preparaty paszowe dla zwierząt gospodarskich. W taki sposób wykorzystuje się biomasę drożdży *Apiotrichum curvatum* (syn. *Cryptococcus curvatus*). Po hodowli w podłożu zawierającym serwatkę i biomasę suszy się oraz wykorzystuje jako paszę o zróżnicowanej zawartości białka i tłuszczu [10].

Drożdże z tego samego gatunku tj. *Cryptococcus curvatus* są zdolne do syntezy i akumulacji lipidów o składzie kwasów tłuszczowych zbliżonym do masła kakaowego. Masło kakaowe wykorzystuje się w przemyśle spożywczym jako nieodłączny składnik czekolady [16]. Tłuszcz kakaowy to jeden z najdroższych tłuszczów, a metody mikrobiologicznej produkcji jego substytutów obecnie są również nierentowne. Obecnie do czekolad dodaje się m.in. olej palmowy, ale badania zmierzające do jego zastąpienia są stale prowadzone.

W Polsce dostępny jest również produkt o nazwie handlowej Apiyarr, preparat kawitowanych drożdży *Y. lipolytica* służący do sporządzania ciasta cukrowo-drożdżowego, stosowanego do podkarmiania pszczół w okresie braku dostępności pyłku kwiatowego [17].

6. Wady i zalety wykorzystania oleju mikrobiologicznego w diecie człowieka

Po dokładnym przeanalizowaniu rynku polskiego pod kątem suplementów diety bogatych w nienasycone kwasy tłuszczowe wnioskować można, że jest na nie bardzo duże zapotrzebowanie. Znaczną przewagą suplementów wykorzystujących olej mikrobiologiczny jest ich sposób otrzymywania. Wykorzystanie drobnoustrojów jako źródła kwasów omega-3 poszerza grono potencjalnych konsumentów o osoby na dietach eliminujących produkty odzwierzęce, jak i osoby z alergiami pokarmowymi. Obecnie, ilość spożywanego mięsa w samej Polsce w przeciągu roku stopniowo się zmniejsza,

jak donosi Główny Urząd Statystyczny [18]. Znaczna ilość nowych suplementów bazujących na SCO świadczy o zapotrzebowaniu na tego typu produkty, a ich bardzo ważną zaletą są duże możliwości sterowania składem kwasów tłuszczowych poprzez odpowiedni dobór szczepów, warunki hodowli oraz możliwości inżynierii genetycznej [19]. Ponadto produkcja suplementów na bazie oleju mikrobiologicznego pozostawia mniejszy ślad węglowy w stosunku do produkcji klasycznych suplementów bazujących na oleju rybnym.

Niewątpliwie wykorzystanie oleju mikrobiologicznego w diecie człowieka ma wiele zalet, ale posiada również wady związane z procesami produkcyjnymi. Produkcja suplementów diety opartych o olej mikrobiologiczny (SCO) wymaga wyższych nakładów finansowych w porównaniu z suplementami opartymi o źródła roślinne. Synteza lipidów wewnątrzkomórkowych wymaga dobrze wyposażonego laboratorium, sterylnych warunków pracy, a praca z mikroorganizmami często wiąże się mniejszą wydajnością procesu. Ponadto, negatywnym aspektem są zdecydowanie trudności związane z ekstrakcją oleju mikrobiologicznego oraz idąca za tym wyższa cena produktu.

7. Podsumowanie

Olej mikrobiologiczny znajdujący się w ciałkach lipidowych niektórych mikroorganizmów, nazywanych olejogennymi, coraz częściej znajduje zastosowanie w suplementach diety. SCO będący alternatywą dla klasycznego oleju rybnego staje się źródłem nienasyconych kwasów tłuszczowych dla szerokiej grupy konsumentów, na dietach ograniczających produkty odzwierzęce lub dla osób z alergiami pokarmowymi. Dzięki wysokiej zawartości kwasów DHA i EPA olej mikrobiologiczny znajduje zastosowanie w klasycznych suplementach diety, jak i w produktach dla kobiet w ciąży, noworodków czy zwierząt.

Obecnie na polskim rynku występują wyłącznie suplementy diety człowieka wykorzystujące olej mikrobiologiczny z alg z rodzaju *Schizochytrium*. Szeroki wybór tych produktów świadczy o wysokim zapotrzebowaniu konsumentów. Najczęstszymi dodatkami do suplementów są oleje roślinne (głównie słonecznikowy), oliwa z oliwek oraz witamina D₃. Dodatkowo SCO pozyskiwany z modelowego gatunku olejogennych drożdży, *Y. lipolytica*, znalazł zastosowanie w paszach zwierząt towarzyszących i sportowych.

Literatura

1. Kołodziejczyk A., *Naturalne związki organiczne*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2013.
2. Kaur N., Chugh V., Gupta A.K., *Essential fatty acids as functional components of foods – a review*, Journal of Food Science and Technology, 51(10), 2014, s. 2289-2303
3. Fabiszewska A., Pielnińska A., Mazurczak P., Zieniuk B., Wołoszynowska M., *Wpływ wybranych czynników na wydajność ekstrakcji i skład kwasów tłuszczowych oleju mikrobiologicznego otrzymywanego z komórek drożdży Yarrowia lipolytica*, ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość, 24,1(110), 2017, s. 59-69.
4. Beopoulos A., Cescut J., Haddouche R., Uribebarrea J.L., Molina-Jouve C., Nicaud J.M., *Yarrowia lipolytica as a model for bio-oil production*, Progress in Lipid Research 48, 2009, s. 375-387.
5. Swanson D., Block R., Mouse S.A., *Omega-3 fatty acids EPA and DHA: health benefits throughout life*, Advances in Nutrition, 3, 2012, s. 1-7.

6. Patel A., Karageorgou D., Rova E., Katapodis P., Rova U., Christakopoulos P., Matsakas L., *An overview of potential oleaginous microorganisms and their role in biodiesel and omega-3 fatty acid-based industries*, *Microorganisms*, 8(3), 2020, s. 434.
7. Thevenieau F., Nicaud J.M., *Microorganisms as sources of oils. Oilseeds and fats*, *Crops and Lipid*, 20, 2013, D603.
8. Mohan S.V., Rohit M.V., Chiranjeevi P., Chandra R., Navaneeth B., *Heterotrophic microalgae cultivation to synergize biodiesel production with waste remediation*, *Bioresource Technology*, 184, 2015, s. 169-178.
9. Li Q., Du W., Liu D., *Perspectives of microbial oils for biodiesel production*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80, 2008, s. 749-756.
10. Leman J. *Otrzymywanie lipidów*, [w:] Bednarski W., Fiedurek J., *Podstawy biotechnologii przemysłowej*, Wydawnictwo WNT, Warszawa, 2012, s. 405-410.
11. Rozporządzenie Wykonawcze Komisji (UE) 2019/760 z dnia 13 maja 2019 r. zezwalające na wprowadzenie na rynek biomasy drożdży *Yarrowia lipolytica* jako nowej żywności zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2015/2283 oraz zmieniające rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2017/2470.
12. Groenewald M., Boekhout T., Neueglise C., Gaillardin C., van Dijck P.W.M., Wyss M., *Yarrowia lipolytica: Safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential*, *Critical Reviews in Microbiology*, 40(3), 2014, s. 187-206.
13. Rywińska A., Juszczyk P., Wojtatowicz M., Robak M., Lazar Z., Tomaszewska L., Rymowicz W., *Glycerol as a promising substrate for Yarrowia lipolytica biotechnological applications*, *Biomass and Bioenergy*, 48, 2013, s. 148-166.
14. Damude H.G., Gillies P.J., Macool D.J., Picataggio S.K., Pollak D.W.M., Ragghianti J.J., Xue Z., Yadav N.S., Zhang H., Zhu Q.Q., *High eicosapentaenoic acid producing strains of Yarrowia lipolytica*, Du Pont. USA, Opis patentowy WO 2006052870 A2, Zgłosz. P. PCT/US2005/040255 z 3.11.2005. data publikacji: 18.5.2006.
15. <http://www.thismamacooks.net/2010/06/new-harvest-omega-3-epa-supplements-fish-oil.html> - New Harvest Omega-3 EPA supplements: all the goodness without the fish oil [dostęp: 08.12.2015].
16. Hassan M., Blanc P.J., Parcilleux A., Goma G., *Production of cocoa butter equivalents from prickly-pear juice fermentation by an unsaturated fatty acid auxotroph of Cryptococcus curvatus grown in batch culture*, *Process Biochemistry*, 30(7), 1995, s. 629-634.
17. Londzin W., Buczek K., Zoń M., *Zastosowanie drożdży Yarrowia lipolytica jako immunostymulującej paszy białkowej dla pszczół*, *Pasieka* 4, 2015.
18. Główny Urząd Statystyczny, Departament Rolnictwa, *Rolnictwo w 2019 r.*, 2019, s. 62-65.
19. Thevenieau F., Nicaud J.-M. *Microorganisms as sources of oils*, *Oilseeds and fats Crops and Lipids*, 20(6), 2013, D603.

Olej mikrobiologiczny jako alternatywny suplement wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w diecie człowieka – analiza rynku

Streszczenie

Olej mikrobiologiczny (SCO – ang. *single cell oil*) to zapasowy tłuszcz gromadzony w ciałkach lipidowych niektórych olejogennych mikroorganizmów, takich jak algi czy grzyby strzępkowe i drożdże, w ilości powyżej 20% suchej biomasy, mogący stanowić źródło wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Obecnie większość dostępnych na rynku suplementów wielonienasyconych kwasów tłuszczowych jest pozyskiwana ze źródeł zwierzęcych bądź roślinnych, jednak coraz częściej pojawiają się wegańskie alternatywy tłuszczów produkowanych na bazie olejów ekstrahowanych z mikroalg, głównie alg z rodzaju *Schizochytrium*. Olej mikrobiologiczny mikroalg jest bogaty w kwas dokozaheksaenowy (DHA) i eikozapentaenowy (EPA). Organizmy autotroficzne kumulują znaczne ilości oleju (aż do 50% plonu suchej masy), co czyni je wydajnym źródłem cennych składników odżywczych. Na rynku stale nie są dostępne suplementy wykorzystujące olej pochodzący z drożdży olejogennych, w tym tych z gatunku *Yarrowia*

lipolytica, pomimo ich wysokiej zdolności do gromadzenia lipidów, niepatogenności oraz dokładnie poznanej fizjologii i genetyki. Celem niniejszego przeglądu jest podsumowanie wiedzy na temat wykorzystania oleju mikrobiologicznego w praktyce przemysłowej oraz wskazanie wad i zalet tego metabolitu w kontekście zastosowania w technologii żywności i żywieniu człowieka. Ponadto, w pracy przedstawiona jest analiza rynku pod kątem rodzaju i charakterystyki suplementów diety i produktów spożywczych zawierających SCO.

Słowa kluczowe: olej mikrobiologiczny, mikroorganizmy olejogenne, wielonienasycone kwasy tłuszczowe, suplementy diety

Single cell oil as an alternative dietary supplement of polyunsaturated fatty acids-market analysis

Abstract

Single cell oil (SCO) is a storage lipid produced by oleaginous microorganisms, like algae, yeast, fungi and bacteria, which can accumulate lipids to more than 20% in their dry cell. Those lipids can be used as a source of polyunsaturated fatty acids. Currently, majority of the available dietary supplements are based on fish oil. However, vegan alternatives based on extracted algae oil (mostly from *Schizochytrium sp.*) are increasingly appearing on the market. SCO of algae species are rich in DHA and EPA acids. These autotroph organisms accumulate significant amounts of oil (up to 50% in their dry cell), which makes them an efficient source of valuable nutrients. Supplements based on SCO from yeast species, like *Yarrowia lipolytica* are constantly unavailable on market, in spite of their high capability to oil accumulation, non-pathogenicity and well-known physiology and genetics. The present research summarizes information about using SCO in industry and shows the pros and cons of using this metabolite in food technology and human nutrition. In addition, the paper presents an analysis of the market in terms of the type and characteristics of dietary supplements and food products containing SCO.

Keywords: single cell oil, oleaginous microorganisms, polyunsaturated fatty acids, dietary supplements

Wpływ sposobu zagospodarowywania użytków zielonych na retencję wody i wypłukiwanie składników mineralnych

1. Wstęp

Trwałe użytki zielone kształtują warunki klimatyczne, hydrologiczne oraz krajobrazowe danego obszaru. Spełniają funkcje ochronne, filtracyjne czy fitosanitarne. Są ważnym czynnikiem w zachowaniu bioróżnorodności flory i fauny [1-4].

Podobne znaczenie mają górskie użytki zielone. Ze względu na specyficzną rzeźbę górskiego terenu i występowanie gleb inicjalnych, zazwyczaj, w postaci cienkich warstw, okrywających kamieniste podłoże, użytki zielone w terenach górskich spełniają dodatkowe funkcje. Ich zadaniem jest zapewnienie ochrony gleby przed erozją, która powoduje zmniejszenie jej żyzności i zanieczyszczenie ekosystemów wodnych [5].

Górskie użytki zielone wpływają na ilościowo-jakościowe kształtowanie zasobów wodnych, poprzez ograniczenie spływów powierzchniowych wody opadowej oraz zwiększenie jej retencji w warstwie darniowej, jak również w całym profilu glebowym [6]. Z prowadzonych obserwacji i badań wynika, że trwałe łąki lepiej spełniają funkcję ochronną niż grunty uprawiane sezonowo [7].

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań lizymetrycznych prowadzonych na odpowiednio przygotowanych obiektach badawczych (tzw. poletka doświadczalne). Pomiary prowadzono w trzech powtórzeniach na czterech obiektach z pokrywą trawiastą oraz w dwóch bez roślinności (czarny ugor). Wykonane zostały pomiary wielkości i składu wody przeciekającej przez profil glebowy celem wykazania, jak sposób użytkowania gleby może zmieniać retencję wody oraz wpływać na wymywanie wybranych składników mineralnych. Badania prowadzono w terenach górskich województwa małopolskiego.

W ostatnich 20 latach zmieniły się charakter i ilość górskich użytków rolnych. Zmniejszył się obszar użytków pod zasiew, zwiększyła się liczba łąk trwałych, ubył pastwisk. Rośnie znaczenie trwałych użytków zielonych (TUZ) w kształtowaniu krajobrazu. Korzystną zmianą jest zmniejszanie się obszarów ugorowanych oraz wzrost ilości sadów [8, 9].

W porównaniu z innymi województwami, w Małopolsce występuje najniższy udział użytków rolnych, również tych przeznaczonych pod zasiew. Wysoki jest udział łąk i pastwisk trwałych, sadów, ogrodów przydomowych oraz lasów i gruntów leśnych [10, 11].

Taka struktura zagospodarowania użytków rolnych wynika z warunków przyrodniczych obszaru. Małopolska to głównie tereny wyżynne i górskie (ponad 1/3 województwa znajduje się powyżej 500 m n.p.m.) [12].

¹ bpolanowska@itp.edu.pl, Małopolski Ośrodek Badawczy w Krakowie, Instytut Technologiczno-Przyrodniczy w Fałentach.

² akowalczyk@itp.edu.pl, Małopolski Ośrodek Badawczy w Krakowie, Instytut Technologiczno-Przyrodniczy w Fałentach.

Charakterystyczną cechą terenów w województwie małopolskim jest pionowa rozpiętość obszaru, co warunkuje duże zróżnicowanie gleb. W północnej i centralnej części występują gleby bardzo dobre, tj. czarnoziemny i gleby brunatne oraz urodzajne mady, zaś w części południowej występują głównie gleby płytkie, łatwo ulegające erozji, o niskiej wartości rolniczej [13].

Ze względu na walory przyrodniczo-krajobrazowe, ponad połowa powierzchni województwa małopolskiego, należy do terenów chronionych. Obecnie prawie 67% powierzchni województwa małopolskiego objęte jest ochroną prawną. System obszarów i obiektów chronionych tworzą parki narodowe o łącznej powierzchni ok. 72 tys. ha (w tym ok. 35 tys. ha otulin parków narodowych) [13]. Około 29% obszaru małopolski stanowią lasy [12].

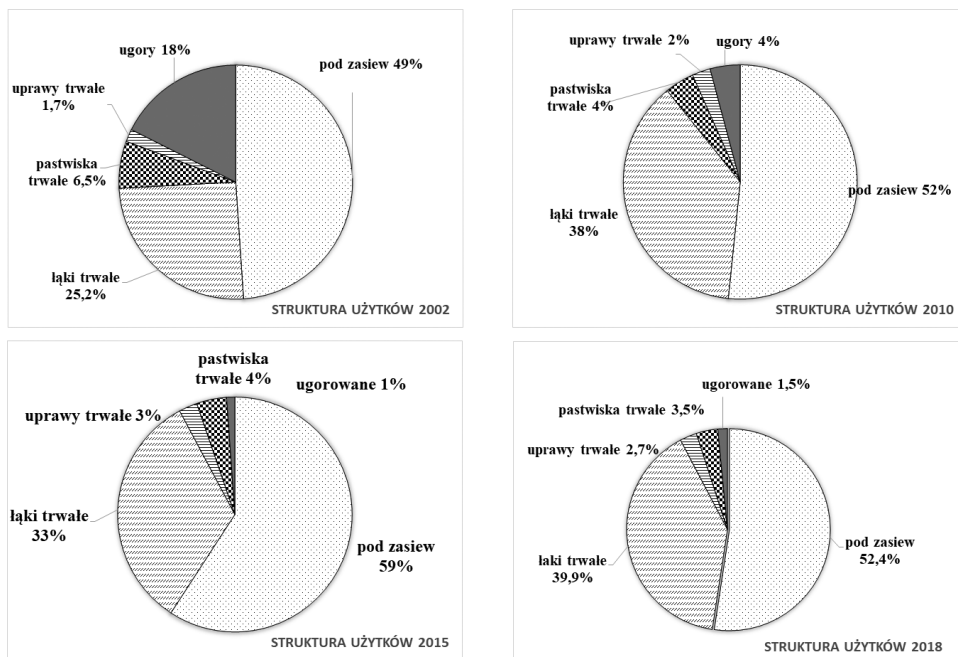
W tabeli 1 przedstawiono strukturę użytków rolnych w latach: 2002, 2010, 2015 i 2018 w województwie małopolskim. W tabeli zawarto dane o użytkach rolnych ogółem oraz utrzymywanych w dobrej kulturze rolnej, czyli takich, które są gospodarowane zgodnie z normami zawartymi w Rozporządzeniu Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 5 marca 2015 r. o płatnościach w ramach systemów wsparcia bezpośredniego (tekst jednolity Dz. U. 2015, poz.1551). Porównano powierzchnie zajmowane przez różne rodzaje użytków: grunty pod zasiew, łąki trwałe, pastwiska trwałe, uprawy trwałe (sady wraz z sadami przydomowymi bez powierzchni przeznaczonej na rekreację), tereny ugorowane (łącznie z powierzchnią upraw na przyoranie uprawianych jako plon główny) [14-16].

Występujące w tym rejonie obszary użytków rolnych zmniejszyły się od roku 2002 do 2018 z 783,6 tys. ha do 557,1 tys. ha [14-16]. Obserwuje się również zmniejszanie obszarów przeznaczonych pod zasiew. W roku 2002 obszar zajmowany przez grunty orne wynosił 521,1 tys. ha jednak faktycznie pod zasiew było przeznaczono tylko 383,4 tys. ha [16]. W latach 2015-2018 obserwuje się ponowny wzrost udziału sadów w użytkach rolnych z 13,4 tys. ha do 14,9 tys. ha. Zmniejszyła się ilość obszarów ugorowanych ze 137,9 tys. ha w roku 2002 do 8,5 tys. ha w roku 2018.

Tabela 1. Porównanie struktury użytków rolnych dla Małopolski w roku 2002, 2010, 2015 i 2018 [14-16]

rok		2002	2010	2015	2018
		Powierzchnia /tys. ha			
użytki rolne	ogółem	783,6	654,1	557,1	557,1
	w dobrej kulturze rolnej	b.d.	594,1	528,8	528,8
rodzaj użytkowania	pod zasiew	383,4	306,7	313	288,4
	łąki trwałe	197,7	223,4	174,5	219,4
	pastwiska trwałe	51	24,2	21,9	19
	uprawy trwałe	13,6	15	13,4	14,9
	ugory	137,9	24,7	6	8,5

Poniżej przedstawiono diagramy ilustrujące procentowe udziały użytków rolnych należących do gruntów utrzymywanych w dobrej kulturze rolnej (dla roku 2002 dane dotyczą użytków rolnych ogółem) (rys. 1). Z przedstawionych danych wynika, że od 2002 do 2018 r. zmniejszyła się liczba pastwisk, wzrosła ilość trwałych łąk, zmniejszyła się ilość obszarów ugorowanych.



Rysunek 1. Diagramy ilustrujące procentowy rozkład sposobu użytkowania użytków rolnych pozostających w dobrej kulturze rolnej [14-16]

2. Charakterystyka obszaru badawczego

Badania lizymetryczne prowadzono w Stacji Badawczej ITP w Jaworkach (600 m n.p.m.) położonych w gminie Szczawnicy, w powiecie nowotarskim, w woj. małopolskim. Jaworki to miejscowość w Małych Pieninach będących przedłużeniem w kierunku wschodnim Pienin Właściwych. Stacja badawcza położona jest w górnej części zlewni potoku Grajcarek (prawobrzeżny dopływ Dunajca), a jego ujście znajduje się w Szczawnicy.

Na obszarze Zlewni Grajcarek występuje kilka rodzajów gleb, między innymi: gleby brunatne, bielcowe, rędziny, czarne ziemie, gleby hydrogeniczne oraz inicjalne. Najczęstsze jest występowanie gleb brunatnych. Pod względem granulometrycznym są to głównie piaski gliniaste oraz gliny lekkie.

Na stoku, na którym zlokalizowana jest stacja, o nachyleniu 14-16°, występuje gleba brunatna właściwa, o granulacji odpowiadającej glinie średniej w wierzchniej warstwie i glinie lekkiej w warstwach głębszych. Pod względem jakościowo-użytkowym gleby górskie zaliczane są do IV, V oraz VI klasy bonitacyjnej. Są one zazwyczaj bardzo ubogie w fosfor.

Badania w Stacji Badawczej ITP prowadzone są nieprzerwanie od 1956 r. Wykonywane są pomiary meteorologiczne m.in. temperatury, opadów (deszczomierz Hellmana, pluwiograf), nasłonecznienia (heliograf).

Obszar badań chociaż mieści się w rejonie górskim charakteryzuje się dość umiarkowanym i łagodnym klimatem [6]. Charakteryzuje się wysokimi temperaturami powietrza, dużym nasłonecznieniem, korzystnie rozłożonymi opadami atmosferycznymi, a także długim okresem wegetacyjnym trwającym na ogół od końca marca do połowy października. Średnia temperatura w rejonie Jaworek, wyznaczona w okresie wielolecia 1956-2012, wynosi 6,2°C. Najwyższe temperatury notowane są w lipcu ze średnią temperatur 16,0°C. Najzimniejszym miesiącem jest styczeń ze średnią temperaturą -12,6°C. Średnia temperatura w półroczach zimowych (XI-IV) wynosi -0,1°C [6, 17].

Na podstawie pomiarów ilości opadów w Jaworkach, średnia roczna suma rejestrowanych opadów atmosferycznych w latach 2001-2010 wynosiła 1047,8 mm i była wyraźnie wyższa od średniej z wielolecia 1956-2006, która wynosiła 895,0 mm [6, 18].

Wartość średnich rocznych opadów wyznaczona dla wielolecia od 2011 do 2019 wynosiła 1003,2 mm. W okresie 2001-2019 najniższe opady roczne wynoszące 693,7 mm zarejestrowano w 2003 r., a najwyższe 1594,1 mm w 2010 r.

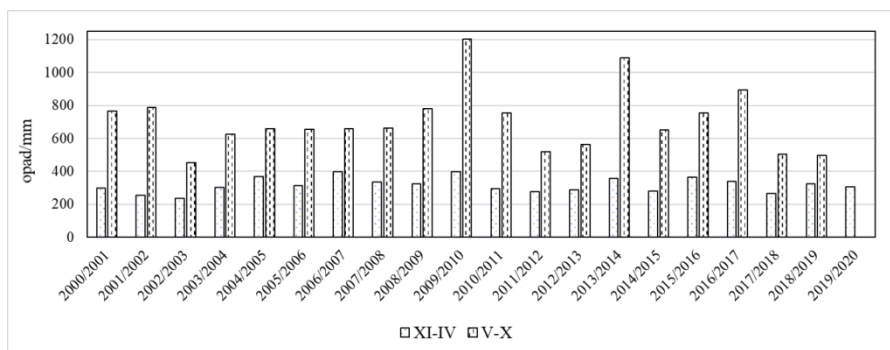
Wyznaczając średnie miesięczne opadów w latach 2001-2010 oraz 2011-2019 można zauważyć, że w okresie wegetacyjnym, najbardziej deszczowymi miesiącami jest czerwiec i lipiec, a najbardziej suchymi kwiecień i październik (tab. 2). Można również zauważyć, że nastąpiło zmniejszenie ilości opadów czerwcowych. W latach 2001-2010 średnia dla czerwca wynosiła 155,3 mm natomiast w latach 2011-2019 uległa obniżeniu do 101,5 mm.

Tabela 2. Średnie opady miesięczne w latach 2001-2010 oraz 2011-2019

miesiąc	Średnie opady miesięczne [mm]	
	2001-2010	2011-2019
I	52,0 ±32,5	57,5 ±32,4
II	45,5 ±23,8	43,6 ±21,8
III	62,2 ±26,2	41,9 ±14,2
IV	60,8 ±38,8	68,1 ±29,4
V	123,4 ±85,0	150,0 ±66,1
VI	155,3 ±58,6	101,5 ±50,1
VII	160,5 ±71,6	179,0 ±108,2
VIII	118,4 ±43,9	93,2 ±42,7
IX	103,0 ±63,3	88,7 ±69,4
X	64,8 ±43,9	79,6 ±51,1
XI	61,4 ±35,7	49,9 ±36,0
XII	48,4 ±25,0	50,1 ±21,5

Źródło: dane pomiarowe ITP MOB w Krakowie – 2001-2019

Przedstawiono sumy opadów zarejestrowane w miesiącach „letnich” V-X i „zimowych” X-IV w okresie od 2000-2020 roku (rys. 2). Na wykresie widoczne jest obniżenie opadów poniżej 600 mm w miesiącach letnich w latach: 2012, 2013, 2018 i 2019. Najniższe opady zanotowano w sezonie 2002/2003 (XI-IV: 234,9 mm; V-X: 451,5 mm) najwyższe w sezonie 2009/2010 (XI-IV: 399,7 mm; V-X: 1202,5 mm).



Rysunek 2. Zestawienie sum opadów w okresach „zimowych” X-IV oraz letnich V-X w wieloleciu 2000-2020 [dane pomiarowe ITP MOB Kraków – 2001-2020]

3. Pomiary lizymetryczne

Prace pomiarowe realizowano w Jaworkach na obiektach poletkowych, w identycznych warunkach siedliskowych i glebowych. W badaniach zastosowano lizymetry, które służą do badania ilości i chemicznego składu roztworu glebowego (odpływu wgłębnego, odcieku) przesiąkającego przez określony profil glebowy.

Lizymetry wykonane są z nierdzewnego metalu o wymiarach 1,0 x 1,0 x 1,0 m. Każdy lizymetr posiada dno wykonane w formie odwróconego ostrosłupa zakończonego otworem odpływowym. Dna lizymetrów wypełnione są żwirem, co zapewnia równomierny odciek nadmiaru wody penetrującej profil glebowy. Lizymetry wypełnione są warstwą gleby, do ich napełnienia zastosowano rodzimą glebę brunatną właściwą, z zachowaniem naturalnego układu profilu glebowego. W wierzchniej warstwie granulacja gleby odpowiada glinie średniej i w warstwach głębszych glinie lekkiej. W profilu pionowym pH gleby wynosiło od 5,9 do 6,5. Na powierzchniach lizymetrów przygotowywane są poletka doświadczalne uprawiane wg określonego schematu.

1 – uprawa reprezentująca porzucony (niewykorzystywany) użytek zielony – ruń niekoszona (3 powtórzenia);

2 – uprawa odpowiadająca ekstensywnemu użytkowaniu – łąka koszona jednorazowo (3 powtórzenia);

3 – uprawa zbliżona do tradycyjnego użytkowania runi, łąka koszona dwukrotnie (3 powtórzenia);

4 – uprawa odpowiadająca półintensywnie użytkowanej runi, łąka koszona trzykrotnie;

5 – poletko utrzymywane bez szaty roślinnej – „czarny ugor”.

W trakcie trwania eksperymentu, dwa razy w miesiącu, w odstępie 15 dni, zbierane są odcieki z poszczególnych poletek doświadczalnych do kanistrów umieszczonych pod każdym lizymetrem, w podpiwniczeniu pola doświadczalnego. Dla uzyskania wiarygodnych i miarodajnych wyników eksperyment powinien być prowadzony przynajmniej przez 3 lata.

Z każdego poletka określana jest ilość odcieku [mm] oraz jego skład chemiczny. W niniejszym artykule przedstawiono wyniki oznaczenia stężenia jonów amonowych, azotanowych, fosforanowych, siarczanowych, wapniowych. Wszystkie analizy wykonywane były metodą spektrofotometryczną.

W celu przeprowadzenia analizy wpływu sposobu gospodarowania użytkami na ilość i skład uzyskiwanego odcieku wykorzystano wyniki badań lizymetrycznych wykonanych na różnie zagospodarowanych poletkach doświadczalnych. W pracy wykorzystano wyniki badań prowadzonych w ITP MOB w Krakowie w latach 2001-2012, w roku 2019 oraz w kwietniu i maju 2020 r.

4. Wyniki badań

Na podstawie badań lizymetrycznych prowadzonych w latach 2001-2012 wykazano, że najmniejsze wartości odcieków wyznaczone jako średnie rocznych sumy odcieków, były zbierane z poletek użytkowanych jak ruń niekoszona oraz koszonych jednokrotnie. W przypadku runi niekoszonej średnia wartość z rocznych sum odcieków wynosiła 223,5 mm dla uprawy jednokośnej wynosiła 222,1 mm [6].

W przypadku poletka użytkowanego jak łąka koszona dwukrotnie średni odciek wynosił 271,1 mm, a w przypadku łąki koszonej trzykrotnie średni roczny odciek wynosił 289,5 mm. Największy odciek uzyskano w przypadku czarnego ugoru. Średnia wartość odcieku dla poletka ugorowanego wynosił 408,8 mm [6].

W tabeli 3 przedstawiono roczne sumy odcieków oraz roczną sumę opadów. Wielkość i intensywność opadu mają wpływ na wielkości odcieków z różnie użytkowanych poletek. W roku 2003 odnotowano najmniejszy opad w roku 2010 największy.

W roku 2010 odnotowano znacznie wyższe odcieki ze wszystkich rodzajów poletek. W obu przypadkach najmniejsze odcieki odnotowano dla runi niekoszonej i łąki koszonej jednokrotnie. Większe odcieki zmierzono w przypadku łąki koszonej trzykrotnie. W przypadku znacznego rocznego opadu (1584,1 mm) roczne sumy odcieków z różnie gospodarowanych użytków były zbliżone. W przypadku znacznych opadów, w roku 2010, odciek z gruntu ugorowanego był nawet mniejszy niż z łąk koszonych dwu i trzykrotnie.

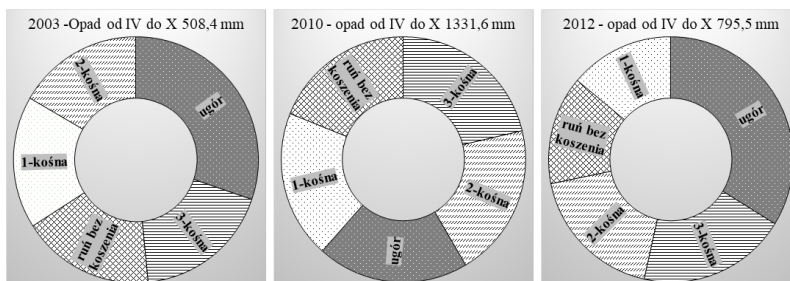
Tabela 3. Wyniki pomiarów lizymetrycznych. Roczne sumy odcieków z różnego typu użytków oraz wartości rocznych opadów

Rok badania	Roczna suma opadów /mm	Rodzaj uprawy	ruń niekoszona	łąka koszona jednokrotnie	łąka koszona dwukrotnie	łąka koszona trzykrotnie	czarny ugor
2001	1113,7	Roczna suma odpływów wglębnych (odcieków) /mm	242,2	236	300,2	369,7	533,2
2002	997,6		253,7	214,2	320,1	331,7	547
2003	693,7		175,2	173,5	166	181,8	301,3
2004	967,6		198,7	213	283,7	317,9	404,1
2005	1055,1		305,3	324,4	423,7	443,4	592,7
2006	980,2		203,6	196,4	251,2	267,4	397,3
2007	1058,4		145,5	142,2	168,5	167,6	339
2008	962,3		182,8	188,3	217,9	222	253,2
2009	1144,2		145,5	140,2	168,1	161,6	272
2010	1584,1		473	488,8	507,1	530,5	503
2011	960,4		200,8	197,9	247	264,8	394,8

2012	826,5		156,1	150,5	199,8	216,1	367,4
		Wartość średnia	223,5	222,1	271,1	289,5	408,8

Źródło: dane pomiarowe ITP MOB w Krakowie – 2001-2012

Na rysunku 3 przedstawiono diagramy ilustrujące ilości odcieków zebrane w latach 2003, 2010 w stosunku do roku 2012, w którym notowano przeciętną ilość opadów. Mimo różnych intensywności opadów, w każdym roku można stwierdzić, że odciek z obiektów bez koszenia i jednokośnych jest najmniejszy. Wysoki poziom opadów w roku 2010 przyczynił się do zwiększenia odcieków i wyrównania ich objętości ze wszystkich testowanych poletek bez względu na sposób ich użytkowania.



Rysunek 3. Diagramy rocznej sumy odcieków z różnego rodzaju użytków, przy różnej wartości sumy opadów w okresie od IV do X w danym roku (dane pomiarowe ITP MOB Kraków – 2001-2012)

W roku 2019 pobrano próbki odcieku od czerwca do października oraz w nowym sezonie wegetacyjnym – w kwietniu i w maju 2020 roku. Miesięczne wartości opadów i odcieków zestawiono w tabeli 4.

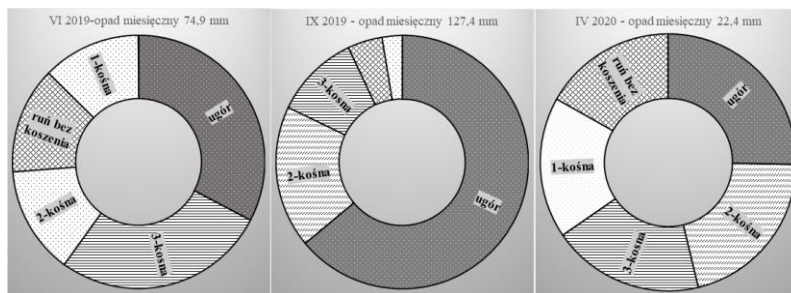
Wszystkie zastosowane w badaniu lizymetry były wypełnione tym samym rodzimym rodzajem gleby, dlatego zaobserwowane zmiany ilości odcieków wynikają przede wszystkim ze sposobu zagospodarowania użytku. Przy umiarkowanych opadach uzyskane wyniki odcieków potwierdzają, że najmniejsze wartości odcieku uzyskuje się z łąki jednokośnej oraz poletka przypominającego run niekoszoną. Wysokie lub niskie opady powodują zaburzenie typowych stosunków odcieków. W maju 2020 r. odnotowano bardzo intensywne gwałtowne opady, co znalazło odzwierciedlenie w zwiększeniu objętości odcieków z poletek przypominających łąkę jednokośną i run niekoszoną.

Tabela 4. Wyniki pomiarów lizymetrycznych. Miesięczne sumy odcieków z różnego typu użytków oraz wartości miesięcznych opadów

rok badania	2019					2020	
	VI	VII	VIII	IX	X	IV	V
opady miesięczne/ mm	74,9	78	199,1	127,4	90,8	22,4	128
rodzaj użytku	odpływ wgłębny (odciek) /mm						
run niekoszona	10,4	0,4	5,2	1,7	7,9	3,6	170
łąka koszona jednorazowo	9,6	0,3	2,3	1	11,4	3,8	185,5
łąka koszona dwukrotnie	10,5	0,3	3,2	7	29,1	4,5	85
łąka koszona trzykrotnie	20,9	1,3	19,9	4,2	23,7	4,1	106,3
czarny ugór	24,8	4,4	6,8	24,6	56,9	5,4	1441,9

Źródło: dane pomiarowe ITP MOB w Krakowie – VI-X 2009 oraz IV-V 2020

Diagramy odcieków miesięcznych zmierzonych w czerwcu i wrześniu 2019 r. oraz w kwietniu 2020 r., przy różnych miesięcznych wielkościach opadów, przedstawiono na rysunku 4.



Rysunek.4. Diagramy miesięcznych odcieków z różnie użytkowanych gruntów, przy różnej wielkości opadów (dane pomiarowe ITP MOB w Krakowie – VI-X-2019 i IV-2020)

W tabeli 5 przedstawiono wyniki analizy wybranych jonów w odciekach pobranych z różnie użytkowanych użytków gruntów. Wyniki opracowano na podstawie badań lizymetrycznych przeprowadzonych w latach 2001-2012 oraz w kwietniu i maju roku 2020. Wpływ sposobu użytkowania gruntu na zmianę składu odcieku jest szczególnie widoczny w przypadku związków azotowych i fosforanowych.

Tabela 5. Wartości średnich, maksymalnych i minimalnych stężeń wybranych jonów (mg/dm^3) w odciekach lizymetrycznych dla gruntów o różnym sposobie użytkowania

oznaczany jon	Wartość stężenia mg/dm^3	ruń nie-koszona	łąka 1-kośna	łąka 2-kośna	łąka 3-kośna	czarny ugor
		Rodzaj użytku				
NH_4^+	średnia	0,12	0,07	0,07	0,06	0,08
	max	0,17	0,12	0,14	0,10	0,25
	min	0,04	0,02	0,02	0,01	0,03
NO_3^-	średnia	0,81	1,16	0,71	1,01	6,57
	max	2,87	4,70	2,75	5,00	11,33
	min	0,08	0,10	0,10	0,17	1,42
PO_4^{3-}	średnia	0,14	0,16	0,28	0,10	0,09
	max	0,19	0,31	0,38	0,11	0,14
	min	0,05	0,08	0,13	0,04	0,01
SO_4^{2-}	średnia	7,04	5,59	4,92	4,74	9,34
	max	17,31	11,80	8,73	9,03	17,10
	min	2,48	1,54	1,14	1,52	6,13
Ca^{2+}	średnia	30,17	34,64	31,72	30,44	43,10
	max	51,02	56,42	48,81	56,94	60,50
	min	18,84	19,14	20,04	19,54	28,65

Źródło: dane pomiarowe ITP MOB w Krakowie – 2001-2012 oraz IV i V 2020

5. Dyskusja wyników i wnioski

Wpływ sposobu użytkowania gruntu na zmianę składu odcieku jest szczególnie widoczny w przypadku związków azotowych i fosforanowych. Najwyższe średnie stężenie jonu amonowego, wynoszące $0,12 \text{ mg/dm}^3$,

oznaczono w odciekach z runi niekoszonej. Obecność niekoszonej runi na poletku doświadczalnym jest źródłem nagromadzenia materii organicznej, która podczas mineralizacji może powodować zwiększenie stężenia jonu amonowego. Oznaczone w poszczególnych odciekach stężenia jonu amonowego nie są niebezpieczne dla jakości wód podziemnych [19].

Oznaczenia jonu azotanowego w odciekach wykazały, że najwyższe stężenia w zakresie od $1,42$ do $6,57 \text{ mg/dm}^3$ są notowane dla odcieków z poletek ugorowanych. Taki efekt jest prawdopodobnie spowodowany brakiem roślinności, która mogłaby pobrać azotany. Azotany mogą być również zatrzymywane przez kompleks sorpcyjny gleb [6, 20]. Użytki ugorowane mogą być zatem źródłem zanieczyszczenia wód podziemnych azotanami.

Najwyższe stężenia fosforanów oznaczono w przypadku odcieków z poletek imitujących łąkę koszoną dwukrotnie (średnia wartość; $0,28 \text{ mg/dm}^3$). Najmniejsze wartości stężenia fosforanów oznaczano dla poletek ugorowanych oraz koszonych trzykrotnie. W przypadku użytków koszonych trzykrotnie fosforany są pobierane i wykorzystane przez rośliny. Główną przyczyną niewielkiego stężenia fosforanów w odciekach z ugoru i łąki trzykrotnie koszonej jest duży odpływ wglębny charakterystyczny dla tych użytków, który powoduje rozcieńczenie fosforanów [6, 21].

Wyznaczone maksymalne i średnie stężenia fosforanów mogą być niebezpieczne dla wód podziemnych [19].

Na podstawie analiz można stwierdzić, że najmniejsze stężenia fosforanów były typowe dla obiektów charakteryzujących się dużym odpływem wglębnym, zaś największe stężenia wyznaczano w przypadku małych odcieków. Największe stężenia fosforanów $0,19 \text{ mg/dm}^3$ i $0,31 \text{ mg/dm}^3$ oznaczono odpowiednio w przypadku runi niekoszonej dla łąki jednoskośnej, a więc dla użytków z małym odciekiem wglębnym i dodatkowo w przypadku małej ilości opadów.

Również w przypadku siarczanów można zaobserwować związek pomiędzy ich stężeniem a sposobem użytkowania ziemi. Na podstawie otrzymanych wyników można zauważyć, że w odciekach, w przypadku użytków łąkowych koszonych dwukrotnie i trzykrotnie, występowały niższe stężenia siarczanów (średnio $4,92$ i $4,74 \text{ mg/dm}^3$) w porównaniu z odciekami z runi niekoszonej (średnia wartość $7,04 \text{ mg/dm}^3$). Wynik ten można wytłumaczyć faktem, że na użytkach koszonych siarczany są pobierane przez rośliny i wynoszeniem ze zbiorami, ograniczając tym samym ich wymywanie do wód gruntowych. W przypadku łąk dwu- i trzykośnych dodatkowym czynnikiem zmniejszającym stężenie siarczanów może być większy odpływ wglębny i rozcieńczenie jonów siarczanowych. Wyższe stężenie siarczanów na poletkach niekoszonych mogą być wynikiem wtórnego wniesienia jonów siarczanowych z obumierającą, nieusuwaną biomasą. Najwyższe stężenia siarczanów, średnio $9,34 \text{ mg/dm}^3$, oznaczano dla użytków ugorowanych. Wartości te nie stanowią jednak zagrożenia dla wód gruntowych [19].

Średnie stężenie jonów wapniowych w odciekach z użytków ugorowanych było najwyższe i wynosiło $43,1 \text{ mg/dm}^3$. Oznaczone wielkości stężeń z poszczególnych

odcieków również ugorowanych nie stanowią zagrożenia dla zanieczyszczeń wód podziemnych wapniem [19].

Analiza ilościowa i jakościowa odcieków uzyskanych z pomiarów lizymetrycznych przeprowadzonych na 5 rodzajach różnie użytkowanych poletek doświadczalnych wykazały pewne prawidłowości.

- Częstsze koszenie runi sprzyja migracji wód opadowych w głąb profilu glebowego. Wartości odpływów wgłębnych wyznaczono jako średnie z rocznych sum odcieków. Większe wartości odcieków wynoszące średnio 270 mm, wykazano w przypadku łąki koszonej dwukrotnie. W przypadku łąki koszonej trzykrotnie średni odciek wynosił 280 mm. Dla runi niekoszonej i łąki jednokośnej odnotowano średnio mniejsze odcieki (ok. 220 mm);
- Największe odcieki z lizymetrów uzyskano w przypadku poletek imitujących łąki ugorowanej. Wielkość tych odcieków wynosiła średnio 400 mm, a podczas intensywnych opadów, notowano nawet wyższe wartości (ponad 600 mm);
- Przeanalizowano wyniki odcieków dla wybranych lat lub miesięcy z najniższą i najwyższą ilością opadów. Z przeprowadzonej analizy wynika, że dla skrajnie niskich lub wysokich opadów, wielkości odcieków dla poszczególnych poletek są zmienne. Wartości odcieków z poszczególnych poletek doświadczalnych wyrównują się. Zwiększają się odcieki dla łąki jednokośnej i dla łąki niekoszonej. Uzyskane wyniki wykazały, że w przypadku obfitych i gwałtownych opadów żaden rodzaj użytku nie jest w stanie zapewnić zatrzymania wody;
- Analiza chemiczna składu odcieków wykazała, że obszary ugorowane sprzyjają wypłukiwaniu jonów azotanowych, siarczanowych i wapniowych. Tym samym stwarzają potencjalne zagrożenie zwiększenia stężenia tych jonów w wodach gruntowych;
- Znaczne ilości jonu amonowego oraz siarczanów oznaczono w odciekach uzyskanych z runi niekoszonej. Taki wynik jest prawdopodobnie spowodowany wtórnym wnoszeniem tych jonów podczas mineralizacji biomasy powstającej przez brak usuwania roślinności z niekoszonej runi. Fosforany są niebezpiecznym dla środowiska czynnikiem eutrofizującym. Najniższe stężenia fosforanów występowały w odciekach z gleb ugorowanych i koszonych trzykrotnie. Większe stężenia wykazano dla użytków koszonych jedno- i dwukrotnie, a także z poletka z runią niekoszoną. Wypłukiwanie jonów fosforanowych z odciekami stanowi zagrożenie dla wód gruntowych.

Przeprowadzona analiza stężeń i ilości odcieków potwierdza jak ważne jest rozważne kształtowanie użytków rolnych. Przedstawione wyniki wskazują na ważną rolę łąk oraz runi niekoszonej. Znaczenie środowiskowe użytków zielonych w górach polega na korzystnym kształtowaniu ilościowo-jakościowych zasobów wodnych, ograniczaniu spływu powierzchniowego na rzecz podpowierzchniowych, co powoduje zwiększenie retencji w warstwie darniowej, a następnie w całym profilu glebowym. Runi trawiasta posiada ponadto duże znaczenie ochronne w odniesieniu do cech jakościowych wód powierzchniowych i podziemnych. Dlatego utrzymanie TUZ jest to niezwykle istotne w obszarze Karpat, gdzie występują obfite opady deszczu (tzw. obszary wodorodne).

W przypadku niskich opadów atmosferycznych wpływ sposobu użytkowania runi nie wpływał znacząco na wielkość odpływu wgłębego, dlatego ilości odcieków dla

poszczególnych obiektów były porównywalne. Podczas opadów umiarkowanych najmniejsze odcieki notowano dla runi koszonej jednokrotnie i niekoszonej. Największe ilości odcieków zmierzono dla czarnego ugoru (rys. 4).

Obecność zadarnienia odgrywa ważną rolę w zapobieganiu wymywania składników mineralnych z gleby, takich jak: NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} , Ca^{2+} . Ilości wynoszone z odciekami z użytków pozbawionych roślinności są wielokrotnie wyższe.

Z przeprowadzonych badań wynika, że najkorzystniejszym sposobem użytkowania terenów w obszarach górskich jest użytkowanie łąkowe. Zaprezentowane wyniki potwierdzają również, że obecność obszarów ugorowanych jest niekorzystna dla środowiska, z powodu zwiększonego wypłukiwaniu z gleby cennych składników mineralnych.

Literatura

1. Burczyk P., Gamrat R., Gałczyńska M., Saran E., *Rola trwałych użytków zielonych w zapewnieniu stanu równowagi ekologicznej środowiska przyrodniczego*, Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie, (VII-IX), 63 (t. 18. z. 3), 2018, s. 21-37, ISSN 1642-8145.
2. Grzegorzczak S., *Użytkowanie ekosystemów trawiastych a kształtowanie środowiska*, Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych 586, 2016, s. 19-32.
3. Laidlaw A.S., Šebek L.B.J., *Grassland for sustainable animal production*, Grassland Science in Europe, 17, 2012, s. 47-58.
4. Wróbel B., Terlikowski J., Wesołowski P., Barszczewski J., *Racjonalne użytkowanie łąk niżowych*, Wydaw. ITP., Materiały Informacyjne, 40, 2015, 24, ISSN 08060-1410.
5. Burzyńska I., *Zróżnicowane użytkowanie łąki a jakość wód gruntowych*, Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie, 47 (T. 14. Z. 3), 2014, s. 5-18.
6. Twardy S., Kopacz M., *Funkcje trwałych użytków zielonych w obszarach górskich*, Wyd. ITP, Falenty-Kraków 2015.
7. Lipski C., Kostuch R., *Charakterystyka procesów erozyjnych gleb na przykładzie zlewni wybranych rzek w Karpatach*, Infrastruktura i Ekologia Terenów Wiejskich, 3, 2005, s. 95-105.
8. Dzun W., *Zmiany skali wykorzystania zasobów gruntów rolnych w Polsce w procesie przemian systemowych i integracji z unią europejską*, Zagadnienia Ekonomiki Rolnej 1, 2012, s. 8-39.
9. Koreleski K., *Ochrona i kształtowanie terenów rolniczych w systemie kreowania krajobrazu wiejskiego*, Infrastruktura i Ekologia Terenów Wiejskich 4, 2009, s. 5-20.
10. Pałuch Ł., *Studium uwarunkowań rozwoju rolnictwa i organizacji produkcji rolniczej w Regionie Małopolski*, Polityki Europejskie Finanse i Marketing, 12 (61), 2014, s. 165-177.
11. Urząd Statystyczny w Krakowie 2016. Rolnictwo w województwie małopolskim w 2016, Informacje i opracowania statystyczne, Kraków 2017, s.11-12.
12. Wojewódzki inspektorat Ochrony Środowiska w Krakowie Raport o stanie środowiska w województwie małopolskim 2013-2015, Charakterystyka województwa, Kraków 2013.
13. Urząd Marszałkowski Województwa Małopolskiego, Raport „Województwo małopolskie 2001”, Kraków 2002.
14. Urząd Statystyczny w Krakowie 2019, Rolnictwo w województwie małopolskim w 2018, Kraków 2019.
15. GUS 2002, 2002 Raport z wyników spisów powszechnych, Urząd statystyczny w Krakowie 2003.
16. Urząd Statystyczny w Krakowie 2011, Raport z wyników województwa małopolskiego, ISBN 978-83-7403-217-9.
17. Jaguś A., Twardy S., *Wpływ zróżnicowanego użytkowania łąki górskiej na plonowanie runi i cechy jakościowe odpywających wód*, Wyd. ITP, Falenty-Kraków 2006.

18. Twardy S., Kopacz M., *Dynamika relacji opad-odpływ w potokach Biała Woda i Czarna Woda w roku hydrologicznym 2010*, Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie, 39 (t. 12 z. 3), (2012), 197-210, ISSN 1642-8145.
19. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 11 lutego 2004 r. w sprawie klasyfikacji dla prezentowania stanu wód powierzchniowych i podziemnych, sposobu prowadzenia monitoringu oraz sposobu interpretacji wyników i prezentacji stanu tych wód. Dziennik Ustaw nr 32, poz. 284.
20. Lityński T., Jurkowska H., 1982. *Żyzność gleby i odżywianie się roślin*, PWN, Warszawa, s. 643.
21. Misztal A., *Produkcyjne wykorzystanie wody oraz odpływ wgłębny w zależności od sposobu użytkowania gleby w warunkach górskich*, Instytut Melioracji i Użytków Zielonych – Małopolski Ośrodek Badawczy, Falenty – Kraków 2001, s. 86.

Wpływ sposobu zagospodarowywania użytków zielonych na retencję wody i wypłukiwanie składników mineralnych

Streszczenie

W celu zilustrowania zależności pomiędzy sposobem wykorzystania użytków rolnych a retencją wody i składników mineralnych w glebie, przedstawiono wyniki pomiarów lizymetrycznych. Badania przeprowadzono w Stacji Badawczej ITP w Jaworkach (gmina Szczawnica, powiat nowotarski, woj. małopolskie) W pracy przedstawiono wyniki z lat 2001-2012 oraz 2019/2020.

Pomiary lizymetryczne przeprowadzono na jednometrowych, różnie użytkowanych profilach glebowych (ruń niekoszona, łąki koszone jedno-, dwu- i trzykrotnie w ciągu okresu wegetacyjnego oraz czarny ugor). Badano również skład chemiczny odcieków oraz wyznaczono miesięczne ilości opadów. Badania prowadzono w okresach wegetacyjnych od kwietnia do października.

Porównano miesięczne wartości opadów z miesięcznymi ilościami odpływów wgłębnych pobieranych z różnie użytkowanych profili glebowych. Przedstawiono zmiany składu chemicznego odcieków w zależności od sposobu zagospodarowania użytku rolnego.

Największe wartości odcieków, blisko dwukrotnie wyższe w porównaniu z łąką niekoszoną i koszoną jednokrotnie, otrzymano z czarnego ugoru. Analiza chemiczna składu odcieków wykazała, że obszary ugorowane sprzyjają wypłukiwaniu jonów azotanowych, siarczanowych i wapniowych.

Prezentowane wyniki badań potwierdzają wpływ sposobu uprawy użytków rolnych na ilość i jakość zatrzymywanej wody. Wzrost obszarów niewykorzystanych rolniczo sprzyja stratom wody i wymywaniu składników mineralnych z gleby.

Słowa kluczowe: użytkowanie gruntów rolnych, pomiary lizymetryczne, retencja wody i składników mineralnych

Impact of farmland use way on water retention and eluting of mineral components

Abstract

In order to illustrate the relationship between the way of farmland use and water and mineral components retention in soil, the results of lysimeter measurements were presented. The research was carried out at the Institute of Technology and Life Science at Research Station located in Jaworki (Szczawnica commune, Nowy Targ county, Lesser Poland voivodeship). In this work the results of researches carried out in years 2001-2012 and 2019/2020 were presented.

Lysimeter measurements were carried out on one-meter, differently used soil profiles (not mown sward, meadow mown once, meadow mown twice, meadow mown three times, black fallow). The chemical composition of the leachates was analysed and the monthly rainfall was determined. The researches were carried out during vegetative periods from April to October. The average monthly values of rainfall with average values of runoff depth of soil profiles of individual objects were compared. The changes in the chemical composition of leachate depending on the manner of grassland farming use were presented.

The highest leachate values, nearly twice as high compared to not mown sward and meadow mown once, were obtained from black fallow. Chemical analysis of the leachate composition has shown that fallow areas allows the eluting of nitrate, sulphate and calcium ions.

The presented results confirmed the influence of the means of farmland use method on the quantity and quality of water retained. It was confirmed the increase in fallow lands leads to water loss and minerals leaching from the soil.

Keywords: farmland use, lysimeter measurements, water and mineral components retention

Ocena przyrodnicza krajobrazu dla potrzeb zachowania bioróżnorodności miasta Tarnowa

1. Wstęp

Działalność antropogeniczna ma szerokie spektrum negatywnego oddziaływania na walory przyrodnicze a tym samym na zachowanie bioróżnorodności. Do priorytetowych działań na świecie należy zachowanie różnorodności biologicznej i usług ekosystemowych, które wpływają na jakość życia człowieka. Termin różnorodność biologiczna został użyty po raz w 1980 przez amerykańskiego biologa w celu ochrony zasobów żywych [1]. Oznacza on zmienność wewnątrzgatunkową populacji, międzygatunkową i ponadgatunkową [2]. Wielu badaczy m.in. [3] podkreśla, że degradacja np. ekosystemów w wielu przypadkach może być nieodwracalnym procesem, lub bardzo drogim w aspekcie ekonomicznym. Problem kryzysu środowiska został już wyeksponowany w Raplocie Sekretarza Generalnego ONZ U'Thanta pt. „Człowiek i jego środowisko” (1969). Zachowanie istniejących wartości przyrodniczych i właściwe gospodarowanie/zarządzanie usługami ekosystemowymi ma na celu zachowanie bioróżnorodności danego obszaru. Zauważono, iż pozytywne zmiany w środowisku różnych krajów odbywają się bardzo wolno, a to stanowi kolejne zagrożenie środowiskowe. Właściwe zarządzanie zasobami naturalnymi daje realną szansę na zachowanie różnorodności biologicznej i polepszenie warunków przyrodniczych i zdrowotnych w miastach.

Miasta są obszarami, w których działalność człowieka ma duży wpływ na wartości przyrodnicze, zarówno w znaczeniu pozytywnym, jak i negatywnym. Ważne jest kształtowanie struktury ekologicznej miast, tak aby mieszkańcy mogli korzystać z wartości przyrodniczych, a jednocześnie żeby były zachowane wysokie wartości przyrodnicze, które mają wpływ na bioróżnorodności [4]. Ważnym dokumentem podkreślającym znaczenie zrównoważonego rozwoju jest podpisana przez Polskę Konwencja w Rio de Janeiro w 1992 r. Baranowski [5] definiuje go jako szacunek dla zasobów przyrody, poszukiwanie harmonii pomiędzy celami społecznymi, ekonomicznymi i ekologicznymi lub jako jakość warunków życia ludzi oraz jakość powierzchni biologicznie czynnej, co ma wpływ na wartości mikroklimatyczne miasta [6]. Istotnym działaniem związanym z zachowaniem bioróżnorodności jest ochrona przyrody. Na terenie miast znajdują się obszary o wysokiej randze ochrony przyrody, tj. rezerwaty przyrody czy obszary Natura 2000. Zachowanie wysokich walorów przyrodniczych tych obszarów na terenie miast jest trudne, ze względu na znaczny wpływ [4]. Na obszarach miejskich można zaobserwować także fragmenty naturalnych i półnaturalnych ekosystemów przyrodniczych, które mogą być komponentem parków miejskich czy ogrodów. Bioróżnorodność należy rozpatrywać nie tylko na poziomie gatunków, ale na poziomie ekosystemów i krajobrazów [7].

¹ beata_fornal_pieniak@sggw.edu.pl Instytut Nauk Ogrodniczych, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, www.sggw.pl.

Krajobraz miejski składa się z elementów abiotycznych i biotycznych. Tereny zieleni oraz inne formy zagospodarowania przestrzennego są jednymi z najważniejszych komponentów ekologicznej struktury miejskiej, które mają wpływ na zachowanie bioróżnorodności terenów miejskich. Ostojami przyrodniczymi dla gatunków mogą być: parki miejskie i historyczne, lasy miejskie, ogródki działkowe, ogrody przydomowe i fragmenty łąk. Tereny zieleni pełnią wiele funkcji biologicznych, rekreacyjnych, ekologicznych, dlatego są bardzo ważne w zurbanizowanych obszarach [8, 9]. Kształtowanie struktury ekologicznej miasta jest bardzo ważne w celu zachowania i projektowania powiązań ekologicznych, które będą sprzyjały przemieszczeniu się roślinom i zwierzęt, co ma wpływ na zachowanie bioróżnorodności. Waloryzacja przyrodnicza jest metodycznym podejściem do wskazania obszarów o zróżnicowanych wartościach przyrodniczych. Właściwe zarządzaniem systemami terenów zieleni daje realną szansę na utrzymanie stosunkowo dużej różnorodności biologicznej w miastach [10, 11].

Celem opracowania było określenie walorów wybranych elementów środowiska przyrodniczego i terenów zieleni miasta Tarnowa w aspekcie kształtowania bioróżnorodności tego obszaru.

2. Charakterystyka terenu badań

Tarnów to miasto o powierzchni 72,38 km² położone w południowej części Polski, w województwie małopolskim. Wybrano je do badań, ponieważ reprezentuje średnie miasto w Polsce z populacją około 100 000 mieszkańców. Przez miasto przepływają dwie rzeki: Biała i Wątok [12].

Roślinność potencjalna miasta Tarnowa jest reprezentowana przez lasy grądowe (*Tilio-Carpinetum*, wariant żyzny) i lasy jesionowo-wiązowe (*Ficario-Ulmetum minoris*) [13]. Lasy i urządzona zieleń miejska zajmują 625 ha, tj. 8,6% powierzchni Tarnowa [12].

Średnia roczna temperatura wynosi +8°C, a roczna suma opadów to 528 mm [12].

3. Metodyka badań

Kryteria i sposób waloryzacji przyrodniczej zależą od celu, specyfiki badanego krajobrazu, a także skali opracowania.

W niniejszym artykule ocena przyrodnicza składała się z kilka etapów:

- badania terenowe;
- podział obszaru badań na jednostki krajobrazowo-przestrzenne;
- sformułowanie kryteriów oceny wraz z oceną wg bonitacji punktowej;
- wykonanie waloryzacji przyrodniczej [7] (z modyfikacją autora);
- podsumowanie wyników badań w celu sformułowania wskazań do kształtowania krajobrazu miasta na potrzeby zachowania bioróżnorodności.

Skartowanie pokrycia terenu zostało opracowane na podstawie badań terenowych, a także mapy topograficznej w skali 1:15000 i zdjęcia lotniczego w skali 1:26 000. W artykule załączono mapy w skali 1:45000.

Badania terenowe obejmowały inwentaryzację roślinności, terenów zieleni oraz występowanie wód powierzchniowych. Następnie wykonano przegląd literatury, podział terenu na jednostki krajobrazowo-przestrzenne. Określono stopień naturalności szaty roślinnej i jej bogactwo gatunkowe. Rozpoznano także istniejące powiązania ekologiczne

pomiędzy jednostkami krajobrazowo-przestrzennymi. W podziale terenu na jednostki badawcze wzięto pod uwagę wielkość powierzchni biologicznie czynnej wraz z zabudową. Zaproponowano następujące typy jednostek krajobrazowo-przestrzennych:

- jednostki krajobrazowo-przestrzenne o powierzchni biologicznie czynnej zajmującej powyżej 75% pokrycia badanego obszaru, z niewielkimi udziałami zabudowy lub jej brakiem;
- jednostki krajobrazowo-przestrzenne o powierzchni biologicznie czynnej od 50% do 75% pokrycia badanego obszaru, z niewielkimi udziałami zabudowy;
- jednostki krajobrazowo- przestrzenne o powierzchni biologicznie czynnej od 25% do 50% pokrycia badanego obszaru z zabudową;
- jednostki krajobrazowo-przestrzenne o powierzchni biologicznie czynnej mniejszej niż 25% pokrycia danego obszaru z zabudową.

W celu przeprowadzenia waloryzacji przyrodniczej wykorzystano wybrane kryteria oceny za Żarską [7, 15]. Modyfikacja metody polegała na określeniu pokrycia zabudowy w poszczególnych jednostkach krajobrazowo-przestrzennych. W waloryzacji przyrodniczej miasta Tarnowa uwzględniono następujące kryteria: stopień naturalności szaty roślinnej, pokrycie zabudową w danej jednostce krajobrazowo-przestrzennej, zróżnicowanie terenów zieleni, występowanie powiązań ekologicznych pomiędzy jednostkami krajobrazowo-przestrzennymi (powiązania zewnętrzne i wewnętrzne), występowanie zbiorników wodnych o charakterze naturalnym (rzeka, jezioro) i bogactwo gatunkowe (tab. 1).

Tabela 1. Kryteria oceny do waloryzacji przyrodniczej miasta Tarnowa wg Żarskiej [15] z modyfikacją autora

Kryteria oceny	Bonitacja punktowa	
Stopień naturalności szaty roślinnej [14]	Dominacja zbiorowisk naturalnych (leśnych, wodnych i przywodnych)	3
	Dominacja zbiorowisk półnaturalnych (głównie trawiastych) z udziałem grup drzew i soliterów	2
	Dominacja roślinności synantropijnej a także celowo posadzonej przez człowieka (np. ogrody przydomowe, ogródki działkowe)	1
	Mozaika różnych typów roślinności	2
Pokrycie zabudową w danej jednostce krajobrazowo-przestrzennej	Duże (pokrycie powyżej 50% badanej jednostki)	1
	Średnie (pokrycie od 25% do 50% jednostki)	2
	Małe (pokrycie do 25% jednostki)	3
Zróżnicowanie terenów zieleni	Występowanie dużych powierzchniowo obszarów terenów zieleni: las miejski, park historyczny lub miejski, bulwar	3
	Występowanie średnich powierzchniowo terenów zieleni: skwery, ogródki działkowe	2
	Występowanie małych form terenów zieleni np. ogrody przydomowe	1

Występowanie powiązań ekologicznych pomiędzy jednostkami krajobrazowo-przestrzennym (powiązania zewnętrzne i wewnętrzne)	Co najmniej 3 połączenia ekologiczne	3
	Dwa połączenia ekologiczne	2
	Jedno połączenie ekologiczne	1
Występowanie zbiorników wodnych o charakterze naturalnym (rzeka, jezioro)	Duża rzeka	3
	Mała rzeka lub dopływ dużej rzeki	2
	Jezioro	1
Bogactwo gatunkowe	Duże	3
	Średnie	2
	Małe	1

Źródło: Opracowanie własne

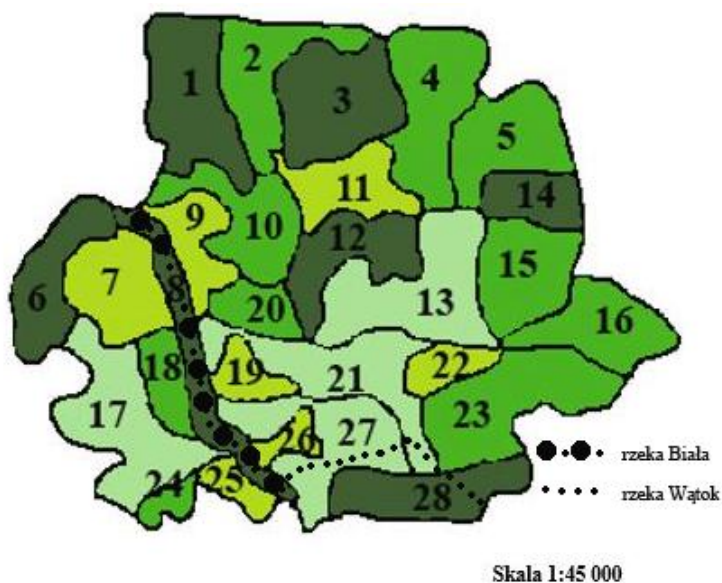
Zastosowano bonitację punktową od 1 punktu do 3 punktów (1 punkt to niski walor, 2 punkty to średni walor, a 3 punkty to wysoki walor) ocenianych elementów przyrodniczych. Wyjątkiem jest ocena jednostek krajobrazowo-przestrzennych pod względem pokrycia zabudowy. W tym przypadku skala jest odwrotna, gdzie 3 punkty oznaczają wysoki walor jednostki, jeśli pokrycie zabudowy jest małe, 2 punkty przy zabudowie średniej a 1 punkt przy zabudowie dużej. Do oceny stopnia naturalności szaty roślinnej zastosowano 3 punkty, przy dominującym pokryciu roślinności o charakterze naturalnym w danej jednostce badawczej. Liczbę 2 punktów przyjęto dla roślinność półnaturalnej, która dominuje w pokryciu roślinności jednostki. Autorzy opracowania zastosowali także 2 punkty przy ocenie zbiorowisk roślinnych, które są zróżnicowane w jednostce krajobrazowo-przestrzennej, ale żaden typ roślinności nie jest dominujący. Mozaika roślinności jest ważna w aspekcie bioróżnorodności i kształtowania systemu przyrodniczego danego obszaru [15] (tab. 1).

Na podstawie wykonanej oceny przyrodniczej wyróżniono:

- jednostki krajobrazowo-przestrzenne o wysokich walorach przyrodniczych (od 18 punktów do 13 punktów);
- jednostki krajobrazowo-przestrzenne o średnich walorach przyrodniczych (od 12 punktów do 7 punktów);
- jednostki krajobrazowo-przestrzenne o niskich walorach przyrodniczych (od 6 punktów do 1 punktu).

4. Wyniki badań

Obszar miasta Tarnowa został podzielony na 28 jednostek badawczych. Obszary te reprezentują 4 typy terenów – jednostki krajobrazowo-przestrzenne o powierzchni biologicznie czynnej o pokryciu 75% z niewielkimi udziałami zabudowy lub brakiem zabudowy (7 obszarów), jednostki krajobrazowo-przestrzenne o powierzchni biologicznie czynnej o pokryciu 50% do 75% z niewielkimi udziałami zabudowy (10 obszarów), jednostki krajobrazowo-przestrzenne o powierzchni biologicznie czynnej o pokryciu od 25% do 50% z zabudową (7 obszarów), jednostki krajobrazowo-przestrzenne o powierzchni biologicznie czynnej mniejszej niż 25% z zabudową (4 obszary).



Rysunek 1. Podział terenu opracowania na typy jednostek krajobrazowo-przestrzennych
1, 3, 6, 8, 12, 14, 28 – jednostki krajobrazowo-przestrzenne o powierzchni biologicznie czynnej o pokryciu 75%, z niewielkim udziałami zabudowy lub brakiem zabudowy
2, 4, 5, 10, 15, 16, 18, 20, 23, 24 – jednostki krajobrazowo-przestrzenne o powierzchni biologicznie czynnej o pokryciu od 50 % do 75%, z niewielkim udziałami zabudowy
7, 9, 11, 19, 22, 25, 26 – jednostki krajobrazowo- przestrzenne o powierzchni biologicznie czynnej o pokryciu od 25% do 50% z zabudową
13, 17, 21, 27 – jednostki krajobrazowo- przestrzenne o powierzchni biologicznie czynnej o pokryciu mniejszym niż 25%

Miasto Tarnów charakteryzuje się zróżnicowanymi walorami przyrodniczymi. Na podstawie przeprowadzonej waloryzacji przyrodniczej, przy zastosowaniu 7 kryteriów oceny (tab. 1) wyróżniono obszary o zróżnicowanych walorach przyrodniczych. Pierwszy typ obszarów oznaczony na mapie literą A – to jednostki krajobrazowo-przestrzenne o wysokich walorach przyrodniczych. Do tego typu należy 10 obszarów w mieście. Obszary o wysokich walorach przyrodniczych znajdują się w różnych częściach miasta i charakteryzują się przede wszystkim występowaniem naturalnych i półnaturalnych zbiorowisk roślinnych. Na tych obszarach badawczych znajdują także wody powierzchniowe o charakterze naturalnym np. rzeka Biała (jednostka o numerze 8) i rzeka Wątok (przepływa przez jednostkę o numerze 28). Jednostki o wysokich walorach przyrodniczych charakteryzują się niewielkim udziałem zabudowy lub jej brakiem oraz występowaniem cennych terenów zieleni miejskiej, tj. lasy, parki miejskie i podworskie. Roślinność o charakterze naturalnym odznacza się dużą różnorodnością gatunkową. Do cenniejszych zbiorowisk roślinnych należą fragmenty lasów łąkowych, lasy łąkowe, łąki wilgotne, roślinność wodna i szuwarowa.

Drugi typ obszarów to jednostki krajobrazowo-przestrzenne o średnich walorach przyrodniczych (na mapie zaznaczone jako B). Tereny te znajdują się w różnych częściach miasta, ale głównie w części wschodniej. Obszary te charakteryzują się zróżnicowanym zbiorowiskami roślinnymi, głównie o charakterze półnaturalnym i częściowo

synantropijnymi (głównie na terenach o charakterze rolniczym). Znaczny jest udział ogrodów przydomowych i ogrodów działkowych. Rzeka Wątok, która jest małym dopływem rzeki Białej przepływa przez jednostki o numerach 21 i 27 w południowej części miasta. Ostatni typ obszarów to jednostki krajobrazowo-przestrzenne o niskich walorach przyrodniczych (na mapie oznaczone jako C). Obszary te charakteryzują się zróżnicowaną zabudową, a także występują tutaj obszary przemysłowe. Dominującą roślinnością są zbiorowiska synantropijne i roślinność trawiasta wraz z grupami drzew.



Fotografia 1. Las miejski na siedlisku grądowym, jako przykład roślinności naturalnej znajdującej się w jednostce krajobrazowo-przestrzennej o wysokich walorach przyrodniczych w północno-wschodniej części miasta Tarnowa (fot. Beata Fornal-Pieniak 2020)



Fotografia 2. Runo leśne w lesie miejskim grądowym w jednostce krajobrazowo-przestrzennej o wysokich walorach przyrodniczych w północno-wschodniej części miasta Tarnowa jednostka krajobrazowo-przestrzenna o numerze 1) (fot. Beata Fornal-Pieniak 2020)



Fotografia 3. Rzeka Wątok wraz z przylegającym bulwarem (jednostka krajobrazowo-przestrzenna o numerze 27) (fot. Beata Fornal-Pieniak 2020)



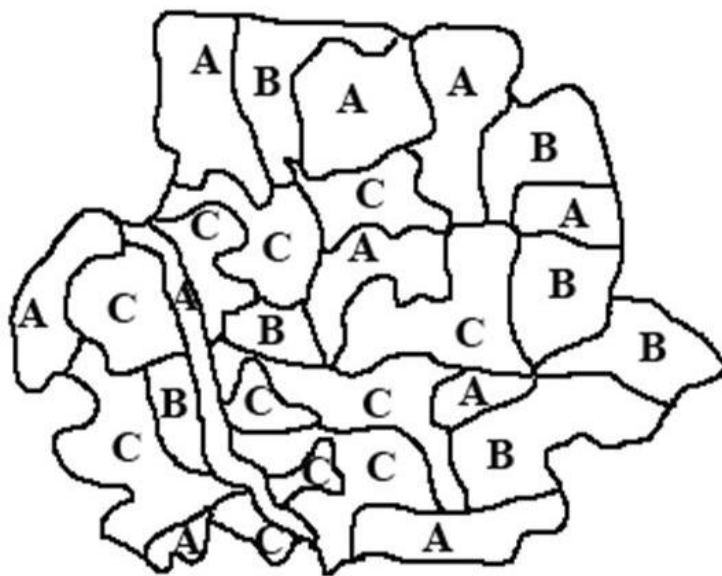
Fotografia 4. Park Strzelecki jako przykład terenu zieleni ze zróżnicowaną roślinnością o charakterze naturalnym, półnaturalnym i synantropijnym (obiekt znajduje się w jednostce krajobrazowo-przestrzennej o numerze 12) (fot. Beata Fornal-Pieniak 2020)



Fotografia 5. Zadrzewienia w parku podworskim Sanguszki jako przykład roślinności naturalnej (obiekt znajduje się w jednostce krajobrazowo-przestrzennej o numerze 22) (fot. Beata Fornal-Pieniak 2020)



Fotografia 6. Skwer – przykład terenu zieleni przy ul. Lwowskiej w Tarnowie jednostka krajobrazowo-przestrzenna o numerze 21) (fot. Beata Fornal-Pieniak 2020)



Skala 1:45 000

Rysunek 2. Wyniki waloryzacji przyrodniczej miasta Tarnowa, z obszarami o wysokich, średnich i niskich walorach przyrodniczych

- A – obszary o wysokich walorach przyrodniczych (10 jednostek krajobrazowo-przestrzennych)
- B – obszary o średnich walorach przyrodniczych (7 jednostek krajobrazowo-przestrzennych)
- C – obszary o niskich walorach przyrodniczych (11 jednostek krajobrazowo-przestrzennych)

5. Podsumowanie

Inwentaryzacja i ocena wartości przyrodniczych stanowi podstawę do właściwego zarządzania zasobami naturalnymi i daje realną szansę na zachowanie różnorodności biologicznej w miastach.

Miasto Tarnów charakteryzuje się zróżnicowanymi walorami elementów przyrodniczych. Obszary o wysokich i średnich walorach przyrodniczych wyróżniają się przede wszystkim występowaniem naturalnych, półnaturalnych zbiorowisk roślinnych (np. w dolinie rzeki Białej, w lasach miejskich, parkach podworskich).

Jednostki krajobrazowo-przestrzenne o niskich walorach przyrodniczych to głównie obszary z zabudową i z zielenią towarzyszącą oraz tereny z dominacją roślinności synantropijnej a także z fragmentami roślinności półnaturalnej (np. tereny rolnicze).

Na podstawie otrzymanych wyników waloryzacji przyrodniczej stwierdzono, że obszary zaklasyfikowane do terenów o niskich walorach przyrodniczych powinny być wzbogacone np. o nowe tereny zielni lub poprzez wprowadzanie zadrzewień śródpolnych na istniejących obszarach rolniczych w celu zwiększenia bioróżnorodności miasta.

Zaproponowana metoda waloryzacji jest łatwa w zastopowaniu praktycznym. Otrzymane wyniki stanowią podstawę w zakresie ustalenia dalszych szczegółowych badań przyrodniczych nad zachowaniem bioróżnorodności miasta.

Literatura

1. Glowka L. (Ed.), *A Guide to the Convention on Biological Diversity*, Environmental Policy and Law Paper, 1999, 30 IUCN Gland and Cambridge 161.
2. Andrzejewski R., Weigle A., *Różnorodność biologiczna Polski. Narodowy Fundusz Ochrony Środowiska*, Warszawa 2003.
3. Kareiva P., Marvier M., *Conservation for people*, Scientific American Magazine, 2004, 297 (4), s. 50-57.
4. Fornal-Pieniak B., Żarska B., Zaraś-Januszkiewicz E., *Natural evaluation of landscape in urban area comprising Bielański Forest nature reserve and surroundings*, Warsaw, Poland. Directions for landscape protection and planning Annals of Warsaw University of Life Sciences – SGGW Land Reclamation, 2018, 50 (4), s. 327-338.
5. Baranowski A., *Projektowanie zrównoważone w architekturze*, Politechnika Gdańska, Gdańsk 1998.
6. Przewoźniak M., *Platy i korytarze ekologiczne w strukturze miasta – teoria i praktyka*, Problemy Ekologii Krajobrazu, 2004, 18.
7. Żarska B., Fornal-Pieniak B., Zaraś-Januszkiewicz E., *Landscape protection and planning*, WULS Press, Warszawa 2014.
8. Czerniakowski Z.W., *Wyspy i korytarze ekologiczne na terenie Rzeszowa* Zeszyt Naukowe, 2005, 6, s. 21-25.
9. Fornal-Pieniak B., Ollik M., Schwerk A., *Impact of different levels of anthropogenic pressure on the plant species composition in woodland sites*, Urban Forestry and Urban Greening, 2019, 38, s. 295-304.
10. Shanahan D.F., Miller C., Possing-Ham H.P., Fuller R.A., *The influence of patch area and connectivity on avian communities in urban revegetation*, Biological Conservation, 2011, 144 (2), s. 722-729.
11. Threlfall C.G., Williams N.S.G., Hahs A.K., Livesley S.J., *Approaches to urban vegetation management and the impacts on urban bird and bat assemblages*, Landscape and Urban Planning, 2016, 153, s. 28-39.
12. Raport o stanie miasta z dn.2018-09-20. file:///C:/Users/forna/AppData/Local/Temp/Raport%20o%20stanie%20miasta_2018_z%20załącznikami.pdf
13. Matuszkiewicz J.M., *Potencjalna roślinność naturalna Polski*, IGiPZ PAN, Warszawa 2008.
14. Matuszkiewicz W., *Przewodnik do rozpoznawania zbiorowisk roślinnych Polski*, PWN, Warszawa 2012.
15. Żarska B., *Ochrona krajobrazu*, SGGW, Warszawa 2011.

Ocena przyrodnicza krajobrazu dla potrzeb zachowania bioróżnorodności miasta Tarnowa

Streszczenie

Miasto jest jednostką o zróżnicowanych elementach przyrodniczych i antropogenicznych. Głównie elementy przyrodnicze ulegają różnym przekształceniom na skutek działalności człowieka, a to ma wpływ na zmniejszenie bioróżnorodności miasta. W miastach można wyróżnić ważne ostoje przyrodnicze, które są reprezentowane przede wszystkim przez tereny zieleni, tj. lasy miejskie, parki, skwery, ogródki działkowe, ogrody przydomowe. Tereny te wpływają na jakość życia mieszkańców, mają duże znaczenie ekologiczne, jak i zdrowotne. W artykule przedstawiono metodę waloryzacji przyrodniczej w celu zidentyfikowania zróżnicowania walorów przyrodniczych miasta Tarnowa, w kontekście zachowania bioróżnorodności. Badany obszar został podzielony na jednostki krajobrazowo-przestrzenne i kryterium podziału była wielkość powierzchni biologicznie czynnej na terenie.

W waloryzacji wykorzystano kryteria oceny, które dotyczą elementów przyrodniczych. W ocenie zastosowano bonitację punktową w skali od 1 punktu do 3 punktów. Na podstawie otrzymanych wyników badań

stwierdzono, iż miasto Tarnów jest zróżnicowane w aspekcie walorów przyrodniczych. Obszary (jednostki krajobrazowo-przestrzenne) o wysokich walorach przyrodniczych charakteryzują się występowaniem przede wszystkim lasów miejskich, parków, doliny rzecznej wraz z roślinnością z małą ilością zabudowy lub jej całkowitym brakiem. Obszary o średnich walorach przyrodniczych charakteryzują się występowaniem grup zadrzewień, roślinności trawiastej, terenów z ogródkami działkowymi, ogrodami przydomowymi, wraz z obecnością zbiorników wodnych. Obszary o niskich walorach przyrodniczych to głównie tereny z dużym pokryciem zabudowy i zielenią towarzyszącą oraz roślinnością synantropijną. Otrzymane wyniki badań zawierają ważne informacje o wartościach przyrodniczych miasta, które powinny być wykorzystane przy określeniu dalszych szczegółowych badań i formułowaniu wskazań związanych z zachowaniem bioróżnorodności badanego obszaru.

Słowa kluczowe: walory przyrodnicze, tereny zieleni, struktura ekologiczna, miasto

Environmental assessment of the landscape for the purposes of preserving the biodiversity of the city of Tarnów

Abstract

The city is a unit with various natural and anthropogenic elements. Mainly natural elements undergo various transformations due to human activities, and this has an impact on reducing the city's biodiversity. Important urban refuges can be distinguished in cities, which are represented primarily by green areas, i.e. urban forests, parks, squares, allotments, and home gardens. These areas affect the quality of life of residents, have great ecological and health significance. The article presents the method of nature valorisation in order to identify the diversity of natural values of the city of Tarnów in the context of preserving biodiversity. The studied area was divided into spatial-landscape units, where the main criterion was the coverage of the area by biologically active area. In the valorisation, evaluation criteria were used that relate to natural elements. The assessment uses point bonitation on a scale of 1 point to 3 points. Based on the obtained research results, it was found that the city of Tarnów is diversified in the aspect of natural values. Areas (spatial-landscape units) of high natural value are characterized mainly by urban forests, parks, river valley along with vegetation with little or no buildings. Areas with medium natural values are characterized by the occurrence of tree groups, grassy vegetation as well as areas with allotment gardens and home gardens, as well as the presence of water reservoirs. Areas with low natural values are mainly areas with high building coverage and accompanying greenery as well as synanthropical vegetation. The obtained research results contain important information about the city's natural values, which should be used in further detailed research when formulating indications related to preserving the biodiversity of the studied area.

Keywords: natural values, green areas, ecological structure, city

Indeks autorów

Antoniak K.	29	Kurowiak J.	39
Będziński R.	39	Lechowski M.	191
Buczel M.	91	Lenart-Boroń A.	153
Cholewa K.	20	Mackiewicz A.	39
Dmowska D.	213	Małajowicz J.	202
Fabiszewska A.	213	Nawrot R.	7
Felczak-Konarska K.	191	Nowak K.E.	91
Filipiak K.	91	Oleś I.	132
Flis M.	114	Sieńko M.A.	75
Fornal-Pieniak B.	233	Siwek M.	20
Górska A.	202	Skarwecki D.	7
Grabowska-Polanowska B.	221	Staśkiewicz K.	173
Grzebieniarz W.	153	Szakiel A.	173
Grzywna N.	91	Szałabska-Rapała K.	54
Hansdorfer-Korzon R.	29	Szpitalak M.	91
Jańczyk M.	20	Urbisz K.	54
Jarosz M.	139	Wacławek W.M.	202
Kamińska W.	84	Warowicka A.	7
Klekiel T.	39	Wołoszyńska M.	139
Kowalczyk A.	221	Zieniuk B.	213
Kozyra M.	20	Zorena K.	29
Kucharska A.	105	Zych M.	54