



**PRZEGLĄD AKTUALNYCH ZAGADNIEŃ Z ZAKRESU
MEDYCyny I BIOLOGII**

Redakcja:
Alicja Danielewska
Izabela Mołdoch-Mendoń

Lublin 2023

Przegląd aktualnych zagadnień z zakresu medycyny i biologii

Przegląd aktualnych zagadnień z zakresu medycyny i biologii

Redakcja:
Alicja Danielewska
Izabela Mołdoch-Mendoń

Lublin 2023

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

Recenzentami niniejszej monografii byli:

- dr hab. n. med. Tadeusz M. Zielonka, profesor WUM
- dr inż. Sylwia Andrzejczuk
- dr n. hum. Agata Janaszczyk
- dr n. o zdr. Mariola Janiszewska
- dr Katarzyna Kowalcze
- dr n. farm. Agnieszka Marzec
- dr n. med. Karolina Nowak
- dr inż. Katarzyna Rubinowska
- dr n. med. Damian Skrypnik
- dr Jolanta Wesołowska
- dr n. med. Agata Wypych-Ślusarska

Wszystkie opublikowane rozdziały otrzymały pozytywne recenzje.

Skład i łamanie:
Monika Maciąg

Projekt okładki:
Marcin Szklarczyk

Korekta:
Małgorzata Gabryś

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

ISBN 978-83-67104-88-3

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

Spis treści

Elżbieta Huk-Wieliczuk Wiedza studentów AWF o cukrzycy typu 2.....	7
Adrianna Marta Kryska, Maryna Khalavka Zaburzenia lipidowe w przebiegu chorób metabolicznych na przykładzie cukrzycy typu 2 i niedoczynności tarczycy.....	16
Daria Kamińska Enzymy szlaku kwasu miewalonowego oraz enzymy prenylujące małe GTPazy w patogenezie cukrzycy typu 2 oraz towarzyszących jej schorzeń.....	27
Katarzyna Śliżewska Otyłość i jej powiązanie z mikrobiotą.....	35
Gabriela Skórska, Michał Krawiec, Olga Odrzywolska, Gabriela Ziółkowska, Aleksandra Lecnar, Karolina Lau, Jadwiga Joško-Ochojska E-papierosy w ujęciu socjo-epidemiologicznym – bezpieczeństwo oraz użyteczność w terapii nikotyno-zastępczej.....	45
Jakub Kamiński, Sara Hmaidan, Ewa Kędzierska, Jolanta Orzelska-Górka, Marta Kruk-Słomka, Grażyna Biała Zagrożenia związane z zażywaniem związków kannabinoidowych.....	73
Sara Hmaidan, Jakub Kamiński, Ewa Kędzierska, Jolanta Orzelska-Górka, Marta Kruk-Słomka, Grażyna Biała Jak nie dać się otruć GHB, czyli co wiemy o „pigułce gwałtu”?.....	83
Gabriela Skórska, Michał Krawiec, Olga Odrzywolska, Gabriela Ziółkowska, Aleksandra Lecnar, Karolina Lau, Jadwiga, Joško-Ochojska Atopowe zapalenie skóry jako dermatoma wieku dziecięcego – czynniki ryzyka, objawy oraz przebieg schorzenia.....	95
Aleksandra Podgórska, Marek Niczyporuk, Marta Wacewicz-Muczyńska Ultradźwięki – historia, działanie i zastosowanie w praktyce dermatologicznej.....	114
Beata Cichacz-Kwiatkowska, Joanna Sekita-Krzak, Marta Lis-Sochocka, Patrycja Chylińska-Wrzos, Barbara Jodłowska-Jędrych Badania immunohistochemiczne w boreliozie.....	125

Anna Kostka

Odkrywając tajemnice cząsteczki życia – krótka historia niezwykle naukowej podróży.
DNA i dziedziczenie 138

Anna Kostka

Odkrywając tajemnice cząsteczki życia – krótka historia niezwykle naukowej podróży.
Geny i ich ekspresja 158

Anna Kostka

Odkrywając tajemnice cząsteczki życia – krótka historia niezwykle naukowej podróży.
Geny to nie wszystko 176

Indeks Autorów..... 193

Wiedza studentów AWF o cukrzycy typu 2

1. Wprowadzenie

Cukrzyca to przewlekła choroba metaboliczna, której przyczyną jest niewystarczająca produkcja insuliny i/lub spadek wrażliwości tkanek obwodowych na ten hormon, co skutkuje podwyższeniem poziomu stężenia glukozy we krwi [1].

Cukrzyca typu 2 to obecnie najczęściej występujący typ cukrzycy. Stanowi ona prawie 90% z około 537 milionów przypadków cukrzycy na całym świecie [2]. Liczba dotkniętych tą jednostką chorobową szybko rośnie, a szczególnie wśród dzieci i młodych dorosłych do 40. roku życia [3, 4]. Zgodnie z danymi populacyjnymi w Polsce na cukrzycę choruje ponad 2 miliony ludzi, co stanowi blisko 8% dorosłej populacji [5].

Liczne badania naukowe wskazują na to, iż stan zdrowia osoby chorej na cukrzycę ulega pogorszeniu, powodując u niej wiele powikłań – przewlekłą chorobę nerek, retinopatię, neuropatię, choroby układu sercowo-naczyniowego, miażdżycę tętnic obwodowych [6-9]. Udowodniono, że cukrzyca typu 2 jest jednym z czynników predysponujących do wystąpienia stanu przedrzucawkowego u ciężarnych [10]. Kudiyirickal i Pappachan [11] podkreślają wzajemne powiązania między cukrzycą a zdrowiem jamy ustnej.

Do czynników ryzyka cukrzycy typu 2 podlegających modyfikacji odnosimy: siedzący tryb życia, złe nawyki żywieniowe warunkujące powstanie nadwagi i otyłości, sięganie po substancje psychoaktywne (palenie tytoniu, picie alkoholu) oraz przyjmowanie środków farmakologicznych o działaniu diabetogennym w postaci leków tiazydowych, beta-adrenolityków, sympatykomimetyków czy leków sterydowych [12, 13].

Rosnący odsetek zachorowań na cukrzycę typu 2 skłania do monitorowania jej zakresu występowania, diagnostyki i leczenia oraz profilaktyki [6].

Istotne znaczenie w zapobieganiu cukrzycy odgrywa edukacja zdrowotna ukierunkowana na młodzież akademicką. Ta grupa populacyjna jest szczególnie narażona na nieprawidłowości w zakresie zachowań żywieniowych, co związane jest w dużym stopniu z nieregularnym trybem zajęć lub sytuacją finansową (ich czy rodziny). W sposobie odżywiania studentów stwierdza się wiele błędów żywieniowych [15-17].

2. Cel pracy

Celem pracy było przedstawienie wiedzy w zakresie wybranych aspektów cukrzycy wśród studentów AWF – tej grupy młodych ludzi, którzy ze względu na specyfikę kierunku studiów są bardziej aktywni fizycznie niż ich rówieśnicy z innych uczelni.

3. Materiał i metody badań

Badaniami objęto 130 osób w wieku od 19 lat do 23 lat studiujących na kierunku wychowanie fizyczne w Akademii Wychowania Fizycznego Józefa Piłsudskiego w Warszawie Filii w Białej Podlaskiej. Włączeni zostali wszyscy obecni na zajęciach w dniu przeprowadzania badań studenci, którzy wyrazili zgodę na udział w nich. Mężczyźni

¹ elzbieta.wieliczuk@awf.edu.pl, Akademia Wychowania Fizycznego Józefa Piłsudskiego w Warszawie Filia w Białej Podlaskiej, <http://orcid.org/0000-0001-8391-3128>.

stanowili większość badanych (75,4%). Respondenci wypełniali autorski kwestionariusz ankiety zawierający pytania odnośnie do czynników ryzyka cukrzycy, znajomości wybranych wskaźników diagnostycznych (prawidłowego stężenia glukozy we krwi, ciśnienia tętniczego krwi, normy hemoglobiny glikowanej – HbA1c) i najbardziej zalecanych form aktywności fizycznej w profilaktyce cukrzycy typu 2. Badania przeprowadzono w roku akademickim 2021/2022. Zebrany materiał empiryczny poddano analizie statystycznej za pomocą testu niezależności chi-kwadrat. Przyjęto poziom istotności $p < 0,05$.

4. Wyniki

W tabeli 1 zaprezentowano wiedzę badanych odnośnie do czynników ryzyka w zależności od płci badanych. Prawie wszyscy respondenci sądzili, że nawyki żywieniowe odgrywają istotną rolę w patogenezie cukrzycy. Prawie 84% mężczyzn i 91% kobiet uważało, że wysoki indeks glikemiczny produktów jest czynnikiem sprzyjającym powstaniu cukrzycy. Również znaczny odsetek badanych podkreślał rolę wysokiego ładunku glikemicznego jako determinanty ryzyka cukrzycy. Co 5. uczestnik badania twierdził, że niedobór witaminy D może być jednym z czynników sprzyjających zachorowalności na cukrzycę typu 2. Spośród substancji zawartych w produktach spożywczych, które mogą zwiększać ryzyko cukrzycy typu 2, badani wskazali zbyt duże spożycie konserwantów i barwników. Prawie 91% ogółu studentów uważało, że nadwaga i otyłość, szczególnie otyłość typu androidalnego, wpływa na możliwość zachorowania na cukrzycę (różnice istotne statystycznie, $\chi^2 = 7,11$; $p < 0,05$). Zdaniem prawie 74% respondentów i ponad 81% respondentek wiek osoby jest determinantą zachorowalności na tę jednostkę chorobową. W opinii 67% ankietowanych cukrzyca ciążowa przyczynia się do wystąpienia u danej osoby cukrzycy. Zbliżony odsetek badanych twierdził, że choroby układu krążenia są czynnikiem ryzyka cukrzycy typu 2. Zdecydowanie częściej kobiety niż mężczyźni sądziły, że w patogenezie cukrzycy odgrywa rolę hipercholesterolemia, odpowiednio: 81,3% i 61,2%, (różnice istotne statystycznie, $\chi^2 = 4,64$, $p < 0,05$). Wybrane elementy stylu życia człowieka w opinii badanych mogą mieć związek z zachorowalnością na ten zespół chorób metabolicznych. Istotnie statystycznie częściej respondentki niż respondenci akcentowały wpływ czynnika stresowego na zachorowalność na cukrzycę (75% vs. 56,1%). Zdaniem badanych sięganie po używki typu tytoń i napoje alkoholowe może sprzyjać pojawieniu się objawów cukrzycy typu 2. Częściej taką opinię wyrażały badane studentki. Co 3. respondentka i co 6. respondent twierdzili, że napoje alkoholowe mają wpływ na ryzyko pojawienia się cukrzycy (różnice istotne statystycznie na poziomie $p < 0,05$). Większy odsetek kobiet niż mężczyzn wskazywał na predyspozycje genetyczne w zakresie tego zespołu chorób metabolicznych, odpowiednio: 65,6% i 45,5% (różnice istotne statystycznie, $\chi^2 = 3,87$, $p < 0,05$). Ponadto odnotowuje się, że badana grupa wiązała wybrane jednostki chorobowe z wystąpieniem cukrzycy typu 2. Ponad 34% kobiet i 17% mężczyzn zaliczyło infekcje wirusowe do czynników zwiększających ryzyko tej jednostki chorobowej (różnice istotne statystycznie, $\chi^2 = 4,42$, $p < 0,05$). W opinii 5,1% respondentów i 25,0% respondentek zespół policystycznych jajników jest czynnikiem ryzyka w przypadku cukrzycy typu 2 (różnice istotne statystycznie, $\chi^2 = 9,04$, $p < 0,05$), a nieliczni badani wskazali problemy gastryczne.

Tabela 1. Czynniki ryzyka cukrzycy typu 2

Zmienna	Mężczyźni	Kobiety	χ^2
Wpływ nawyków żywieniowych	99,0	100,00	0,56
Dieta bogata w produkty o wysokim indeksie glikemicznym	83,7	90,6	1,01
Dieta bogata w produkty o wysokim ładunku glikemicznym	77,6	87,5	1,61
Niedobór witaminy D	21,2	21,9	0,01
Zbyt duże spożycie konserwantów, barwników	17,3	21,9	0,32
Nadwaga i otyłość	91,8	90,6	0,04
Brzuszny typ otyłości (typu androidalnego)	52,1	78,1	7,11*
Wiek	73,5	81,3	0,82
Cukrzyca ciążowa	67,3	64,5	0,08
Choroby układu krążenia	64,3	62,5	0,03
Nadciśnienie	54,1	56,3	0,05
Hipercholesterolemia	61,2	81,3	4,64*
Stres	56,1	75,0	3,77*
Palenie tytoniu	22,4	28,1	0,42
Napoje alkoholowe	17,2	31,3	2,74*
Genetyczne predyspozycje	45,5	65,6	3,87*
Infekcje wirusowe	16,3	34,4	4,42*
Zespół policystycznych jajników	5,1	25,0	9,04*
Problemy gastryczne (biegunki, zgaga)	5,1	6,3	0,06

* różnice istotne statystycznie na poziomie $p < 0,05$

Źródło: opracowanie własne.

Badana młodzież akademicka udzielała odpowiedzi odnośnie do prawidłowego poziomu glukozy we krwi żyłnej na czczo i ciśnienia tętniczego krwi (tab. 2). Wiedza w tym zakresie kobiet była wyższa niż mężczyzn. Ponad 81% respondentek i 56% respondentów wskazywało na wartość poniżej 100 mg/dl w zakresie poziomu glukozy (różnice istotne statystycznie, $p < 0,05$), a poniżej 130/85 mm Hg odnośnie optymalnego ciśnienia tętniczego – 71,9% studentek i 61,2% studentów. Niepokojąco niska była wiedza badanych o normie hemoglobiny glikowanej (HbA1c) u osób zdrowych; tylko co 12. mężczyzna potrafił i co 5. kobieta potrafiła podać jej prawidłowy poziom (różnice istotne statystycznie, $p < 0,05$).

Tabela 2. Wiedza badanych na temat prawidłowego stężenia glukozy we krwi i ciśnienia tętnicze krwi

Zmienna	Mężczyźni	Kobiety	χ^2
Prawidłowy poziom glukozy we krwi żyłnej na czczo	56,1	81,3	6,99*
Prawidłowe ciśnienie tętnicze krwi	61,2	71,9	1,22
Prawidłowy poziom hemoglobiny glikowanej (HbA1c)	8,2	21,9	3,95*

* różnice istotne statystycznie na poziomie $p < 0,05$

Źródło: opracowanie własne.

W opinii badanych bieganie (81,6% mężczyzn i 90,6% kobiet) i jazda na rowerze (77,3% mężczyzn i 84,4% kobiet) są tymi formami aktywności fizycznej, które mogą odgrywać istotną rolę w profilaktyce cukrzycy typu 2 (tab. 3). Ponad 70% respondentów i prawie 63% respondentek uważało, że pływanie może przejawiać działanie prewencyjne w zakresie tego zespołu chorób metabolicznych. Znaczny odsetek ankietowanych podał, że nordic walking jest kolejną formą aktywności fizycznej pozytywnie oddziałującą na organizm człowieka w kontekście profilaktyki cukrzycy typu 2. Prawie połowa badanych wskazywała w tym zakresie na szybki marsz. Kobiety istotnie częściej niż mężczyźni twierdziły, że uprawianie jogi może zmniejszyć ryzyko zachorowania na cukrzycę, odpowiednio: 64,5% i 20,4%.

Tabela 3. Najbardziej zalecane formy aktywności fizycznej w profilaktyce cukrzycy typu 2 w opinii badanych

Zmienna	Mężczyźni	Kobiety	χ^2
Pływanie	70,7	62,5	0,74
Jazda na rowerze	77,3	84,4	0,93
Bieganie	81,6	90,6	1,59
Szybki marsz	44,9	50,0	0,25
Nordic walking	58,2	62,5	0,19
Joga	20,4	64,5	20,24*

* różnice istotne statystycznie na poziomie $p < 0,05$

Źródło: opracowanie własne.

5. Dyskusja

Światowa Organizacja Zdrowia uważa cukrzycę za pierwszą niezakaźną pandemię, która generuje wiele powikłań dla zdrowia człowieka. Jest też istotnym ciężarem dla zdrowia publicznego, powodując ogromne obciążenia w postaci finansowania świadczeń oraz refundacji leków, a także koszty związane z przejściem na rentę z tytułu niezdolności do pracy.

W profilaktyce cukrzycy typu 2 ważnym aspektem są zachowania i nawyki żywieniowe. Badana grupa młodzieży miała wysoką świadomość, że właśnie one są czynnikami ryzyka tej jednostki chorobowej. Prawie 84% mężczyzn i 91% kobiet uważało, że dieta bogata w produkty o wysokim indeksie glikemicznym jest czynnikiem sprzyjającym powstaniu cukrzycy. Najkorzystniejsze w aspekcie żywienia są produkty, których

indeks glikemiczny nie przekracza wartości 50, stanowią one również dobre źródło błonnika pokarmowego, należą do nich np. warzywa zielone, jabłka, grejpfruty czy płatki owsiane [18, 19]. Jak donosi Livesey [20], indeks glikemiczny i ładunek glikemiczny są istotnymi markerami żywnościowymi przewidującymi rozwój cukrzycy na całym świecie, szczególnie dla osoby pochodzenia europejskiego i wschodnioazjatyckiego.

W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie naukowców korzyściami wynikającymi z suplementacji witaminą D. Jak podaje Żukowska-Szczechowska i Kiszka [21], istnieje związek z jej niedoborem a upośledzonym wydzielaniem insuliny. Odpowiednia podaż witaminy D poprawia zdolność komórek wysp Langerhansa do syntezy *de novo* wielu białek oraz przekształcania proinsuliny w insulinę. Co 5. uczestnik badania twierdził, że niedobór witaminy D może być jednym z czynników sprzyjających zachorowalności na cukrzycę typu 2.

Prawie 74% mężczyzn i ponad 81% kobiet uważało, że z wiekiem wzrasta zagrożenie zachorowaniem na cukrzycę. Niższe wartości uzyskała Rybarczyk-Szwajkowska [22]; prawie 63% studentów szkół wyższych w Łodzi, studentów Uniwersytetu Wiedeńskiego i Narodowego Uniwersytetu Medycznego w Kijowie wskazało na związek pomiędzy wiekiem a zwiększonym ryzykiem wystąpienia cukrzycy typu 2.

Styl życia uważany jest za element profilaktyki w kwestii zapobiegania ryzyka wystąpienia wielu chorób przewlekłych, w tym cukrzycy typu 2 [23, 24]. Dużą rolę przypisuje się w tym zakresie aktywności fizycznej, która też umożliwia rozładowanie napięcia nerwowego. Stres powoduje zwiększenie stężenia glukozy we krwi, co doprowadza do większego wydzielania insuliny, a w rezultacie prowadzi do insulinooporności [25, 26]. Sytuacje stresowe często sprzyjają sięganiu po słodkie lub słone przekąski oraz inne kaloryczne posiłki, co doprowadza do hiperglikemii oraz zwiększenia ryzyka rozwoju cukrzycy [27]. Trzy czwarte badanych studentek i ponad 56% studentów wskazuje, że istnieje związek między czynnikiem stresowym a zachorowalnością na cukrzycę.

Aktywność fizyczna pozytywnie wpływa na przebieg metabolizmu glukozy, na obniżenie poziomu hemoglobiny glikowanej (HbA1c), na redukcję tkanki tłuszczowej oraz na zmniejszenie masy ciała i obwodu talii [29-31]. Najbezpieczniejszymi ćwiczeniami dla pacjentów chorych na cukrzycę są ćwiczenia o umiarkowanej intensywności (tzw. aerobowe). Natomiast połączenie treningu aerobowego i oporowego u chorych na cukrzycę typu 2 redukuje wartość HbA1c (-0,8%), stężenie glukozy na czczo (-1,5%) i po posiłku (-6%), poprawia insulinowrażliwość (106%) i obniża stężenie insuliny na czczo (-7%) [32]. W opinii badanych bieganie i jazda na rowerze, pływanie czy nordic walking są tymi formami aktywności fizycznej, które mogą odgrywać rolę w profilaktyce cukrzycy typu 2.

6. Wnioski

1. Badana młodzież akademicka **posiada** zróżnicowaną wiedzę na temat modyfikowalnych czynników ryzyka cukrzycy typu 2. Wśród tych czynników ankietowani najczęściej wymieniali: nawyki żywieniowe, wskaźniki – indeks glikemiczny i ładunek glikemiczny, nadwagę i otyłość, wiek, hipercholesterolemię oraz stres. Studentki częściej niż studenci uważały, że istnieje związek z zachorowalnością na ten zespół chorób metabolicznych a brzuszny typem otyłości (typu androidalnego), hipercholesterolemią, wybranymi elementami stylu życia (stressem, spożywaniem

- napojów alkoholowych), predyspozycjami genetycznymi czy wybranymi jednostkami chorobowymi (infekcje wirusowe, zespół policystycznych jajników).
- Przeprowadzone badania wskazały, że niski odsetek studentów zna retrospektywny wskaźnik stężenia glukozy we krwi, jakim jest hemoglobina glikowana (HbA1c); tylko 8,2% mężczyzn i 21,9% kobiet było w stanie podać jej normę dla osób dorosłych (bez wysokiego poziomu trójglicerydów, niedokrwistości, niewydolności nerek czy choroby alkoholowej).
 - Respondenci za najbardziej zalecane formy aktywności fizycznej w profilaktyce cukrzycy typu 2 uznali jazdę na rowerze, pływanie i nordic walking. Kobiety istotnie częściej niż mężczyźni twierdziły, że uprawianie jogi może zmniejszyć ryzyko zachorowania na cukrzycę, odpowiednio: 64,5% i 20,4%.
 - Ze względu na zagrożenie cukrzycą typu 2 istnieje potrzeba edukowania młodych ludzi w zakresie czynników ryzyka tej jednostki chorobowej i roli aktywności fizycznej w jej profilaktyce.

Literatura

- World Health Organization, *Global report on diabetes*, <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257> [data dostępu: 28.11.2022].
- Ahmad E., Lim S., Lamptey R., Webb D.R., Davies M.J., *Type 2 diabetes*, *Lancet*, 400(10365), 2022, s. 1803-1820.
- Wild S., Roglic G., Green A., Sicree R., King H., *Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030*, *Diabetes Care*, 27(5), 2004, s. 1047-1053.
- Lascar N., Brown J., Pattison H., Barnett A.H., Bailey C.J., Bellary S., *Type 2 diabetes in adolescents and young adults*, *Lancet Diabetes Endocrinol*, 6, 2018, s. 69-80.
- Grygiel S., Błachnio-Zabielska A., *Cukrzyca typu 2 – epidemiologia i farmakologia*, *Problemy Higieny i Epidemiologii*, 100, 2019, s. 75-81.
- Cheung N., Mitchell P., Wong T.Y., *Diabetic retinopathy*, *Lancet*, 376(9735), 2010, s. 124-136.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). National diabetes fact sheet, *National estimates and general information on diabetes in the United States*, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, <https://www.cdc.gov/diabetes/pubs/pdf/methods11.pdf> [data dostępu: 1.12.2022].
- Chudek J., Wikarek T., Więcek A., *Epidemia przewlekłej choroby nerek w populacji osób w podeszłym wieku jako nakładanie się procesu fizjologicznego starzenia i nabytych uszkodzeń nerek*, *Forum Nefrologiczne*, 6(1), 2013, s.1-8.
- Mazzone T., Chait A., Plutzky J., *Addressing cardiovascular disease risk in diabetes. Insights from mechanistic studies*, *Lancet*, 371(9626), 2008, s. 1800-1809.
- Zegarska P., Brzozowska N., Bandykowska M., Mędrak E., *Cukrzyca, otyłość i przewlekłe nadciśnienie tętnicze jako czynniki ryzyka stanu przedcukrzycowego w ciąży*, [w:] Danielewska A., Młodoch-Mendoń I. (red.), *Choroby XXI wieku – diagnostyka, profilaktyka i leczenie*, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, Lublin 2022, s. 144-151.
- Kudiyirickal M.G., Pappachan J.M., *Diabetes mellitus and oral health*, *Endocrine*, 49(1), 2015, s. 27-34.
- Wierusz-Wysocka B., *Postępy w zakresie rozpoznawania i leczenia cukrzycy*, *Family Medicine & Primary Care Review*, 8(3), 2006, s. 1196-1203.
- Tatoń J., Czech A. (red.), *Diabetologia*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2001, s. 101-105.
- Mędrak E., Koseska K., Zegarska P., Gromadzka G., *Cukrzyca MODY. Heterogenność genetyczna, metaboliczna i kliniczna*, [w:] Danielewska A., Młodoch-Mendoń I. (red.),

- Choroby XXI wieku – diagnostyka, prewencja i leczenie*, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, Lublin 2022, s. 137-142.
15. Kłos A., Tomczak A., Kłos K., Kęska A., Bertrandt J., *Ocena stanu odżywienia oraz zachowań żywieniowych studentów Akademii Wychowania Fizycznego Józefa Piłsudskiego w Warszawie*, Bromatologia i Chemia Toksykologiczna, 2, 2016, s. 138-144.
 16. Huk-Wieliczuk E., *Ocena nawyków żywieniowych i aktywności fizycznej studentów polskich i hiszpańskich w kontekście profilaktyki chorób cywilizacyjnych*, Rozprawy Społeczne, 15(2), 2021, s. 84-99.
 17. Mohammadbeigi A., Asgarian A., Moshir E., Heidari H., Afrashteh S., Khazaei S., Ansari H., *Fast food consumption and overweight/obesity prevalence in students and its association with general and abdominal obesity*, Journal of Preventive Medicine and Hygiene, 4(3), 2018, s. 236-240.
 18. Kłosiewicz-Latoszek L., *Cukrzyca*, [w:] Jarosz M. (red.), *Dietetyka. Żywność, żywienie w prewencji i leczeniu*, Instytut Żywności i Żywienia, Warszawa 2016, s. 366-377.
 19. Polskie Towarzystwo Diabetologiczne, *Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę 2013. Stanowisko Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego*, Diabetologia Kliniczna, 4, 2015, s. 1-73.
 20. Livesey G., Taylor R., Livesey H., Buyken A., Jenkins D., Augustin L., Sievenpiper J.L., BarLiu S., Barclay A., Wolever T., Willett W.C., Brighenti F., Salas-Salvadó J., Björck I., Rizkalla S.W., Riccardi G., Vecchia C.L., Ceriello A., Trichopoulou A., Poli A., Astrup A., Kendall C.W.C., Ha M.A., Baer-Sinnott S., Brand-Miller J., *Dietary Glycemic Index and Load and the Risk of Type 2 Diabetes. A Systematic Review and Updated Meta-Analyses of Prospective Cohort Studies*, Nutrients, 11(6), 2019, s. 1280-1331.
 21. Żukowska-Szczechowska E., Kiszka B., *Niedobór witaminy D – rozpoznawanie i postępowanie w celu redukcji ryzyka sercowo-naczyniowego u chorych na cukrzycę*, Forum Zaburzeń Metabolicznych, 2, 2011, s. 151-157.
 22. Rybarczyk-Szwajkowska A., *Awareness of civilization diseases threat amongst students – international comparative research*, Journal of Health Policy, Insurance and Management – Polityka Zdrowotna, 13(3), 2013, s. 119-132.
 23. Kurpas D., Kern J.B., Jacquet J.P., Randall-Smith J., Mroczek B., *Programy promocji zdrowia i profilaktyki chorób – przykłady z Europy i USA*, Fam Med & Prim Care Review, 17(2), 2015, s. 152-156.
 24. Schwingshackl L., Schlesinger S., Devleeschauwer B., Hoffmann G., Bechthold A., Schwedhelm K., Iqbal K., Knüppel S., Boeing H., *Generating the evidence for risk reduction. A contribution to the future of food-based dietary guidelines*, Proceedings of the Nutrition Society, 77(4), 2018, s. 1-13.
 25. Stults-Kolehmainen M.A., Sinha R., *The effects of stress on physical activity and exercise*, Sports Medicine, 44(1), 2014, s. 81-121.
 26. Niebisz A.B., Jasik M., Karnafel W., *Rola diety i zmiany stylu życia w leczeniu cukrzycy typu 2 u osoby z zespołem metabolicznym*, Diabetologia Praktyczna, 7(2), 2006, s. 138-141.
 27. Cohen B.E., Panguluri P., Na B., Whooley M.A., *Psychological risk factors and the metabolic syndrome in patients with coronary heart disease. Findings from the Heart and Soul Study*, Psychiatria, 175, 2010, s. 133-137.
 28. Gibała M., Jankowski G., *Wpływ stylu życia na zapobieganie oraz przebieg cukrzycy*, Pielęgniarstwo i Zdrowie Publiczne, 6(1), 2016, s. 63-67.
 29. World Health Organization, *The world health report 2002. Reducing risk, promoting health life*, Geneva 2002, s. 7-14.
 30. Zanuso S., Jimenez A., Pugliese G., Corigliano G., Balducci S., *Exercise for the management of type 2 diabetes. A review of the evidence*, Acta Diabetologica, 47(1), 2010, s. 15-22.

31. Zielińska K., Bysiak-Korus D., Sosna-Kondera A., Banaś E., Bosowska K., Strojek K., *Ocena częstości występowania hipoglikemii w zależności od aktywności fizycznej*, Clinical Diabetology, 2, 2018, s. 108-113.
32. Bronas U.G., Treat-Jacobson D., Painter P., *Alternatywne formy aktywności fizycznej jako terapia uzupełniająca w prewencji i leczeniu cukrzycy typu 2*, Diabetologia po Dyplomie, 1, 2010, s. 26-31.

Wiedza studentów AWF o cukrzycy typu 2

Streszczenie

Wprowadzenie. Cukrzyca typu 2 to obecnie najczęściej występujący typ cukrzycy. Jest istotnym, nierozwiązanym problemem zdrowia publicznego w Polsce. Liczba dotkniętych tą chorobą szybko rośnie, a szczególnie wśród dzieci i młodych dorosłych do 40. roku życia. W celu jej ograniczenia podejmowane są działania edukacyjne i profilaktyczne.

Cel pracy. Przedstawienie wiedzy w zakresie wybranych aspektów cukrzycy u studentów AWF – tej grupy młodych ludzi, którzy ze względu na specyfikę kierunku studiów – są bardziej aktywni fizycznie niż ich rówieśnicy z innych uczelni.

Materiał i metody. Badaniem objęto 130 osób w wieku od 19 lat do 23 lat studiujących na kierunku wychowanie fizyczne w Akademii Wychowania Fizycznego Józefa Piłsudskiego w Warszawie Filii w Białej Podlaskiej. Mężczyźni stanowili większość badanych (75,4%). Respondenci wypełniali autorski kwestionariusz ankiety zawierający pytania dotyczące czynników ryzyka cukrzycy, znajomości wybranych wskaźników diagnostycznych – prawidłowego stężenia glukozy we krwi, ciśnienia tętniczego krwi, normy hemoglobiny glikowanej (HbA1c), a także najbardziej zalecanych form aktywności fizycznej w profilaktyce cukrzycy typu 2. Badania przeprowadzono w roku akademickim 2021/2022. Zebrany materiał empiryczny poddano analizie statystycznej za pomocą testu niezależności chi-kwadrat. Przyjęto poziom istotności $p < 0,05$.

Wyniki. Prawie wszyscy respondenci uważali, że nawyki żywieniowe są istotnymi determinantami ryzyka cukrzycy typu 2. Znaczny odsetek badanych uważał, że dieta bogata w produkty spożywcze o wysokim indeksie glikemicznym i wysokim ładunku glikemicznym są czynnikami sprzyjającymi powstaniu u człowieka cukrzycy typu 2. Co piąty uczestnik badania wskazywał niedobór witaminy D. Zdaniem prawie 74% respondentów i ponad 81% respondentek wiek osoby jest determinantą zachorowalności na cukrzycę typu 2. Wybrane elementy stylu życia (stres, sięganie po używki typu tytoń i napoje alkoholowe) i jednostki chorobowe (nadwaga i otyłość, szczególnie otyłość typu androidalnego, choroby układu krążenia, cukrzyca ciążowa, infekcje wirusowe i zespół policystycznych jajników) przyczyniają się do wystąpienia cukrzycy typu 2. Większy odsetek kobiet niż mężczyzn wskazywał na predyspozycje genetyczne w zakresie tej jednostki chorobowej, odpowiednio: 65,6% i 45,5%. Tylko 11,5% ogółu studentów znało normę hemoglobiny glikowanej (HbA1c). Respondenci za najbardziej zalecane formy aktywności fizycznej w profilaktyce cukrzycy typu 2 uznali: jazdę na rowerze, pływanie i nordic walking oraz jogę (kobiety istotnie częściej niż mężczyźni).

Wnioski. Badana młodzież akademicka posiada zróżnicowaną wiedzę na temat modyfikowalnych czynników ryzyka cukrzycy typu 2. Ze względu na zagrożenie tą chorobą cywilizacyjną istnieje potrzeba edukowania młodych ludzi w zakresie etiologii i roli aktywności fizycznej w jej profilaktyce.

Słowa kluczowe: wiedza, studenci, cukrzyca, czynniki ryzyka

AWF students' knowledge about type 2 diabetes mellitus

Abstract

Background. Type 2 diabetes is currently the most common type of diabetes. It is a significant, unresolved public health problem in Poland. The number of people affected by this disease is growing rapidly, especially among children and young adults under 40 years of age. Educational and preventive measures are being taken to reduce its prevalence.

Aim of the study. To present knowledge on selected aspects of diabetes among students of the Academy of Physical Education (AWF), the group of young people who, due to the nature of their field of study, are more physically active than their peers from other universities.

Material and Methods. The study involved 130 students of physical education at the Józef Piłsudski Academy of Physical Education in Warsaw, Biała Podlaska Branch, aged 19-23 years. Men made up the majority of the respondents (75.4%). The Respondents completed a proprietary survey questionnaire which included

questions about diabetes risk factors, knowledge of selected diagnostic indicators (normal blood glucose levels, blood pressure, normal glycated haemoglobin (HbA1c) and the most recommended forms of physical activity in prevention of type 2 diabetes. The study was conducted during the academic year 2021/2022. The collected empirical material was analysed statistically using the chi-square test of independence. The significance level of $p < 0.05$ was adopted.

Results. Almost all respondents believed that dietary habits were important determinants of type 2 diabetes risk. A significant proportion of respondents believed that a diet rich in foods with a high glycaemic index and a high glycaemic load were factors contributing to a person's onset of type 2 diabetes. One in five survey participants indicated vitamin D deficiency. According to almost 74% of the respondents and more than 81% of the female respondents, the age of the person is a determinant of the incidence of type 2 diabetes. Selected lifestyle elements (such as stress, use of stimulants such as tobacco and alcoholic beverages) and disease entities (such as overweight and obesity, especially android obesity, cardiovascular disease, gestational diabetes, viral infections and polycystic ovary syndrome) will contribute to the onset of type 2 diabetes. The higher percentage of women than men indicated a genetic predisposition for this disease entity, 65.6% and 45.5% respectively. Only 11.5% of the total number of students knew the glycated haemoglobin (HbA1c) standard. Respondents considered cycling, swimming and Nordic walking or yoga to be the most recommended forms of physical activity for the prevention of type 2 diabetes (women significantly more often than men).

Conclusions. The surveyed university adolescents have varied knowledge of the modifiable risk factors for type 2 diabetes. Due to the threat of this civilization disease, there is a need to educate young people about the etiology of this disease and the role of physical activity in its prevention.

Keywords: knowledge, students, diabetes, risk factors

Zaburzenia lipidowe w przebiegu chorób metabolicznych na przykładzie cukrzycy typu 2 i niedoczynności tarczycy

1. Wprowadzenie

Choroby metaboliczne to coraz bardziej rozpowszechniony problem o szerokim zakresie powikłań, które w konsekwencji mogą prowadzić nawet do zgonu. Na tym etapie można mówić już o epidemii chorób metabolicznych. Są one wywołane zaburzeniem procesów przemian metabolicznych stanowiących podstawę prawidłowego funkcjonowania organizmu. Procesy te obejmują szereg reakcji chemicznych, gdzie każdy otrzymany produkt jest substratem w kolejnej reakcji. Procesy są odpowiedzialne za syntezę nowych związków, m.in. węglowodanów, białek, tłuszczów (anabolizm), lub ich degradację (katabolizm).

W przypadku, gdy zaburzenie dotyczy szlaków metabolicznych lipidów, wywołana choroba nosi miano dyslipidemii. Kiedy jest ona wywołana połączeniem predyspozycji genetycznych z czynnikami środowiskowymi, jak np. dieta wysokotłuszczowa czy nadmierne spożywanie alkoholu, mówi się o dyslipidemii pierwotnej. Dyslipidemia jest jednak możliwa do zaobserwowania jako objaw w przypadku takich chorób jak m.in. cukrzyca typu 2 czy też niedoczynność tarczycy – jest to wtedy dyslipidemia wtórna. W pracy przedstawiono problem zaburzeń gospodarki lipidowej w przebiegu tych chorób. Dyslipidemia dotyczy przede wszystkim: cholesterolu o niskiej gęstości (LDL-C, ang. *low-density lipoprotein cholesterol*), cholesterolu o wysokiej gęstości (HDL-C, ang. *high-density lipoprotein cholesterol*) oraz trójglicerydów we krwi.

Celem niniejszej pracy jest przybliżenie problemu, jakim jest dyslipidemia wtórna w przebiegu cukrzycy typu 2 i niedoczynności tarczycy, a także podniesienie świadomości ryzyka, jakie stanowi dla naszego zdrowia. Dyslipidemię uznaje się za główny czynnik chorób układu krążenia takich jak m.in. miażdżycy – powstająca wskutek tworzenia się blaszek miażdżycowych w wyniku nadmiaru odkładanego cholesterolu w naczyniach krwionośnych, choroba niedokrwienna serca i zatorowość płucna. Dlatego istotna jest szybka diagnoza oraz wprowadzenie profilaktyki.

Praca ta stanowi wprowadzenie do przyszłych badań nad lipidomiką wybranych narządów w zwierzęcym modelu cukrzycy, skupiających się na szerszym zakresie grup lipidów. Lipidomika jest dziedziną nauki zajmującą się badaniem profili lipidowych oraz czynników reagujących z lipidami w całym organizmie [1]. Dalsze badania nad lipidomiką mogą prowadzić do odkrycia nowych szlaków lipidowych w tkankach, co w przyszłości może przyczynić się do opracowania nowych metod w terapii zarówno dyslipidemii, jak i chorób współistniejących.

¹ ada.kryska@gmail.com, Samodzielna Pracownia Spektroskopii i Obrazowania Chemicznego, Wydział Biomedyczny, Uniwersytet Medyczny w Lublinie.

² maryna.khalavka@umlub.pl, Samodzielna Pracownia Spektroskopii i Obrazowania Chemicznego, Wydział Biomedyczny, Uniwersytet Medyczny w Lublinie; marinakhalavka@gmail.com, Department of Industrial Technology of Drugs, National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine.

2. Metabolizm a choroby metaboliczne

Metabolizm to ogół przemian metabolicznych stanowiących podstawę utrzymania homeostazy w organizmie. Można je podzielić na dwie kategorie: reakcje anaboliczne i reakcje kataboliczne. Anabolizm to grupa reakcji chemicznych odpowiedzialnych za syntezę nowych związków, gdzie katabolizm jest odpowiedzialny za ich degradację [2].

Gdy w organizmie dochodzi do zaburzenia przebiegu tych procesów, prowadzi to do bardzo rozległych zmian w funkcjonowaniu organizmu, które to zmiany stanowią grupę chorób metabolicznych. Obecnie do najczęściej występujących chorób metabolicznych zalicza się cukrzycę typu 2 oraz niedoczynność tarczycy [3, 4]. Są one wywołane nieprawidłowym wydzielaniem hormonu trzustkowego – insuliny (cukrzyca typu 2) oraz hormonów tarczycy – m.in. tyroksyny (niedoczynność tarczycy), które mają istotny wpływ na gospodarkę lipidową w organizmie [5, 6].

Hormony te są wydzielane poprzez narządy układu dokrewnego. Insulina, wydzielana przez komórki β wysp Langerhansa trzustki, jest hormonem białkowym, którego działanie może być zróżnicowane. W wątrobie wpływa na aktywność enzymów biorących udział w procesach metabolicznych, w tkance mięśniowej może wpływać na skład protein odpowiedzialnych za transport glukozy natomiast w mózgu nie ma żadnego wpływu na metabolizm [3]. Hormony tarczycy natomiast zwiększają ekspresję genu ATPazy Na^+/K^+ w tkankach, co prowadzi do zwiększonego zużycia tlenu, zwiększonej częstości oddychania i temperatury ciała. Może to również indukować syntezę lipidów lub ich rozpad. Hormony tarczycy stymulują również metabolizm węglowodanów i anabolizm białek [4].

3. Dyslipidemia

Dyslipidemia dzieli się na dyslipidemię pierwotną oraz wtórną. Postać pierwotna wywołana jest głównie czynnikami genetycznymi. Pierwszym etapem w kierunku leczenia dyslipidemii pierwotnej jest zmiana trybu życia i nawyków żywieniowych [7]. Przede wszystkim ważne jest rozpoczęcie diety niskotłuszczowej oraz wprowadzenie aktywności fizycznej. Ponadto ograniczenie stosowania używek takich jak alkohol czy papierosy również jest wysoce zalecane. Dyslipidemia wtórna natomiast stanowi ok. 30-40% wszystkich przypadków i występuje w sytuacji istnienia innych chorób takich jak niedoczynność tarczycy, cukrzyca typu 2 czy też przewlekła niewydolność nerek (tab. 1) [8]. Z tego powodu leczenie tych chorób jest jednoznaczne z leczeniem dyslipidemii wtórnej.

Diagnoza dyslipidemii polega na oznaczeniu poziomu lipidów we krwi (cholesterol całkowity, trójglicerydy, HDL, LDL) [6]. Opracowanych jest wiele metod pomiaru poziomu cholesterolu we krwi. Metody te można podzielić na trzy główne kategorie: klasyczne metody chemiczne oparte na protokole Abell-Kendalla, powszechnie stosowane w zestawach testowych fluorymetryczne i kolorymetryczne testy enzymatyczne oraz instrumentalne metody analityczne – takie jak chromatografia gazowa i cieczowa lub spektrometria mas [9]. Obecnie jako dwie referencyjne procedury pomiarowe cholesterolu we krwi zostały wyznaczone: spektrometria mas z rozcieńczeniami izotopowymi sprzężona z chromatografią gazową (GC/ID-MS, ang. *gas chromatography/isotope dilution mass spectrometry*) i zmodyfikowany protokół Abell-Kendalla [4]. Protokół Abell-Kendalla to wieloetapowa klasyczna metoda chemiczna polegająca na zmydleniu estrów cholesterolu przez wodorotlenek potasu, ekstrakcję heksanem i kolorymetrię za

pomocą bezwodnika octowego kwasu siarkowego [10]. Natomiast metoda GC/ID-MS polega na dodaniu do próbki mieszanin kalibracyjnych o znanym stężeniu cholesterolu oraz cholesterolu oznakowanego izotopowo. Kwantyfikacja opiera się na obliczeniu stosunku powierzchni pików odpowiadającego nieznakowanemu oraz znakowanemu cholesterolowi dla nieznannej próbki i porównaniu go ze stosunkami obliczonymi dla mieszanek kalibracyjnych [9]. Obecnie na rynku dostępne są również aparaty komercyjne pozwalające na oznaczenie cholesterolu, trójglicerydów, a nawet glukozy z krwi włośniczkowej [10]. Niekontrolowany stan dyslipidemii może powodować inne poważne problemy zdrowotne, takie jak choroba wieńcowa i choroba tętnic obwodowych, co może skutkować poważnymi konsekwencjami w postaci zawału serca, udaru mózgu lub nawet zgonu [6, 11-13].

W badaniu J.B. Echouffo-Tcheugi z 2021 roku zostały przeanalizowane dane z badania Look AHEAD (*Action for Health in Diabetes*). W badaniu zostały wykorzystane dane dotyczące poziomu trójglicerydów i cholesterolu HDL u 4199 osób dorosłych z nadwagą i otyłych ze stwierdzoną cukrzycą typu 2, a bez stwierdzonych chorób sercowo-naczyniowych na początku badania (2001–2004). Wśród uczestników 40% (n = 1659) osób miało stwierdzoną dyslipidemię. W okresie obserwacji, który trwał ok. 9,5 roku, u 396 uczestników wystąpiły objawy związane z chorobą wieńcową, a u 100 uczestników – udar. W badaniu powiązано niski poziom HDL z większym ryzykiem wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych i choroby wieńcowej. W porównaniu z pacjentami z prawidłowym stężeniem trójglicerydów i prawidłowym HDL uczestnicy z dyslipidemią mieli wyższe ryzyko wystąpienia powikłań [14].

Przeprowadzono także badania mające na celu porównanie bioaktywności krążących mikrocząstek (MP, ang. *microparticles*) wyizolowanych z *Psammomys obesus* (*P. obesus* – piaskówka tłusta z rodziny myszowatych), uwalnianych w przebiegu dyslipidemii. Zwierzęta podzielono na dwie grupy. Grupa badawcza była karmiona dietą wysokoenergetyczną (HED, ang. *high energy diet*) w celu wyindukowania dyslipidemii, natomiast grupa kontrolna karmiona była normalną dietą (ND, ang. *normal diet*). Po upływie 12 tygodni od zwierząt pobrano próbki krwi, z których następnie wyizolowano MP. Mikrocząstki są uwalniane przez pączkowanie z błony plazmatycznej i przenoszą specyficzne antygeny ze swoich pierwotnych komórek. MP to pęcherzyki pochodzące z błon plazmatycznych komórek w odpowiedzi na bodziec aktywujący lub apoptozę. W badaniach oceniono reaktywność naczyniową pierścieni aorty za pomocą miografii – po 24 godzinach inkubacji pod nieobecność lub w obecności krążących MP izolowanych przez wirowanie różnicowe z osocza zwierząt poddanych działaniu HED (MPsHED) lub ND (MPsND) przez 12 tygodni. Leczenie za pomocą MPsND lub MPsHED wywołało znaczące zmniejszenie maksymalnego rozluźnienia wywołanego przez acetylocholinę, co spowodowało upośledzenie funkcji śródbłonka. Wyniki wskazują, że zarówno MPsND, jak i MPsHED wykazywały znaczący wpływ na homeostazę naczyniową związaną z relaksacją naczyń. Działaniu wyizolowanymi MPsHED lub MPsND poddano również ludzkie komórki śródbłonka żyły pępowinowej (HUVEC, ang. *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) przez 24 godziny, następnie zostały one poddane: barwieniu immunofluorescencyjnemu kaweoliną-1 (cav-1, ang. *caveolin 1*), działaniu międzykomórkowej cząsteczki adhezyjnej-1 (ICAM-1, ang. *intercellular adhesion molecule 1*) i śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS, ang. *endothelial nitric oxide synthase*), barwieniu F-aktyną i detekcji reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen*

spiecies). Wcześniejsze badania sugerowały, że MP indukowały dysfunkcję naczyniową przydatków, zwiększając zarówno uwalnianie ROS, jak i NO. W tym badaniu określono, czy ekspozycja HUVEC na MPshED przez 24 godziny wpłynęła na ekspresję eNOS i produkcję ROS w porównaniu z MPshND. Wyniki wykazały znaczącą różnicę między wpływem MPshND i MPshHE w ekspresji eNOS. Zauważono, że MPshED znacznie zmniejszył ekspresję eNOS – do ok 25%, a także zwiększył produkcję ROS do ok 75% na HUVEC. Wyniki te wykazały, że MPshED są związane z dysfunkcją śródbłonna z powodu zmniejszonej ekspresji eNOS i zwiększonego uwalniania ROS. Ponadto MPshND i MPshED mogą mieć zróżnicowany wpływ na ekspresję niektórych białek śródbłonna. Zbadano, czy MPshND i MPshED wpływały na ekspresję cav-1, ICAM-1 i organizację F-aktyny. MPshND i MPshED wywołały zróżnicowany wpływ na ekspresję cav-1 i ICAM-1 w śródbłonku. MPshND znacznie zwiększyło ekspresję cav-1 bez żadnego wpływu na ekspresję ICAM-1, gdzie MPshED znacząco zmniejszył ekspresję cav-1 – o ok. 50%, a ok. 200% podniósł ekspresję ICAM-1. Zarówno MPshND, jak i MPshED nie wpłynęło na organizację cytoszkieletu HUVEC obserwowaną przez F-aktynę. Wyniki te wykazały specyficzny dla diety wpływ krążących MP na ekspresję białek śródbłonna. W niniejszym badaniu opisano związek między dyslipidemią i ich potencjalnym działaniem na homeostazę naczyniową za pośrednictwem MP. Wyniki wskazują na podwójną funkcję krążących MP, regulujących ekspresję niektórych białek śródbłonna i rozważających MP jako wektor informacji biologicznej uwalnianej przez komórki naczyniowe. Badanie to dodaje nowe aspekty do zrozumienia złożoności wiadomości biologicznych niesionych MP, pokazuje również konieczność zagłębienia się w temat dyslipidemii i konsekwencji, jakie ona powoduje [15].

Tabela 1. Powody występowania dyslipidemii wtórnej wraz z przedstawionym zaburzeniem poziomu lipidów

	Choroba	Cholesterol	Trójglicerydy
1	Niedoczynność tarczycy	↑	-
2	Zespół nerczycowy	↑	↑
3	Przewlekła choroba nerek	-	↑
4	Pierwotne zapalenie dróg żółciowych	↑	-
5	Żółtaczką zaporową	↑	-
6	Cukrzyca	↑	↑
7	Otyłość	-	↑
8	Zespół Cushinga	↑	↑
9	Guz chromochłonny	↑	↑
10	Stosowanie używek	Zależne od substancji	
11	Nadużycie alkoholu	-	↑
12	Palenie tytoniu	-	↑

Źródło: opracowane własne na podstawie [8].

4. Cukrzyca typu 2

Cukrzyca typu 2 (T2DM, ang. *type 2 diabetes mellitus*) jest zaliczana do grona chorób cywilizacyjnych. Dane z 2019 roku podają, że liczba osób chorujących na cukrzycę wynosiła ponad 400 milionów, z czego ok. 90% odnosiło się do T2DM [16]. Ryzyko wystąpienia T2DM u osób z cukrzycą w wywiadzie rodzinnym jest od pięciu do dziesięciu razy wyższe niż u osób bez czynnika genetycznego, jednak patogenezą T2DM jest połączeniem zarówno uwarunkowań genetycznych, jak i środowiskowych, a zatem

konieczna jest również obecność elementu wyzwalającego. Ryzyko wystąpienia T2DM również wzrasta u osób otyłych mało aktywnych fizycznie i z zaburzonymi nawykami żywieniowymi takimi jak nadmierna kaloryczność posiłków lub spożywanie żywności wysoko przetworzonej [17]. T2DM spowodowana jest połączeniem wytworzenia oporności komórek na insulinę (insulinooporność) z możliwą dysfunkcją komórek β wysp trzustkowych powodujących zaburzenie wydzielania insuliny. Względny bądź całkowity brak wydzielania insuliny w konsekwencji prowadzi do przewlekłej hiperglikemii [18]. W odpowiedzi na wchłanianie glukozy w układzie pokarmowym i podniesienie jej stężenia we krwi krążącej – trzustka zwiększa produkcję insuliny, której zadaniem jest umożliwienie transportu glukozy z krwi do komórek. Prowadzi to do obniżenia poziomu glukozy we krwi obejmującego zahamowanie endogennej produkcji glukozy, zahamowania lipolizy, wychwytu komórkowego dostępnej glukozy w osoczu i zwiększonej syntezy glikogenu [19, 20]. W przypadku przewlekłego dostarczania nadmiernej ilości substancji energetycznych, w tym również glukozy, w odpowiedzi produkcja insuliny jest również przewlekłe zwiększona. Z czasem powoduje to zmniejszenie wrażliwości receptorów insulinowych w komórkach i wywołuje oporność tych komórek na insulinę, czyli insulinooporność, jak również dochodzi do zmniejszenia wydzielania insuliny w wyniku „przemęczenia” trzustki jej nadprodukcją [21].

Nieleczona T2DM może prowadzić do takich powikłań jak: neuropatia, retinopatia, nefropatia czy też miażdżyca. Pierwszym etapem leczenia T2DM jest wprowadzenie zdrowej diety, aktywności fizycznej oraz zmniejszenie masy ciała. Leczenie farmakologiczne jest wprowadzane w przypadku, gdy zmiana stylu życia nie przynosi efektów. Najbardziej popularną substancją leczniczą przy T2DM jest metformina [22, 23].

5. Niedoczynność tarczycy

Niedoczynność tarczycy, podobnie jak T2DM, jest jedną z najczęściej występujących chorób. Choruje na nią ok. 5% populacji światowej, z czego kolejne 5% może pozostawać niezdiagnozowane [24]. Niedoczynność tarczycy charakteryzuje się zaburzeniem wydzielania hormonów tarczycy (TH, ang. *thyroid hormones*) takich jak trijodotyronina (T_3) i tyroksyna (T_4) [25]. Dzieli się ją na niedoczynność pierwotną i wtórną. Istnieje wiele przyczyn niedoczynności tarczycy, między innymi może to być niedobór jodu, przewlekłe autoimmunologiczne zapalenie tarczycy (przewlekłe limfocytowe zapalenie tarczycy – choroba Hashimoto) czy też tyreoidektomia, czyli chirurgiczne usunięcie tarczycy [26]. Objawami niedoczynności tarczycy może być zwiększenie masy ciała, zmęczenie, nieregularności menstruacyjne, a w przypadku braku leczenia mogą również wystąpić choroby układu krążeniowego [26, 27]. Obniżony poziom hormonów tarczycy powoduje odpowiedź przysadki mózgowej w postaci nadmiernej produkcji hormonu tyreotropowego (TSH, ang. *thyroid stimulating hormone*), dlatego w celu diagnozy niedoczynności tarczycy stosuje się badanie zarówno poziomu wolnej tyroksyny, jak i poziomu TSH we krwi [28]. Nie zawsze jednak w badaniu ukaże się obniżony poziom TH. Niedoczynność tarczycy można bowiem podzielić na postać kliniczną, w której zmienia się zarówno poziom tyreotropiny, jak i tyroksyny, oraz postać subkliniczną (inaczej utajniona, łagodna niedoczynność tarczycy), w której poziom TSH jest podwyższony, jednak poziom wolnej tyroksyny pozostaje w normie [25]. Najbardziej popularna metoda leczenia obejmuje suplementację lewotyroksyny (LT_4 , ang. *levotyroxine*) [13, 14]. Uniwersalne podejście terapeutyczne z monoterapią LT_4 opiera się na założeniu,

w którym T₄ przekształca się w hormon T₃ w tkankach obwodowych poprzez dejodynazę typu 2. Zabieg ten ma na celu normalizację poziomów krążących T₄ oraz T₃ już po jednej dziennej dawce LT₄ [24, 26, 29].

6. Dyslipidemia wtórna

6.1. Dyslipidemia w cukrzycy typu 2

Dyslipidemia pojawia się u pacjentów z T2DM nawet w ok. 80% przypadków. Z tego względu ryzyko wystąpienia chorób układu krążenia znacząco wzrasta [30]. Zaburzenia lipidowe w przebiegu T2DM objawiają się przede wszystkim podwyższonym poziomem VLDL (lipoproteiny o bardzo niskiej gęstości, ang. *very low density lipoproteins*), LDL oraz trójglicerydów, a także obniżonym poziomem HDL i są one ściśle związane z zaburzonym wydzielaniem insuliny oraz insulinoopornością (tab. 2) [31, 32].

Tabela 2. Zmiany poszczególnych rodzajów lipidów w przebiegu cukrzycy typu 2

Rodzaj lipidu	Zmiana
Trójglicerydy	↑
Lipoproteiny bogate w trójglicerydy	↑
Cholesterol poposiłkowy	↑
Apolipoproteina B (ApoB)	↑
LDL	↑
sdLDL	↑
Apolipoproteina C (ApoC)	↑
Lipidy glikowane	↑
Apolipoproteina A (ApoA)	↓
HDL	↓

Źródło: opracowanie własne na podstawie [33].

W przebiegu T2DM nie ma jednego mechanizmu powodującego dyslipidemię. Jednym z nich jest zmiana aktywności lipazy wątrobowej. Wzrost tej aktywności powoduje przyspieszony metabolizm cząsteczek HDL, przyczyniając się do spadku ich ilości [33]. Ponadto cząsteczki HDL mogą ulegać modyfikacjom strukturalnym, co z kolei prowadzi do ich dysfunkcji i wywołuje stany zapalne. Przewlekłe zapalenie zwiększa poziom amyloidu A w surowicy w T2DM, co prowadzi do wypierania apolipoproteiny A i innych białek z powierzchni HDL, powodując jego zwiększony klirens [34].

Dyslipidemia cukrzycowa obejmuje również hipertriglicydemię (HTG, ang. *hypertriglyceridemia*), czyli zbyt wysoki poziom trójglicerydów we krwi, i jest ona kluczowa dla dyslipidemii w T2DM. Zaburzone wydzielanie glukozy, a zarazem utrata wrażliwości na insulinę prowadzi do kompensacyjnego wzrostu wydzielania insuliny, co powoduje zwiększoną produkcję lipoprotein o bardzo niskiej gęstości w wątrobie. Dlatego też można stwierdzić, że insulinooporność również wiąże się z zaburzeniami lipidowymi [32]. W T2DM ze względnym niedoborem insuliny podniesiony zostaje poziom wolnych kwasów tłuszczowych, które stymulują wątrobę do produkcji lipoprotein o bardzo niskiej gęstości. Krążące wolne kwasy tłuszczowe odgrywają istotną rolę w produkcji trójglicerydów i pochodzą głównie z tkanki tłuszczowej. Oporność na insulinę powoduje zwiększoną lipolizę, która uwalnia wolne kwasy tłuszczowe, zwiększając produkcję

trójglicerydów w wątrobie [35]. Insulinooporność powoduje również produkcję lipoprotein o bardzo niskiej gęstości poprzez zwiększenie aktywności wątrobowego mikrosomalnego białka transportującego trójglicerydy (MTP, ang. *microsomal triglyceride transfer protein*), które przenosi neutralne lipidy do powstającej apolipoproteiny B. Hipertriglicydemia dodatkowo jest wzmacniana przez zmniejszoną konwersję VLDL do LDL w wyniku zmniejszonej aktywności lipazy lipoproteinowej [36].

Osoby cierpiące na T2DM są również w grupie zwiększonego ryzyka hipertriglicydemii poposiłkowej. HTG poposiłkowe jest wywołane głównie zwiększoną produkcją resztkowych lipoprotein bogatych w trójglicerydy oraz ich zmniejszonym katabolizmem. Jest to kolejny czynnik zwiększający ryzyko wystąpienia chorób układu krążenia [37, 38].

6.2. Dyslipidemia w niedoczynności tarczycy

Niedoczynność tarczycy charakteryzuje się podwyższonym poziomem TSH oraz obniżonym poziomem T_4 , a w przypadku niedoczynności subklinicznej – wyłącznie podwyższonym poziomem TSH. Zarówno TSH, jak i TH mają wpływ na metabolizm lipidów. W przebiegu niedoczynności tarczycy obserwuje się wzrost cholesterolu ogólnego i trójglicerydów oraz LDL, a także spadek HDL [39, 40].

Hormony tarczycy podwyższają syntezę cholesterolu poprzez zwiększenie ekspresji reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylokoenzymu A (HMG-CoA) w wątrobie. Ponadto wpływ T_3 na regulację SREBP-2 (ang. *sterol regulatory element-binding protein-2*) powoduje zmniejszenie powierzchni komórek receptorowych cholesterolu LDL, co prowadzi do zmniejszenia klirensu cholesterolu LDL w osoczu i zwiększonego stężenia ApoB. TH wpływają również na metabolizm cholesterolu poprzez zmianę aktywności lipazy wątrobowej i lipoproteinowej oraz aktywności receptora LDL w wątrobie, co powoduje utrudnione wydalanie cholesterolu i trójglicerydów z osocza [24, 42]. Podobnie jak w przypadku T2DM, także i w niedoczynności tarczycy rośnie poziom sdLDL (ang. *small, dense low-density lipoproteins*), który z uwagi na mniejszy rozmiar od LDL łatwiej penetruje ściany tętnicy. Ze względu na mniejsze powinowactwo do receptorów LDL ma również przedłużony okres półtrwania w osoczu i większą podatność na proces glikacji i oksydacji. To powoduje, że podwyższony poziom sdLDL zwiększa ryzyko wystąpienia aterosclerozy bardziej niż podwyższony poziom LDL [42, 43].

Badania wykazały, że ekspresja genu TSH β koreluje z ekspresją mobilizacji wolnych kwasów tłuszczowych (FFA, ang. *free fatty acids*). TSH zwiększa poziom lipazy wrażliwej na hormony, co zwiększa lipolizę, a to prowadzi do wzrostu poziomu krążących FFA w organizmie. TSH może również spowodować wzrost ApoB [44-46].

Zaobserwowano, że w przypadku poprawy poziomu TSH i TH – poprawiają się również wyniki lipidogramu we krwi. Można zatem potwierdzić, iż systematyczna kontrola stanu zdrowia w przebiegu niedoczynności tarczycy poprawia także stan zdrowia w kontekście dyslipidemii [41, 44].

Wpływ subklinicznej niedoczynności tarczycy na poziom lipidów nie jest jeszcze do końca znany. Niektóre badania nie wykazały różnicy w poziomie lipidów wśród pacjentów z subkliniczną niedoczynnością tarczycy, podczas gdy inni stwierdzili znacznie wyższe poziomy całkowitego cholesterolu, trójglicerydów i LDL. Uważa się, że insulinooporność i palenie są możliwymi czynnikami zakłócającymi badania, ponieważ oba powodują wyższy wzrost cholesterolu w obecności niedoczynności tarczycy [45-47].

7. Wnioski

Powyższa praca miała na celu przedstawienie problematyki związanej z występowaniem zaburzeń gospodarki lipidowej w organizmie na przykładach niedoczynności tarczycy i cukrzycy typu 2. Dyslipidemia jest poważnym zagrożeniem dla zdrowia, a nawet życia, ze względu na ryzyko wystąpienia chorób układu naczyniowo-kръżeniowego, dlatego bardzo istotne jest jej szybkie wykrywanie i przeciwdziałanie. Ponadto występuje ona również jako następstwo innych chorób, m.in. cukrzycy typu 2 i niedoczynności tarczycy, a zatem zmiany w profilu lipidowym są związane ze zmianami w wydzielaniu hormonów takich jak np. insulina, tyreotropina i tyroksyna, natomiast przeciwdziałanie tym chorobom pozytywnie wpływa również na zaburzenia w gospodarce lipidowej.

Uwagi ogólne

Praca została zrealizowana w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki, projekt SONATA pt. „Synergia metod chemicznego obrazowania w modelu cukrzycy” (nr projektu: UMO-2020/39/D/ST4/01604).

Literatura

1. Wenk M.R., *The emerging field of lipidomics*, Nature Reviews, Drug Discovery, 4, 2005, s. 594-610.
2. Bańkowski E., *Biochemia. Podręcznik dla studentów uczelni medycznych*, Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2004.
3. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500006/> [data dostępu: 2.12.2022].
4. Silverthorn D.U., *Fizjologia człowieka. Zintegrowane podejście*, red. nauk. wyd. pol. Ponikowska B., Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2018.
5. O'Malley P.G., Arnold M.J., Kelley C., Spacek L., Buelt A., Natarajan S., Donahue M.P., Vagichev E., Ballard-Hernandez J., Logan A., Thomas L., Ritter J., Neubauer B.E., Downs J.R., *Management of dyslipidemia for cardiovascular disease risk reduction. Synopsis of the 2020 updated U.S. Department of Veterans Affairs and U.S. Department of Defence Clinical Practice guideline*, Annals of Internal Medicine, 173(10), 2020, s. 822-829.
6. Kopin L., Lowenstein C.J., *Dyslipidemia*, Annals of Internal Medicine, 167, 2017, s. 81-96.
7. Daryabor G., Atashzar M.R., Kabelitz D., Meri S., Kalantar K., *The effects of type 2 diabetes Mellitus on organ metabolism and immune system*, Frontiers in Immunology, 11, 2020.
8. Yanai H., Yoshida H., *Secondary dyslipidemia. Its treatments and association with atherosclerosis*, Global Health & Medicine, 3, 2021, s. 15-23.
9. Li L., Dutkiewicz E.P., Huang Y., Zhou H., Hsu C., *Analytical methods for cholesterol quantification*, Journal of Food and Drug Analysis, 27, 2019, s. 375-386.
10. Nakamura M., Iso H., Kitamura A., Imano H., Kiyama M., Yokoyama S., Kayamori Y., Koyama I., Nishimura K., Nakai M., Dasti M., Vesper H.W., Teramoto T., Miyamoto Y., *Total cholesterol performance of Abel-Levy-Brodie-Kendall reference measurement procedure. Certification of Japanese in-vitro diagnostic assay manufacturers through CDC's cholesterol reference method laboratory network*, Clinica Chimica Acta, 445, 2015, s. 127-132.
11. <https://diabetyk24.pl/accutrend-plus-mgdl- aparat-do- oznaczenia- glukozy- cholesterolu- trojglicerydow-i- kwasu- mlekowego> [data dostępu: 2.12.2022].
12. [ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560891/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560891/) [data dostępu: 28.11.2022].
13. Berberich A.J., Hegele R.A., *A modern approach to dyslipidemia*, Endocrine Reviews, 43, 2022, s. 611-653.

14. Kaze A.D., Santhanam P., Musani S.K., Ahima R., Echouffo-Tcheugui J.B., *Metabolic dyslipidemia and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes mellitus. Findings from the Look AHEAD study*, Journal of the American Heart Association, 10(14), 2021.
15. Ousmall M.E.F., Gaceb A., Khene M.A., Ainouz L., Giaimis J., Andriantsitohaina R., Martinez M.C., Baz A., *Circulating microparticles released during dyslipidemia may exert deleterious effects on blood vessels and endothelial function*, Journal of Diabetes and its Complications, 34, 2020.
16. World Health Organization, *Classification of diabetes mellitus*, WHO, 2019.
17. Zheng Y., Ley S.H., Hu F.B., *Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications*, Nature Reviews. Endocrinology, 151, 2017.
18. Kharroubi A.T., Darwish H.M., *Diabetes mellitus. The epidemic of the century*, World Journal of Diabetes, 6, 2015, s. 580-867.
19. Petersen M.C., Shulman G.I., *Mechanisms of insulin action and insulin resistance*, Physiological Reviews, 98, 2018, s. 2133-2223.
20. Samuel V.T., Shulman G.I., *The pathogenesis of insulin resistance. Integrating signaling pathways and substrate flux*, The Journal of Clinical Investigation, 126, 2016, s. 12-22.
21. Yaribeygi H., Farrokhi F.R., Butler A.E., Sahebkar A., *Insulin resistance. Review of the underlying molecular mechanisms*, Journal of Cellular Physiology, 234, 2019, s. 8152-8161.
22. Padhi S., Nayak A.K., Behera A., *Type II diabetes mellitus. A review on recent drug based therapeutics*, Biomedicine & Pharmacotherapy, 131, 2020.
23. Chaudhury A., Duvoor C., Dendi V.S.R., Kraleti S., Chada A., Ravilla R., Marco A., Shekhawat N.S., Montales M.T., Kuriakose K., Sasapu A., Beebe A., Patil N., Musham C.K., Lohani G.P., Mirza W., *Clinical review of antidiabetic drugs. Implications for type II diabetes mellitus management*, Frontiers in Endocrinology, 8, 2017.
24. Chiovato L., Magri F., Carle A., *Hypothyroidism in context. Where we've been and where we're going*, Advances in Therapy, 36, 2019, s. 47-58.
25. Taylor P.N., Albrecht D., Scholz A., Gutierrez-Buey G., Lazarus J.H., Dayan C.M., Okosieme O.E., *Global epidemiology of hyperthyroidism and hypothyroidism*, Nature Reviews. Endocrinology, 18, 2018, s. 301-316.
26. Robbins S.L., Kumar V., Cotran R.S., *Robbins Patologia*, red. wyd. pol. Olszewski W.T., Urban & Partner, Wrocław 2005, s. 831-833.
27. Perros P., van der Feltz-Cornelis Ch., Papini E., Nagy E.V., Weetman A.P., Hegedus L., *The enigma of persistent symptoms in hypothyroid patients treated with levothyroxine. A narrative review*, Clinical Endocrinology, 98(4), 2023, s. 461-468.
28. Jansen H.I., Boelen A., Heijboer A.C., Bruinstroop E., Fliers E., *Hypothyroidism. The difficulty in attributing symptoms to their underlying cause*, Frontiers in Endocrinology, 14, 2023.
29. Biondi B., *Persistent dyslipidemia in patients with hypothyroidism. A good marker for personalized replacement therapy?* Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 104, 2019, s. 624-627.
30. Padhy P.K., *Assesment of dyslipidemia in type II diabetes mellitus patients*, Journal of Advanced Medical and Dental Sciences Research, 7, 2019, s. 151-153.
31. Nelson A.J., Rochelau S.K., Nicholls S.J., *Managing dyslipidemia in type II diabetes*, Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, 47, 2017, s. 153-173.
32. Thambiah S.C., Lai L.C., *Diabetic dyslipidemia*, Practical Laboratory Medicine, 26, 2021.
33. Mancini G.B.J., Hegele R.A., Leiter L.A., *Dyslipidemia*, Canadian Journal of Diabetes, 42, 2018, s. 178-185.
34. Dhanya A.V., Karale S., Varkey P., Anil A., Abhijith K., *Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus (T₂DM). Pathophysiology, pattern and management*, IP International Journal of Comprehensive and Advanced Pharmacology, 4, 2019, s. 34-38.

35. Albai O., Roman D., Frandes M., *Hypertriglyceridemia, an important and independent risk factor for acute pancreatitis in patients with type 2 diabetes mellitus*, Therapeutics and Risk Management, 13, 2017, s. 515-522.
36. Shahwan M.J., Jairoun A.A., Farajallah A., *Prevalence of dyslipidemia and factors affecting lipid profile in patients with type 2 diabetes*, Diabetes & Metabolic Syndrome, 13, 2019, s. 2387-2392.
37. Skoczyńska A., Wawrzynowicz-Syczewska M., Barlik-Rysa M., Danik A., Różański J., Filipiak K.J., Cybulska B., *Lipidemia poposilkowa – problem kliniczny i potencjalne miejsce w algorytmach diagnostycznych. Stanowisko polskich ekspertów*, Folia Cardiologica, 15, 2020, s. 1-17.
38. Tomlinson B., Chan P., Lam W.K., *Postprandial hyperlipidemia as risk factor in patients with type 2 diabetes*, Expert Review on Endocrinology & Metabolism, 15, 2020.
39. Liu H., Peng D., *Update on dyslipidemia in hypothyroidism. The mechanism of dyslipidemia in hypothyroidism*, Endocrine Connections, 11, 2022.
40. Haghi A.R., Solhjo M., Tavakoli M.H., *Correlation between subclinical hypothyroidism and dyslipidemia*, Iranian Journal of Pathology, 12, 2017, s. 106-111.
41. Mavromati M., Jomayvaz F.R., *Hypothyroidism – associated dyslipidemia. Potential molecular mechanisms leading to NAFLD*, International Journal of Molecular Sciences, 22, 2021.
42. Santos H.O., Earnest C.P., Tinsley G.M., Izidoro L.F.M., Macedo R.C.O., *Small dense low-density lipoprotein-cholesterol (sdLDL-C). Analysis, effects on cardiovascular endpoints and dietary strategies*, Progress in Cardiovascular Diseases, 63, 2020, s. 503-509.
43. Saric M.S., Jurasic M.J., Sovic S., Kranjec B., Glivetic T., Demarin V., *Dyslipidemia in subclinical hypothyroidism requires assessment of small dense low density lipoprotein cholesterol (sdLDL-C)*, Romanian Journal of Internal Medicine, 55, 2017, s. 159-166.
44. Beukhof C.M., Massolt E.T., Visser T.J., Korevaar T.I.M., Medici M., de Herder W.W., Roeters van Lennep J.E., Mulder M.T., de Rijke Y.B., Reiners C., Verburg F.A., Peeters R.P., *Effects of thyrotropin on peripheral thyroid hormone metabolism and serum lipids*, Thyroid, 28, 2017.
45. Mugii S., Hanada H., Okubo M., Masuda D., Takeoka K., Hidaka Y., Ohama T., Matsuyama A., Nakagawa-Toyama Y., Nishida M., Ishigami M., Komuro I., Yamashita S., *Thyroid function influences serum apolipoprotein B-48 levels in patients with thyroid disease*, Journal of Atherosclerosis and Thrombosis, 19, 2012, s. 890-896.
46. Gagnon A., Antunes T.T., Ly T., Pongsuwan P., Gavin C., Lochlan H.A., Sorisky A., *Thyroid-stimulating hormone stimulates lipolysis in adipocytes in culture and raises serum free fatty acid levels in vivo*, Metabolism Clinical and Experimental, 59, 2010, s. 547-553.
47. Pearce E.N., *Update in lipid alterations in subclinical hypothyroidism*, Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 97, 2012, s. 326-333.

Zaburzenia lipidowe w przebiegu chorób metabolicznych na przykładzie cukrzycy typu 2 i niedoczynności tarczycy

Streszczenie

Praca ma na celu przedstawienie problematyki związanej z zaburzeniami lipidowymi (zwanymi dyslipidemia) w przebiegu niedoczynności tarczycy i cukrzycy typu 2, które zaliczane są do grupy chorób metabolicznych. Opisano zmiany, jakie zachodzą w lipidach w przypadku występowania tych chorób oraz konsekwencje, jakie powodują. Przedstawione w pracy zagadnienia wykazują powagę zagrożeń, dlatego istotne jest przeprowadzenie badań poszerzających wiedzę na temat zmian wywoływanych przez zaburzenia lipidowe. Praca ta stanowi wprowadzenie teoretyczne do przyszłych badań nad lipidomią wybranych narządów w zwierzęcym modelu cukrzycy, skupiających się na szerszym zakresie grup lipidów.

Słowa kluczowe: dyslipidemia, cukrzyca typu 2, niedoczynność tarczycy

Lipid disorders in course of metabolic diseases in type 2 diabetes and hypothyroidism as examples

Abstract

The aim of this paper is to present the issues related to lipid disorders called dyslipidemia, in the course of hypothyroidism and type 2 diabetes, classified as metabolic diseases. In this paper the changes occurring in lipids in the presence of those diseases and the consequences they cause are described. The issues presented in this paper show the gravity of those consequences, which is why it is important to conduct research to expand knowledge about the changes caused by lipid disorders. This paper is a theoretical introduction to future studies on lipidomics of selected organs in an animal model of diabetes, focusing on a wider range of lipid groups.

Keywords: dyslipidemia, type 2 diabetes, hypothyroidism

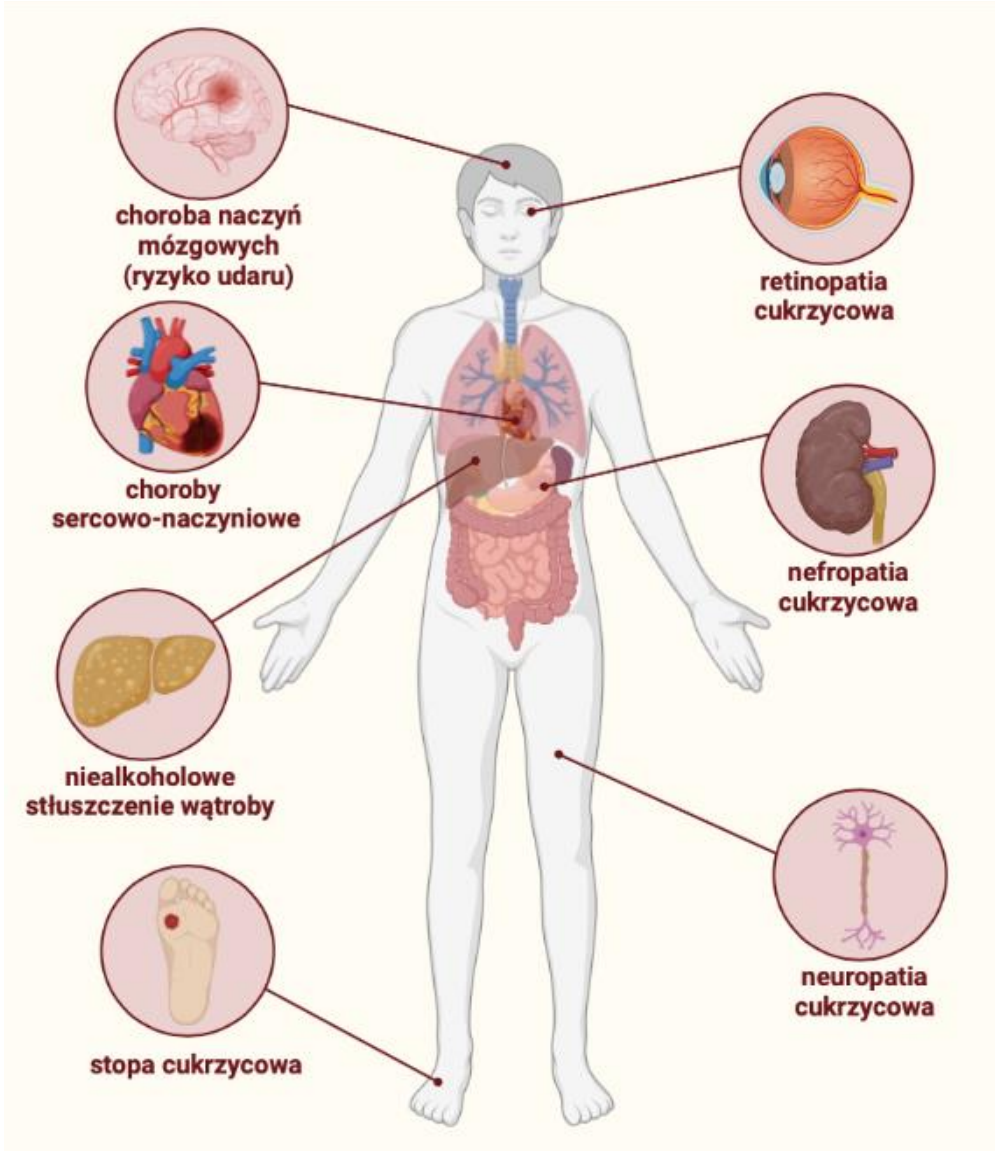
Enzymy szlaku kwasu mewalonowego oraz enzymy prenylujące małe GTPazy w patogenezie cukrzycy typu 2 oraz towarzyszących jej schorzeń

1. Wprowadzenie

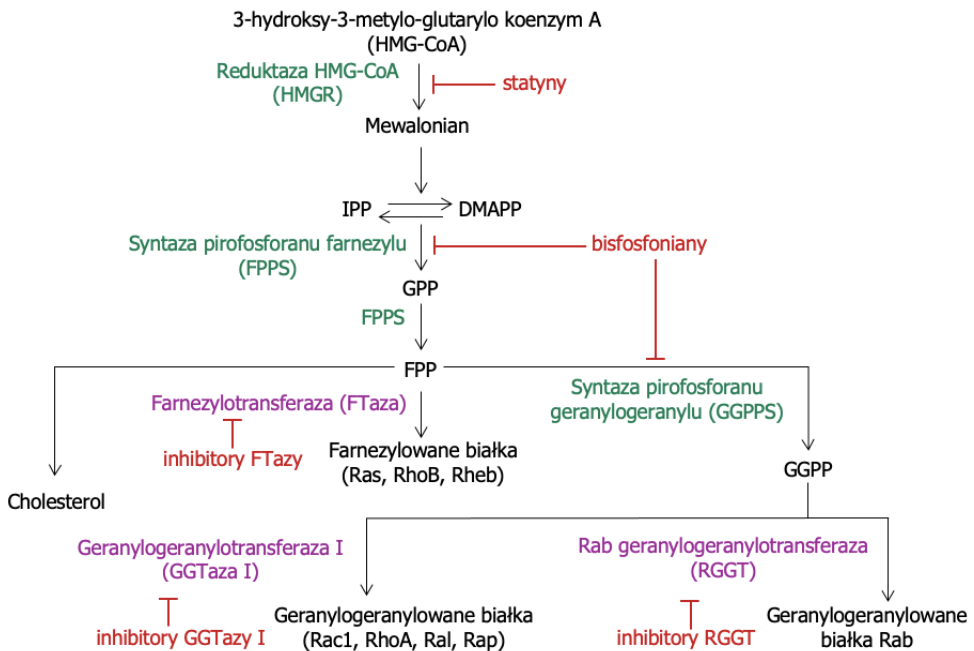
Według danych pochodzących z „The International Diabetes Federation” w 2021 roku liczba dorosłych (20-79 lat) chorych na cukrzycę na całym świecie wynosiła ok. 537 milionów. Szacuje się, że do 2045 roku liczba ta wzrośnie o ok. 46% (do 783 milionów) [1]. Szybki postęp cywilizacyjny i towarzyszący mu siedzący tryb życia, brak aktywności fizycznej, starzejące się społeczeństwo oraz wysokokaloryczna dieta przyczyniają się do fali otyłości. Wszystkie wymienione czynniki związane są z nagłym wzrostem występowania cukrzycy typu 2 (T2D, ang. *type 2 diabetes*), która stanowi 90% obserwowanych przypadków zachorowalności na cukrzycę [2, 3]. T2D jest złożonym schorzeniem metabolicznym charakteryzującym się niewydolnością komórek β trzustki oraz upośledzoną wrażliwością tkanek docelowych (wątroba, mięśnie, tkanka tłuszczowa) na działanie insuliny – określaną mianem insulinooporności (IR, ang. *insulin resistance*) [4]. IR wraz z przewlekłym stanem zapalnym stanowi jeden z najwcześniejszych czynników patogenetycznych w powikłaniach T2D (rys. 1), które znacznie obniżają jakość życia chorych, a z czasem nawet mu zagrażają. T2D jest jedną z wiodących przyczyn śmierci na świecie. W porównaniu z osobami, które nie chorują na cukrzycę, pacjenci z cukrzycą typu 2 mają o 15% większe ryzyko zgonu [3-5].

Czynniki molekularne związane z patogenezą cukrzycy typu 2 są złożone. Pojawiające się dowody wskazują, że zmiana ekspresji lub aktywności enzymów szlaku kwasu mewalonowego (MVA, ang. *mevalonate pathway*) oraz enzymów prenylujących małe GTPazy mogą być zaangażowane w rozwój T2D. MVA jest jednym z ważniejszych szlaków metabolicznych, który odpowiada za syntezę steroli (m.in. cholesterolu) oraz izoprenoidów biorących udział w jednej z potranslacyjnych modyfikacji białek, tj. prenylacji – pirofosforanu farnezyli (FPP, ang. *farnesyl pyrophosphate*) oraz pirofosforanu geranylgeranyli (GGPP, ang. *geranylgeranyl pyrophosphate*) (rys. 2) [6]. Proces prenylacji kontroluje lokalizację i aktywność małych GTPaz (nadrodzina białek Ras), które pełnią kluczową rolę w wielu procesach komórkowych (transport pęcherzykowy, organizacja cytoszkieletu, wzrost i różnicowanie komórek). Wyłącznie uprenylowane białka zostają przyłączone do różnych membran i mogą zostać aktywowane [7].

¹ daria.kaminska@dokt.p.lodz.pl, Instytut Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka, www.p.lodz.pl.



Rysunek 1. Schorzenia towarzyszące cukrzycy typu 2 – opracowanie własne z wykorzystaniem programu BioRender na podstawie [3]



Rysunek 2. Schemat szlaku kwasu mewalonowego oraz potranslacyjnych modyfikacji małych GTPaz.

HMGR katalizuje przekształcenie HMG koenzymu A w mewalonian. Następnie powstają prekursorzy izoprenoidu: pirofosforan izopentenyli (IPP) oraz jego izomer – pirofosforan dimetyloallilu (DMAPP). W dalszej części FPPS uczestniczy w syntezie pirofosforanu geranyli (GPP) i pirofosforanu farnezyli (FPP). Z kolei GGPPS przekształca FPP w pirofosforan geranylogeranyli (GGPP). FTaza przyłącza FPP do białek Ras, RhoB i Rheb, zaś GGPP może zostać przyłączony przez GGTazę I do białek Rac1, RhoA, Ral, Rap lub przez RGGT do białek Rab – opracowanie własne na podstawie [6, 8]

Celem niniejszego opracowania jest przedstawienie przeglądu literatury poświęconej dotychczasowym badaniom podejmującym tematykę enzymów szlaku kwasu mewalonowego oraz enzymów prenylujących małe GTPazy w patogenezie cukrzycy typu 2 i towarzyszących jej schorzeń.

2. Obserwowane zmiany w ekspresji/aktywności enzymów MVA oraz prenylotransferaz

2.1. Komórki β trzustki

Veluthakal i wsp. wykazali, że stres metaboliczny (stres retikulum endoplazmatycznego i gluko-, lipotoksyczny), który występuje w warunkach cukrzycowych indukuje dysfunkcję komórek β trzustki. Zasugerowali oni, że warunki stresu prowadzą do zaburzeń funkcjonowania mitochondriów, co w konsekwencji prowadzi do aktywacji kaspazy-3. Enzym ten degraduje wspólną podjednostkę α farnezylotransferazy oraz geranylogeranylotransferazy I, co prowadzi do funkcjonalnej inaktywacji obu enzymów i akumulacji nieprenyloowanych białek w komórkach – komórki linii INS-1 832/13, normalne wysepki gryzoni, ludzkie wysepki oraz wysepki trzustkowe szczurów ZDF (ang. *Zucker diabetic fatty*) stanowiących model T2D. Chociaż podjednostka α FTazy i GGTazy I pełni funkcje regulacyjne, a podjednostki β posiadają centra aktywne, to utworzenie heterodimerycznej konformacji „holoenzymu” jest niezbędne dla aktywności katalitycznej

tych prenylotransferaz. Badania te wskazują, że małe GTPazy oraz ich prenylacja mogą odgrywać ważną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu komórek wydzielających insulinę [9]. Natomiast Goalstone i wsp. udowodnili, że wysokie stężenie glukozy stymuluje w komórkach INS-1 832/13 i normalnych wysepkach szczurzych ekspresję wspólnej podjednostki α FTazy i GGTazy I oraz nie ma wpływu na ekspresję podjednostek β . Prowadzi to do ich zwiększonej aktywności [10].

2.2. Mięśnie szkieletowe

W badaniach przeprowadzonych przez Vicenta i wsp. wykazano, że syntaza pirofosforanu geranylogeranylu jest nadekspresjonowana w mięśniach szkieletowych myszy *ob/ob*, które stanowią model indukowanej genetycznie otyłości z ekstremalną insulinoopornością [7]. Z kolei Tao i wsp. udowodnili, że ekspresja GGPPS jest podwyższona u myszy *db/db* (otyłych myszy z cukrzycą) oraz myszy z otyłością indukowaną wysokotłuszczową dietą (HFD, ang. *high-fat diet*), co wskazuje na udział podwyższonego poziomu wolnych kwasów tłuszczowych. Autorzy wykazali także, że kontrolowana przez GGPPS geranylogeranylacja może promować indukowaną lipidami insulinooporność w mięśniach poprzez regulowanie szlaku sygnałowego RhoA/ROCK [11]. Co więcej, GGPPS nie jest jedynym enzymem, którego nadekspresja w mięśniach szkieletowych ma negatywne skutki. Nakazawa i wsp. zaobserwowali, że obniżony poziom stymulowanego insuliną wychwytu glukozy jest powiązany ze zwiększoną ekspresją FTazy [12].

2.3. Adipocyty

Ekspresja GGPPS jest podwyższona w insulinoopornej tkance tłuszczowej myszy *ob/ob*, co w swojej pracy przedstawili Vicent i wsp. [11]. Hiperinsulinemia stymuluje ekspresję GGPPS i prowadzi do aktywacji szlaku Ras/MAPK/Erk1/2, co skutkuje rozwojem insulinooporności w adipocytach myszy *db/db*. Nokaut genu *Ggpps* w insulinoopornych adipocytach doprowadził do przywrócenia wrażliwości na insulinę [13].

2.4. Wątroba, niealkoholowe stłuszczenie wątroby

Udowodniono, że ekspresja syntazy pirofosforanu geranylogeranylu w wątrobie jest wysoka u myszy *ob/ob* [7]. Liu i wsp. zauważyli, że ekspresja tego enzymu w wątrobie jest również wysoka u osób z niealkoholowym stłuszczeniem wątroby i myszy z HFD [14]. Xu i wsp. wykazali, że niedobór GGPPS prowadzi do zmiany proporcji pomiędzy FPP i GGPP, akumulacja FPP prowadzi do zwiększonego poziomu farnesylicacji białek i aktywacji innych szlaków sygnałowych. Zgromadzony pirofosforan farnesyli aktywuje receptor farnezoidowy X (FXR, ang. *farnesoid X receptor*), co w efekcie aktywuje szlak hamujący proces lipogenezy *de novo* [15]. Z badań przeprowadzonych przez Zhao i wsp. wynika, że zwiększenie stężenia lipidów zwiększa ekspresję GGPPS, co reguluje w konsekwencji sekrecję pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pochodzących z hepatocytów celujących w adipocyty, a ostatecznie wpływa na lipogenezę i adipogenezę. Myszy ze specyficznym wątrobowym nokautem genu *Ggpps* mają zmniejszone odkładanie się tłuszczu [16].

2.5. Schorzenia sercowo-naczyniowe

Wysokie stężenie glukozy prowadzi do nadekspresji szeregu enzymów: HMGR, FPPS, GGPPS, FTazy i GGTazy-I w aortach pochodzących od myszy cukrzycowych i w naczyniowych komórkach mięśni gładkich, co zaobserwowała grupa Chen i wsp [6].

Ta sama grupa badawcza dowiodła, że nokaut genu kodującego GGTA ζ I skutecznie blokuje przyspieszoną przez cukrzycę miażdżycę u myszy. To ochronne działanie prawdopodobnie jest spowodowane obniżoną proliferacją naczyńniowych komórek mięśni gładkich. Zahamowanie proliferacji ww. komórek jest spowodowane obniżoną geranylogeranylacją białka Rac1 – mediatora oksydacyjnego stresu, a tym samym jego aktywnością [17]. Li i wsp. w swoich eksperymentach zauważyli, że ekspresja FPPS jest podwyższona również w modelach kardiomiopatii cukrzycowej [18]. Liu i wsp. wykazali ponadto, że enzym ten jest zaangażowany w proces zwłóknienia aorty piersiowej [19, 20]. Draznin w swojej pracy stwierdził, że stymulujący wpływ hiperinsulinemii na FTa ζ w warunkach insulinooporności może odpowiadać za proliferacyjne i aterogenne działanie insuliny [21].

2.6. Retinopatia cukrzycowa

Prace eksperymentalne Mohammada i wsp. wykazały, że ekspresja FTazy jest podwyższona w mikronaczyńniach siatkówki pochodzących od osób z retinopatią cukrzycową. Nokaut FTazy hamuje aktywację stymulowanego glukozą szlaku sygnałowego Rac1-Nox2 odpowiedzialnego za rozwój stresu oksydacyjnego i przyczyniającego się do rozwoju retinopatii [22].

2.7. Nefropatia cukrzycowa

Danesh i wsp. udowodnili, że inhibicja HMGR może złagodzić szkodliwy wpływ wysokiego stężenia glukozy na proliferację komórek mezangialnych, która jest cechą wczesnych stadiów nefropatii cukrzycowej. Zahamowanie proliferacji komórek jest związane z inhibicją geranylogeranylacji GTPazy Rho [23].

3. Podsumowanie

Coraz więcej dowodów wskazuje na udział enzymów szlaku kwasu miewalonowego oraz enzymów prenylujących małe GTPazy w patogenezie cukrzycy typu 2 oraz towarzyszących jej schorzeń. Wydaje się, że mogą one być interesującym celem terapeutycznym w leczeniu T2D i jej komplikacji. Wykorzystanie selektywnych inhibitorów poszczególnych enzymów jako środków terapeutycznych potencjalnie może stanowić jedną z strategii kontroli aktywności tych białek. Należy jednak zaznaczyć, że konieczne są dalsze badania, które pozwoliłyby na zrozumienie mechanizmów molekularnych, na które enzymy te mają wpływ. Można przypuszczać, że enzymy szlaku MVA, jak i prenylotransferazy zyskają jeszcze większe zainteresowanie z powodu pojawiających się w literaturze informacji dotyczących diabetogennego działania statyn [24, 25].

Podziękowania

Praca finansowana w ramach programu „FU²N – Fundusz Udoskonalania Umiejętności Młodych Naukowców” wspierającego doskonałość naukową Politechniki Łódzkiej – grant nr W5/FU2N/03/2022.

Niniejsza praca została ukończona w czasie, gdy jej autor był doktorantem w Interdyscyplinarnej Szkole Doktorskiej Politechniki Łódzkiej.

Literatura

1. Sun H., Saeedi P., Karuranga S., Pinkepank M., Ogurtsova K., Duncan B.B., Stein C., Basit A., Chan J.C.N., Mbanya J.C., Pavkov M.E., Ramachandaran A., Wild S.H., James S., Herman W.H., Zhang P., Bommer C., Kuo S., Boyko E.J., Magliano D.J., *IDF Diabetes Atlas. Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045*, Diabetes Research and Clinical Practice, 183, 2022, s. 109119, doi:10.1016/j.diabres.2021.109119.
2. Chatterjee S., Khunti K., Davies M.J., *Type 2 diabetes*, The Lancet, 389(10085), 2017, s. 2239-2251, doi:10.1016/S0140-6736(17)30058-2.
3. Deshpande A.D., Harris-Hayes M., Schootman M., *Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications*, Physical Therapy, 88(11), 2008, s. 1254-1264, doi:10.2522/ptj.20080020.
4. Zheng Y., Ley S.H., Hu F.B., *Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications*, Nature Reviews Endocrinology, 14(2), 2018, s. 88-98, doi:10.1038/nrendo.2017.151.
5. Lin X., Xu Y., Pan X., Xu J., Ding Y., Sun X., Song X., Ren Y., Shan P.F., *Global, regional and national burden and trend of diabetes in 195 countries and territories. An analysis from 1990 to 2025*, Scientific Reports, 210(1), 2020, s. 14790, doi:10.1038/s41598-020-71908-9.
6. Chen G.P., Zhang X.Q., Wu T., Li L., Han J., Du C.Q., *Alteration of mevalonate pathway in proliferated vascular smooth muscle from diabetic mice. Possible role in high-glucose-induced atherogenic process*, Journal of Diabetes Research, 2015, 2015, s. 1-11, doi:10.1155/2015/379287.
7. Vicent D., Maratos-Flier E., Kahn C.R., *The branch point enzyme of the mevalonate pathway for protein prenylation is overexpressed in the ob / ob mouse and induced by adipogenesis*, Molecular and Cellular Biology, 20(6), 2000, s. 2158-2166, doi:10.1128/mcb.20.6.2158-2166.2000.
8. Gendaszewska-Darmach E., Garstka M.A., Błażewska K.M., *Targeting small GTPases and their prenylation in diabetes mellitus*, Journal of Medicine Chemistry, 64(14), 2021, s. 9677-9710, doi:10.1021/acs.jmedchem.1c00410.
9. Veluthakal R., Arora D.K., Goalstone M.L., Kowluru R.A., Kowluru A., *Metabolic stress induces caspase-3 mediated degradation and inactivation of farnesyl and geranylgeranyl transferase activities in pancreatic β -cells*, Cellular Physiology and Biochemistry, 39(6), 2016, s. 2110-2120, doi:10.1159/000447907.
10. Goalstone M., Kamath V., Kowluru A., *Glucose activates prenyltransferases in pancreatic islet β -cells*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 391(1), 2010, s. 895-898, doi:10.1016/j.bbrc.2009.11.159.
11. Tao W., Wu J., Xie B.X., Zhao Y.Y., Shen N., Jiang S., Wang X.X., Xu N., Jiang C., Chen S., Gao X., Xue B., Li C.J., *Lipid-induced muscle insulin resistance is mediated by GGPPS via modulation of the RhoA/Rho kinase signaling pathway*, Journal of Biological Chemistry, 290(33), 2015, s. 20086-20097, doi:10.1074/jbc.M115.657742.
12. Nakazawa H., Yamada M., Tanaka T., Kramer J., Yu Y.-M., Fischman A.J., Martyn J.A.J., Tompkins R.G., Kaneki M., *Role of protein farnesylation in burn-induced metabolic derangements and insulin resistance in mouse skeletal muscle*, PLoS One, 10(1), 2015, s. 116633, doi:10.1371/journal.pone.0116633.
13. Shen N., Yu X., Pan F.Y., Gao X., Xue B., Li C.J., *An early response transcription factor, Egr-1, enhances insulin resistance in type 2 diabetes with chronic hyperinsulinism*, Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(16), 2011, s. 14508-14515, doi:10.1074/jbc.M110.190165.

14. Liu J., Jiang S., Zhao Y., Sun Q., Zhang J., Shen D., Wu J., Shen N., Fu X., Sun X., Yu D., Chen J., He J., Shi T., Ding Y., Fang L., Xue B., Li C., *Geranylgeranyl diphosphate synthase (GGPPS) regulates non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) – fibrosis progression by determining hepatic glucose/fatty acid preference under high-fat diet conditions*, The Journal of Pathology, 246(3), 2018, s. 277-288, doi:10.1002/path.5131.
15. Xu N., Shen N., Wang X.X., Jiang S., Xue B., Li C.J., *Protein prenylation and human diseases. A balance of protein farnesylation and geranylgeranylation*, Science China Life Sciences, 58(4), 2015, s. 328-335, doi:10.1007/s11427-015-4836-1.
16. Zhao Y., Zhao M.F., Jiang S., Wu J., Liu J., Yuan X.W., Shen D., Zhang J.Z., Zhou N., He J., Fang L., Sun X.T., Xue B., Li C.J., *Liver governs adipose remodelling via extracellular vesicles in response to lipid overload*, Nature Communications, 11(1), 2020, s. 719, doi:10.1038/s41467-020-14450-6.
17. Chen G.P., Yang J., Qian G.F., Xu W.W., Zhang X.Q., *Geranylgeranyl transferase-I knockout inhibits oxidative injury of vascular smooth muscle cells and attenuates diabetes-accelerated atherosclerosis*, Journal of Diabetes Research, 2020, 2020, s. 1-14, doi:10.1155/2020/7574245
18. Li Z., Zhang J., Wang M., Qiu F., Jin C., Fu G., *Expression of farnesyl pyrophosphate synthase is increased in diabetic cardiomyopathy*, Cell Biology International, 45(7), 2021, s. 1393-1403, doi:10.1002/cbin.11573.
19. Liu X.W., Jin H.F., Du C.Q., Tang L.J., *Farnesyl pyrophosphate synthase blocker ibandronate reduces thoracic aortic fibrosis in diabetic rats*, American Journal of the Medical Sciences, 357(4), 2019, s. 323-332, doi:10.1016/j.amjms.2019.01.014.
20. Liu X., Liu Y., Tang L., Du C., *Inhibition of farnesyl pyrophosphate synthase alleviates cardiomyopathy in diabetic rat*, Cell Cycle, 22(6), 2023, s. 666-679, doi:10.1080/15384101.2022.2139126.
21. Draznin B., *Mitogenic action of insulin: Friend, foe or „frenemy”?*, Diabetologia, 53(2), 2010, s. 229–233, doi:10.1007/s00125-009-1558-6.
22. Mohammad G., Duraisamy A.J., Kowluru A., Kowluru R.A., *Functional regulation of an oxidative stress mediator, Rac1, in diabetic retinopathy*, Molecular Neurobiology, 56(12), 2019, s. 8643-8655, doi:10.1007/s12035-019-01696-5.
23. Danesh F.R., Sadeghit M.M., Amro N., Philips C., Zeng L., Lin S., Sahai A., Kanwar Y.S., *3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors prevent high glucose-induced proliferation of mesangial cells via modulation of Rho GTPase/p21 signaling pathway. Implications for diabetic nephropathy*, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 99(12), 2002, s. 8301-8305, doi:10.1073/pnas.122228799.
24. Henriksbo B.D., Tamrakar A.K., Xu J., Duggan B.M., Cavallari J.F., Phulka J., Stampfli M.R., Ashkar A.A., Schertzer J.D., *Statins promote interleukin-1 β -dependent adipocyte insulin resistance through lower prenylation, not cholesterol*, Diabetes, 68(7), 2019, s. 1441-1448, doi:10.2337/db18-0999.
25. Yandrapalli S., Malik A., Guber K., Rochlani Y., Pemmasani G., Jasti M., Aronow W.S., *Statins and the potential for higher diabetes mellitus risk*, Expert Review of Clinical Pharmacology, 12(9), 2019, s. 825-830, doi:10.1080/17512433.2019.1659133.

Enzymy szlaku kwasu miewalonowego oraz enzymy prenylujące małe GTPazy w patogenezie cykrzycy typu 2 oraz towarzyszących jej schorzeń

Streszczenie

Cukrzyca typu 2 (T2D, ang. *type 2 diabetes*) zyskała miano epidemii i stanowi jedno z poważniejszych wyzwań zdrowia publicznego w XXI wieku. Szacuje się, że na świecie liczba osób dorosłych ze zdiagnozowaną cukrzycą w 2021 r. wynosiła ponad pół miliarda, gdzie dominująca część przypadków (90%) to osoby chore na T2D. Cukrzyca typu 2 jest złożonym schorzeniem charakteryzującym się dysfunkcją komórek β trzustki oraz osłabioną wrażliwością tkanek docelowych na działanie insuliny, określaną jako insulinooporność (IR,

ang. *insulin resistance*), co między innymi skutkuje wysokim poziomem glukozy we krwi. Poza tym T2D jest rozpoznawana jako choroba z przewlekłym stanem zapalnym. Komplikacjami towarzyszącymi cukrzycy typu 2 są m.in. choroby sercowo-naczyniowe, nefropatia, neuropatia, retinopatia cukrzycowa czy niealkoholowe stłuszczenie wątroby, które z czasem zagrażają życiu chorych.

Chociaż czynniki związane z rozwojem T2D oraz towarzyszącymi jej schorzeniami są złożone, sugeruje się, że enzymy szlaku kwasu mewalonowego (MVA, ang. *mevalonate pathway*) oraz enzymy prenylujące małe GTPazy mogą być zaangażowane w ich patogenezę. MVA stanowi ważny szlak metaboliczny, który odpowiada m.in. za produkcję prekursorów w syntezie cholesterolu czy izoprenoidów stanowiących substraty w jednej z potranslacyjnych modyfikacji białek – prenylacji. Dane literaturowe wskazują, że ekspresja/aktywność tych enzymów jest zmieniona w warunkach cukrzycowych.

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie wyników przeglądu literatury dotyczącej enzymów szlaku MVA oraz enzymów prenylujących małe GTPazy, a także ich znaczenia w rozwoju cukrzycy typu 2 oraz chorób jej współtowarzyszących. Białka te są warte uwagi, ponieważ mogą stanowić potencjalny cel terapeutyczny w leczeniu T2D, aczkolwiek niezbędne są dalsze badania pozwalające na lepsze zrozumienie molekularnych mechanizmów, na które mają wpływ.

Słowa kluczowe: cukrzyca typu 2, szlak kwasu mewalonowego, prenylotransferazy, insulinooporność

Enzymes of the mevalonate pathway and enzymes prenylating small GTPases in the pathogenesis of type 2 diabetes and its accompanying diseases

Abstract

Type 2 diabetes (T2D) has become an epidemic and is one of the major public health challenges of the 21st century. It is estimated that the number of adults diagnosed with diabetes worldwide in 2021 was more than half a billion, where the dominant part of cases (90%) are people with T2D. Type 2 diabetes is a complex condition characterized by pancreatic β -cell dysfunction and impaired sensitivity of target tissues to insulin, termed insulin resistance (IR), which, among other things, results in high blood glucose levels. In addition, T2D is recognized as a disease with chronic inflammation. Complications associated with type 2 diabetes include cardiovascular disease, diabetic: nephropathy, neuropathy, retinopathy, or non-alcoholic fatty liver disease, which over time threaten the lives of patients.

Although the factors involved in the development of T2D and its associated conditions are complex, it has been suggested that enzymes of the mevalonate pathway (MVA) and prenylating enzymes of small GTPases may be involved in their pathogenesis. MVA is an important metabolic pathway that is responsible for, among other things, the production of precursors in the synthesis of cholesterol, or isoprenoids that are substrates in one of the post-translational modifications of proteins – prenylation. Literature data indicate that the expression/activity of these enzymes is altered under diabetic conditions.

The purpose of this paper is to present the results of a literature review on MVA pathway enzymes and small GTPase prenylating enzymes and their importance in the development of type 2 diabetes and its associated diseases. These proteins are noteworthy because they may be potential therapeutic targets for the treatment of T2D, although further studies are needed to better understand the molecular mechanisms they affect.

Keywords: type 2 diabetes, mevalonate pathway, prenyltransferases, insulin resistance

Otyłość i jej powiązanie z mikrobiotą

1. Wprowadzenie

Otyłość jest jednym z największych wyzwań zdrowotnych XXI wieku. Badania naukowe wskazują na różnice dotyczące składu mikrobioty jelitowej osób otyłych oraz osób z prawidłową masą ciała, a mikrobiota jelitowa może mieć wpływ na rozwój otyłości.

2. Otyłość

Otyłość (łac. *obesitas*) to choroba przewlekła o złożonej etiologii. Definiowana jest jako nieprawidłowe lub nadmierne nagromadzenie tkanki tłuszczowej, które może stanowić zagrożenie dla zdrowia. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organization*) definiuje otyłość jako posiadanie wskaźnika masy ciała (BMI, ang. *body mass index*) powyżej 30 kg/m², z zastrzeżeniem, że może nie być to właściwa miara dla niektórych osób, np. sportowców [1].

BMI to współczynnik, który ma znaczenie w ocenie zagrożenia chorobami związanymi z nadwagą i otyłością u osób dorosłych (tab. 1). Można go obliczyć przez podzielenie masy ciała podanej w kilogramach przez kwadrat wysokości podanej w metrach. Współczynnik ten dobrze koreluje z zawartością tkanki tłuszczowej w organizmie, ale nie uwzględnia typu budowy ciała, np. udziału tłuszczu ustrojowego. Ten parametr natomiast można określić za pomocą stosunku obwodu talii do obwodu bioder (WHR, ang. *waist-hip ratio*) [2].

Tabela 1. Klasyfikacja masy ciała osób dorosłych na podstawie BMI

Kategoria	BMI (kg/m ²)	Masa ciała	Ryzyko chorób towarzyszących otyłości
wygodzenie	<16,0	niedowaga	minimalne, ale możliwość występowania innych problemów zdrowotnych
wychudzenie	16,0-16,99		
niedowaga	17,0-18,49		
prawidłowa masa ciała	18,5-24,99	optimum	minimalne, populacyjne
nadwaga	25,0-29,99	nadwaga	średnie
otyłość I stopnia	30,0-34,99	otyłość	wysokie bardzo wysokie ekstremalny poziom ryzyka
II stopnia	35,0-39,99		
III stopnia (tzw. otyłość olbrzymia)	≥40,0		

Źródło: opracowanie własne na podstawie [2].

Można stwierdzić, że otyłość osiągnęła rangę epidemii, ponieważ rocznie blisko 2,8 miliona osób umiera w wyniku powikłań związanych z nadwagą lub otyłością. Według danych zebranych przez WHO w 2016 roku ponad $1,9 \times 10^9$ dorosłych miało nadwagę,

¹ katarzyna.slizewska@p.lodz.pl, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Politechnika Łódzka.

a 650 milionów dorosłych było otyłych. Ponadto ponad 340 milionów dzieci i młodzieży w wieku od 5 lat do 19 lat miało nadwagę, a 124 miliony było otyłych. Jeszcze bardziej niepokojące jest to, że w 2018 roku ponad 40 milionów dzieci w wieku poniżej 5 lat miało nadwagę lub otyłość. Średnio 39% dorosłej populacji świata miało nadwagę, podczas gdy 13% było otyłych. Liczby te pokazują, że otyłość na całym świecie znacznie zwiększyła się od 1975 roku. Najwyższy wzrost nadwagi i otyłości zaobserwowano wśród dzieci i młodzieży (w wieku od 5 lat do 19 lat) – od 4% w 1975 roku do 18% w 2016 roku. Pierwotnie otyłość była uważana za problem krajów o wysokich dochodach i dobrze rozwiniętych, jednak statystyki pokazują, że liczba osób z nadwagą i otyłością rośnie w krajach o niskich i średnich dochodach. Przykładem może być Afryka, gdzie w przeszłości populacja z nadwagą była bardzo niska, natomiast od 2000 roku liczba dzieci z nadwagą w wieku poniżej 5 lat wzrosła o prawie 50% [3, 4].

Prognozy WHO nie są obiecujące. Szacuje się, że do 2030 roku liczba otyłych dzieci sięgnie 250 milionów (w 2018 roku było to 150 milionów). Statystyki pokazują ponadto, że otyłe dzieci znacznie częściej stają się otyłymi dorosłymi i cierpią na problemy zdrowotne związane z otyłością [3].

Otyłość wiąże się z szeregiem powikłań zdrowotnych, które mogą być śmiertelne (tab. 2). Nadwaga lub otyłość są uznawane przez WHO za 5 najczęstszą przyczynę śmierci. Wśród powikłań zdrowotnych związanych z nadwagą lub otyłością dominują cukrzyca typu 2 (44% powiązań) czy choroby serca (23%) [1].

Tabela 2. Następstwa zdrowotne wywołane przez otyłość

Rodzaj powikłań	
Endokrynologiczne	insulinooporność, cukrzyca typu 2, przedwczesne dojrzewanie
Mięśniowo-szkieletowe	złamania, zwyrodnienie i choroby zapalne stawów, bóle grzbietu
Nerkowe	zaburzenia pracy nerek, m.in.: kamica nerkowa, przewlekła choroba nerek
Neurologiczne	wiele nowotworów: nerek, okrężnicy, przewodów żółciowych, trzustki, przełyku, wątroby, szpiczaka mnogiego, endometrium, jajników i piersi
Płciowe	zespół policystycznych jajników, upośledzenie płodności, nieprawidłowości płodu, nowotwory piersi i trzonu macicy
Płucne	astma, zespół nocnego bezdechu
Psychologiczne	depresja, lęki, niska samoocena, zmiany w relacjach z innymi ludźmi
Sercowo-naczyniowe	nadciśnienie tętnicze, choroba niedokrwienna, niewydolność serca, miażdżyca naczyń, wysokie stężenie lipidów
Żołądkowo-jelitowe	zaparcia stolca, refluks przełyku, choroby wątroby (w tym stłuszczenie wątroby), zespół jelita drażliwego, kamica pęcherzyka żółciowego

Źródło: opracowanie własne.

Z otyłością wiąże się wzrost kosztów zarówno leczenia, jak i życia. Ogólnie rzecz biorąc, koszty związane z otyłością mogą być podzielone na 3 grupy, a mianowicie koszty bezpośrednie, pośrednie i indywidualne. Koszty bezpośrednie wiążą się z profilaktyką, diagnostyką i leczeniem otyłości oraz jej konsekwencji. Do kosztów pośrednich otyłości

zalicza się m.in.: częste nieobecności w pracy (do 80% częstsze), zmniejszoną produktywność w miejscu pracy, krótszą długość życia osób otyłych. Ostatnia grupa dotyczy indywidualnych wydatków, jakie musi ponieść osoba otyła – wyższe koszty utrzymania i życia, dostosowanie przestrzeni mieszkalnej do konkretnych potrzeb. Oceniono, że koszty opieki zdrowotnej osoby otyłej mogą być do 44% wyższe w porównaniu z pacjentem nieotyłym. Dodatkowo całkowite koszty leczenia otyłych pacjentów i powikłań związanych z otyłością stanowią aż 20% całkowitych środków na ochronę zdrowia [5]. Amerykańskie szacunki podają, że koszty opieki medycznej rosną rocznie o 76 USD na każdą dodatkową jednostkę BMI, co daje łącznie 907 USD na otyłego pacjenta i łącznie 1491 USD na poważnie otyłego pacjenta (odpowiednio 92% i 151% więcej w porównaniu z osobą zdrową) [6].

Wyżej wymienione koszty wynosiły w USA łącznie $149,4 \times 10^9$ USD rocznie w 2014 roku [5]. Sytuacja w Europie jest bardzo podobna. Koszty związane z nadwagą i otyłością wynoszą od 0,47% do 0,61% produktu krajowego brutto, przy czym nadwyżka kosztów na osobę waha się od 117 EUR do 1873 EUR [7].

3. Mikrobiota jelitowa

Mikrobiota jelitowa człowieka może zawierać nawet 10^{14} komórek drobnoustrojów i tym samym stanowi jeden z najbardziej złożonych ekosystemów na Ziemi. Zawiera on między innymi 17 rodzin, 45 rodzajów i ponad 1000 gatunków mikroorganizmów. Ludzkie jelita nie są kolonizowane jedynie przez bakterie, które dominują w tym ekosystemie, ale również przez *Archaea* i *Eukaryota* [8]. Jelita człowieka mają ogromną powierzchnię, której wymiary wahają się od 200 m² do 250 m². Pomiędzy limfocytami śródłonkowymi, blaszką właściwą, kępkami Peyera i pęcherzykami limfatycznymi a tkanką chłonną powierzchnia jelita jest miejscem, które zasiedla około 800 różnych gatunków bakterii, a co za tym idzie ponad 7000 szczepów, przy czym 99% tych mikroorganizmów to bezwzględnie beztlenowce [9].

Kolonizacja przewodu pokarmowego noworodka rozpoczyna się wraz z przyjściem dziecka na świat. Do niedawna panowało powszechnie przekonanie, że zarówno płód, jak i łożysko nie mają kontaktu z drobnoustrojami, a to sterylne środowisko zapewnia prawidłowy rozwój płodu [10]. Pojawiły się jednak doniesienia wskazujące na obecność drobnoustrojów w prawidłowo rozwijającym się łożysku [11]. Wykazano, że pośród drobnoustrojów obecnych w łożysku najliczniej występującym typem bakterii jest *Proteobacteria*, a skład mikrobioty obecnej w łożysku przypomina kompozycję jamy ustnej. Ponadto obecność mikrobioty jelitowej matki wykryto w płynie owodniowym oraz w smółce noworodka [12]. Obserwacje te są zgodne z wynikami innych badań wykazującymi obecność drobnoustrojów w krwi pępowinowej [13]. Obecnie niewiele wiadomo na temat interakcji pomiędzy płodem i mikrobiotą *in utero*. Jednakże stopień ekspozycji na drobnoustroje w okresie poporodowym jest nieporównywalnie wyższy od tego, który jest obserwowany podczas życia płodowego [14].

Kształtowanie mikrobioty jelitowej u dziecka następuje etapami. W ciągu pierwszych godzin życia sterylna powierzchnia błon śluzowych przewodu pokarmowego, oddechowego, moczowo-płciowego jest zasiedlana przez bakterie tlenowe i względnie beztlenowe pochodzące ze skóry i pochwy matki. Należą one najczęściej do rodzaju *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* i *Staphylococcus*, a ich liczba sięga nawet 10^{10} jtk/g kału [15]. Bakterie te wykorzystują tlen, przygotowując środowisko do kolonizacji

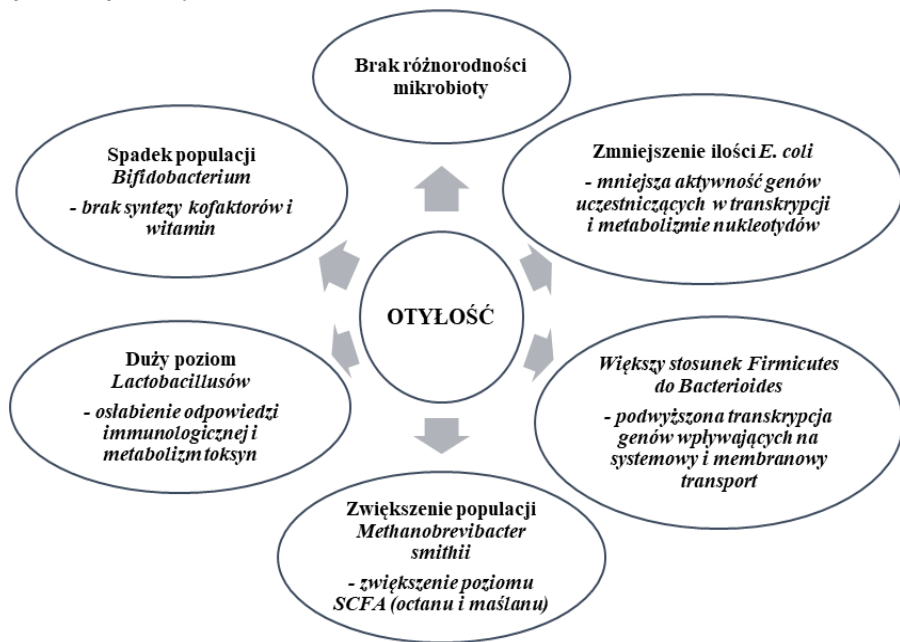
przez bakterie beztlenowe. W przebiegu prawidłowej kolonizacji w jelitach dziecka pojawiają się także bakterie z rodzaju *Enterococcus* i *Staphylococcus*. Następnymi w przewodzie pokarmowym noworodka są bakterie z rodzaju *Lactobacillus* – pochodzące z pochwy i przewodu pokarmowego matki. Ponadto u dzieci karmionych mlekiem matki w około 2. dobie życia pojawiają się szczególnie istotne bakterie z rodzaju *Bifidobacterium*. Najważniejszym etapem kształtowania się mikrobioty jelitowej, zachodzącym w ciągu pierwszych 7 dni życia, jest kolonizacja bakteriami bezwzględnie beztlenowymi należącymi do rodzaju *Bacteroides*, *Clostridium* oraz *Eubacterium* [16]. Po 1. roku życia skład mikroflory jelitowej staje się coraz bardziej podobny do występującego u dorosłego człowieka, zwiększa się liczba *Lactobacillus*, *Bacteroides* i *Clostridium*, maleje natomiast liczebność bifidobakterii oraz *Escherichia coli*. Stwierdza się również obecność w przewodzie pokarmowym bakterii, takich jak: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus fecalis* oraz należących do *Enterobacteriaceae*: *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia* sp., a także *Pseudomonas aeruginosa* [17]. Stabilizacja mikrobioty jelitowej następuje około 2. roku życia, a w około 5.-7. roku składem przypomina mikroflorę osoby dorosłej. Na podstawie badań, w których analizowano skład i zmienność mikroflory w trakcie życia, stworzono profile mikrobiologiczne flory jelitowej dla niemowląt i dorosłych [18]. Mikrobiota noworodków składa się w większości z bakterii z rodzaju: *Bifidobacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* oraz rodziny *Enterobacteriaceae*. W skład flory jelit dorosłych wchodzi natomiast głównie bakterie należące do *Bacteroidetes* i *Clostridium*. Do tej pory dzięki analizie sekwencji 16S rRNA zidentyfikowano 395 gatunków bakterii tworzących jelitowy ekosystem [19].

4. Wpływ mikrobioty jelitowej na występowanie otyłości

W 2004 roku, doktor Jeff Gordon z Uniwersytetu w Saint Louis wysunął hipotezę wiążącą mikrobiotę jelitową z kontrolowaniem masy ciała gospodarza. Zgodnie z tymi założeniami pewne gatunki bakterii są zdolne do pochłaniania energii dużo efektywniej, przez co osoby, których mikrobiota jelitowa jest zdolna do szybkiego metabolizowania energii wchłaniają więcej kalorii, a co za tym idzie – dużo łatwiej zwiększają masę ciała i są podatne na otyłość [20, 21].

Pierwsze badania dotyczące wpływu mikrobioty jelitowej na występowanie otyłości przeprowadzono na myszach GF (ang. *GF-mice*, *germ free mice*) pozbawionych kontaktu z mikroorganizmami [22]. W tym celu dokonano transferu mikroorganizmów z jelit myszy z genetycznie wywołaną otyłością do jelit myszy GF. Zaobserwowano, że już po 2 tygodniach od kolonizacji przewodu pokarmowego myszy GF wykazywały znacznie większy przyrost tkanki tłuszczowej niż myszy, które otrzymały bakterie od szczupłych, zdrowych osobników [22]. W innych badaniach grupę kontrolną do myszy GF stanowiły myszy hodowane w warunkach tradycyjnych, konwencjonalnych CONV-R (ang. *conventionally raised mice*). W początkowym okresie badań myszy CONV-R miały ok. 40% więcej tkanki tłuszczowej niż myszy GF, niezależnie od ilości spożywanego pożywienia. Natomiast po skolonizowaniu jelit myszy GF mikroflorą przeniesioną od myszy CONV-R – u biorców zanotowano istotny statystycznie wzrost zawartości tkanki tłuszczowej, rozwój insulinooporności oraz znamiennej wzrost wątrobowej produkcji triglicerydów [23, 24].

Uważa się, że względny stosunek bakterii typu *Bacteroidetes* oraz *Firmicutes*, które stanowią 90% bakterii kolonizujących jelita, ma związek z otyłością. Wzrost ilości bakterii typu *Firmicutes* przy jednoczesnej redukcji ilości bakterii typu *Bacteroidetes* był obserwowany w dalszych odcinkach jelit zarówno u genetycznie otyłych myszy, jak i u ludzi w stosunku do ich odpowiedników charakteryzujących się prawidłową masą ciała [25]. Według analiz modyfikacji mikroflory jelitowej, które związane były z dietą, u otyłych myszy obserwowano 50% spadek liczebności bakterii typu *Bacteroidetes* przy proporcjonalnym wzroście *Firmicutes* oraz zwiększenie ekspresji genów związanych z wykorzystywaniem energii z pożywienia w mikrobiomie jelitowym otyłych myszy. Również u osób stosujących dietę niskokaloryczną zaobserwowano spadek liczebności bakterii z typu *Bacteroidetes*, jednakowoż nie wykazano jednoznacznie, czy jest to przyczyna zwiększenia masy ciała, czy jedynie efekt przyjmowania określonych pokarmów [26]. U osób z nadmierną masą ciała zaobserwowano ponadto w mikrobiocie jelitowej dominację bakterii z rodzaju *Mollicutes*, które charakteryzują się dużą zdolnością do pozyskiwania energii z pożywienia [27]. Na rysunku 1 przedstawiono zależność mikroflory jelitowej od otyłości.



Rysunek 1. Zależność mikroflory jelitowej od otyłości
 Źródło: opracowanie własne na podstawie [28].

Zbilansowana prawidłowa dieta o zmniejszonej kaloryczności celem redukcji masy ciała zawiera prawidłowe ilości białek i węglowodanów. Może to powodować modyfikacje składu mikrobioty oraz jej aktywności w jelicie grubym. Zmniejszenie ilości spożywanych węglowodanów prowadzi do zmniejszenia liczebności bakterii produkujących kwas masłowy, będący preferowanym źródłem energii dla komórek takich jak: *Roseburia*, *Eubacterium* czy *Bifidobacterium*, ale nie stymuluje zmiany liczby *Bacterioides*. Przyjmowanie zwiększonej ilości węglowodanów wpływa natomiast na wzrost ogólnej liczby

bakterii [26]. Badania prowadzone przez Everard i Cani [29] wykazały, że dieta bogata w tłuszcze ma wpływ na zmiany w mikroflorze jelitowej myszy. Zwiększone przyjmowanie tłuszczów wraz z pokarmem zwiększa absorpcję lipidów, a nawet krótki okres wzmoczonego przyjmowania tłuszczów (od 3 do 4 tygodni) skutkuje pobudzeniem proliferacji komórek nabłonka i przerostem nabłonka jelita krętego, co predysponuje myszy do zwiększonej absorpcji lipidów, nawet po powrocie do zbilansowanej diety oraz prawidłowej masy ciała [30]. Zarówno u myszy, jak i u ludzi otyłych stwierdzono zmiany w stosunku ilości bakterii z typu *Firmicutes* oraz *Bacteroidetes*, ponadto u ludzi wykazano zmiany w liczebności konkretnych gatunków lub rodzajów bakterii, szczególnie w przypadku bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*, których jest znacznie mniej w przypadku osób otyłych niż osób z prawidłową masą ciała [29]. Różnice w składzie mikroflory kałowej pozwalają również na badanie predyspozycji do otyłości u dzieci we wczesnych etapach ich życia. Dzieci, które utrzymują prawidłową masę ciała, wykazują dużą liczbę bifidobakterii, natomiast te, które stały się otyłe lub osiągnęły nadwagę zawierają większą ilość bakterii *Staphylococcus aureus* w mikroflorze kałowej w okresie niemowlęcym [25].

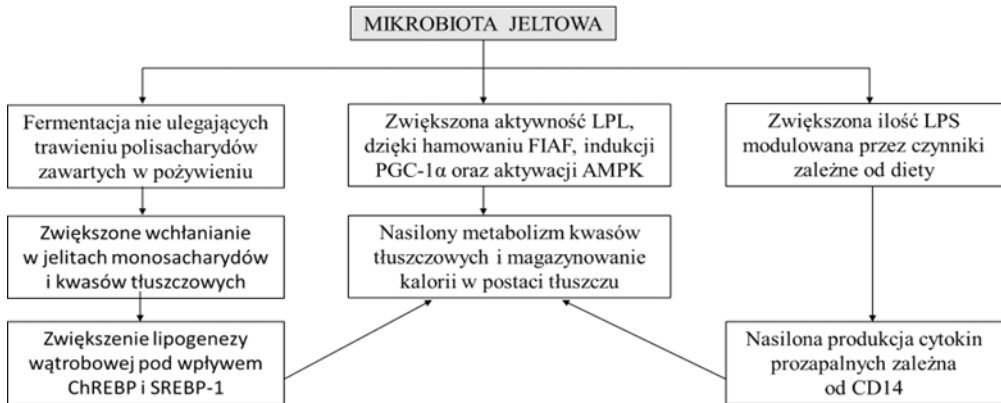
Przeszczepienie mikrobioty jelitowej od osoby otyłej może spowodować wzrost zawartości tłuszczu w ciele nawet do 60% oraz dodatkowo oporność na insulinę [26]. Ma to związek z supresją ekspresji czynnika tkankowego indukowanego głodem (FIAF, ang. *fasting-induced adipose factor*), który należy do grupy białek angiopoetyno-podobnych [31]. Białko podobne do angiopoetyny 4, inaczej określane jako FIAF, ma działanie hamujące względem lipazy lipoproteinowej (LPL, ang. *lipoprotein lipase*), czyli enzymu odpowiedzialnego za trawienie tłuszczów. Stąd hamowanie ekspresji genu białka FIAF skutkuje wzmoczoną aktywnością LPL w komórkach tkanki tłuszczowej oraz magazynowaniem energii właśnie w postaci tłuszczu [32].

Drugim mechanizmem wiążącym mikroflorę jelitową z otyłością może być hamowanie działania kinazy białkowej aktywowanej przez AMP (AMPK, ang. *activated protein kinase*). Białko to jest swego rodzaju miernikiem poziomu energii w komórkach wątroby oraz mięśniach szkieletowych, a jego działanie skutkuje wzmocnionym utlenianiem kwasów tłuszczowych oraz obniżeniem poziomu glikogenu [32].

Również krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFA, ang. *short chain fatty acids*) odgrywają dużą rolę w patogenezie otyłości. Jednym z mechanizmów, na który wpływają SCFA jest stymulowanie wydzielania peptydu YY (PYY, ang. *peptide YY*), który jest hormonem zmniejszającym motorykę jelit. Konsekwencją jego działania jest spowolnione przechodzenie treści pokarmowej w jelitach, czego skutkiem jest zwiększone wchłanianie składników odżywczych. Ponadto SCFA stanowią ligandy dla receptorów sprzężonych z białkami G – GPR41 oraz GPR43 [32]. Wykazano, że myszy pozbawione receptorów GPR41 oraz GPR43 mają niższą wagę niż ich dzikie odpowiedniki [32], przy czym niski poziom receptorów GPR41, powodujących produkcję leptyny, jest związany z obniżoną ekspresją peptydu YY, zwiększonym transportem treści jelitowej, ograniczeniem wchłaniania energii z diety oraz zmniejszonym poziomem lipogenezy w wątrobie [31].

Z kolei Cani i wsp. [33] zaproponowali kolejny mechanizm wiążący mikrobiotę jelitową z otyłością. Bakteryjny lipopolisacharyd (LPS, ang. *lipopolysaccharide*) zwany inaczej endotoksyną, którego źródłem są Gram-ujemne bakterie jelitowe, jest czynnikiem łączącym stan zapalny z zespołem metabolicznym indukowanym dietą bogatą w tłuszcze. W doświadczeniach na myszach otrzymujących pożywienie o dużej zawartości tłuszczu wykazali zwiększoną endotoksemię i zmianę stosunku bakterii Gram-ujemnych do Gram-

-dodatnich na korzyść tych pierwszych [33]. W innych badaniach na myszach ze zmuto-
wanym genem CD14 (ang. *cluster of differentiation*) żywionych dietą bogatą w tłuszcze
endotoksemia nasila ekspresję cytokin prozapalnych, tj.: TNF- α (ang. *tumor necrosis*
factor α), interleukin IL-1 (ang. *interleukin*) i IL-6 [34]. CD14 wiąże natomiast bakteryjny
lipopolisacharyd LPS na powierzchni komórek układu odpornościowego, powodując
wydzielanie cytokin prozapalnych. Wright i wsp. [34] sugerowali, że kompleks LPS/CD14
reguluje próg wrażliwości na insulinę i w związku z tym wpływa na występowanie
otyłości i cukrzycy. Na rysunku 2 przedstawiono prawdopodobne mechanizmy wiążące
mikroflorę jelitową z otyłością.



Rysunek 2. Mechanizmy wiążące mikroflorę jelitową z otyłością

AMPK – kinaza białkowa aktywowana przez AMP (ang. *activated protein kinase*), ChREBP – białko wiążące sekwencję odpowiedzi na węglowodany (ang. *carbohydrate response element-binding protein*), FIAF – czynnik tkankowy indukowany głodem (ang. *fasting-induced adipose factor*), LPL – lipaza lipoproteinowa (ang. *lipoprotein lipase*), LPS – lipopolisacharyd (ang. *lipopolysaccharide*), PGC-1 α – koaktywator receptora gamma aktywowany przez proliferatory peroksyosomów 1 α (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*), SREBP – białko wiążące element odpowiedzi na sterol (ang. *sterol response element binding protein*)

Źródło: opracowane własne na podstawie [35].

5. Podsumowanie

Światowa epidemia nadwagi i otyłości, której jesteśmy świadkami, powinna przyczynić się do zwiększenia wysiłków w celu zidentyfikowania osobniczych i środowiskowych czynników wpływających na równowagę energetyczną. Mikrobiota jelitowa odgrywa istotną rolę w regulacji równowagi energetycznej i masy ciała, a tym samym ma wpływ na otyłość. Uważa się, że względny stosunek bakterii typu *Bacteroidetes* oraz *Firmicutes*, które stanowią 90% bakterii kolonizujących jelita, ma związek z otyłością. Mechanizmem wiążącym mikroflorę jelitową z otyłością może być natomiast: hamowanie ekspresji genu białka FIAF, zwiększona aktywność lipazy lipoproteinowej, hamowanie działania aktywowanej kinazy białkowej czy zwiększona ilość bakteryjnego lipopolisacharydu. Potrzebne są jednak dalsze badania w celu wyjaśnienia związków pomiędzy zróżnicowanym składem mikrobioty jelitowej a predyspozycją do otyłości, a także ustalenia tego, czy modulowanie składu mikrobioty może być wykorzystane w leczeniu otyłości.

Literatura

1. World Health Organization, *Obesity. Preventing and Managing the Global Epidemic. Report of a WHO consultation*, WHO Technical Report Series, 2000, ISBN 92-4-120894-5.
2. World Health Organization, *Mean body mass index (BMI)*, WHO [data dostępu: 16.11.2022].
3. Gargallo-Vaamonde J., Álvarez-Món M.A. (2020). *Obesity and overweight*, *Medicine (Spain)*, 13(14), 2020, <https://doi.org/10.1016/j.med.2020.07.010>.
4. Wąsowski M., Walicka M., Marcinowska-Suchowierska E., *Otyłość – definicja, epidemiologia, patogeneza*, *Postępy Nauk Medycznych*, 4, 2013, s. 301-306.
5. Springer M., Zaporowska-Stachowiak I., Hoffmann K., Markuszewski L., Bryl W., *Obesity – an expensive disease*, *Hygeia Public Health*, 54(2), 2019, s. 88-91.
6. Biener A.I., Cawley J., Meyerhoefer C., *The medical care costs of obesity and severe obesity in youth. An instrumental variables approach*, *Health Economics*, 29(5), 2020, s. 624-639.
7. Chooi Y.C., Ding C., Magkos F., *The epidemiology of obesity*, *Metabolism Clinical and Experimental*, 92, 2019, s. 6-10.
8. Nowak A., Libudzisz Z., *Mikroorganizmy jelitowe człowieka*, *Standardy Medyczne. Pediatria*, 5, 2008, s. 372-379.
9. Betta P., Vitaliti G., *Intestinal microbial flora – effects of probiotics in newborns*, [w:] Brzozowski T. (red.), *New advances in the basic and clinical gastroenterology*, IntechOpen, 2012, s. 1-20.
10. Koenig J.E., Spor A., Scalfone N., Fricker A., Stombaugh J., Knight R., Angenent L., Ley R.E., *Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 108(1), 2011, s. 4578-4585.
11. Aagaard K., Stewart C.J., Chu D., *Does exposure to the vaginal microbiota confer health benefits to the infant, and does lack of exposure confer disease risk?* *Embo Reports*, 17(12), 2016, s. 1679-1684.
12. Gensollen T., Iyer S.S., Kasper D.L., Blumberg R.S., *How colonization by microbiota in early life shapes the immune system*, *Science*, 352, 2016, s. 539-544.
13. Nuriel-Ohayon M., Neuman H., Koren O., *Microbial changes during pregnancy, birth, and infancy*, *Frontiers Microbiology*, 7, 2016, s. 1-13.
14. Gałęcka M., Bartnicka A., Szewc M., Mazela J., *Kształtowanie się mikrobioty jelitowej u niemowląt warunkiem zachowania zdrowia*, *Standardy Medyczne. Pediatria*, 13, 2016, s. 359-367.
15. Gibson G.R., Roberfroid M.B., *Dietary modulation of the human colonic microbiota. Introducing the concept of prebiotics*, *The Journal of Nutrition*, 125, 1995, s. 1401-1412.
16. Penders J., Thijs C., Vink C., Stelma F.F., Snijder B., Kummeling I., Van den Brandt P.A., Stobberingh E.E., *Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy*, *Pediatrics*, 118, 2006, s. 511-521.
17. Walker W.A., Dufny L.C., *Diet and bacterial colonization role of probiotics and prebiotics*, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 9, 1998, s. 668-675.
18. Ley R.E., Peterson D.A., Gordon J.I., *Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine*, *Cell*, 124, 2006, s. 837-848.
19. Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein C.N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S.R., Nelson K.E., Relman D.A., *Diversity of the human intestinal microbial flora*, *Science*, 308, 2005, s. 1635-1638.
20. Gordon J., Heidenreich F.P., Carpenter C.J., Kelly-Hahn J., Schoenecker P.L., *Comprehensive treatment of late-onset tibia vara*, *Journal of Bone and Joint Surgery*, 7, 2005, s. 1561-1570.

21. Lewandowska M., *Microbiota of human gastrointestinal tract*, Food Chemistry and Biotechnology, 74, 2010, s. 39-50.
22. Turnbaugh P.J., Ley R.E., Mahowald M.A., *An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest*, Nature, 444, 2006, s. 1027-1031.
23. Turnbaugh P.J., Ley R.E., Hamady M., *The human microbiome project*, Nature, 449, 2007, s. 804-810.
24. Bäckhed F., Ding H., Wang T., *The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101, 2004, s. 15718-15723.
25. Sanz Y., Santacruz A., De Palma G., *Insight into the roles of gut microbes in obesity*, Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases, 14, 2008, s. 1-9.
26. Olszewska J., Jegusztyn-Krynicka E.K., *Human Microbiome Project – mikroflora jelit oraz jej wpływ na fizjologię i zdrowie człowieka*, Postępy Mikrobiologii, 51(4), 2012, s. 243- 456.
27. Nawrocka M., Szulińska M., Bogdański P., *Rola mikroflory jelitowej w patogenezie i leczeniu otyłości oraz zespołu metabolicznego*, Forum Zaburzeń Metabolicznych, 6(3), 2015, s. 1-3.
28. Kasai C., Sugimoto K., Moritani I., Tanaka J., Oya Y., Inoue H., Takase K., *Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing*, BMC Gastroenterology, 15(1), 2015, s. 1-10.
29. Everard A., Cani P.D., *Diabetes, obesity and gut microbiota*, Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 37, 2013, s. 73-83.
30. Greer R.L., Morgun A., Shulzhenko N., *Bridging immunity and lipid metabolism by gut microbiota*, Journal of Allergy and Clinical Immunology, 132(2), 2013, s. 253-262.
31. Diamant M., Blaak E.E., de Vos W.M., *Do nutrient-gut-microbiota interaction play a role in human obesity, insulin resistance and type 2 diabetes?*, Obesity Reviews, 12, 2011, s. 272-281.
32. Stachowicz N., Kiersztan A., *Rola mikroflory jelitowej w patogenezie otyłości i cukrzycy*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 67, 2013, s. 288-303.
33. Cani P.D., Amar J., Iglesias M.A., *Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance*, Diabetes, 56(7), 2007, s. 1761-1772.
34. Wright S.D., Ramos R.A., Tobias P.S., Ulevitch R.J., Mathison J.C., *CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein*, Science, 249(4975), 1990, s. 1431-1433.
35. DiBaise J.K., Zhang H., Crowell M.D., Krajmalnik-Brown R., Decker G.A., Rittmann B.E., *Gut microbiota and its possible relationship with obesity*, Mayo Clinic Proceedings, 83, 2008, s. 460-469.

Otyłość i jej powiązanie z mikrobiotą

Streszczenie

Otyłość jest jednym z największych wyzwań zdrowotnych XXI wieku. Badania naukowe wskazują na różnice dotyczące składu mikrobioty jelitowej osób otyłych oraz osób z prawidłową masą ciała, a mikrobiota jelitowa może mieć wpływ na rozwój otyłości. Uważa się, że względny stosunek bakterii typu *Bacteroidetes* oraz *Firmicutes*, które stanowią 90% bakterii kolonizujących jelita, ma związek z otyłością. W pracy przedstawiono postęp wiedzy na temat otyłości, mikrobioty jelitowej i jej roli w patogenezie otyłości. Omówiono badania dotyczące wpływu mikrobioty jelitowej na występowanie otyłości. Zaproponowano również mechanizmy wiążące mikroflorę jelitową z otyłością.

Słowa kluczowe: otyłość, mikrobiota jelitowa

Obesity and its connection with the microbiota

Abstract

Obesity is one of the biggest health challenges of the 21st century. Scientific research indicates the differences in the composition of the intestinal microbiota obese compared to people with normal body weight, and the intestinal microbiota can affect the development of obesity. It is believed that the relative ratio of bacteroides and firmicutes bacteria, which constitute 90% of the intestinal colonizing bacteria, is related to obesity. The work presents the progress of knowledge about obesity, intestinal microbiota and its role in the pathogenesis of obesity. Research on the effect of intestinal microbiota on obesity was discussed. Mechanisms binding intestinal microflora with obesity were also proposed.

Keywords: obesity, intestinal microbiota

E-papierosy w ujęciu socio-epidemiologicznym – bezpieczeństwo oraz użyteczność w terapii nikotyno-zastępczej

1. Wprowadzenie

E-papierosy – tj. papierosy elektroniczne – stają się w ostatnich latach coraz częstszym substytutem papierosów tradycyjnych. Opracował je w 2003 roku w Chinach farmaceuta Hon Lik, zaś na rynek amerykański i europejski zostały wprowadzone w 2007 [1]. Od tamtego czasu obserwuje się szybki wzrost ich użycia, w tym – zgodnie z pierwotnym założeniem – przez palaczy konwencjonalnych papierosów [2]. Niestety, większość z nich nie tylko nie porzuciła dawnych przyzwyczajeń, ale popadła w kolejny nałóg [3]. Warto wszak zwrócić uwagę na fakt, że dotychczas przedstawiono niewiele naukowych dowodów potwierdzających rolę papierosów elektronicznych w ograniczeniu nałogu palenia tytoniu.

Niepokój budzi jednak zjawisko rosnącego zainteresowania, jakim e-papierosy cieszą się wśród osób nastoletnich i młodych dorosłych. To właśnie w tej grupie wiekowej tempo wzrostu użytkowania [4], jak i popularność tego typu wyrobów są największe [5]. Znaczną rolę w tej kwestii odgrywają agresywne zabiegi marketingowe producentów – reklamujące papierosy elektroniczne jako zdrowszy, tańszy zamiennik, bardziej akceptowalny społecznie [6] w porównaniu z tradycyjnymi, wykorzystujący jedynie parę wodną i nikotynę, pozbawiony zaś substancji rakotwórczych, w tym substancji smolistych [7]. Nie bez znaczenia pozostaje także innowacyjność oferowanych produktów, atrakcyjny wygląd czy szeroka gama dostępnych smaków [8].

Trwa debata wśród środowisk naukowych i klinicznych odnośnie do bezpieczeństwa i długoterminowych skutków użytkowania e-papierosów, gdyż kwestie te wciąż pozostają sporne.

¹ s81338@365.sum.edu.pl, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Medycyny i Epidemiologii Środowiskowej, Wydział Nauk Medycznych w Zabrz, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl.

² Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Medycyny i Epidemiologii Środowiskowej, Wydział Nauk Medycznych w Zabrz, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl.

³ Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Medycyny i Epidemiologii Środowiskowej, Wydział Nauk Medycznych w Zabrz, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl.

⁴ Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Medycyny i Epidemiologii Środowiskowej, Wydział Nauk Medycznych w Zabrz, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl.

⁵ Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Medycyny i Epidemiologii Środowiskowej, Wydział Nauk Medycznych w Zabrz, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl.

⁶ karolina.lau@sum.edu.pl, Katedra i Zakład Medycyny i Epidemiologii Środowiskowej, Wydział Nauk Medycznych w Zabrz, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl.

⁷ jjosko@sum.edu.pl, Katedra i Zakład Medycyny i Epidemiologii Środowiskowej, Wydział Nauk Medycznych w Zabrz, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl.

2. Budowa i skład e-papierosów

Do podstawowych elementów papierosa elektronicznego zalicza się ładowalną baterię, atomizer (rozpylacz) lub element grzewczy oraz zbiorniczek z płynem, często smakowym (tzw. liquid). Termin „wapowanie” oznacza czynność wdychania aerozolu powstałego na skutek podgrzania owego liquidu. Tym, co budzi największe kontrowersje jest ostatnia z powyższych składowych, a dokładniej jej zawartość. Liquid stanowi bowiem mieszaninę glikolu propylenowego, gliceryny roślinnej, dodatków smakowych i aromatów, a także nikotyny w różnych stężeniach [9]. W przeciwieństwie do tradycyjnych papierosów – w e-papierosach nie zachodzi proces spalania tytoniu, a co za tym idzie – uwalniania takich substancji kancerogennych jak wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) czy N-nitrozoaminy [10]. Glikol propylenowy i gliceryna, choć uważane za bezpieczne do spożycia, po podgrzaniu przekształcają się w substancje toksyczne [11, 12]. Wyniki wielu badań [13-23] potwierdzają obecność w dymie e-papierosów produktów degradacji termicznej, takich jak akroleina, formaldehyd i aldehyd octowy, zaliczanych do grupy tzw. substancji szkodliwych i potencjalnie szkodliwych (HPHCs, ang. *harmful and potentially harmful constituents*) [24]. Podobnie rzecz ma się w przypadku aromatów i dodatków smakowych (np. aldehydu cytrynowego) – toksycznych przy ich wdychaniu [12]. Sama nikotyna uwalniana z soli nikotynowej [25, 26] wykazuje większą biodostępność od nikotyny w tradycyjnych papierosach, przez co aerozole e-papierosów dostarczają ją w stężeniach porównywalnych bądź wyższych niż dym konwencjonalnych papierosów [27]. Fakt ten przemawia za wysoce uzależniającym działaniem papierosów elektronicznych. To jednak nie koniec obaw. W badaniu z roku 2013 dotyczącym zawartości cartridge’a do e-papierosów wykryto cynę, która okazała się toksyczna wobec fibroblastów płucnych [14]. Ponadto, zgodnie z doniesieniami Departamentu Zdrowia i Opieki Społecznej Stanów Zjednoczonych z roku 2016, w e-papierosach stwierdza się również obecność diacetylu, ultradrobnych cząstek stałych, lotnych związków organicznych, a także metali ciężkich, m.in. niklu i ołowiu [28]. Stężenia 9 z 11 składowych wdychanego aerozolu przewyższają ich stężenia w dymie z tradycyjnych papierosów, a wiele spośród tych substancji prowadzi do chorób układu oddechowego [14].

3. Ewolucja e-papierosów

Dotychczas producenci wypuścili w obieg 4 generacje papierosów elektronicznych, z których każda następną – bardziej zaawansowana – coraz bardziej odbiegała wyglądem od tradycyjnych papierosów. Zmieniały się także parametry techniczne urządzeń – w celu ograniczenia uwalniania cząsteczek cyny do aerozolu kruche spoiny lutownicze zaczęto powlekać srebrem, by ostatecznie odchodzić od nich na rzecz łączenia przewodów poprzez zaciski [29, 30]. Z kolei usunięcie silikonowej osłony z aparatu zmniejszyło zawartość jej cząsteczek w aerozolu [31]. Produkty 2 i 3 generacji zyskały kolejno większy pojemnik na liquid oraz możliwość regulacji mocy baterii. Warto przy tym nadmienić, iż zwiększona moc baterii w połączeniu z większymi atomizerami oraz większą ilością użytego metalu poskutkowało analogicznie większą objętością generowanego aerozolu, a co za tym idzie – większym transferem jego cząsteczek, w tym toksycznych [32, 33]. Dodatkowo zwiększenie stosunku napięcia do mocy stworzyło ryzyko pojawienia się nowych, potencjalnie niebezpiecznych produktów ubocznych [31]. Cechą wyróżniającą 4 generację jest natomiast użycie nikotyny w formie protonowanej (soli), co niweluje jej

drażniący wpływ na błonę śluzową gardła, niemniej zwiększa ilość nikotyny dostarczanej w aerozolu [34].

Powyższe aspekty utrudniają dokładną ocenę zdrowotną e-papierosów ze względu na zróżnicowanie w budowie i funkcji urządzeń do nich zaliczanych. Nie bez znaczenia pozostają również osobiste nawyki dotyczące długości i częstości palenia.

4. Rozpowszechnienie nawyku palenia elektronicznych papierosów w społeczeństwie

4.1. Wzrost użytkowania na przestrzeni lat

Od momentu, w którym elektroniczne papierosy weszły na rynek światowy, ich popularność ciągle rośnie. Jest to zauważalne w większości krajów świata. Najdokładniejsze dane dotyczące użytkowania przez konkretne grupy społeczne, regulacji prawnych oraz innych aspektów związanych z e-papierosami pochodzą z prac przeprowadzanych w Stanach Zjednoczonych. Nie można nie zauważyć, że w Europie również zaczyna się dostrzegać ten problem i pojawia się coraz więcej informacji na temat nawyku palenia na tym kontynencie [35]. Dane z badania Eurobarometr 385 z 2012 roku, które objęło populację 26 566 młodych dorosłych palaczy z 27 krajów, wskazywały, że 20,3% z nich używało e-papierosa. Młodzi ludzie z Europy Środkowej i Wschodniej deklaruowali, że używali e-papierosów częściej w porównaniu ze średnią UE. Używanie e-papierosów było najbardziej popularne w Danii (36,3%), a najmniej na Słowacji (7,9%) [36]. Również kraje takie jak Kanada, Australia i Wielka Brytania zauważają rosnący problem. Wyniki badania The International Tobacco Four-Country Survey (Stany Zjednoczone, Wielka Brytania, Kanada i Australia) wśród nastolatków i dorosłych podają, iż wskaźniki świadomości i pierwszego użycia e-papierosów podwoiły się w latach 2008-2012 – wzrosło z 0,6% do 1,1%. W przypadku uczniów szkół średnich zażywanie kiedykolwiek wzrosło z 4,7% do 10%, a obecne zażywanie wzrosło z 1,5% do 2,8% ($p < 0,05$ dla wszystkich) [37]. Chociaż badania dotyczące papierosów elektronicznych różnią się od siebie pod względem elementów i metod pobierania próbek czy otrzymywania informacji, wyraźny jest trend zwiększania się ich popularności [36].

4.2. Użytkownicy e-papierosów, grupy docelowe i motywacje w paleniu

Rozpowszechnienie użytkowania e-papierosów zależne jest od wieku, płci, statusu społecznego, zawodu oraz tego, czy palący byli palaczami konwencjonalnych papierosów. Najczęstsze używanie papierosów elektronicznych można zaobserwować wśród mężczyzn, nastolatków, młodych mężczyzn, palaczy konwencjonalnych papierosów, a także byłych palaczy [35]. Szacuje się, że mężczyźni wykazywali nawet do 5 razy większą częstość użytkowania niż kobiety. Mężczyźni palili też codziennie częściej niż kobiety [35]. Obserwuje się dość spore różnice wieku wśród użytkowników e-papierosów. Największe rozpowszechnienie e-palania zauważono wśród młodzieży i młodych dorosłych wieku od 10 lat do 24 lat (od 5,5% do 56,6% badanych), następnie w wieku od 25 lat do 39 lat (od 13,7% do 25% badanych), od 40 lat do 65 lat (od 5% do 6,7%) oraz w wieku ≥ 65 lat (od 1,3% do 1,6%) [35, 36, 38]. Można więc stwierdzić, że trend palenia papierosów elektronicznych maleje z wiekiem. Stwierdzono, że status społeczny również wpływa na decyzję o paleniu papierosów elektronicznych. Dotyczy to przede wszystkim stopnia wykształcenia. Osoby ze średnim wykształceniem używały papierosów elektronicznych znacznie częściej niż osoby z wysokim czy niskim wykształceniem. Dodat-

kowo wykazano, że dzieci rodziców, którzy posiadali podstawowe wykształcenie znacznie częściej sięgały po papierosy elektroniczne niż ich rówieśnicy, których rodzice posiadali wykształcenie wyższe [39, 40]. Znaczący wzrost użytkowania papierosów elektronicznych można zauważyć w grupie studentów. Używanie e-papierosów w Stanach Zjednoczonych jest 3-krotnie wyższe wśród młodych osób dorosłych niż osób starszych [41]. W 2018 roku amerykańska telewizja informacyjna (CNN) nazwała e-papierosy „epidemią wśród nastolatków” [42]. W odniesieniu do użytego przez media terminu, nie ulega wątpliwości, że od momentu wprowadzenia na rynek USA w 2007 roku elektrycznych systemów dostarczania nikotyny (ENDS) szybko stały się one najbardziej powszechną używką wśród amerykańskiej młodzieży [43]. Prowadzone w latach 2011-2017 analizy stopnia używania e-papierosów przez uczniów wykazały nieliniową tendencję wzrostową (od 1,5% do 11,3%) dla uczniów szkół średnich oraz (od 0,6% do 4,3%) dla gimnazjalistów [42]. Jak się okazuje – można także obserwować wyższy wskaźnik stosowania e-papierosów u osób mających doświadczenie w używaniu konwencjonalnych papierosów, u płci męskiej, młodzieży mieszkającej na terenach miejskich oraz tej, której rodzice są użytkownikami tradycyjnej formy dostarczania nikotyny [44]. Interesująca zaś jest korelacja pomiędzy rozpowszechnieniem e-papierosów w stosunku do ich tradycyjnych odpowiedników wśród młodych dorosłych: gwałtowny wzrost popularności tych pierwszych po ich wprowadzeniu na rynek wiązał się z jednoczesnym spadkiem używania formy konwencjonalnej [45]. Warto ponadto podkreślić, że młodzież związana z medycyną rzadziej w stosunku do osób pozbawionych styczności z tą dziedziną użytkowała papierosy elektroniczne. Daje to wyraźną przesłankę, iż wiedza nabyta podczas edukacji ma wpływ na prezentowaną przez młodzież postawę zdrowotną [46]. Możliwość podjęcia próby interwencji w celu zatrzymania niekorzystnych tendencji w użytkowaniu e-papierosów wśród młodzieży wymaga znajomości wieku inicjacji. National Youth Tobacco Survey prezentuje następujące wyniki: 7. rok życia to wiek będący początkiem wzrostu ryzyka podjęcia inicjacji; zagrożenie stopniowo rośnie i osiąga szczyt w wieku 18 lat dla obu płci. Innymi, poza wiekiem, czynnikami zwiększającymi narażenie na inicjację są: rasa biała oraz płeć męska [43]. Obserwując wzrost użytkowości e-papierosów wśród osób nieletnich, można zapytać, jaka jest przyczyna tak znacznego wzrostu atrakcyjności tej formy używki w oczach młodzieży. Dotychczasowe badania wskazują, że pierwotna inicjacja wśród młodzieży wynika głównie z ciekawości, jednak opłacalność finansowa, duża liczba propozycji smakowych, brak trudności w zakupie (dzięki dużej dostępności) czy wpływ rówieśników także wydają się stanowić zachętę dla osób w młodym wieku do podjęcia próby stosowania e-papierosów [42]. Zaslugującym na odrębne wyróżnienie determinantem inicjacji wapingu wśród osób w młodym wieku jest wpływ mediów społecznościowych. Badanie mające ustalić charakter związku pomiędzy intensywnością ekspozycji na treści internetowe promujące e-papierosy a ich postrzeganiem przez młodzież wykazało, że udostępniana młodym odbiorcom reklama papierosów elektronicznych silnie oddziałuje na ich nastawienie w stosunku do tej formy używki. Szeroko pojęty marketing, promowanie tych produktów jako normy społecznej przez posty rówieśników bądź influencerów rozbudza w młodym odbiorcy podświadome przekonanie o pozytywnym, akceptowalnym przez otoczenie, wartym naśladowania charakterze e-papierosów [45].

Warto dodatkowo zaznaczyć, że znaczna część użytkowników e-papierosów należy do grupy tzw. „podwójnie palących,” czyli osób stosujących zarówno papierosy tradycyjne,

jak i elektroniczne. Liczna grupa osób zdecydowała się na taki krok, aby poradzić sobie z głodem nikotynowym w środowiskach wolnych od dymu, a także zachować postrzeganie profesjonalizmu (np. nierobienie przerw na papierosa w pracy lub niewąchanie dymu tytoniowego) [47-53]. Podwójnie palący komentowali, że ich decyzja o paleniu papierosów elektronicznych – jako alternatywa dla papierosów tradycyjnych – była wspierana przez ich rodziny. Uczestnicy zgłaszali, że członkowie rodziny kupili im e-papierosy, a wapowanie stało się wspólnym doświadczeniem [47, 50, 54]. Palenie e-papierosów jest więc postrzegane jako metoda redukcji ilości wypalanych tradycyjnych papierosów. Z tej opcji korzystają osoby nie tylko starsze, np. wieloletni uzależnieni, ale także młodzi dorośli, którzy rozpoczynali palenie od papierosów tradycyjnych [36, 41, 55]. Opublikowano ograniczoną liczbę randomizowanych badań klinicznych oceniających używanie e-papierosów w rzucaniu palenia, a ich wyniki są sprzeczne [35]. Dodatkowo organizacje zajmujące się zdrowiem nie znajdują wspólnego stanowiska w kwestii używania e-papierosów w celu rzucania palenia. Na przykład organizacja Public Health England popiera używanie e-papierosów w celu rzucenia palenia [56], podczas gdy amerykańskie agencje zdrowia stwierdziły, że nie ma wystarczających dowodów, aby zalecać e-papierosy w celu rzucenia palenia [57]. Większość pacjentów odstawiających palenie przy pomocy papierosów elektronicznych wierzy w ich skuteczność, stąd trudno ocenić, czy stanowią realną pomoc, czy też działają wyłącznie w oparciu o efekt placebo [36, 41, 55]. Należy zaznaczyć, że palenie papierosów to nie tylko sama nikotyna, ale też szereg bodźców nienikotynowych, do których są przyzwyczajeni palący, np. uczucie smaku, widok dymu czy ruchy ust. W tym przypadku palenie e-papierosów może pomóc, ponieważ zaspokojenie tych bodźców tłumi objawy abstynencji u pacjentów [55]. Istnieje obawa, że palenie papierosów elektronicznych może predysponować młodzież do palenia papierosów tradycyjnych w przyszłości, co może częściowo potwierdzić badanie Treura i wsp. (2018 r.). Młodzież, która kiedykolwiek zapaliła e-papierosa była o wiele bardziej skłonna do zapalenia papierosa tradycyjnego [35]. Konieczne są dalsze badania określające, w jakim stopniu e-papierosy otwierają drogę dla ich użytkowników do palenia papierosów tradycyjnych. Stąd bardzo ważne jest monitorowanie i regulowanie sprzedaży elektronicznych papierosów.

5. Uregulowania prawne dotyczące e-papierosów

Przegląd literatury naukowej nie daje nam kompletnych danych dotyczących skutków zdrowotnych e-papierosów. Sprzeczne dane z badań naukowych nie umożliwiają wdrożenia spójnej polityki regulującej używanie e-papierosów w różnych krajach [36, 41, 58]. Jednym z największych problemów związanych z regulacją prawną e-papierosów jest to, czy urządzenia te kwalifikują się jako leki, czy też są stosowane jako narkotyki rekreacyjne. E-papierosy – w zależności od użycia – stanowią jedno i drugie, co znacznie utrudnia wprowadzenie ścisłych regulacji prawnych. Światowa Organizacja Zdrowia wskazuje na konieczność wprowadzenia zakazu sprzedaży e-papierosów osobom niepełnoletnim, z czym zgadza się również FIRS (ang. *Forum of International Respiratory Societies*), które wskazuje, że do czasu uzyskania jednoznacznych danych na temat bezpieczeństwa i wpływu e-palenia na zdrowie e-papierosy powinny być ograniczone lub zakazane [36]. Również organy takie jak American Heart Association i European Respiratory Society zwracają uwagę na konieczność ścisłego monitorowania rynku e-papierosów i podejmowania bieżących decyzji w sprawie konkretnych regulacji praw-

nych. Unia Europejska w dyrektywie o wyrobach tytoniowych (2014/40/UE) wskazuje, że e-palenie jest poważnym problemem zdrowia publicznego, ponieważ e-papierosy stymulują zachowania związane z paleniem i społeczne przyzwolenie na palenie [36]. Dodatkowo palenie papierosów elektronicznych może doprowadzić do eksperymentowania z innymi wyrobami z nikotyną. Unijna dyrektywa określa również zasady dotyczące opakowania i oznakowania e-papierosów. Celem dyrektywy jest, by skład chemiczny podany na opakowaniu był zgodny z rzeczywistością oraz by udało się ograniczyć zawartość nikotyny w liquidzie do 20 mg/ml. Dyrektywa zaczęła obowiązywać 20 maja 2016 roku [36]. Problemem jest również marketing e-papierosów, który nie podlega ścisłym regulacjom. Twierdzenia marketingowe przekonują konsumentów o bezpieczeństwie reklamowanych produktów, przedstawiając e-papierosy jako zdrową alternatywę dla papierosów lub też pomoc w rzuceniu wyrobów nikotynowych. Informacje przekazywane są w nowatorski i strategiczny sposób, bardzo często poprzez media społecznościowe, co może zachęcać, szczególnie ludzi młodych, do sięgania po papierosy elektroniczne [41]. Aby zrównoważyć czynniki wpływające na regulację e-papierosów – należy zwrócić uwagę na 2 ważne aspekty: prewencyjny w przypadku młodzieży i kontrolny w przypadku palaczy, którzy szukają alternatywy dla papierosów tradycyjnych. Aspekt prewencyjny powinien obejmować ustanowienie ściśle określonych przepisów zakazujących sprzedaży nieletnim oraz kampanii reklamowych, które są kierowane do młodzieży. Należy również wprowadzić zakaz smakowych wkładów do e-papierosów, nad czym obecnie pracuje Unia Europejska. Aspekt kontrolny powinien obejmować lepsze środki produkcyjne, przepisy licencyjne dotyczące sprzedaży detalicznej i internetowej.

6. Wpływ palenia e-papierosów na układ krążenia

Istnieje wiele dobrze poznanych mechanizmów, poprzez które konwencjonalne papierosy wpływają na funkcjonowanie układu krążenia. Znacznie mniej badań wykazuje wpływ e-papierosów na ten układ, a wyciągane wnioski często są niejednoznaczne i tworzone poprzez porównywanie do konwencjonalnych sposobów używania tytoniu.

Główne zmiany, które zachodzą w układzie sercowo-naczyniowym pod wpływem e-papierosów, dotyczą przede wszystkim remodelingu naczyń krwionośnych, powstawania miażdżycy oraz zmian hemodynamiki serca i naczyń. Trudno jednak rozpatrywać te zmiany indywidualnie ze względu na wzajemne przenikanie się ich molekularnych mechanizmów (np. wielokierunkowy wpływ reaktywnych form tlenu – ROS, ang. *reactive oxygen species*) oraz oddziaływanie na siebie różnych elementów układu sercowo-naczyniowego (np. wzrost ciśnienia tętniczego krwi w wyniku zwiększonej sztywności naczyń obwodowych powoduje przebudowę mięśnia sercowego i powstawanie miażdżycy w uszkodzonych ścianach naczyń) [59, 60]. Podobnie wielu naukowców zwraca uwagę na konieczność całościowej analizy wpływu palenia na zdrowie, gdyż badanie pojedynczych składników dymu tytoniowego lub naparów, np. nikotyny, może prowadzić do wysuwania błędnych czy niepełnych wniosków o oddziaływaniu używek na organizm [59].

6.1. Wpływ na funkcję naczyń krwionośnych i płytek krwi

Kuntic i wsp. w badaniach na myszach i ludziach wykazali, że pary e-papierosa wywierały negatywny wpływ na funkcjonowanie naczyń w wyniku upośledzenia syntezy tlenu azotu i powstania stresu oksydacyjnego zależnego od jednej z oksydaz – NADPH – NOX2 [61]. Jako przyczynę tego zjawiska zidentyfikowano obecną w dymie e-papieroso-

wym akroleinę, o której negatywnym wpływie wiadomo od dawna [62, 63]. Co ciekawe, w badaniach Kuntica i wsp. większe upośledzenie funkcji śródbłonna obserwowano po zastosowaniu papierosów elektronicznych z wkładem pozbawionym nikotyny niż tych zawierających ową substancję [61]. Wynik ten dziwi w kontekście wielu wcześniejszych badań mówiących o negatywnym wpływie nikotyny na funkcję śródbłonna i indukowanie przez nią wewnątrznaczyniowego stanu zapalnego [62].

Innymi składnikami dymu e-papierosowego, które mogą prowadzić do dysfunkcji śródbłonna, a dalej także do rozwoju miażdżycy, nadciśnienia tętniczego czy choroby wieńcowej i zawału serca, są cząstki stałe PM 2,5 i PM 0,1, które działają m.in. poprzez indukcję stresu oksydacyjnego i in., co zostanie omówione w dalszej części tekstu [62, 64].

Również pochodne aldehydowe (acetaldehyd, formaldehyd i akroleina) wpływają na funkcję naczyń poprzez promocję stresu oksydacyjnego, stanu zapalnego, dysfunkcji śródbłonna i miażdżycy [62].

W patologicznym tworzeniu się skrzeplin blokujących światło naczyń (np. w konsekwencji pęknięcia blaszki miażdżycowej) biorą udział płytki krwi. Struktury te po aktywacji zmieniają kształt i agregują [65]. Według badań pod wpływem e-papierosów zwiększa się zarówno liczba płytek krwi, jak i stopień ich aktywacji [65-67].

6.2. Zmiany ciśnienia tętniczego krwi

Istnieją badania mówiące o wzroście ciśnienia tętniczego krwi pod wpływem nikotyny [62, 68]. Może to być spowodowane zwiększonym uwalnianiem z komórek śródbłonna działającej naczynioskurczowo endoteliny-1 (ET-1) [68]. Badania na hodowlach komórkowych i zwierzętach wykazały, że zmiany w ilości ET-1 zachodzą zarówno tuż po ekspozycji [69], jak i przy długotrwałym stosowaniu nikotyny [70, 71]. Drugi przytaczany w badaniach mechanizm wazokonstrykcji to zmniejszenie ekspresji śródbłonkowej syntazy tlenku azotu (eNOS) [72] (także pod wpływem kotyniny [73]) i spadek biodostępności tlenku azotu [74]. Warto jednak dodać, że działanie nikotyny różni się w zależności od narządu – rozszerza ona naczynia mózgowie właśnie za pośrednictwem NO [75].

Cząstki stałe (PM 2,5 i PM 0,1) mogą powodować wzrost ciśnienia tętniczego krwi poprzez blokadę angiotensyny w szlaku renina–angiotensyna, co prowadzi do skurczu naczyń krwionośnych [76].

7. Zmiany zachodzące w mięśniu sercowym

Zmiany zachodzące w mięśniu sercowym pod wpływem substancji toksycznych można ogólnie podzielić na zmiany funkcjonalne i morfologiczne.

7.1. Zmiany funkcjonalne

Wzrost częstości akcji serca (tętno – HR, ang. *heart rate*) podczas używania papierosów elektronicznych zachodzi prawdopodobnie w wyniku oddziaływania nikotyny na receptory nikotynowe $\alpha 7$ dla acetylocholiny ($\alpha 7$ -nAChR) [68, 77]. Efekt ten jest wyraźniejszy niż zachodzące wcześniej, ale krótkotrwałe obniżenie HR za pośrednictwem receptorów nikotynowych $\alpha 4\beta 2$ dla acetylocholiny ($\alpha 4\beta 2$ -nAChR) [68].

Zgodnie z badaniami Vansickela i Eissenberga u e-palaczy wzrost HR może zachodzić już w ciągu 5 minut od pierwszego wdechu (średnio z 73,2 ud./min do 78 ud./min) i utrzymywać się przez cały okres inhalacji [78]. W wymienionych badaniach wzrost HR był równoległy do wzrostu poziomu nikotyny w osoczu. Podobne zjawisko zaobserwowali Nides i wsp. [79]. W ich badaniu wyjściowe HR wynosiło średnio 68 u./min

i wzrosła o 2,4 ud./min (5 minut po pierwszym zaciągnięciu) oraz 5,3 ud./min (10 minut po pierwszym zaciągnięciu). Podobne zmiany zaobserwowano także w drugiej serii zaciągnięć (godzinę po rozpoczęciu pierwszej serii) – wówczas HR wzrosło o 2 oraz 4,8 ud./min odpowiednio po 5 i 10 minutach od pierwszego wdechu.

Istnieją również doniesienia sugerujące związek aldehydów (w tym wspomnianej wcześniej akroleiny oraz aldehydu octowego i formaldehydu) ze zmianami funkcjonalnymi w sercu [80]. W badaniach na zwierzętach substancje z tej grupy powodowały zmiany aktywności autonomicznego układu nerwowego i zaburzenia rytmu serca [80-82].

7.2. Zmiany morfologiczne

Zmiany morfologiczne w sercu mogą być następstwem patologii w układzie naczyń krwionośnych (skutkujących wzrostem ciśnienia tętniczego krwi) lub też powstawać *de novo* w wyniku bezpośredniego działania niekorzystnych czynników na kardiomiocyty.

Akroleina, oprócz pośredniego wpływu poprzez indukcję skurczu naczyń krwionośnych, może także oddziaływać bezpośrednio na serce. Jest w stanie tworzyć addukty z białkami kardiomiocytów (zarówno wewnątrz jądra komórkowego, jak i w cytoplazmie), indukować ich martwicę i apoptozę. Nasilenie tego zjawiska prowadzi do rozwoju kardiomiopatii i w konsekwencji do niewydolności serca [83]. Również inne pochodne aldehydowe powodują apoptozę kardiomiocytów, działając np. poprzez tworzenie reaktywnych form tlenu i uszkodzenie mitochondriów [84]. Basma i wsp. wykazali, że – pomimo różnic w stężeniu nikotyny – papierosy elektroniczne wywoływały podobny efekt kardiotoksyczny co papierosy tradycyjne, indukując apoptozę komórek za pośrednictwem ROS [85].

Hasan i wsp. przeprowadzili eksperyment, w którym na przykładzie myszy zaobserwowali, że narażenie ciężarnych na dym e-papierosów i dietę wysokotłuszczową powoduje apoptozę kardiomiocytów już w życiu płodowym [86]. Winien temu jest stres oksydacyjny, zaburzenia białek proapoptotycznych, aktywacja kaspazy 3 i inaktywacja kinazy białkowej aktywowanej przez AMP (AMPK, ang. *AMP-activated protein kinase*).

8. Wzrost ryzyka długoterminowych powikłań sercowo-naczyniowych

Istniejące obecnie badania nie dostarczają jednoznacznych wniosków na temat związku używania e-papierosów z długoterminowymi powikłaniami sercowo-naczyniowymi, takimi jak choroba wieńcowa i zawał serca [87].

Duże (biorące pod uwagę prawie 450 tys. osób) badania Osei'a i wsp. nie wykazały związku pomiędzy paleniem wyłącznie e-papierosów a udarem, zawałem serca czy chorobą wieńcową [88].

W badaniach autorstwa Farsalinosa i wsp. początkowo wykazywano zależność pomiędzy – paradoksalnie – nieczęstym (w oryg. *some days*) używaniem e-papierosów a zawałem serca. Jednak w analizie zbiorczej tych samych badań przewlekłe powikłania sercowo-naczyniowe były powiązane z powszechnie znanymi czynnikami ryzyka, takimi jak nadciśnienie, wiek, cukrzyca i zaburzenia lipidowe [89].

Alzahrani i wsp. wykazali istotny związek pomiędzy używaniem papierosów elektronicznych a zawałem serca – u osób korzystających z tej używki ryzyko zawału było 1,79 raza większe niż w grupie kontrolnej [90]. Badanie to posiadało jednak poważne ograniczenia związane z nieprecyzyjnym ustaleniem kolejności używania e-papierosów i zawału serca w populacji badanej [89-91].

Naukowcy zajmujący się związkiem pomiędzy używaniem e-papierosów a odległymi powikłaniami ze strony układu sercowo-naczyniowego zwracają uwagę na ograniczenia badań: stosunkowo krótki czas, który minął od upowszechnienia się e-papierosów [89], częste używanie papierosów konwencjonalnych przed rozpoczęciem e-palenia [89] oraz konieczność precyzyjnego ustalenia sekwencji czasowej (tzn. zbadania, czy osoby z obciążeniami sercowo-naczyniowymi w historii najpierw przeszły chorobę, czy też rozpoczęły używanie papierosów elektronicznych) [89-91].

8.1. Zmiany w układzie sercowo-naczyniowym zachodzące po zmianie tradycyjnych papierosów na papierosy elektroniczne

Papierosy elektroniczne są często propagowane jako „mniejsze zło” dla osób mających trudności z porzuceniem palenia tradycyjnych papierosów [61, 80, 92]. Stąd też istnieje wiele badań dotyczących zmian, jakie zachodzą w organizmie (w tym układzie sercowo-naczyniowym) po zaprzestaniu tradycyjnego palenia na korzyść używania e-papierosów.

8.2. Funkcja śródbłonna

W 2019 roku George i wsp. zbadali zmiany zachodzące w śródbłonku polegające na poprawie funkcjonowania śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS) [93]. Naukowcy wykorzystali do tego zjawisko rozszerzenia zależnego od przepływu (FMD, ang. *flow-mediated dilation*). Po miesiącu od porzucenia klasycznego palenia i stosowania w zamian e-papierosów zaobserwowano znaczną poprawę funkcji śródbłonna. Intensywność poprawy funkcji śródbłonna była zależna od płci: „terapia” e-papierosami przyniosła lepsze skutki wśród kobiet niż mężczyzn, nie zależała jednak od używania e-papierosów w wkładami nikotynowymi lub wolnymi od tego składnika.

Podobne badania w 2021 roku przeprowadzili Klonizakis i wsp. Zaobserwowali oni poprawę funkcji śródbłonna już po 3 dniach [94] (a następnie po 3 i po 6 miesiącach [95]) od zaprzestania tradycyjnego palenia. Poprawa występowała zarówno wśród osób używających e-papierosów zawierających nikotynę oraz bez nikotyny, jak i stosujących nikotynową terapię zastępczą, przy czym żadna z tych grup nie odniosła większych korzyści sercowo-naczyniowych niż pozostałe. Podobnie jednak jak w badaniach George’a i wsp. – po 3 i 6 miesiącach interwencji lepszą odpowiedź pod względem zjawiska FMD prezentowały kobiety [95].

8.3. Ciśnienie tętnicze

George i wsp. zauważyli redukcję skurczowego ciśnienia krwi po zmianie papierosów tradycyjnych na elektroniczne niezależnie od stażu palenia, jednak wyniki te nie wykazały jednoznacznej istotności [93]. W tych samych badaniach zauważono poprawę sztywności naczyń, mierzoną poprzez badanie szybkości fali tętna. Poprawa tego parametru dotyczyła jednak tylko osób palących ≤ 20 paczkolet (gdzie paczkoleta oblicza się poprzez pomnożenie liczby wypalanych paczek papierosów – 1 paczka to 20 sztuk – na dobę przez lata nałogu, np.: 1 paczkolet oznacza wypalenie 1 paczki papierosów na dobę w ciągu jednego roku). Również Klonizakis i wsp. w swoich badaniach stwierdzili poprawę średniego ciśnienia tętniczego (MAP, ang. *mean arterial pressure*) zarówno po 3 dniach, jak i 3 oraz 6 miesiącach po porzuceniu tradycyjnej formy palenia tytoniu na rzecz e-papierosów [94, 95]. Zmiany po roku w grupie pacjentów z nadciśnieniem tętniczym opisali Polosa i wsp. [96]. Zaobserwowali oni spadek mediany ciśnienia skurczowego ze 140 mm Hg do 130 mm Hg i rozkurczowego z 86 mm Hg do 80 mm Hg.

9. Wpływ palenia e-papierosów na układ oddechowy

9.1. Astma

Użytkownicy papierosów elektronicznych są bardziej narażeni na zachorowanie na astmę niż osoby niepalące [97]. E-papierosy nie tylko są niezależnym czynnikiem ryzyka, wykazują również działanie addytywne w połączeniu z innymi zmiennymi, takimi jak palenie papierosów tradycyjnych lub marihuany czy otyłość [98]. W badaniach Willsa i wsp. zaobserwowano, że ryzyko zachorowania na astmę związane z używaniem papierosów elektronicznych wzrasta o 1,33 raza wśród osób niepalących tradycyjnego tytoniu [99]. Zachorowania mogą występować już na etapie szkoły średniej [98]. Osoby chore na astmę, które używają e-papierosów, są bardziej podatne na ataki choroby [100].

Jako potencjalne mechanizmy prowadzące do astmy badacze wskazują głównie przewlekły stan zapalny i podatność na infekcje dróg oddechowych, jednak wymaga to dalszych badań [98].

9.2. POChP

Istnieją badania mówiące o wyższym ryzyku zachorowania na przewlekłe zapalenie oskrzeli, rozedmę płuc czy przewlekłą obturacyjną chorobę płuc (POChP) wśród użytkowników e-papierosów [101-103]. W badaniach Osei'a i wsp. ryzyko to było 1,75 raza wyższe u ogółu aktualnych użytkowników e-papierosów, przy czym wśród osób palących codziennie wzrastało ono do 2,64 raza [101]. W dużych (ponad 32 tys. osób) badaniach Pereza i wsp. użytkownicy e-papierosów, którzy nigdy nie palili papierosów tradycyjnych, mieli 2,94 raza wyższe ryzyko zachorowania na POChP w porównaniu do osób nigdy nie używających ani papierosów konwencjonalnych, ani elektronicznych [102]. W tych samych badaniach również w grupie palaczy papierosów konwencjonalnych użytkownicy e-papierosów byli narażeni na wyższe ryzyko zachorowania. Również Wills i wsp. zauważyli, że związek pomiędzy użytkownikami e-papierosów i POChP jest duży w grupie osób niepalących (ryzyko 2,98 raza większe), zaś według badaczy korelacja słabnie wśród palaczy papierosów konwencjonalnych. Według Xie i wsp. największe ryzyko POChP wykazywały osoby korzystające zarówno z e-papierosów, jak i papierosów konwencjonalnych (4,39 raza większe ryzyko w porównaniu do osób niekorzystających z tych używek) [103]. Dalej byli palacze, którzy wcześniej używali papierosów tradycyjnych (ryzyko 3,24 raza większe).

9.3. Zapalenia płuc

Istnieje szereg doniesień o zapaleniu płuc spowodowanym używaniem e-papierosów, chociaż nie ustalono jeszcze jednoznacznego związku przyczynowo-skutkowego [104]. Choroba może mieć podłoże lipidowego zapalenia płuc [105, 106], eozynofilowego zapalenia płuc [107], organizującego się zapalenia płuc [104, 108], zapalenia płuc z nadwrażliwości (HP, ang. *hypersensitivity pneumonitis*) [109, 110], śródmiąższowej choroby płuc związanej z zapaleniem oskrzelików (RB-ILD, ang. *respiratory bronchiolitis interstitial lung disease*) [110], może także wystąpić wysięk opłucnowy [111] czy rozlane krwawienie pęcherzykowe (DAH, ang. *diffuse alveolar hemorrhage*) [112]. Objawy choroby występowały w ciągu kilku dni [107, 111] do kilku miesięcy [104-106] od rozpoczęcia stosowania e-papierosów. W leczeniu podstawą było zaprzestanie używania papierosów elektronicznych, a w niektórych przypadkach także systemowe zastosowanie działających przeciwwzapalnie steroidów (np. metyloprednizolonu) [104].

W badaniach na myszach stwierdzono odpowiedź zapalną (napływ makrofagów, limfocytów T, wzrost stężenia cytokin prozapalnych), a także wzrost ekspresji konwertazy angiotensyny II (ACE2, ang. *angiotensin converting enzyme*; receptor stanowi punkt uchwytu wirusa SARS-CoV-2) w płucach po ekspozycji na e-papierosy [113]. W procesie tym pośredniczył receptor dla nikotyny nAChR α 7.

9.4. Inne

Wśród użytkowników e-papierosów objawy ze strony układu oddechowego, takie jak świszczący oddech, przewlekły kaszel, odkrztuszanie wydzieliny czy zapalenia oskrzeli mogą wystąpić już w młodym wieku [114].

Carter i wsp. opisali przypadek 35-letniej pacjentki, która doznała uszkodzenia płuc prawdopodobnie w konsekwencji intensywnego używania papierosów elektronicznych [115]. Szybko pogarszający się stan kobiety wymagał użycia oksygenacji pozaustrojowej (ECMO, ang. *extracorporeal membrane oxygenation*), a następnie długotrwałej rehabilitacji. Jako główną przyczynę choroby badacze podali wdychanie toksycznych produktów rozpadu substancji znajdujących się we wkładzie do e-papierosa, których reaktywność i lotność wzrosły w wyniku podgrzania w urządzeniu.

9.5. Przejście z papierosów tradycyjnych na papierosy elektroniczne (ang. *switch-on*)

Istnieją zarówno badania mówiące o pozytywnym wpływie na układ oddechowy porzucenia papierosów konwencjonalnych na rzecz e-papierosów [116, 117], jak i te o przeciwnych wnioskach [101, 118]. Potencjalne korzyści związane są z zaprzestaniem palenia papierosów konwencjonalnych (co jest udowodnionym czynnikiem poprawiającym rokowanie w POChP) [118]. Konieczność zaprzestania lub ograniczenia palenia papierosów konwencjonalnych obok stosowania papierosów elektronicznych powinna być podkreślana w komunikacji z pacjentem, aby uniknąć nieporozumień i – co gorsza – stosowania e-papierosów jako dodatku do „normalnego” funkcjonowania. O skutkach takiego postępowania donoszą Bowler i wsp., którzy zauważyli, że niekiedy pacjenci nie tylko nie ograniczyli użycia papierosów konwencjonalnych po skorzystaniu z e-papierosów, ale wręcz jeszcze intensywniej używali palonego tytoniu. Postępowanie takie powodowało zaostrzenie POChP [119].

W badaniach Xie i in. zauważono, że palacze, którzy porzucili palenie papierosów konwencjonalnych, mają niższe ryzyko POChP niż czynni palacze (ryzyko względne 0,85) [103]. Korzyści dotyczą również pacjentów z postawioną już diagnozą – Polosa i wsp. wykazali spadek liczby zaostrzeń POChP (średnio 2,3 do 1,7, 1,4 i 1,3 zaostrzeń rocznie po odpowiednio 1 roku, 2 i 3 latach *follow-upu*) u pacjentów, którzy o co najmniej 75% zmniejszyli liczbę wypalanych papierosów konwencjonalnych na korzyść e-papierosów [101]. Poprawa wystąpiła również w teście marszu 6-minutowego (6MWT, ang. *6 Minute Walk Test*) oraz została zauważona przez samych pacjentów, co wyrażono poprzez różnice w punktacji CAT na różnych etapach badania.

10. Palenie bierne

Podczas używania papierosów elektronicznych użytkownicy często praktykują „widowskie” wydychanie dymu, nawet jeśli same urządzenia pozbawione są strumienia bocznego [62]. Nie pozostaje to bez wpływu na jakość powietrza w otoczeniu i organizmy osób postronnych. Konsekwencje są odczuwalne nawet w miejscach, w których

używanie tradycyjnych papierosów jest zakazane – chęć ominięcia tego zakazu np. w restauracjach czy miejscach pracy jest bowiem częstym powodem używania e-papierosów przez nałogowych palaczy [92, 120].

Bierne palenie e-papierosów niesie ze sobą narażenie m.in. na nikotyne. W badaniach Flourisa i wsp. e-papierosy i papierosy tytoniowe skutkowały porównywalnym stężeniem kotyniny (metabolitu nikotyny) w osoczu podczas sesji zarówno czynnego (odpowiednio 60,6 ng/ml \pm 34,3 ng/ml vs. 61,3 ng/ml \pm 36,6 ng/ml), jak i biernego palenia (2,4 ng/ml \pm 0,9 ng/ml vs. 2,6 ng/ml \pm 0,6 ng/ml) [121]. Ballbè i wsp. zauważyli, że stężenia nikotyny w powietrzu wynosiły średnio 0,13 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ w domach użytkowników e-papierosów i 0,74 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ w domach użytkowników klasycznych papierosów oraz 0,02 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ u osób niepalących [122]. Podczas tych badań średnie stężenie kotyniny w ślinie wynosiło 0,19 ng/ml w domach użytkowników e-papierosów (dla porównania: 0,38 ng/ml w domach tradycyjnych palaczy i 0,07 ng/ml w domach kontrolnych) przy narażeniu na opary e-papierosów przez ponad 2 godziny dziennie.

Jakość powietrza po intensywnym używaniu e-papierosów pozostawia wiele do życzenia również pod względem obecności cząsteczek stałych. Podczas badań przeprowadzonych w 2015 roku Soule i wsp. wykazali, że w dużej (4023 m^3) sali podczas spotkania z udziałem użytkowników e-papierosów stężenie PM_{2,5} wzrosło z 1,92-3,20 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ do 311,68-818,88 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ [123]. Dla porównania, zgodnie z wytycznymi Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organization*) maksymalna norma dla pyłów zawieszonych PM_{2,5} średnio w ciągu roku nie powinna przekraczać 5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, zaś w ciągu doby maksimum to 15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ [124].

W badaniach Flourisa i wsp. czynność płuc mierzona stosunkiem nasilonej pierwszosekundowej objętości wydechowej (FEV₁, ang. *forced expiratory volume in 1 second*) do nasilonej pojemności życiowej (FVC, ang. *forced vital capacity*) podczas godzinnej sesji biernego palenia e-papierosów nie uległa zmianom [121]. Jednocześnie ekspozycja na wyżej opisane cząsteczki stałe PM_{2,5} i PM_{0,1} może powodować negatywne, długoterminowe skutki, m.in. o podłożu zapalnym [76].

11. E-papierosy a ciąża

Powszechnie znane jest przekonanie o paleniu konwencjonalnych wyrobów tytoniowych przez matkę w trakcie ciąży jako poważnym problemie zdrowia publicznego. Niepodważalny, potwierdzony wieloma badaniami, jest związek tradycyjnych papierosów z niepłodnością, ograniczeniem wzrostu wewnątrzmacicznego, poronieniami, porodem przedwczesnym oraz nagłą śmiercią, która dotyka niemal 1000 niemowląt rocznie. Także bierna ekspozycja na dym tytoniowy wiąże się z opóźnieniem rozwoju i problemami behawioralnymi, a nawet z utratą słuchu spowodowaną uszkodzeniem ślimaka u dzieci w wieku od 6 do 12 lat. Kontrowersyjne jest natomiast zagadnienie wpływu elektrycznych systemów dostarczania nikotyny stosowanych przez kobiety ciężarne na rozwijający się płód. Brak randomizowanych badań kontrolnych związanych z tym problemem wynika z trudności w zdobyciu zgody komisji etycznych, które nie są skłonne do zatwierdzenia testów e-papierosów u kobiet w ciąży z uwagi na wysoce prawdopodobną szkodliwość dla zdrowia i życia rozwijającego się płodu [125]. Potencjalnym kierunkiem rozwoju wiedzy w tym temacie mogą być badania oparte na obserwacji oraz sondaże sporządzane na podstawie specjalnie opracowanych kwestionariuszy [126]. W świetle dotychczas przeprowadzanych statystyk szacuje się, iż w skali międzynarodowej

rozpowszechnienie aktywnego użytkowania e-papierosów w ciąży wynosi od 0,5% do 15%. [127]. Należy mieć na uwadze, że badania oparte na samoocenie mogą dawać znaczną część wyników fałszywie ujemnych, co sugeruje, iż rzeczywisty poziom palenia może być wyższy [126]. Istnieją 2 kierunki przekonań w kontekście słuszności stosowania ENDS u kobiet w ciąży. Pierwszy dotyczy postrzegania tych urządzeń jako zdrowszej alternatywy dla tradycyjnych papierosów, drugi zaś wykorzystuje je jako narzędzia zmierzającego do rzucenia nałogu [128]. Warto jednak podkreślić, że bezpieczeństwo stosowania nikotynowych urządzeń zastępczych podczas ciąży nie jest poparte dowodami, dlatego też kobiety w okresie prenatalnym powinny zachować szczególną ostrożność z uwagi na możliwość wystąpienia niekorzystnych skutków u dziecka. E-papierosy nie powinny być używane u kobiet w ciąży z uwagi na następujące przesłanki: badania na zwierzętach ujawniły toksyczny wpływ ENDS na nerwowe komórki macierzyste. Mitochondria w nich zawarte charakteryzują się większą wrażliwością na czynniki cytotoksyczne *in vitro* po ekspozycji na substancje zawarte w e-papierosach. [125]. Nikotyna jest cząsteczką łatwo penetrującą barierę łożyskową, która osiąga o 80% wyższe stężenie w płynie owodniowym w stosunku do osocza matki po 30 minutach od ekspozycji. Szybko narastający poziom nikotyny w mózgu dziecka wpływa między innymi na uwalnianie neuroprzekazników (dopaminy, adrenaliny, noradrenaliny, serotoniny, glutamianu, acetylocholino, GABA), a także na liczbę receptorów dla acetylocholino. Warto nadmienić, że nikotyna przenika także do mleka matki, co może przedłużać ekspozycję dziecka na tę substancję w okresie poporodowym. Poza wpływem na rozwój ośrodkowego układu nerwowego – podejrzewa się również możliwość upośledzenia funkcji trofoblastu oraz zmniejszonej proliferacji komórek pęcherzyków płucnych u potomstwa matek użytkujących ENDS w ciąży [125]. 1,2 PDO to nośnik wykorzystywany w e-papierosach, w wysokich stężeniach może powodować kwasicę metaboliczną, hemolizę, neurotoksyczność oraz nefrotoksyczność u noworodków. Do innych, wymienianych w literaturze, potencjalnych skutków użytkowania ENDS w ciąży należą: spontaniczne poronienia, zespół nagłej śmierci niemowląt (SIDS), późniejsze trudności w nauce oraz problemy behawioralne rozwijającego się dziecka [129]. Przypuszcza się, że ryzyko uzależnienia u dziecka to także skutek narażenia na nikotynę w życiu prenatalnym. Biorąc pod uwagę przytoczone zależności należy przypuszczać, że stosunkowo nowy na rynku produkt, jakim jest e-papieros, stanowi realne zagrożenie dla zdrowia zarówno matki, jak i płodu. Renomowane organizacje profilaktyczne przestrzegają przed użytkowaniem ENDS w ciąży, co z jednej strony stanowi oczywistą profilaktykę zdrowia matek i ich potomstwa, z drugiej zaś – stanowi barierę dla badań klinicznych, które mogłyby dostarczyć nowych danych na ten wciąż słabo poznany problem [127].

12. Wpływ e-papierosów na jamę ustną i gardło

Pierwszy kontakt różnych wdychanych substancji chemicznych z aerozolem ma miejsce w jamie ustnej, a wnioski dotyczące skutków tej interakcji pochodzą głównie z badań na zwierzętach lub *in vitro*. Zgłoszono także sprzeczne wyniki odpowiadające różnym kombinacjom urządzeń i liquidów oraz różnym metodom badania [130]. Podczas oceny wpływu ekspozycji jamy ustnej na e-aerozol należy wziąć pod uwagę rozwój i nasilenie chorób przyzębia, takich jak krwawienie z dziąseł podczas zgłębnikowania, ocenę ilości płytki nazębnej, określenie głębokości kieszonki dziąsłowej jako markera zapalenia przyzębia oraz potencjalnego wpływu na komórki nabłonka i mikrobiom jamy ustnej.

W badaniu pilotażowym przekrojowym z udziałem ochotników, aby ocenić wpływ używania e-papierosów na biomarkery stanu zapalnego, stres oksydacyjny, przeciwzapalne mediatory lipidowe, czynniki wzrostu i naprawy tkanek w ślinie i płynie dziąsłowym, wykazano znaczny wzrost między poziomami mieloperoksydazy i metaloproteinazy macierzy-9 użytkowników e-papierosów względem osób, które z nich nie korzystają. Pomiedzy osobami palącymi tradycyjne papierosy i korzystającymi z e-papierosów a tymi, którzy korzystają wyłącznie z e-papierosów, wykazano wzrost mediatorów zapalnych jako receptorów produktów końcowych zaawansowanej glikacji, mieloperoksydazy i rekombinowanej ludzkiej utoeroglobiny/CC10 [131]. Używanie e-papierosów przyczynia się do chorób przyzębia. Badania wykazały, że użytkownicy e-papierosów zgłaszali krwawienie z dziąseł podczas szczotkowania, występowanie bólu i owrzodzeń w jamie ustnej częściej niż osoby niepalące [132]. Zdolności antyoksydacyjne śliny u użytkowników e-papierosów są upośledzone, podobnie jak u palaczy tradycyjnych papierosów [133]. Istnieją dowody na to, że używanie e-papierosów wiąże się z kompozycyjnym i funkcjonalnym przesunięciem mikrobiomu jamy ustnej, w tym ze wzrostem patogenów oportunistycznych i cech zjadliwości [130]. Pary glikolu i glicerolu są składnikami większości e-papierosów. Kontakt z mgiełką glikolową może powodować wysuszenie błon śluzowych [134], którymi wyścielona jest między innymi jama ustna. W przypadku stosowania doustnego – produkty rozpadu glikolu propylenowego obejmują kwas octowy, kwas mlekowy i aldehyd propionowy, które są toksyczne dla szkliwa i tkanek miękkich [135]. PG (ang. *propylene glycol*, glikol propylenowy) i VG (ang. *vegetable glycerin*, gliceryna roślinna), będące bezbarwnymi i bezzapachowymi płynami dającymi po zmieszaniu liquid do e-papierosa, powodują dużą lepkość e-papierosów, co umożliwia łatwiejszą adhezję bakterii do tkanek jamy ustnej – zarówno twardych, jak i miękkich, a także implantów. To właśnie może predysponować do infekcji w jamie ustnej, w tym próchnicy. Ostatnie badania wykazały, iż aerozole w e-papierosach spowodowały zwiększoną adhezję *Streptococcus mutans* do szkliwa [136]. Wciąż obecna w e-papierosach nikotyna jest dobrze wchłaniana przez błony śluzowe. Warto w tym miejscu zaznaczyć, iż poziom narażenia na nikotynę w wyniku używania e-papierosów jest bardzo zróżnicowany. Badania wykazały szerokie rozbieżności w zawartości nikotyny, zmienność składu aerozolu, niedokładne czy też fałszywe oznakowanie produktów. Analiza badań wykazała, iż ostre narażenie na e-papierosy (bądź aerozole pochodzące z nich) powoduje podrażnienie ust i gardła oraz suchy kaszel przy pierwszym użyciu, chociaż dolegliwości zmniejszały się przy dalszym używaniu [137]. Jednym z działań niepożądanych papierosów okazał się również ból gardła [138]. Podczas badań w 108 na 145 dostępnych na rynku liquidach wykryto benzaldehyd. Najwyższe stężenia benzaldehydu obserwowano w liquidach o smaku wiśniowym (od 5,129 µg do 141,2 µg na 30 zaciągnięć) i były one istotnie wyższe niż w przypadku pozostałych smaków ($p < 0,0001$). Obecność benzaldehydu, który dobrze wchłania się podczas wdychania jego pary, może prowadzić do takich dolegliwości jak ból gardła i kaszel [136]. Dostępne są publikacje wykazujące, że poziomy kotyniny, będącej głównym metabolitem nikotyny, w ślinie użytkowników e-papierosów są podobne do tych u czynnych palaczy konwencjonalnych papierosów. Nikotyna z aerozolu lub cieczy e-papierosa może długo pozostać na powierzchni – kilka tygodni, a nawet miesięcy – i reagować z otoczeniem, tworząc z kwasem azotowym związki TSNA (*tobacco-specific nitrosamines*), a to z kolei może skutkować wdychaniem, spożyciem lub narażeniem skóry na kancerogeny [137]. W literaturze szeroko oceniano cytotoksyczne skutki

palenia papierosów; jednak badania dotyczące e-papierosów często koncentrują się na ich używaniu do rzucania palenia lub skutkach ubocznych. Podczas badań prowadzonych przez Vicky Yu i wsp. odkryto, że komórki wystawione na działanie e-papierosów miały znacznie zmniejszoną żywotność i przeżycie klonogeniczne, a także zwiększone wskaźniki apoptozy i martwicy, niezależnie od zawartości nikotyny w e-papierosach. Komórki wykazały również znacznie zwiększoną długość ogona komety i akumulację ognisk γ -H2AX, co wskazało na zwiększone pęknięcia nici DNA. Warto jednak zaznaczyć, że ważnymi ograniczeniami tego badania były jego brak powtarzalności *in vivo* oraz wykorzystanie linii komórkowych raka głowy i szyi, które są uszkodzone genotypowo i już ukierunkowane na rozwój raka [139, 140].

13. Wpływ na zdrowie psychiczne. Szkodliwość e-papierosów w pediatrii

Uzupełniając to, co zostało powiedziane na temat wpływu elektronicznych systemów dostarczania nikotyny na różne obszary zdrowia fizycznego, należy także zwrócić uwagę na obecną korelację pomiędzy stosowaniem zyskującego na popularności wapingu a stanem zdrowia psychicznego jego użytkowników. Na podstawie przeglądu prac dotyczących dwukierunkowych zależności pomiędzy używaniem elektronicznych papierosów a objawami pogorszenia stanu zdrowia psychicznego można stwierdzić, że rozpowszechnienie tej formy używki wśród konsumentów z MHC (ang. *mental health continuum* – zaburzenia psychiczne) jest wyższe w stosunku do badanych bez tych schorzeń o około 70%. Jak się okazuje – stopień nasilenia uzależnienia nie jest taki sam w odniesieniu do wybranych jednostek chorobowych i wynosi odpowiednio: 38% – wśród osób z zaburzeniami lękowymi, 45% – dla badanych z zaburzeniami afektywnymi, 64% – wśród chorych z SUD (ang. *substance use disorder* – zaburzenia używania substancji psychoaktywnych) [141]. Dodatkowo popularność wapingu rośnie wśród osób z postawioną diagnozą schizofrenii, zaś codzienna rutyna w użytkowaniu ENDS wydaje się zwiększać ryzyko wystąpienia pierwszego epizodu psychozy u szczególnie narażonych na to zjawisko. Panuje przekonanie, że leki przeciwpsychotyczne oddziałują na te same receptory co zawarta w e-papierosach nikotyna. Można więc sądzić, że wysoka skłonność do e-palenia związana jest bezpośrednio z łagodzącym wpływem nikotyny zarówno na poznawcze, jak i negatywne objawy schizofrenii [142]. Nie ulega wątpliwości, że trend wapingu bardzo silnie koreluje z współwystępowaniem zaburzeń zdrowia psychicznego, czego dowodem jest fakt, że badani z tego typu problemami nie tylko częściej próbują (w porównaniu z osobami bez tych schorzeń), ale też są aktualnymi użytkownikami elektronicznych systemów dostarczania nikotyny. W odniesieniu do powyższych informacji nasuwa się jednak pytanie, czy wzrastające na popularności e-papierosy wykazują bezpośrednio potencjalną szkodliwość dla zdrowia psychicznego [143]. Uzyskanie jednoznacznej odpowiedzi na to pytanie jest stosunkowo problematyczne, co wynika z faktu, że badania nad wpływem konsumpcji nikotyny zawartej w ENDS na rozwój ośrodkowego układu nerwowego i zdrowie psychiczne to obszar stosunkowo zaniedbany [144]. Koncentrując się na wynikach dotychczasowych badań prowadzonych w zakresie ryzyka indukcji zagrożeń dla zdrowia psychicznego poprzez praktykę wapingu, można wyciągnąć następujące wnioski: nikotyna, będąca głównym psychoaktywnym składnikiem e-papierosów, jest w stanie modulować funkcjonalność mózgu na zasadzie ingerencji w regulację przekąźnictwa neuronalnego dopaminy, kwasu γ -aminomasłowego, glutamianu w obszarach pola brzuszno-nakrywkowego (VTA), jądra ogoniastego (*nucleus caudatus*), oraz w korze

przedczołowej. Biorąc pod uwagę udział podanych struktur w patofizjologii schorzeń neuropsychiatrycznych należy sądzić, że zawarta w papierosach elektronicznych nikotyna jest przyczyną zmian behawioralnych towarzyszących jednostkom chorobowym o podłożu psychicznym [145]. Co więcej, ENDS oprócz nikotyny zawierają w sobie pewną dawkę metali śladowych, z których na szczególną uwagę zasługują ołów oraz aluminium, znane ze swojego toksycznego oddziaływania zarówno na ośrodkowy, jak i obwodowy układ nerwowy. Fakt ten może tłumaczyć obserwowaną korelację między praktykowaniem wapingu a depresją [146]. Wyniki analiz przeprowadzonych na grupie osób dorosłych w Korei w roku 2016 sugerują, że istnieją 2 główne mechanizmy odpowiedzialne za rozwój depresji wśród użytkowników e-papierosów. Z jednej strony substancje takie jak glikol propylenowy, aromaty, roślinny płyn glicerynowy oraz nikotyna są bezpośrednimi czynnikami napędzającymi rozwój oraz przyczyniającymi się do zaostrzenia/utrzymywania objawów depresyjnych. Z drugiej strony – obniżony nastrój towarzyszący depresji może wynikać z prób wyzbycia się nawyku palenia tradycyjnych papierosów, a częstym narzędziem mającym pomóc w osiągnięciu tego celu jest elektryczny system dostarczania nikotyny [147]. Uzupełniając to, co zostało powiedziane na temat negatywnego wpływu stosowania elektronicznych papierosów dla zdrowia psychicznego, warto pochylić się nad wynikami badań prowadzonych wśród populacji osób szczególnie narażonych na nadużycie ENDS, a więc nastolatków. Dane wskazują, że ryzyko wystąpienia objawów depresyjnych jest związane ze stosowaniem e-papierosów, zaś stopień nasilenia tych objawów jest łagodniejszy w stosunku do palaczy konwencjonalnych papierosów lub użytkowników podwójnych [148]. Niepokojące z kolei są wyniki badań dotyczących zależności pomiędzy użytkowaniem ENDS a zachowaniami samobójczymi – stosowanie w przeszłości e-papierosów wśród uczniów szkół średnich zwiększa szanse na pojawienie się myśli samobójczych, podejmowanie planów, a nawet prób odebrania sobie życia w stosunku do osób nieużywających ich. Co ciekawe, płęć żeńska była bardziej narażona na podjęcie próby samobójczej [148]. Jak się okazuje – pomimo wyraźnego oddziaływania e-papierosów na ryzyko wystąpienia depresji oraz myśli samobójczych – nie zaobserwowano podobnych korelacji w odniesieniu do stanów lękowych (paniki, fobii społecznych, zachowań obsesyjno-kompulsywnych) [148]. Dodatkowo należy uwzględnić wpływ stosowanych ENDS na zachowania impulsywne, tj. skłonność do nieplanowanych, dynamicznych działań związanych z ChAD (choroba afektywna dwubiegunowa, ang. *bipolar affective disorder*), ADHD (ang. *attention deficit hyperactivity disorder* – zespół nadpobudliwości ruchowej z deficytem uwagi), zaburzeniami osobowości, a także na funkcję wykonawczą (zdolność do samokontroli). Okazuje się, że można zaobserwować pozytywną zależność pomiędzy stosowaniem ENDS a objawami impulsywności oraz deficytem funkcji wykonawczej [149].

Na koniec warto zwrócić uwagę na fakt, iż nadal istnieją znaczne luki w świadomości nastolatków na temat szkodliwości dla zdrowia psychicznego zawartej w e-papierosach nikotyny. Substancja ta w okresie rozwoju silnie oddziałuje na rozwijający się mózg, w szczególności na korę przedczołową, hipokamp i ciało migdałowate, co skutkuje deficytem uwagi, pamięci, zdolności uczenia się, obniżeniem nastroju oraz wzrostem drażliwości i impulsywności [150]. Co więcej, wczesna ekspozycja znacznie nasila ryzyko późniejszego uzależnienia od tradycyjnych papierosów [151]. Na podstawie powyższych informacji można stwierdzić, że młodzież niewątpliwie wymaga edukacji w zakresie zagrożeń, jakie niesie za sobą stosowanie ENDS w okresie rozwoju. Wzrost

świadomości wśród nastolatków można osiągnąć np. poprzez organizowanie konferencji dla uczniów w szkołach, za co odpowiedzialne mogą być organizacje społeczne działające na rzecz ochrony zdrowia dzieci i młodzieży [152]. Ponadto postuluje się dokonanie radykalnych zmian w przepisach prawnych regulujących zakazy palenia tytoniu, aby utrudnić populacji nastolatków dostęp do korzystania z e-papierosów [153]. Należy przypuszczać, iż większa selekcja treści postów dotyczących e-papierosów, które są prezentowane w mediach społecznościowych, również może przynieść pozytywny efekt [151]. Świadomość poważnych zagrożeń dla rozwoju psychicznego, jakie niesie za sobą wczesna inicjacja, motywuje do dalszego rozwoju badań nad możliwymi ścieżkami edukacji i sposobami wpływania na ograniczenie użytkowania elektronicznych form dostarczania nikotyny przez młodzież.

Z zebranego materiału i dokonanych analiz wynika, że stosowanie e-papierosów jest punktem wyjścia dla pogorszenia stanu zdrowia psychicznego, jednak złożoność problemu pod postacią skomplikowanych mechanizmów przyczynowych powoduje, że przyszłe badania nad wspomnianą zależnością są nieuniknione i silnie pożądane.

14. E-papierosy a nowotwory

E-papierosy zawierają ponad 25 razy mniej substancji kancerogennych niż tradycyjny dym papierosowy. Stężenie tych substancji jest również niższe, co przekłada się na niższe zachorowanie na nowotwory w stosunku do osób palących wyroby tytoniowe [154]. Co interesujące, ilość szkodliwych związków jest o wiele mniejsza, gdy tytoń podgrzewamy, a nie spalamy [155].

Za główną szkodliwą substancję w e-papierosach uznawana jest nikotyna. Jest ona silną neurotoksyną oraz ma wpływ na rozwój nowotworów [156]. Liczne doniesienia sugerują, że nikotyna nie jest kancerogenem, ponieważ sama nie wywołuje zmian nowotworowych, ale wywiera ona wpływ na istniejące już komórki rakowe, stąd też nikotyne uznaje się za kokancerogen [134, 157].

Kancerogeny są wykrywane w płynach ustrojowych palaczy e-papierosów, czego przykładem jest to, że w moczu użytkowników e-papierosów wykryto 2 kancerogeny, chociaż w stężeniach niższych niż w moczu palaczy papierosów tradycyjnych. O-toluidyna i 2-naftyloamina są prawdopodobnymi kancerogenami w raku pęcherza moczowego u ludzi [158].

Nie ma badań klinicznych analizujących długoterminowy wpływ e-papierosów na zapadalność i progresję nowotworów, warto jednak zwrócić uwagę na kilka faktów. Choć stężenia nietoksycznych substancji nienikotynowych we krwi użytkowników e-papierosów są znacznie niższe niż u palaczy papierosów tradycyjnych, stężenie nikotyny wzrasta wraz z pojawieniem się nowych generacji e-papierosów. Użytkownicy modeli trzeciej generacji e-papierosów osiągają poziomy nikotyny w osoczu porównywalne z poziomami występującymi u palaczy papierosów tradycyjnych [159]. E-papierosy mogą oddziaływać bezpośrednio i pośrednio rakotwórczo [159].

Badania nad bezpośrednim działaniem rakotwórczym wykazały, iż narażenie na klinicznie istotne stężenia nośników kondycjonowanych parą e-papierosów nasilało procesy związane z nowotworami w drogach oddechowych, w tym wykazaną zdolność do transformacji nowotworowej. Ekspozycja zmutowanych komórek nabłonkowych na nośniki kondycjonowane oparami e-papierosów indukowała zmiany ekspresji genów w drogach oddechowych podobne do tych obserwowanych w przypadku ekspozycji na tradycyjny

dym papierosowy. Aeroszol z e-papierosa zwiększał poziom prozapalnych cytokin (IL-6 i IL-8) oraz zmniejszał poziom glutationu w komórkach nabłonka płuc człowieka i myszy – zwiększone poziomy IL-6 mogą promować wzrost komórek raka płuc. E-papierosy mają działanie wspomagające enzymy bioaktywujące czynniki rakotwórcze I fazy, w tym aktywatory wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA), zwiększoną produkcję wolnych rodników tlenowych i utlenianie DNA do 8-hydroksy2'-deoksyguanozyny [159]. Badania zwracają również uwagę na zwiększoną podatność nabłonka płuc na transformację onkogeną i onkogenezę poprzez działanie metabolitów nikotyny i późniejsze wytwarzanie mutagennych produktów nukleotyдовых w płucach i pęcherzu moczowym myszy narażonych na opary e-papierosów. Podobne wyniki miały miejsce w hodowlach ludzkich komórek nabłonka oskrzeli i nabłonka dróg moczowych [159]. Aktywność naprawy DNA i ekspresja białek naprawczych XPC i OGG1/2 podczas badań po ekspozycji na parę z e-papierosa były znacznie zmniejszone w płucach myszy, a także w hodowlach ludzkich komórek nabłonka oskrzeli. E-papierosy powodują pęknięcia nici DNA w ludzkiej linii komórek nabłonkowych HaCaT niezależnie od nikotyny. Co więcej, istnieją dowody na to, że opary e-papierosów znacznie zwiększają zakres uszkodzeń DNA wywołanych przez nikotynę. Badania donoszą, że nawet krótkotrwałe używanie e-papierosów indukuje czynniki sprzyjające nowotworom i przerzutom związane z rakiem płuc w nabłonku drobnych dróg oddechowych. Istnieją doniesienia o znaczących zmianach epigenetycznych w komórkach jamy ustnej użytkowników e-papierosów [159]. U użytkowników e-papierosów występuje aktywacja receptorów nikotynowych w mikrośrodowisku raka – receptory nikotynowe ulegają ekspresji na powierzchni komórek nowotworowych i odpornościowych, umożliwiając bezpośredni wpływ nikotyny na mikrośrodowisko guza [159]. Choć wiele badań koncentrowało się na bezpośrednim wpływie e-papierosów na rozwój nowotworów, istnieją również te mówiące o pośrednim efekcie stosowania e-papierosów promującym nowotwory. Pośredni wpływ polega na tym, iż nikotyna, będąca składnikiem e-papierosów, aktywuje układ współczulno-nadnerczowy, a układ współczulno-nadnerczowy stymuluje inicjację i progresję raka [159].

Istnieją pewne dowody sugerujące potencjalnie kancerogenną rolę e-papierosów w patogenezie nowotworów głowy i szyi. Między innymi wykazano, że krótkotrwałe traktowanie prawidłowych komórek nabłonka aerozolami z e-papierosów indukowało do 5-krotnego wzrostu śmiertelności komórek bez nikotyny i do 10-krotnego wzrostu z nikotyną w porównaniu z nienarażonymi na aerozole próbkami kontrolnymi. Tylko w nielicznych badaniach badano e-papierosy w kontekście nowotworów głowy i szyi w środowisku klinicznym, jednak wyniki badań różniły się od siebie. Trudno jest bezpośrednio porównać różne badania, ponieważ ilość substancji toksycznych różni się w zależności od marki e-papierosa, smaku liquidu i rozpuszczalników, a także napięcia urządzenia [160]. Badania sugerują również możliwy wpływ e-papierosów na rozwój raka płuc. Ponadto, chociaż ryzyko raka płuc jest prawdopodobnie największe w przypadku liquidów do e-papierosów opartych na nikotynie, istnieją wyraźne dowody potencjału rakotwórczego także w liquidach „bez nikotyny” – w szczególności w postaci aromatów, dodatków w formie środków aromatyzujących i zanieczyszczeń – zwłaszcza metali ciężkich pochodzących z urządzenia [161].

E-papierosy są na rynku stosunkowo niedługo, stąd wciąż brak jest badań klinicznych na temat długoterminowego wpływ e-papierosów na zapadalność i progresję nowotwo-

rów, a co za tym idzie – nasza wiedza na temat ich wpływu na zdrowie jest wciąż niewystarczająca i wymaga dalszego zgłębiania. Wiadomo jednak, że używanie e-papierosów naraża użytkownika na działanie znanych karcynogenów, jak np. formaldehydu, co sprawia, że ryzyko zachorowania na raka w ciągu życia wzrasta [162].

15. Podsumowanie

W niniejszej pracy pochyłono się nad zagadnieniem elektrycznych systemów dostarczania nikotyny (popularne e-papierosy) pod kątem wielu wartych uwagi aspektów, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu omawianych urządzeń na szeroko pojęte zdrowie ich użytkowników. Motywacją do podjęcia tego tematu był nie tylko obserwowany obecnie wzrost zainteresowania tą formą używki, ale także potrzeba ujednoczenia i scalenia dotychczasowej wiedzy na jej temat. E-papierosy – postrzegane jako zdrowszy substytut dla tradycyjnej formy używki – budzą niepokój z wielu przyczyn, z badań wynika, że budowa i skład urządzeń wbrew powszechnym przekonaniom nie przewyższa jakością form konwencjonalnych. Z tego względu wątpliwa wydaje się zasadność zamiennego stosowania e-papierosów w celu złagodzenia negatywnych skutków dla zdrowia. Potwierdza to wiedza na temat zagrażającego wpływu ENDS na układ krążenia (m.in. zmiany na poziomie komórkowym, wahania ciśnienia, ryzyko długoterminowych powikłań), układ oddechowy (m.in. możliwość wystąpienia astmy, POChP i zapalenia płuc), a także jamę ustną i gardło. Nie tylko czynne użytkowanie niesie za sobą ryzyko fluktuacji – jakość powietrza po intensywnym użytkowaniu e-papierosów naraża na szkodliwe składowe dymu i związane z tym możliwe powikłania zdrowotne także tak zwanych biernych palaczy. Warto nadmienić, że w przeciwieństwie do tradycyjnych papierosów – ich odpowiedniki elektroniczne zawierają niemal 25 razy mniej kancerogenów, co może sugerować znikomy wpływ na rozwój i progresję nowotworów. Jednak istnieją przesłanki o możliwości udziału w patogenezie kancerogenezy w obrębie głowy i szyi. Ograniczona wiedza w wielu aspektach związanych z używaniem e-papierosów będzie wymagała dalszych badań w tym kierunku. Z dotychczasowych obserwacji wynika, że zagrożona jest nie tylko sprawność fizyczna, lecz także psychiczna (m.in. obserwacja korelacji pomiędzy wapingiem a ryzykiem wystąpienia: depresji, psychozy, zachowań impulsywnych). Obecnie duży niepokój wzbudza możliwość wystąpienia nadmienionych powikłań u wzrastającej wśród odbiorców najmłodszej grupy wiekowej (epidemia wśród nastolatków). Nadal okrojona wiedza w temacie wpływu e-papierosów na rozwijający się organizm powinna zmusić do wdrożenia regulacji prawnych uniemożliwiających młodzieży ich użytkowanie. Podsumowując, z przeglądu materiałów i dokonanych analiz wynika, że e-papierosy są punktem wyjścia dla wielu problemów zdrowotnych, jednak złożoność tego zagadnienia powoduje, że przyszłe badania w tym kierunku są nieuniknione i bardzo pożądane.

Literatura

1. Virgili F., Nenna R., Ben-David S., *E-cigarettes and youth. An unresolved Public Health concern*, Italian Journal of Pediatrics, 48, 2022, s. 97.
2. King B.A., Patel R., Nguyen K.H., Dube S.R., *Trends in awareness and use of electronic cigarettes among US adults, 2010-2013*, Nicotine & Tobacco Research, 17, 2015, s. 219-227.
3. Glantz S.A., Bareham D.W., *E-cigarettes. Use, effects on smoking, risks, and policy implications*, Annual Review of Public Health, 39, 2018, s. 215-235.

4. Shinbashi M., Rubin B.K., *Electronic cigarettes and e-cigarette/vaping product use associated lung injury (EVALI)*, Paediatric Respiratory Reviews, 36, 2020, s. 87-91.
5. Janssen B.P., Walley S.C., Section on Tobacco Control, *E-cigarettes and similar devices*, Pediatrics, 143, 2019.
6. Rom O., Pecorelli A., Valacchi G., Reznick A.Z., *Are E-cigarettes a safe and good alternative to cigarette smoking?* Annals of the New York Academy Sciences, 1340, 2015, s. 65-74.
7. Stobbs N., Lillis A., Kumar N., *E-cigarettes in ENT. What do we need to know?*, The Journal of Laryngology & Otology, 130, 2016, s. 512-515.
8. Walley S.C., Wilson K.M., Winickoff J.P., Groner J., *A public health crisis. Electronic cigarettes, vape and JUUL*, Pediatrics, 143, 2019.
9. Traboulsi H., Cherian M., Abou Rjeili M., *Inhalation toxicology of vaping products and implications for pulmonary health*, International Journal of Molecular Sciences, 21, 2020, s. 3495.
10. Fadus M.C., Smith T.T., Squeglia L.M., *The rise of e-cigarettes, pod mod devices, and JUUL among youth. Factors influencing use, health implications, and downstream effects*, Drug and Alcohol Dependence, 201, 2019, s. 85-93.
11. Zhang G., Wang Z., Zhang K., *Safety assessment of electronic cigarettes and their relationship with cardiovascular disease*, International Journal of Environmental Research and Public Health, 15, 2018, s. 75.
12. Buchanan N.D., Grimmer J.A., Tanwar V., Schwieterman N., Mohler P.J., Wold L.E., *Cardiovascular risk of electronic cigarettes. A review of preclinical and clinical studies*, Cardiovascular Research, 116, 2020, s. 40-50.
13. Kaur G., Pinkston R., McLemore B., Dorsey W.C., Batra S., *Immunological and toxicological risk assessment of e-cigarettes*, European Respiratory Review, 27, 2018.
14. Williams M., Villarreal A., Bozhilov K., Lin S., Talbot P., *Metal and silicate particles including nanoparticles are present in electronic cigarette cartomizer fluid and aerosol*, PLoS One, 8, 2013.
15. Farsalinos K.E., Voudris V., Poulas K., *E-cigarettes generate high levels of aldehydes only in „dry puff” conditions*, Addiction, 110, 2015, s. 1352-1356.
16. Jensen R.P., Luo W., Pankow J.F., Strongin R.M., Peyton D.H., *Hidden formaldehyde in e-cigarette aerosols*, The New England Journal of Medicine, 372, 2015, s. 392-394.
17. Kosmider L., Sobczak A., Fik M., *Carbonyl compounds in electronic cigarette vapors. Effects of nicotine solvent and battery output voltage*, Nicotine & Tobacco Research, 16, 2014, s. 1319-1326.
18. Flora J.W., Meruva N., Huang C.B., *Characterization of potential impurities and degradation products in electronic cigarette formulations and aerosols*, Regulatory Toxicology and Pharmacology, 74, 2016, s. 1-11.
19. Talih S., Balhas Z., Salman R., Karaoghlanian N., Shihadeh A., *„Direct Dripping”. A high-temperature, high-formaldehyde emission electronic cigarette use method*, Nicotine & Tobacco Research, 18, 2016, s. 453-459.
20. Geiss O., Bianchi I., Barrero-Moreno J., *Correlation of volatile carbonyl yields emitted by e-cigarettes with the temperature of the heating coil and the perceived sensorial quality of the generated vapours*, International Journal of Hygiene Environmental Health, 219, 2016, s. 268-277.
21. Sleiman M., Logue J.M., Montesinos V.N., *Emissions from electronic cigarettes. Key parameters affecting the release of harmful chemicals*, Environmental Science & Technology, 50, 2016, s. 9644-9651.
22. Margham J., McAdam K., Forster M., *Chemical composition of aerosol from an e-cigarette. A quantitative comparison with cigarette smoke*, Chemical Research Toxicology, 29, 2016, s. 1662-1678.

23. Talih S., Balhas Z., Salman R., *Transport phenomena governing nicotine emissions from electronic cigarettes. Model formulation and experimental investigation*, *Aerosol Science and Technology*, 51, 2017, s. 1-11.
24. Zarini D., Sangion A., Ferri E., *Are in silico approaches applicable as a first step for the prediction of e-liquid toxicity in e-cigarettes?* *Chemical Research Toxicology*, 33, 2020, s. 2381-2389.
25. Strongin R.M., *E-cigarette chemistry and analytical detection*, *Annual Review of Analytical Chemistry*, 12, 2019, s. 23-39.
26. Barrington-Trimis J.L., Leventhal A.M., *Adolescents' use of „Pod Mod” e-cigarettes – urgent concerns*, *The New England Journal of Medicine*, 379, 2018, s. 1099-1102.
27. Voos N., Goniewicz M.L., Eissenberg T., *What is the nicotine delivery profile of electronic cigarettes?* *Expert Opinion on Drug Delivery*, 16, 2019, s. 1193-1203.
28. Yang I., Sandeep S., Rodriguez J., *The oral health impact of electronic cigarette use. A systematic review*, *Critical Reviews in Toxicology*, 50, 2020, s. 97-127.
29. Williams M., Ghai S., Talbot P., *Disposable electronic cigarettes and electronic hookahs. Evaluation of performance*, *Nicotine & Tobacco Research*, 17, 2015, s. 201-208.
30. Hua M., Omaie E.E., Luo W., McWhirter K.J., Pankow J.F., Talbot P., *Identification of cytotoxic flavor chemicals in top-selling electronic cigarette refill fluids*, *Scientific Reports*, 9, 2019, s. 2782.
31. Williams M., Talbot P., *Design features in multiple generations of electronic cigarette atomizers*, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16, 2019, s. 2904.
32. Hess C.A., Olmedo P., Navas-Acien A., Goessler W., Cohen J.E., Rule A.M., *E-cigarettes as a source of toxic and potentially carcinogenic metals*, *Environmental Research*, 152, 2017, s. 221-225.
33. Olmedo P., Goessler W., Tanda S., *Metal concentrations in e-cigarette liquid and aerosol samples. The contribution of metallic coils*, *Environmental Health Perspectives*, 126, 2018.
34. Gotts J.E., Jordt S.E., McConnell R., Tarran R., *What are the respiratory effects of e-cigarettes?* *BMJ*, 366, 2019.
35. Kapan A., Stefanac S., Sandner I., Haider S., Grabovac I., Dorner T.E., *Use of electronic cigarettes in European populations. A narrative review*, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17, 2020, s. 1971.
36. Jankowski M., Brożek G., Lawson J., Skoczyński S., Zejda J.E., *E-smoking: emerging public health problem?* *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 30, 2017, s. 329-344.
37. Bhalerao A., Sivandzade F., Archie S.R., Cucullo L., *Public Health Policies on E-Cigarettes*, *Current Cardiology Reports*, 21, 2019, s. 111.
38. Dautzenberg B., Berlin I., Tanguy M.L., Rieu N., Birkui P., *Factors associated with experimentation of electronic cigarettes among Parisian teenagers in 2013*, *Tobacco Induced Diseases*, 13, 2015, s. 40.
39. Kock L., Shahab L., West R., Brown J., *E-cigarette use in England 2014-17 as a function of socio-economic profile*, *Addiction*, 114, 2019, s. 294-303.
40. Kaleta D., Wojtysiak P., Polańska K., *Use of electronic cigarettes among secondary and high school students from a socially disadvantaged rural area in Poland*, *BMC Public Health*, 15, 2016, s. 703.
41. Ranjit A., McCutchan G., Brain K., Poole R., *„That’s the whole thing about vaping, it’s custom tasty goodness”. A meta-ethnography of young adults’ perceptions and experiences of e-cigarette use*, *Substance Abuse Treatment, Prevention and Policy*, 16, 2021, s. 85.

42. Sapru S., Vardhan M., Li Q., Guo Y., Li X., Saxena D., *E-cigarettes use in the United States. Reasons for use, perceptions, and effects on health*, BMC Public Health, 20, 2020, s. 1518.
43. Chen X., Yu B., Wang Y., *Initiation of electronic cigarette use by age among youth in the U.S.*, American Journal of Preventive Medicine, 53, 2017, s. 396-399.
44. Durmowicz E.L., *The impact of electronic cigarettes on the paediatric population*, Tobacco Control, 23, 2014.
45. Vogel E.A., Ramo D.E., Rubinstein M.L., *Effects of social media on adolescents' willingness and intention to use e-cigarettes. An experimental investigation*, Nicotine & Tobacco Research, 23, 2021, s. 694-701.
46. Jankowski M., Minarowski Ł., Mróz R.M., *E-cigarette use among young adults in Poland. Prevalence and characteristics of e-cigarette users*, Advances in Medical Sciences, 2, 2020, s. 437-441.
47. Cheney M.K., Gowin M., Wann T.F., *Electronic cigarette use in straight-to-work young adults*, American Journal of Health Behavior, 40, 2016, s. 268-279.
48. Pokhrel P., Herzog T.A., Muranaka N., Fagan P., *Young adult e-cigarette users' reasons for liking and not liking e-cigarettes. A qualitative study*, Psychology & Health, 30, 2015, s. 1450-1469.
49. Hess C.A., Antin T.M., Annechino R., Hunt G., *Perceptions of e-cigarettes among black youth in California*, International Journal of Environmental Research and Public Health, 14, 2017, s. 60.
50. Hilton S., Weishaar H., Sweeting H., Trevisan F., Katikireddi S.V., *E-cigarettes, a safer alternative for teenagers? A UK focus group study of teenagers' views*, BMJ Open, 6, 2016.
51. Wagoner K.G., Cornacchione J., Wiseman K.D., Teal R., Moracco K.E., Sutfin E.L., *E-cigarettes, hookah pens and vapes. Adolescent and young adult perceptions of electronic nicotine delivery systems*, Nicotine & Tobacco Research, 18, 2016, s. 2006-2012.
52. McDonald E.A., Ling P.M., *One of several „toys” for smoking. Young adult experiences with electronic cigarettes in New York City*, Tobacco Control, 24, 2015, s. 588-593.
53. Coleman B.N., Johnson S.E., Tessman G.K., *„It's not smoke. It's not tar. It's not 4000 chemicals. Case closed”. Exploring attitudes, beliefs, and perceived social norms of e-cigarette use among adult users*, Drug and Alcohol Dependence, 159, 2016, s. 80-85.
54. Hardcastle K., Hughes K., Worsley J., Bennett A., Irlandia R., Sweeney S., *„Większość ludzi, których znam, ma jeden” – raport podsumowujący postrzeganie i doświadczenia młodych ludzi w zakresie elektronicznych papierosów*, Grupa Równości Zdrowotnej, Liverpool 2014.
55. Breland A.B., Spindle T., Weaver M., Eissenberg T., *Science and electronic cigarettes. Current data, future needs*, Journal of Addiction Medicine, 8, 2014, s. 230-233.
56. Bandura A., *Spoleczne podstawy myśli i działania. Społeczna teoria poznawcza*, Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey 1986.
57. Patnode C.D., Henderson J.T., Thompson J.H., Senger C.A., Fortmann S.P., Whitlock E.P., *Behavioral counseling and pharmacotherapy interventions for tobacco cessation in adults., including pregnant women. A review of reviews for the U.S. preventive services task force*, Annals of Internal Medicine, 163, 2015, s. 608-621.
58. Bhalerao A., Sivandzade F., Archie S.R., Cucullo L., *Public health policies on e-cigarettes*, Current Cardiology Reports, 21, 2019, s. 111.
59. Ding R., Ren X., Sun Q., Sun Z., Duan J., *An integral perspective of canonical cigarette and e-cigarette-related cardiovascular toxicity based on the adverse outcome pathway framework*, Journal of Advanced Research, 48, 2023, s. 227-257.
60. Lewandowska A., Kręgielska-Narożna M., Bogdański P., *Ocena sztywności naczyń jako element analizy ryzyka sercowo-naczyniowego*, Forum Zaburzeń Metabolicznych, 4, 2017, s. 161-170.

61. Kuntic M., Oelze M., Steven S., *Short-term e-cigarette vapour exposure causes vascular oxidative stress and dysfunction. Evidence for a close connection to brain damage and a key role of the phagocytic NADPH oxidase (NOX-2)*, *European Heart Journal*, 41, 2020, s. 2472-2483.
62. Bianco E., Skipalskyi A., Goma F., *E-cigarettes. A new threat to cardiovascular health – a World Heart Federation Policy brief*, *Global Heart*, 16, 2021, s. 72.
63. Hochman D.J., Collaco C.R., Brooks E.G., *Acrolein induction of oxidative stress and degranulation in mast cells*, *Environmental Toxicology*, 29, 2014, s. 908-915.
64. Buchanan N.D., Grimmer J.A., Tanwar V., Schwieterman N., Mohler P.J., Wold L.E., *Cardiovascular risk of electronic cigarettes. A review of preclinical and clinical studies*, *Cardiovascular Research*, 116, 2020, s. 40-50.
65. Khadka S., Awasthi M., Lamichhane R.R., *The cardiovascular effects of electronic cigarettes*, *Current Cardiology Reports*, 23, 2021, s. 40.
66. Hom S., Chen L., Wang T., Ghebrehiwet B., Yin W., Rubenstein D.A., *Platelet activation, adhesion, inflammation, and aggregation potential are altered in the presence of electronic cigarette extracts of variable nicotine concentrations*, *Platelets*, 27, 2016, s. 694-702.
67. Nocella C., Biondi-Zoccai G., Sciarretta S., *Impact of tobacco versus electronic cigarette smoking on platelet function*, *The American Journal of Cardiology*, 122, 2018, s. 1477-1481.
68. Whitehead A.K., Erwin A.P., Yue X., *Nicotine and vascular dysfunction*, *Acta Physiologica*, 231, 2021.
69. Lee W.O., Wright S.M., *Production of endothelin by cultured human endothelial cells following exposure to nicotine or caffeine*, *Metabolism*, 48, 1999, s. 845-848.
70. Rodella L.F., Favero G., Rossini C., Foglio E., Reiter R.J., Rezzani R., *Endothelin-1 as a potential marker of melatonin's therapeutic effects in smoking-induced vasculopathy*, *Life Sciences*, 87, 2010, s. 558-564.
71. El-Seweid M.M., Mohamed H.E., Asker M.E., Atteia H.H., *Nicotine and vascular endothelial dysfunction in female ovariectomized rats. Role of estrogen replacement therapy*, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 64, 2012, s. 108-119.
72. Xiao D., Huang X., Yang S., Zhang L., *Direct effects of nicotine on contractility of the uterine artery in pregnancy*, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 322, 2007, s. 180-185.
73. Conklin B.S., Surowiec S.M., Ren Z., *Effects of nicotine and cotinine on porcine arterial endothelial cell function*, *Journal of Surgical Research*, 95, 2001, s. 23-31.
74. Carnevale R., Sciarretta S., Violi F., *Acute impact of tobacco vs electronic cigarette smoking on oxidative stress and vascular function*, *Chest*, 150, 2016, s. 606-612.
75. Toda N., Toda H., *Nitric oxide-mediated blood flow regulation as affected by smoking and nicotine*, *European Journal of Pharmacology*, 649, 2010, s. 1-13.
76. Nelin T.D., Joseph A.M., Gorr M.W., Wold L.E., *Direct and indirect effects of particulate matter on the cardiovascular system*, *Toxicology Letters*, 208, 2012, s. 293-299.
77. Li Y.F., LaCroix C., Freeling J., *Specific subtypes of nicotinic cholinergic receptors involved in sympathetic and parasympathetic cardiovascular responses*, *Neuroscience Letters*, 462, 2009, s. 20-23.
78. Vansickel A.R., Eissenberg T., *Electronic cigarettes. Effective nicotine delivery after acute administration*, *Nicotine & Tobacco Research*, 15, 2013, s. 267-270.
79. Nides M.A., Leischow S.J., Bhattar M., Simmons M., *Nicotine blood levels and short-term smoking reduction with an electronic nicotine delivery system*, *American Journal of Health Behavior*, 38, 2014, s. 265-274.
80. Qasim H., Karim Z.A., Rivera J.O., Khasawneh F.T., Alshbool F.Z., *Impact of Electronic Cigarettes on the Cardiovascular System*, *Journal of the American Heart Association*, 6, 2017.
81. Tani T., Horiguchi Y., *Effects of formaldehyde on cardiac function*, *The Japanese Journal of Pharmacology*, 52, 1990, s. 563-572.

82. Tani T., Kogi K., Horiguchi Y., *Inhibitory effects of formaldehyde inhalation on the cardiovascular and respiratory systems in unanesthetized rabbits*, The Japanese Journal of Pharmacology, 40, 1986, s. 551-559.
83. Henning R.J., Johnson G.T., Coyle J.P., Harbison R.D., *Acrolein Can Cause Cardiovascular Disease. A review*, Cardiovascular Toxicology, 17, 2017, s. 227-236.
84. Pei Z., Zhuang Z., Sang H., α, β -unsaturated aldehyde crotonaldehyde triggers cardiomyocyte contractile dysfunction. *Role of TRPV1 and mitochondrial function*, Pharmacological Research, 82, 2014, s. 40-50.
85. Basma H., Tatineni S., Dhar K., Qiu F., Rennard S., Lowes B.D., *Electronic cigarette extract induced toxic effect in iPSC-derived cardiomyocytes*, BMC Cardiovascular Disorders, 20, 2020, s. 357.
86. Hasan K.M., Munoz A., Tumoyan H., *Adverse effects of fetal exposure of electronic-cigarettes and high-fat diet on male neonatal hearts*, Experimental and Molecular Pathology, 118, 2021.
87. Münzel T., Hahad O., Kuntic M., Keaney J.F., Deanfield J.E., Daiber A., *Effects of tobacco cigarettes, e-cigarettes, and waterpipe smoking on endothelial function and clinical outcomes*, European Heart Journal, 41, 2020, s. 4057-4070.
88. Osei A.D., Mirbolouk M., Orimoloye O.A., *Association between e-cigarette use and cardiovascular disease among never and current combustible-cigarette smokers*, The American Journal of Medicine, 132, 2019, s. 949-954.
89. Farsalinos K.E., Polosa R., Cibella F., Niaura R., *Is e-cigarette use associated with coronary heart disease and myocardial infarction? Insights from the 2016 and 2017 National Health Interview Surveys*, Therapeutic Advances in Chronic Disease, 10, 2019.
90. Alzahrani T., Pena I., Temesgen N., Glantz S.A., *Association Between Electronic Cigarette Use and Myocardial Infarction*, American Journal of Preventive Medicine, 57, 2019, s. 579-584.
91. Middlekauff H.R., Gornbein J., *Association of electronic cigarette use with myocardial infarction. Persistent uncertainty*, American Journal of Preventive Medicine, 56, 2019, s. 159-160.
92. Patel D., Davis K.C., Cox S., *Reasons for current E-cigarette use among U.S. adults*, Preventive Medicine, 93, 2016, s.14-20.
93. George J., Hussain M., Vadiveloo T., *Cardiovascular effects of switching from tobacco cigarettes to electronic cigarettes*, Journal of the American College of Cardiology, 74, 2019, s. 3112-3120.
94. Klonizakis M., Gumber A., McIntosh E., Brose L.S., *Short-term cardiovascular effects of e-cigarettes in adults making a stop-smoking attempt. A randomized controlled trial*, Biology (Basel), 10, 2021, s. 1208.
95. Klonizakis M., Gumber A., McIntosh E., Brose L.S., *Medium- and longer-term cardiovascular effects of e-cigarettes in adults making a stop-smoking attempt. A randomized controlled trial*, BMC Medicine, 20, 2022, s. 276.
96. Polosa R., Morjaria J.B., Caponnetto P., *Blood pressure control in smokers with arterial hypertension who switched to electronic cigarettes*, International Journal of Environmental Research and Public Health, 13, 2016, s. 1123.
97. Hajat C., Stein E., Shantikumar S., Niaura R., Ferrara P., Polosa R., *A scoping review of studies on the health impact of electronic nicotine delivery systems*, Internal and Emergency Medicine, 17, 2022, s. 241-268.
98. Schweitzer R.J., Wills T.A., Tam E., Pagano I., Choi K., *E-cigarette use and asthma in a multiethnic sample of adolescents*, Preventive Medicine, 105, 2017, s. 226-231.
99. Wills T.A., Pagano I., Williams R.J., Tam E.K., *E-cigarette use and respiratory disorder in an adult sample*, Drug and Alcohol Dependence, 194, 2019, s. 363-370.

100. Choi K., Bernat D., *E-cigarette use among Florida youth with and without asthma*, American Journal of Preventive Medicine, 51, 2016, s. 446-453.
101. Osei A.D., Mirbolouk M., Orimoloye O.A., *Association between e-cigarette use and cardiovascular disease among never and current combustible-cigarette smokers*, The American Journal of Medicine, 58, 2019, s. 336-342.
102. Perez M.F., Atuegwu N.C., Mead E.L., Oncken C., Mortensen E.M., *Adult e-cigarettes use associated with a self-reported diagnosis of COPD*, International Journal of Environmental Research and Public Health, 16, 2019, s. 3938.
103. Xie Z., Ossip D.J., Rahman I., Li D., *Use of electronic cigarettes and self-reported chronic obstructive pulmonary disease diagnosis in adults*, Nicotine & Tobacco Research, 22, 2020, s. 1155-1161.
104. Khan M.S., Khateeb F., Akhtar J., *Organizing pneumonia related to electronic cigarette use. A case report and review of literature*, The Clinical Respiratory Journal, 12, 2018, s. 1295-1299.
105. McCauley L., Markin C., Hosmer D., *An unexpected consequence of electronic cigarette use*, Chest, 141, 2012, s. 1110-1113.
106. Modi S., Sangani R., Alhajhusain A., *Acute lipoid pneumonia secondary to e-cigarettes use. An unlikely replacement for cigarettes*, Chest, 148, 2015, s. 382.
107. Thota D., Latham E., *Case report of electronic cigarettes possibly associated with eosinophilic pneumonitis in a previously healthy active-duty sailor*, Journal of Emergency Medicine, 47, 2014, s. 15-17.
108. Mantilla R.D., Darnell R.T., Sofi U., *Vapor lung. Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia (BOOP) in patient with e-cigarette use*, American Thoracic Society, 2016.
109. Atkins G., Drescher F., *Acute inhalational lung injury related to the use of electronic nicotine delivery system (ENDS)*, Chest, 148, 2015, s. 83.
110. Sommerfeld C.G., Weiner D.J., Nowalk A., Larkin A., *Hypersensitivity pneumonitis and acute respiratory distress syndrome from e-cigarette use*, Pediatrics, 141, 2018.
111. Moore K., Young H., Ryan M., *Bilateral pneumonia and pleural effusions subsequent to electronic cigarette use*, Open Journal of Emergency Medicine, 2015, s. 5.
112. Long J.L., *Diffuse Alveolar Hemorrhage Due to Electronic Cigarette Use*, American Thoracic Society, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 193, 2016.
113. Wang Q., Sundar I.K., Li D., *E-cigarette-induced pulmonary inflammation and dysregulated repair are mediated by nAChR $\alpha 7$ receptor. Role of nAChR $\alpha 7$ in SARS-CoV-2 Covid-19 ACE2 receptor regulation*, Respir Research, 21, 2020, s. 154.
114. McConnell R., Barrington-Trimis J.L., Wang K., *Electronic cigarette use and respiratory symptoms in adolescents*, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 195, 2017, s. 1043-1049.
115. Carter T., Tucker D., Kilic A., Papadimos T.J., Barlow A., Berry E., *Life-threatening vesicular bronchial injury requiring veno-venous extracorporeal membrane oxygenation rescue in an electronic nicotine delivery system user*, Clinical Practice and Cases in Emergency Medicine, 1, 2017, s. 212-217.
116. Polosa R., Morjaria J.B., Caponnetto P., *Evidence for harm reduction in COPD smokers who switch to electronic cigarettes*, Respiratory Research, 17, 2016, s. 166.
117. Polosa R., Morjaria J.B., Prosperini U., *Health effects in COPD smokers who switch to electronic cigarettes. A retrospective-prospective 3-year follow-up*, International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, 13, 2018, s. 2533-2542.
118. Bowler R.P., Hansel N.N., Jacobson S., *Electronic cigarette use in US adults at risk for or with COPD. Analysis from two observational cohorts*, Journal of General Internal Medicine, 32, 2017, s. 1289-1329.
119. Glantz S.A., Bareham D.W., *E-Cigarettes. Use, effects on smoking, risks, and policy implications*, Annual Review of Public Health, 39, 2018, s. 215-235.

120. Flouris A.D., Chorti M.S., Poulianiti K.P., *Acute impact of active and passive electronic cigarette smoking on serum cotinine and lung function*, *Inhalation Toxicology*, 25, 2013, s. 91-101.
121. Ballbè M., Martínez-Sánchez J.M., Sureda X., *Cigarettes vs. e-cigarettes. Passive exposure at home measured by means of airborne marker and biomarkers*, *Environmental Research*, 135, 2014, s. 76-80.
122. Soule E.K., Maloney S.F., Spindle T.R., Rudy A.K., Hiler M.M., Cobb C.O., *Electronic cigarette use and indoor air quality in a natural setting*, *Tobacco Control*, 26, 2017, s. 109-112.
123. J.W., PAP, *WHO opublikowało nowe, restrykcyjne wytyczne dot. zanieczyszczenia powietrza*, <https://pulsmedycyny.pl/who-opublikowało-nowe-restrykcyjne-wytyczne-dot-zanieczyszczenia-powietrza-1128376> [data dostępu: 22.11.2022].
124. Sailer S., Sebastiani G., Andreu-Fernández V., García-Algar O., *Impact of nicotine replacement and electronic nicotine delivery systems on fetal brain development*, *Int J Environ Res Public Health*, 24, 2019, s. 5113.
125. Bryce R., Robson S.J., *E-cigarettes and pregnancy (E-papierosy a ciąża)*, *Aust NZ J Obstet Gynaecol.*, 3, 2015, s. 218-221.
126. Schilling L., Spallek J., Maul H., Tallarek M., Schneider S., *Aktywna i bierna ekspozycja na tytoń i e-papierosy w czasie ciąży*, *Zdrowie Dziecka Matki J.*, 4, 2021, s. 656-665.
127. McCubbin A., Fallin-Bennett A., Barnett J., Ashford K., *Postrzeżenie i używanie elektronicznych papierosów w ciąży*, *Zdrowotna Res.*, 1, 2017, s. 22-32.
128. Baeza-Loya S., Viswanath H., Carter A., *Postrzeżenie bezpieczeństwa e-papierosów może prowadzić do e-palenia w czasie ciąży*, *Bull Menninger Clin.*, 3, 2014, s. 243-252.
129. Szumilas P., Wilk A., Szumilas K., Karakiewicz B., *The effects of e-cigarette aerosol on oral cavity cells and tissues. A narrative review*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8878056/> [data dostępu: 31.10.2022].
130. Dongxia Y., Sangeeta G., Lawyer G., Neelam J., Pishey D., Pathagunti S., Lyons J., Veazie P., Watson G., McIntosh S., Rahman I., *Inflammatory biomarkers and growth factors in saliva and gingival crevicular fluid of e-cigarette users, cigarette smokers, and dual smokers. A pilot study*, <https://aap.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/JPER.19-0457> [data dostępu: 31.10.2022].
131. Mahmoud R., *Impact of electronic cigarettes on oral health. Review*, <https://jcda.ca/sites/default/files/k7.pdf> [data dostępu: 31.10.2022].
132. Cichońska D., Król O., Słomińska E.M., Kochańska B., Świetlik D., Ochocińska J., Kusiak A., *Influence of electronic cigarettes on antioxidant capacity and nucleotide metabolites in saliva*, <https://www.mdpi.com/2305-6304/9/10/263> [data dostępu: 31.10.2022].
133. Stepniowska A., Kowalczyk M., Cholewińska E., Ognik K., *E-papierosy – pomoc w rzuceniu palenia czy zagrożenie?* <http://www.h-ph.pl/pdf/hyg-2017/hyg-2017-2-086.pdf> [data dostępu: 31.10.2022].
134. Froum S., Neymark A., *Vaping and oral health. It's worse than you think*, <https://www.perioimplantadvisory.com/clinical-tips/article/16412201/vaping-and-oral-health-its-worse-than-you-think> [data dostępu: 31.10.2022].
135. Poznański M., Pietras T., Antczak A., *Debata. Czy możemy polecać e-papierosy naszym pacjentom? Opinia 2*, https://journals.viamedica.pl/advances_in_respiratory_medicine/article/view/50852/37594 [data dostępu: 31.10.2022].
136. Callahan-Lyon P., *Electronic cigarettes. Human health effects*, https://tobaccocontrol.bmj.com/content/23/suppl_2/ii36 [data dostępu: 31.10.2022].
137. Napierała M., Kulza M., Wachowiak A., Jabłecka K., Florek E., *Elektroniczne papierosy – wpływ na zdrowie. Dotychczasowe doniesienia*, https://www.researchgate.net/profile/Marta-Szukalska-2/publication/274085710_Electronic_cigarettes_-

- _effects_on_health_Previous_reports/links/5776a47b08ae1b18a7e1aefe/Electronic-cigarettes-effects-on-health-Previous-reports.pdf [data dostępu: 31.10.2022].
138. Franco T., Trapasso S., Puzzo L., Allegra E., *Electronic cigarette. Role in the primary prevention of oral cavity cancer*, <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.4137/CMEMT.S40364> [data dostępu: 31.10.2022].
139. Yu V., Rahimy M., Korrapati A., Xuan Y., Zou A.E., Krishnan A.R., Tsui T., Aguilera J.A., Advani S., Crotty Alexander L.E., Brumund K.T., Wang-Rodriguez J., Ongkeko W.M., *Electronic cigarettes induce DNA strand breaks and cell death independently of nicotine in cell lines*, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1368837515003620> [data dostępu: 31.10.2022].
140. Cummins S.E., Zhu S.H., Tedeschi G.J., Gamst A.C., Myers M.G., *Use of e-cigarettes by individuals with mental health conditions*, *Tobacco Control*, 23, 2014.
141. Brown J.E.H., Gartner C., Carter A., *Can e-cigarettes improve the well-being of people with mental health disorders?* *International Journal of Drug Policy*, 73, 2019, s. 170-171.
142. Pham T., Williams J.V.A., Bhattarai A., Dores A.K., Isherwood L.J., Patten S.B., *Electronic cigarette use and mental health. A Canadian population-based study*, *Journal of Affective Disorders*, 260, 2020, s. 646-652.
143. Grant J.E., Lust K., Fridberg D.J., King A.C., Chamberlain S.R., *E-cigarette use (vaping) is associated with illicit drug use, mental health problems, and impulsivity in university students*, *Annals of Clinical Psychiatry*, 31, 2019, s. 27-35.
144. Laviolette S.R., *Molecular and neuronal mechanisms underlying the effects of adolescent nicotine exposure on anxiety and mood disorders*, *Neuropharmacology*, 184, 2021.
145. Obisesan O.H., Mirbolouk M., Osei A.D., *Association between e-cigarette use and depression in the behavioral risk factor surveillance system, 2016-2017*, *JAMA Network Open*, 2, 2019.
146. Lee S., Oh Y., Kim H., Kong M., Moon J., *Implications of electronic cigarette use for depressive mood. A nationwide cross-sectional study*, *Medicine (Baltimore)*, 99, 2020.
147. Livingston J.A., Chen C.H., Kwon M., Park E., *Physical and mental health outcomes associated with adolescent e-cigarette use*, *Journal of Pediatric Nursing*, 64, 2022, s. 1-17.
148. Becker T.D., Arnold M.K., Ro V., Martin L., Rice T.R., *Systematic review of electronic cigarette use (vaping) and mental health comorbidity among adolescents and young adults*, *Nicotine & Tobacco Research*, 23, 2021, s. 415-425.
149. Society for Adolescent Health and Medicine, *Protecting youth from the risks of electronic cigarettes*, *Journal of Adolescent Health*, 66, 2020, s. 127-131.
150. Vogel E.A., Ramo D.E., Rubinstein M.L., *Effects of social media on adolescents' willingness and intention to use e-cigarettes. An experimental investigation*, *Nicotine & Tobacco Research*, 23, 2021, s. 569-711.
151. Vincent D., Potts J., Durbin J., Moore J.M., Eley S., *Adolescent use of electronic nicotine delivery systems*, *Nurse Practitioner*, 43, 2018, s. 17-21.
152. Sapru S., Vardhan M., Li Q., Guo Y., Li X., Saxena D., *E-cigarettes use in the United States. Reasons for use, perceptions, and effects on health*, *BMC Public Health*, 20, 2020, s. 1438.
153. Stelmach M., *Trudna walka z nikotynizmem*, <https://www.termedia.pl/Trudna-walka-z-nikotynizmem,12,40186,1,1.html> [data dostępu: 31.10.2022].
154. Zielonka T.M., *Debata. Czy możemy polecać e-papierosy naszym pacjentom? Opinia I*, https://journals.viamedica.pl/advances_in_respiratory_medicine/article/view/50851/37593 [data dostępu: 31.10.2022].
155. Szyfter K., Napierała M., Florek E., Szyfter W., *Czy używanie e-papierosów wpływa na występowanie raka krtani?* <https://www.termedia.pl/Does-the-use-of-e-cigarettes-affect-the-occurrence-of-laryngeal-cancer-,11,37007,1,1.html> [data dostępu: 31.10.2022].

156. Mravec B., Tibenskyn M., Horvathova L., Babal P., *E-Cigarettes and cancer risk*, <https://aacrjournals.org/cancerpreventionresearch/article/13/2/137/47335/E-Cigarettes-and-Cancer-RiskE-Cigarettes-and> [data dostępu: 31.10.2022].
157. Pokhrel P., Fagan P., Herzog T.A., *Social media e-cigarette exposure and e-cigarette expectancies and use among young adults*, *Addictive Behaviors*, 78, 2018, s. 51-58.
158. Flach S., Maniam P., Manickavasagam J., *E-cigarettes and head and neck cancers. A systematic review of the current literature*, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/coa.13384> [data dostępu: 31.10.2022].
159. Hoffmann D., Hecht S.S., Wynder E.L., *Tumor promoters and cocarcinogens in tobacco carcinogenesis*, <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/epdf/10.1289/ehp.8350247> [data dostępu: 31.10.2022].
160. Bracken-Clarke D., Kapoor D., Baird A.M., Buchanan P.J., Gately K., Cuffe S., Finn S.P., *Vaping and lung cancer – a review of current data and recommendations*, *Lung Cancer*, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169500220307583?via%3Dihub> [data dostępu: 31.10.2022].
161. Zborovskaya Y., *E-Cigarettes and smoking cessation. A primer for oncology clinicians*, *Clinical Journal of Oncology Nursing*, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28107337/> [data dostępu: 31.10.2022].

E-papierosy w ujęciu socio-epidemiologicznym – bezpieczeństwo oraz użyteczność w terapii nikotyno-zastępczej

Streszczenie

Papierosy elektroniczne (e-papierosy, ENDS – elektryczne systemy dostarczania nikotyny) zyskują coraz większą popularność. W sprzedaży znajduje się szeroki wachlarz tych urządzeń i akcesoriów, które różnią się napięciem baterii, zawartością wkładu (np. obecnością lub brakiem nikotyny) czy wyglądem (od tych przypominających tradycyjne papierosy, aż po zupełnie odbiegające kształtem i rozmiarem od pierwowzorów).

Użytkownicy sięgają po e-papierosy z różnych przyczyn. Często są one promowane jako zdrowszy zamiennik papierosów konwencjonalnych. Dodatkowo wciąż istnieją miejsca, w których zakaz palenia nie uwzględnia papierosów elektronicznych – wówczas korzystanie ze zdobyczy techniki umożliwia obejście przepisów.

W niniejszej pracy przedstawiono przegląd aktualnej wiedzy na temat wpływu e-papierosów na zdrowie użytkowników – zarówno czynnych, jak i biernych. Poruszono związek z chorobami układu krążenia (m.in. miażdżycą, nadciśnieniem tętniczym, chorobą niedokrwinną serca, zaburzeniami rytmu serca), układu oddechowego (m.in. astmą, przewlekłą obturacyjną chorobą płuc), z psychiką czy nowotworami. Opisano również mechanizmy prowadzące do powstania wymienionych chorób – podłoże zapalne, stres oksydacyjny czy oddziaływanie na receptory komórkowe.

Słowa kluczowe: vaping, e-papierosy, papierosy elektroniczne

E-cigarettes from a socio-epidemiological perspective – safety and utility in nicotine replacement therapy

Abstract

Electronic cigarettes (e-cigarettes, ENDS – electronic nicotine delivery systems) are gaining popularity. A wide range of these devices and accessories are on sale, differing in battery voltage, cartridge content (e.g., presence or absence of nicotine) or appearance (from those resembling traditional cigarettes to those completely different in shape and size from the prototypes).

Users turn to e-cigarettes for a variety of reasons. They are often promoted as a healthier substitute for conventional cigarettes. In addition, there are still places where the smoking ban does not include electronic cigarettes, in which case the use of technological advances makes it possible to circumvent the regulations. This article presents an overview of current knowledge on the impact of e-cigarettes on the health of users – both active and passive. The relationship with cardiovascular diseases (including atherosclerosis, hypertension, ischemic heart disease, cardiac arrhythmias), respiratory diseases (including asthma, chronic obstructive pulmonary disease), mental illness or cancer is addressed. Also described are the mechanisms leading to the mentioned diseases – inflammatory background, oxidative stress or effects on cell receptors.

Keywords: vaping, e-cigarettes, electronic cigarettes

Zagrożenia związane z zażywaniem związków kannabinoidowych

1. Wstęp

Konopie (*Cannabis* L.) są to rośliny użytkowe należące do rodziny konopiowatych (*Cannabaceae* Endl.), uprawiane i wykorzystywane od wieków w przemyśle włókienniczym, spożywczym oraz leczniczym. W wielu krajach konopie stanowią ważną część życia społecznego i tradycji. Bywają również istotnym elementem obrzędów religijnych. Jednakże najpopularniejszym zastosowaniem konopi jest wykorzystanie ich do celów rekreacyjnych – w postaci marihuany lub haszyszu [1]. Marihuana pozyskiwana jest poprzez suszenie kwiatostanów żeńskich, niekiedy z niewielką domieszką liści. Z kolei haszysz to zlepiona i sprasowana żywica konopi [2].

Według niektórych źródeł konopie siewne, jako że stanowią odmianę nominatywną – czyli zostały zdefiniowane jako pierwsze w obrębie gatunku, uznawane są za jedyne przedstawiciela rodzaju konopie. Inne ujęcia systematyczne wyróżniają kilka gatunków z rodzaju konopie. Wyróżniamy 3 odmiany konopi (*Cannabis indica*, *Cannabis sativa*, *Cannabis ruderalis*) i ponad 700 szczepów. Poza różnicami anatomicznymi znacząca jest dysproporcja w stężeniu substancji aktywnych wspomnianych roślin. Tym samym spotykane są odmiany bardziej żywiczne i bogate w silny składnik psychoaktywny – delta-9-tetrahydrokannabinol (THC), ale mogą trafić się też rośliny, w których to inny fitokannabinoid, pozbawiony działania psychoaktywnego (kannabidiol – CBD), będzie w ilości przeważającej, a THC obecny będzie jedynie w śladowych ilościach. Szacuje się, że genotyp indyjski cechuje się najwyższą zawartością THC, co koreluje z największą popularnością rekreacyjną tej odmiany [2].

Wiedza ta determinuje legalność konopi. Jednakże każdy kraj precyzuje obowiązujące własne regulacje dotyczące możliwości posiadania, spożywania lub handlu produktami konopnymi. Za sprawą szybko zmieniających się statusów prawnych określających

¹ jak.kaminski1998@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Farmakologii z Farmakodynamiką, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, <https://www.umlub.pl/uczelnia/struktura-organizacyjna/szczegoly,184.html>.

² sara.hmaidan@o2.pl, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Farmakologii z Farmakodynamiką, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, <https://www.umlub.pl/uczelnia/struktura-organizacyjna/szczegoly,184.html>.

³ ewa.kedzierska@umlub.pl, Katedra i Zakład Farmakologii z Farmakodynamiką, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, <https://www.umlub.pl/uczelnia/struktura-organizacyjna/szczegoly,184.html>.

⁴ jolanta.orzelska-gorka@umlub.pl, Katedra i Zakład Farmakologii z Farmakodynamiką, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, <https://www.umlub.pl/uczelnia/struktura-organizacyjna/szczegoly,184.html>.

⁵ marta.kruk-slomka@umlub.pl, Katedra i Zakład Farmakologii z Farmakodynamiką, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, <https://www.umlub.pl/uczelnia/struktura-organizacyjna/szczegoly,184.html>.

⁶ grazyna.biala@umlub.pl, Katedra i Zakład Farmakologii z Farmakodynamiką, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, <https://www.umlub.pl/uczelnia/struktura-organizacyjna/szczegoly,184.html>.

dopuszczalną ilość i stężenie substancji aktywnych, sytuacja na rynku konopnym jest dynamiczna. Możliwe są różne stanowiska państw mające na celu uregulowanie stosunku państwa do marihuany: całkowita delegalizacja – nie wolno posiadać, uprawiać i palić marihuany; zezwolenie na wykorzystywanie marihuany w celach medycznych; dekryminalizacja marihuany – można posiadać niewielkie ilości i palić, ale pozostałe sfery są ograniczone (produkcja, dystrybucja, palenie w miejscach publicznych itp.); oraz legalizacja – powstaje bardziej lub mniej ograniczony rynek obrotu suszem konopnym.

Handel marihuaną jest legalny np. w niektórych miejscach w Stanach Zjednoczonych Ameryki, w Kanadzie oraz w Republice Południowej Afryki. Obecnie w większości państw europejskich, również w Polsce, legalność marihuany ograniczona jest do marihuany medycznej dostępnej na receptę, w której stężenie substancji czynnych (THC i CBD) może być różne i zależne od terapii danego schorzenia. Obecnie jedynym krajem europejskim, który w pełni zalegalizował marihuanę jest Malta. Używka ta została zaś zdekryminalizowana np. w Czechach czy Hiszpanii, co sprawia, że jej posiadanie na własny użytek nie jest traktowane jako przestępstwo [3].

Jeśli chodzi o sytuację prawną dotyczącą marihuany – w Polsce przedstawia się ona następująco: za samo nielegalne posiadanie marihuany grozi kara do 3 lat pozbawienia wolności, zaś za jej rozpowszechnianie i sprzedaż – do 10 lat; w przypadku osób małoletnich – nawet do 15 lat. W Polsce zarówno import, produkcja, sprzedaż, jak i samo posiadanie marihuany jest nielegalne i stanowi przestępstwo, zgodnie z ustawą z 29 lipca 2005 r. o przeciwdziałaniu narkomanii. W Polsce i prawie na całym świecie można mieć nasiona (nie zawierają one substancji psychoaktywnych), ale uprawa jest zabroniona. Wyjątek stanowi uprawa odmian włóknistych na potrzeby przemysłu włókienniczego, chemicznego i celulozowo-papierniczego oraz nasiennictwa (jednak potrzebne jest zezwolenie) [4]. Warto wspomnieć, że w Polsce nastąpiła zmiana ustawy z dnia 24 marca 2022 roku o przeciwdziałaniu narkomanii, która to ustawa podnosi limit THC z 0,2% do 0,3%. Ustawa weszła w życie i obowiązuje od 7 maja 2022 roku. To oznacza, że w Polsce dozwolone jest posiadanie konopi siewnych (*Cannabis sativa* L.) o łącznej zawartości THC nie przekraczającej 0,3% [5].

Biorąc pod uwagę powyższe aspekty, zarówno prawne, jak i medyczne – celem pracy było przedstawienie realnych zagrożeń związanych z zażywaniem związków kannabinoidowych zarówno po spożyciu jednorazowym, jak i przy stosowaniu przewlekłym.

2. Sposoby przyjmowania marihuany

Spośród najpopularniejszych sposobów zażywania marihuany można wyróżnić inhalację, palenie suszonych kwiatostanów konopii oraz podanie doustne.

Droga wziewna gwarantuje bezpośredni kontakt substancji aktywnych zawartych w dymie z krwioobiegiem poprzez bogatą sieć naczyń włosowatych w płucach. Krew bogata w substancje czynne konopi, czyli kannabinoidy, szybko przedostaje się do mózgu, co po krótkim czasie może wywołać pożądany efekt euforyczny. Z tego względu palenie jest najczęstszym sposobem przyjmowania marihuany [6]. Warto dodatkowo zwrócić uwagę na fakt, że ilość wdychanej smoły i poziom tlenu węgla absorbowany w wyniku palenia marihuany jest wyższy w porównaniu do palenia tytoniu [7]. W ten sposób narażenie na działanie czynników nowotwórczych podczas palenia marihuany jest dużo większe niż podczas palenia tytoniu. By ograniczyć to ryzyko, ostatnio wysokie uznanie zyskują waporyzatory, które umożliwiają ogrzewanie marihuany do temperatury niższej

od temperatury spalania. Dzięki temu waporyzacja jest bezpieczniejszą wzięwną formą zażywania marihuany, gdyż pozwala na zmniejszenie ilości wdychanych substancji smolistych na korzyść stężenia aktywnych związków – kannabinoidów [8]. Niższa temperatura ogranicza również powstawanie kancerogenego benzenu, toluenu czy naftalenu [2].

W przypadku zażycia doustnego związków konopi – przyjmowany produkt musi ulec strawieniu, a działanie substancji aktywnych jest warunkowane procesem wchłaniania, co determinuje wyraźnie wolniejszy początek działania. Rynek tego typu konsumpcji rozwija się jednak dość pręźnie. Biorąc pod uwagę wysoką lipofilność związków kannabinoidowych, popularne są zupy mleczne z konopi lub na bazie takiej zupy popularne są ciastka konopne lub budynie. W sprzedaży dostępne są również kawy czy herbaty zawierające substancje czynne konopi, ale zdecydowanie mniej aktywne [9].

3. Układ endokannabinoidowy

Konopie swoje efekty farmakologiczne wywierają dzięki obecności specyficznych związków kannabinoidowych. Kannabinoidy w organizmie ludzkim działają modulująco na tzw. układ endokannabinoidowy (ECS, ang. *endocannabinoid system*). Najważniejszymi składowymi ECS są: receptory kannabinoidowe – receptor kannabinoidowy typu 1 (CB1, ang. *cannabinoid receptor type 1*) oraz receptor kannabinoidowy typu 2 (CB2, ang. *cannabinoid receptor type 2*); endogenne kannabinoidy (endokannabinoidy), które są naturalnymi ligandami dla receptorów CB, a także enzymy biorące udział w ich metabolizmie i rozkładzie endokannabinoidów w mózgu. Receptory CB występują najpowszechniej w organizmie ludzkim. Ich najliczniejszą obecność zaobserwowano przede wszystkim w poszczególnych strukturach centralnego układu nerwowego: w korze czołowej (odpowiadającej za funkcje intelektualne i społeczne), hipokampie (warunkującym procesy uczenia się i pamięci), mózdzku (związanym z koordynacją ruchową) oraz prądkowiu (powiązanym z procesem uzależnienia – układ nagrody). Mimo że receptory CB1 najliczniej zlokalizowane są ośrodkowo, ten typ występuje również obwodowo, między innymi w wątrobie, płucach czy mięśniach. Z kolei, receptory CB2, w przeciwieństwie do CB1, zlokalizowane są głównie w strukturach odpowiedzialnych za prawidłową pracę układu odpornościowego, między innymi na powierzchni komórek limfocytów B i T, komórek tzw. naturalnych zabójców (NK, ang. *Natural killer*) oraz makrofagów. Tego typu receptory w mniejszej ilości występują również w centralnym i obwodowym układzie nerwowym, aczkolwiek ich obecność potwierdzono również w ośrodkowym układzie nerwowym, między innymi w mikrogleju [1].

Tak szerokie rozmieszczenie receptorów CB1 i CB2 w organizmie ludzkim koreluje z wieloma efektami farmakologicznymi związanymi z modulacją funkcji receptorów CB, potwierdzono ich odpowiedź w zaangażowanie układu ECS praktycznie we wszystkie najważniejsze funkcje fizjologiczne. W obrębie najważniejszych funkcji ECS można wymienić: zapewnienie homeostazy energetycznej, działanie przeciwbólowe i uspokajające, regulację motoryki przewodu pokarmowego, a także stymulację procesów uczenia się. Ponadto ECS ma wpływ na immunomodulację, kontrolę ciśnienia krwi i koordynację ruchową [10].

4. Podział związków kannabinoidowych

Związki kannabinoidowe to wszystkie substancje, które mają powinowactwo do receptorów CB (CB1 i/lub CB2).

Do takich związków zaliczamy:

- endokannabinoidy, będące częścią ECS – najważniejszymi są amidowa pochodna kwasu arachidowego, czyli anandamid (AEA), oraz 2-arachidonoglicerol (2-AG);
- fitokannabinoidy, czyli związki kannabinoidowe pochodzenia roślinnego zawarte w konopiach;
- kannabinoidy syntetyczne, czyli związki działające modulująco na receptory CB otrzymywane drogą syntetyczną. Związki te są bardzo częstą jedną ze składowych popularnych dopalaczy [11].

4.1. Fitokannabinoidy

Tak szerokie zainteresowanie konopiami od wieków związane jest właśnie z obecnością w tych roślinach wielu substancji czynnych, a zwłaszcza fitokannabinoidów. Spośród ponad 80 wyizolowanych fitokannabinoidów najważniejszymi – w kontekście efektów farmakologicznych – są wspomniane wcześniej: THC i CBD [2].

4.1.1. Delta-9-tetrahydrokannabinol (THC)

THC jest analogiem endogennego anandamidu (AEA), jako częściowy agonista przede wszystkim receptorów kannabinoidowych CB1 i CB2 wywołuje efekt psychoaktywny, co jest często i zazwyczaj głównym powodem spożywania wyrobów konopnych w celach rekreacyjnych i niemedycznych. THC jest jednym z najczęściej występujących i najbardziej pożądanych fitokannabinoidów w marihuanie. Obecnie obserwuje się tendencję do zwiększania jego stężenia w konopiach, dlatego w kwestii bezpieczeństwa kluczowe jest źródło – skąd i od kogo marihuana jest pozyskiwana, a także w jakiej dawce zostanie ona przyjęta. Zawartość THC w konopiach waha się od mniej niż 0,2% aż do 30%, a wraz ze wzrostem dawki wzrasta siła działania [12].

THC, jak większość kannabinoidów, jest związkiem o wysokiej lipofilności. Jest magazynowany między innymi w tkance tłuszczowej, mózgu, płucach oraz wątrobie. Okres półtrwania THC i jego metabolitów jest długi i zależy on od częstotliwości stosowania. Przy stosowaniu przewlekłym może wynosić nawet od 5 do 13 dni [12].

THC – jako agonista receptorów CB – odpowiada za efekt psychostymulujący, powodując wywołanie pożądanego przez użytkowników tzw. „haju”. THC oprócz powyższego działania powoduje również inne efekty farmakologiczne, jak efekt przeciwbólowy i przeciwzapalny, za pośrednictwem hamowania cyklooksygenazy-2 (COX-2). Zastosowanie kannabinoidów w redukcji odczuwanego bólu ma jednak charakter głównie pomocniczy. Warto jednak wspomnieć, że odmienne punkty uchwytu oraz brak depresji ośrodka oddechowego umożliwiają połączenie kannabinoidów z opioidami. Dane literaturowe opisują wiele możliwych połączeń kannabinoidów z typowymi opioidowymi lekami analgetycznymi [2]. Dodatkowo THC wykazuje właściwości neuroprotektyjne, a ze względu na obwodowe rozmieszczenie receptorów CB1 powoduje miorelaksację i rozszerza oskrzela [12].

4.1.2. Kannabidiol (CBD)

CBD, w przeciwieństwie do THC, nie wykazuje aktywacji receptorów CB1, przejawiając raczej słaby antagonizm wobec tych receptorów. CBD wykazuje większe powinowactwo do receptora CB2 niż do receptora CB1, przez co nie ma właściwości psychoaktywnych, odurzających i wydaje się być bardziej bezpieczny w użyciu. Dodatkowo

CBD zwiększa zakres terapeutyczny omawianego wcześniej THC, przez co może potęgować jego właściwości przeciwbólowe; prawdopodobnie odwraca też aktywność psychotropową THC, działając uspokajająco [13].

CBD wykazuje również właściwości przeciwlękowe i przeciwpsychotyczne, co może mieć zastosowanie jako alternatywa leczenia schizofrenii, oraz przeciwwymiotne – wykorzystywane między innymi w opanowaniu lekoopornych wymiotów będących skutkiem chemioterapii chorób nowotworowych [8]. Istnieją również twarde dowody naukowe mówiące o korzystnym wpływie CBD na przebieg/kontrolę pewnych postaci padaczki [14].

4.2. Kannabinoidy syntetyczne

Kannabinoidy syntetyczne to duża grupa niepowiązanych chemicznie związków, funkcjonalnie podobnych do THC. Syntetyczne kannabinoidy są pełnymi agonistami receptorów CB, co warunkuje ich znaczącą siłę działania. Syntezowane, rozprowadzane i sprzedawane są do użytku medycznego w ramach badań naukowych, ale częściej jednak jako nielegalne środki odurzające. W tym ostatnim celu syntetyczne kannabinoidy są dostępne w różnej postaci, dzięki czemu możliwe jest przyjmowanie ich drogą wziewną, doustną czy nawet doodbytniczą. Po preparaty zawierające kannabinoidy syntetyczne sięgają zazwyczaj osoby młode, częściej mężczyźni. Kannabinoidy syntetyczne wchodziły w skład tzw. nowych substancji psychoaktywnych (NSP), potocznie nazywanych „dopalaczami” (ang. *legal highs*). Szczyt zatruc i zgonów spowodowanych przyjmowaniem tych związków w Polsce przypada na rok 2015. Sprzedaż początkowo prowadzona w sklepach stacjonarnych, obecnie w większości przeniosła się do przestrzeni internetowej, gdzie łatwiej o nielegalny obrót środkami psychoaktywnymi. W ostatnich latach obserwuje się tendencję spadkową, po części za sprawą kolejnych delegalizacji nowo-syntezowanych związków [15]. Dynamika modyfikacji struktur kannabinoidów syntetycznych powoduje jednak, że gama tych związków jest różnorodna, a na opakowaniach produktów często brakuje sprecyzowanych informacji o składzie chemicznym. Spośród syntetycznych kannabinoidów najpopularniejszymi związkami są przedstawiciele grupy JWH (akronim zawdzięczany odkrywcy wielu z tych substancji, Johnowi Williamowi Huffmanowi), między innymi: JWH-200, JWH-018, JWH-073, JWH-250, JWH-081 [16]. Producenci chwytliwymi nazwami przekonują potencjalnych konsumentów do użycia produktu, jednocześnie zastrzegając, że nie ponoszą odpowiedzialności za ewentualne szkody wywołane w organizmie. Mocarz (identyfikujący się nazwą chemiczną UR-1144) lub Amulet ochronny (5-Fluoro-UR-144) to tylko niektóre ze spopularyzowanych nazw obiegowych, które nakłaniają użytkownika do przyjęcia substancji [17]. Użytkownicy kierują się nie tylko chęcią odurzenia czy odprężenia, ale ich motywem przewodnim bywa również fakt, że kannabinoidy syntetyczne, będące często mieszanką niezidentyfikowanych substancji, są trudne do wykrycia w badaniach toksykologicznych. W mieszaninach wchodzących w skład „dopalaczy” wykrywa się często również związki psychostymulujące naśladujące działanie amfetaminy oraz syntetyczne opioidy, które naśladują działanie heroiny, a także inne substancje takie jak psychoaktywna kofeina czy miejscowo znieczulająca benzokaina. Dodatkowo „dopalacze” często przyjmowane są jednocześnie z innymi narkotykami lub alkoholem, co potęguje ich toksyczność. Objawy kliniczne występujące po zażyciu omawianych związków są zróżnicowane i zależne od przyjętej dawki, składu produktu oraz stanu psychofizycznego organizmu. Skrajnie niebezpieczne jest zarówno jednorazowe spożycie substancji, jak i przewlekłe

ich stosowanie, jako że każdy organizm inaczej zareaguje na mieszaninę trujących i niezbadanych związków. Spośród najczęściej zgłaszanych symptomów występujących po przyjęciu „dopalaczy” wymienia się nadmierne pobudzenie, drgawki, hipokaliemię, uszkodzenie nerek, tachykardię, zawał mięśnia sercowego oraz śmierć [15].

5. Wpływ fitokannabinoidów na organizm

Ze względu na popularność i dostępność ze związków kannabinoidowych najpowszechniej stosowane są fitokannabinoidy zawarte w marihuanie.

Wpływ marihuany na organizm jest zależny od tego, czy jest to spożycie jednorazowe, czy proces stale powtarzający się – zażywanie przewlekłe [18].

5.1. Jednorazowe spożycie marihuany

Zazwyczaj po jednorazowym spożyciu marihuany zarówno palonej, jak i dostarczonej drogą pokarmową, użytkownik wpada w stan euforyczny, ale nie jest to regułą, jako że istotnym czynnikiem indukującym jest nastrój osoby spożywającej marihuane. W niektórych przypadkach zażywanie konopi może powodować senność, nadmierne uspokojenie czy nawet napady lęku przy zastosowaniu wyższej dawki [19]. W pierwszej fazie, bezpośrednio po spożyciu konopi zazwyczaj dochodzi do wzrostu samooceny, wprawienia się w euforyczny nastrój, gadatliwości i spadku samokontroli. Wyostrajają się zmysły. Może pojawić się synestezja, czyli przenikanie zmysłów, np. widzenie dźwięków, słyszenie lub nawet odczuwanie kolorów, co może wywoływać swego rodzaju omamy czy urojenia. Poza charakterystycznymi symptomami ze strony układu nerwowego mogą pojawiać się również objawy obwodowe, jak wahania ciśnienia krwi oraz tachykardia [18]. Następnym etapem jest zrelaksowanie i wyciszenie. Pojawiają się senność (nawet kilkunastogodzinne okresy trwania snu), a także zaburzenia kontroli czasu i przestrzeni. Dodatkowo zawarty w marihuanie THC osłabia koordynację wzrokowo-ruchową i prowadzi do wzrostu apetytu (tzw. gastrofaza).

Działanie marihuany rozpoczyna się nawet po kilku minutach od przyjęcia produktu, jeśli produkt był przyjmowany drogą wziewną lub po około godzinie, jeśli drogą pokarmową. Efekty farmakologiczne utrzymują się do kilku godzin. Jednakże czas jej aktywności u każdego człowieka może się różnić. Wrażenia są często subiektywne i zależne chociażby od przyjętej dawki [20].

5.2. Stosowanie przewlekłe marihuany

Przy stosowaniu przewlekłym efekty przyjmowania marihuany mogą obejmować – podobnie jak przy podaniu jednorazowym – zaburzenia somatyczne i psychiczne [21].

5.2.1. Zaburzenia somatyczne

Palenie marihuany w taki sam sposób jak palenie tytoniu wywiera szkodliwy wpływ na układ oddechowy. Zawarte w dymie substancje mogą skutkować pogorszeniem czynności płuc. Co istotne, badania dowodzą, że w porównaniu do dymu tytoniowego dym z palonych konopi zawiera więcej kancerogennych związków, a to potencjalnie zwiększa ryzyko wystąpienia nowotworów płuc [21]. Stosowane długotrwale konopie mogą prowadzić także do incydentów zakrzepowo-zatorowych nawet u osób młodych. Wśród najważniejszych zaburzeń somatycznych można wymienić także osłabienie funkcji immunologicznych oraz zmniejszenie masy urodzeniowej u dzieci w przypadku spożycia konopi przez kobiety w ciąży [21, 22].

5.2.2. Zaburzenia psychiczne

Najbardziej kontrowersyjną kwestią związaną z przewlekłym zażywaniem konopi jest ryzyko rozwoju tolerancji, a co z tym związane – uzależnienia.

W przypadku długotrwałego zażywania marihuany istnieje także ryzyko rozwoju tolerancji, czyli stanu, w którym organizm przyzwyczaja się do przyjmowanej dotychczas dawki. Tolerancja kannabinoidowa związana jest ze zmniejszeniem wrażliwości receptorów CB1 na endogenne kannabinoidy, więc aby utrzymać ten sam efekt dawkę należy stale zwiększać [21].

Uzależnienie fizyczne – przewlekłe zażywanie marihuany o wysokiej zawartości THC nie wywołuje uzależnienia fizycznego, ale może prowadzić do wspomnianego rozwoju tolerancji i wystąpienia objawów odstawiennych. W niektórych badaniach kwestionuje się ich występowanie, jednak istnieją dowody na symptomy, które pojawiają się po zaprzestaniu przewlekłego spożywania marihuany [7]. Takie objawy manifestują się przede wszystkim stanami lękowymi, drżeniami kończyn, nudnościami oraz zaburzeniami snu. Objawy ewentualnego zespołu odstawienia konopi związane są ze stosowaniem bardzo dużych dawek [21].

Uzależnienie psychiczne – tolerancja stanowi często początkowy etap rozwoju uzależnienia psychicznego, które jest wynikiem długotrwałego stosowania przetworów konopi o wysokiej zawartości THC. Poza nadużywaniem marihuany czynnikiem ryzyka rozwoju uzależnienia jest forma konsumpcji – palenie stanowi najbardziej niebezpieczną metodę.

Statystycznie w przypadku rozpoczęcia stosowania używek w wieku młodzieńczym ryzyko rozwoju uzależnienia jest wyższe, a mężczyźni uzależniają się częściej od kobiet. Jednakże potencjał uzależniający fitokannabinoidów jest niewielki – szacuje się, że ryzyko uzależnienia wynosi około 9% [1]. Rozwój uzależnienia związany jest przede wszystkim z aktywacją receptorów CB1 zlokalizowanych ośrodkowo, a w szczególności w układzie nagrody odpowiadającym za proces rozwoju uzależnień. Największą motywacją osoby uzależnionej jest koncentracja na przyjęciu kolejnej, często większej, dawki w celu osiągnięcia pożądanego efektu odurzającego. Osoba uzależniona może mieć obniżony nastrój, zaburzenia pamięci, problemy ze snem czy trudności w nawiązywaniu relacji międzyludzkich.

Jednym ze skutków długotrwałego przyjmowania marihuany jest również zespół amotywacyjny. Jest to zaburzenie dotyczące funkcjonowania poznawczego, które może prowadzić do zmian osobowości. Przejawia się między innymi trudnościami w podejmowaniu decyzji czy brakiem realizacji wyznaczonych celów. Osoby zażywające przewlekłe marihuanę zaniedbują codzienne obowiązki, jednakże często nie zdają sobie sprawy z ich pogarszającego się stanu. Charakterystyczna jest obojętność uczuciowa i spłylenie więzi emocjonalnych z bliskimi osobami. Pojawia się także odczucie pustki, beżsenność czy stany depresyjne [23].

Jeśli chodzi o inne zaburzenia psychiczne, szczególnie niebezpieczne jest przewlekłe przyjmowanie marihuany przez osoby niepełnoletnie, może przyczyniać się do pogorszenia zdolności uczenia się i zapamiętywania informacji, a także obniżać selektywność uwagi. Dodatkowo wczesna inicjacja stosowania marihuany może również stanowić furtkę do twardych narkotyków. U długotrwałych palaczy konopi może dochodzić do występowania deficytów poznawczych, a według niektórych doniesień nawet do spadku ilorazu inteligencji. Wraz ze stosowaniem marihuany wzrasta ryzyko zaburzeń lękowych oraz

zwiększają się predyspozycje do wystąpienia schizofrenii, zwłaszcza u osób obciążonych genetycznie. Szacuje się, że może to pośrednio prowadzić do zwiększenia częstości popełniania samobójstw [21, 24].

6. Podsumowanie

Jak wynika z przedstawionych rozważań – marihuana stanowi używkę potencjalnie szkodliwą, szczególnie dla osób młodych. Jej wpływ na organizm nie pozostaje obojętny i zależy jest od metody konsumpcji, przyjętej dawki oraz indywidualnych predyspozycji organizmu. Poza jednorazowym spożyciem, które niesie za sobą zaburzenia percepcji i negatywne działanie na układ krążenia, szczególnie niebezpieczne jest długotrwałe stosowanie, którego rezultatem może być uzależnienie czy zespół amotywacyjny. Istotne jest zatem zwiększenie świadomości społeczeństwa odnośnie do zagrożeń wynikających z zażywania związków kannabinoidowych. Patrząc przez pryzmat rozwoju medycyny – należy jednak pamiętać o szerokim i przyszłościowym zastosowaniu terapeutycznym konopi w leczeniu wielu chorób, między innymi chorób ośrodkowych (epilepsja), autoimmunologicznych (stwardnienie rozsiane), onkologicznych (nowotwory piersi, glejaki) czy neurodegeneracyjnych (choroba Alzheimera czy choroba Parkinsona) [25].

Uwagi ogólne

Praca jest wynikiem przeglądu najnowszej literatury naukowej z wykorzystaniem baz danych PubMed, Scopus oraz Google Scholar i jest związana z realizacją międzynarodowego projektu z Funduszu Wyszehradzkiego: Education and research in the field of drug design and development within the V4 region (no. 22130144).

Literatura

1. Formela A., Stachowicz M., Lebedzińska A., *Właściwości i perspektywa zastosowania kannabinoidów jako substancji leczniczych – szanse i zagrożenia*, Bromatologia i Chemia Toksykologiczna, 2, 2017, s. 184-189.
2. Dzierżanowski T., *Kannabinoidy – możliwości zastosowania w medycynie paliatywnej*, Medycyna Paliatywna, 10(1), 2018, s. 1-11.
3. www.legalized.pl/legalizacja-marihuany-polska [data dostępu: 18.02.2023].
4. Kuna M., *Warunki medycznego zastosowania marihuany w Polsce – aspekty prawa administracyjnego*, Przegląd Prawa Administracyjnego, 2, 2019, s. 81-93.
5. www.adwokat-tumielewicz.pl/aktualności [data dostępu: 18.02.2023].
6. Lucas C.J., Galettis P., Schneider J., *The pharmacokinetics and the pharmacodynamics of cannabinoids*, British Journal of Clinical Pharmacology, 84(11), 2018, s. 2477-2482.
7. Szulc M., *Konsekwencje zdrowotne używania marihuany w świetle badań oraz propozycja ujednolicenia stanowiska psychologów wobec problemu legalizacji konopi, sformułowana w oparciu o Kodeks Etyczno-Zawodowy Psychologa*, Alkoholizm i Narkomania, 26(4), 2013, s. 381-401.
8. Tai H., Swartz M.D., Marsden D., Perry C.L., *The future of substance abuse now. Relationships among adolescent use of vaping devices, marijuana, and synthetic cannabinoids*, Substance Use & Misuse, 56(2), 2021, s. 192-204.
9. www.konopnymarket.pl [data dostępu: 01.12.2022].
10. Lu H.C., Mackie K., *Review of the endocannabinoid system*, Biological Psychiatry. Cognitive Neuroscience and Neuroimaging, 6(6), 2021, s. 607-615.
11. Borowska M., Czarnywojtek A., Sawicka-Gutaj N., Woliński K., Płazińska M.T., Mikołajczak P., Ruchała M., *The effects of cannabinoids on the endocrine system*, Endokrynologia Polska, 69(6), 2018, s. 705-719.

12. Kaczmarczyk-Sedlak I., Wojnar W., Zych M., Dudek S., *Lecznicze właściwości konopi i możliwości ich zastosowania w medycynie*, Apothecarius. Śląskie Forum Farmaceutyczne, 27(47), 2017, s. 29-37.
13. Maroon J., Bost J., *Review of the neurological benefits of phytocannabinoids*, Surgical Neurology International, 9, 2018, s. 91.
14. Britch S.C., Babalonis S., Walsh S.L., *Cannabidiol. Pharmacology and therapeutic targets*, Psychopharmacology, 238(1), 2021, s. 9-28.
15. Lubecka B., Lubecki M., Pudło R., „Dopalacze” – co wiemy o nowych substancjach psychoaktywnych? *Psychiatria*, 15(2), 2018, s. 99-109.
16. Sun X., Dey S.K., *Synthetic cannabinoids and potential reproductive consequences*, Life Sciences, 97(1), 2014, s. 72-77.
17. Piechaczek M., Smolik M., Bystrowska B., *Ciemna twarz konopi. Syntetyczne kannabinoidy jako „dopalacze”*, Farmacja Polska, 78(5), 2022, s. 235-248.
18. Dąbrowska K., Miturska E., Moskalewicz J., Wieczorek Ł., *Co mówią wyniki badań o szkodliwości zażywania marihuany? Przegląd badań*, Serwis Informacyjny. Narkomania, 3(59), 2012.
19. Jacobus J., Tapert S.F., *Effects of cannabis on the adolescent brain*, Current Pharmaceutical Design, 20(13), 2014, s. 2186-2193.
20. Urits I., Charipova K., Gress K., Li N., Berger A.A., Cornett E.M., Kassem H., Ngo A.L., Kaye A.D., Viswanath O., *Adverse Effects of Recreational and Medical Cannabis*, Psychopharmacology Bulletin, 51(1), 2021, s. 94-109.
21. Klimkiewicz A., Jasińska A., *Zdrowotne następstwa rekreacyjnego używania kannabinoidów*, Psychiatria, 15(2), 2018, s. 88-92.
22. Zakrzaska A., Grędziński T., Kisiel W., Chabielska E., *Kannabinoidy a hemostaza*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 70, 2016, s. 760-774.
23. Lac A., Luk J.W., *Testing the amotivational syndrome. Marijuana use longitudinally predicts lower self-efficacy even after controlling for demographics, personality, and alcohol and cigarette use*, Prevention Science, 19(2), 2018, s. 117-126.
24. Zehra A., Burns J., Liu C.K., Manza P., Wiers C.E., Volkow N.D., Wang G.J., *Cannabis addiction and the brain. A review*, Journal of Neuroimmune Pharmacology, 13(4), 2018, s. 438-452.
25. Tkaczyk M., Florek E., Piekoszewski W., *Marihuana i kannabinoidy jako leki*, Przegląd Lekarski, 69(10), 2012, s. 1095-1097.

Zagrożenia związane z zażywaniem związków kannabinoidowych

Streszczenie

Konopie (*Canabis*) są jedną z bardziej kontrowersyjnych roślin XXI wieku. Zażywanie konopi w celach rekreacyjnych, odurzających jest niezwykle popularne u coraz młodszych osób, co niesie za sobą szereg niepożądanych długoterminowych efektów. Zawarte w konopiach związki aktywne to tzw. kannabinoidy (fitokannabinoidy), z przedstawicielem: Δ^9 -tetrahydrokanabinol (Δ^9 -THC) odpowiedzialnym za pożądane przez użytkowników działanie psychoaktywne. Warto zauważyć, że terminem kannabinoidy określa się nie tylko związki naturalnie występujące w *Canabis*. Realne zagrożenie stanowią syntetyczne kannabinoidy, znane również jako „falsywe ziola”, będące składnikami dopalaczy. Cechują się znacznie silniejszym działaniem, ale też często niesprecyzowaną substancją aktywną i dawką, co stanowi poważne konsekwencje dla ludzkiego zdrowia i życia.

Mechanizm działania kannabinoidów pochodzenia naturalnego oraz syntetycznego opiera się na modulacji funkcji układu endokannabinoidowego, poprzez wpływ na 2 główne typy receptorów kannabinoidowych (CB): CB1 i CB2. Receptory CB1 występują głównie w centralnym układzie nerwowym, natomiast CB2 zlokalizowane są w większości na obwodzie. Pobudzenie tych receptorów poprzez związki kannabinoidowe odpowiada za szereg efektów zarówno ośrodkowych, jak i obwodowych. Zażywanie przetworów konopi w postaci marihuany czy haszyszu, jak i syntetycznych kannabinoidów będących jednym z wielu składników dopalaczy, prowadzi nie tylko do krótko- czy długoterminowych zaburzeń percepcji i problemów z pamięcią,

ale także do zaburzeń osobowościowych, zespołu amotywacyjnego czy zaburzeń o podłożu psychicznym. Poważne konsekwencje dotyczą także działań obwodowych: dochodzi do osłabienia układu odpornościowego, rozrodczego, krążenia, oddechowego czy endokrynnego.

Biorąc pod uwagę prężnie rozwijający się handel wszelkimi środkami psychoaktywnymi, zwłaszcza na bazie marihuany, istotne jest poszerzenie wiedzy na ten temat, by zachować czujność oraz zwrócić uwagę na osoby, które są potencjalnie narażone na spożycie wspomnianych związków.

Słowa kluczowe: dopalacze, kannabinoidy, marihuana, uzależnienie, zespół amotywacyjny

The dangers of taking cannabinoid compounds

Abstract

Cannabis is one of the most controversial plants of the 21st century. The use of cannabis for recreational, intoxicating purposes is extremely popular among younger and younger people, which brings a number of undesirable long-term effects. The active compounds contained in hemp are the so-called cannabinoids (phyto-cannabinoids), with a representative: Δ 9-tetrahydrocannabinol (Δ 9-THC) responsible for the psychoactive effect desired by users. It is worth noting that the term cannabinoids is used not only to describe naturally occurring compounds in Cannabis. The real threat is posed by synthetic cannabinoids, also known as "fake herbs", which are ingredients of legal highs. They are characterized by a much stronger effect, but also often unspecified substance and dose, which has serious consequences for human health and life.

The mechanism of action of cannabinoids, whether of natural or synthetic origin, is based on the modulation of the function of the endocannabinoid system, through the influence of two main types of cannabinoid (CB) receptors: CB1 and CB2. CB1 receptors are found mainly in the central nervous system, while CB2 receptors are mostly located in the periphery. Stimulation of these receptors by cannabinoid compounds is responsible for a number of both central and peripheral effects. The use of cannabis products in the form of marijuana or hashish, as well as synthetic cannabinoids, which are one of the many components of legal highs, leads not only to short- or long-term perception disorders and memory problems, but also to personality disorders, amotivational syndrome or mental disorders. Serious consequences also apply to peripheral effects: the immune, reproductive, circulatory, respiratory and endocrine systems are weakened.

Given the dynamically developing trade in all psychoactive substances, especially those based on marijuana, it is important to expand knowledge on this subject in order to remain vigilant and pay attention to people who are potentially exposed to the consumption of these compounds.

Keywords: addiction, amotivational syndrome, cannabinoids, legal highs, marijuana

Jak nie dać się otruć GHB, czyli co wiemy o „pigulce gwałtu”?

1. Wprowadzenie. „Pigułka gwałtu” – czym właściwie jest?

W przekazie medialnym często możemy spotkać się z problemem wykorzystania w celach przestępczych tak zwanej „pigulki gwałtu” (ang. *date-rape drug*) – dodana do napojów alkoholowych powoduje u osoby, która ją przyjęła, senność aż do utraty przytomności, a także niepamięć następczą, która uniemożliwia późniejsze określenie okoliczności zajścia.

Mianem „pigulki gwałtu” określamy szereg substancji chemicznych, wykorzystywanych w celu dokonania przestępstwa, głównie na tle seksualnym. Są to przede wszystkim związki wykazujące hamujący wpływ na ośrodkowy układ nerwowy (OUN), mające wywołać u potencjalnej ofiary określone skutki, takie jak: opóźnienie reakcji, poczucie senności prowadzące do utraty przytomności, a także niepamięć. Objawy te występują najczęściej przy wyższych dawkach substancji i mogą być odwrotne po zażyciu ich w mniejszej ilości. Obserwowane jest wtedy pobudzenie, rozluźnienie i pozbycie się zahamowań. Do substancji najczęściej określanymi jako „pigulka gwałtu” należą: kwas γ -hydroksymasłowy (GHB) oraz jego prekursorzy: γ -butyrolakton (GBL) i 1,4-butanodiol (BDO), pochodne benzodiazepiny, głównie flunitrazepam, a także niebenzodiazepinowe leki nasenne, znane pod nazwą leki „Z”, np. zolpidem. Pozostałe substancje, które można zaliczyć do tej grupy, to m.in.: ketamina, etanol, leki przeciwbólowe, jak np. fentanyl, leki przeciwdepresyjne (citalopram, fluoksetyna, amitryptylina), przeciwhistaminowe (difenhydramina i hydroksyzyna), środki halucynogenne takie jak dietyloamid kwasu D-lizergowego (LSD) lub psychostymulujące, np. amfetamina i jej pochodne, a także metakwalon czy wodzian chloralu. Dodatkowo w połączeniu z alkoholem, który także należy do środków hamujących OUN, ich działanie toksyczne może wzrastać, powodując trudne do przewidzenia skutki zdrowotne. Najczęściej wykorzystywany jako „pigulka gwałtu” związek – GHB – ulega szybkiemu wchłonięciu, a następnie metabolizmowi i eliminacji z organizmu, dlatego tak ważna jest szybka interwencja w celu wykrycia

¹ sara.hmaidan@o2.pl, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Farmakologii z Farmakodynamiką, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, <https://www.umlub.pl/uczelnia/struktura-organizacyjna/szczegoly,184.htm>.

² jak.kaminski1998@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Farmakologii z Farmakodynamiką, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, <https://www.umlub.pl/uczelnia/struktura-organizacyjna/szczegoly,184.html>.

³ ewa.kedzierska@umlub.pl, Katedra i Zakład Farmakologii z Farmakodynamiką, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, <https://www.umlub.pl/uczelnia/struktura-organizacyjna/szczegoly,184.html>.

⁴ jolanta.orzelska-gorka@umlub.pl, Katedra i Zakład Farmakologii z Farmakodynamiką, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, <https://www.umlub.pl/uczelnia/struktura-organizacyjna/szczegoly,184.html>.

⁵ marta.kruk-slomka@umlub.pl, Katedra i Zakład Farmakologii z Farmakodynamiką, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, <https://www.umlub.pl/uczelnia/struktura-organizacyjna/szczegoly,184.html>.

⁶ grazyna.biala@umlub.pl, Katedra i Zakład Farmakologii z Farmakodynamiką, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, <https://www.umlub.pl/uczelnia/struktura-organizacyjna/szczegoly,184.html>.

substancji. Analiza toksykologiczna może być wykonana po pobraniu materiału biologicznego – najczęściej krwi lub moczu. Jednakże pozwala ona na wykrycie wspomnianego narkotyku tylko przez okres do 8 godzin w przypadku krwi oraz do 12 godzin, jeżeli analizie poddany został mocz [1-6].

2. Cel i metody wykorzystane w opracowaniu

Dobra zabawa w gronie znajomych stwarza złudne poczucie bezpieczeństwa, które niekiedy może skończyć się tragicznie. W Polsce skala wykorzystania substancji określanych mianem „pigulek gwałtu” nie jest do końca poznana (zważywszy na brak wiarygodnych statystyk). Warto również zaznaczyć, że część ofiar nie zgłasza się do organów ścigania ze względu na towarzyszący wstyd oraz niezdolność opisaną sprawcy i okoliczności zdarzenia. Nie należy jednak bagatelizować problemu, przeciwnie – ważne jest poruszanie tej kwestii ze względu na stosunkowo łatwą dostępność tego typu związków na narkotykowym rynku [1, 2].

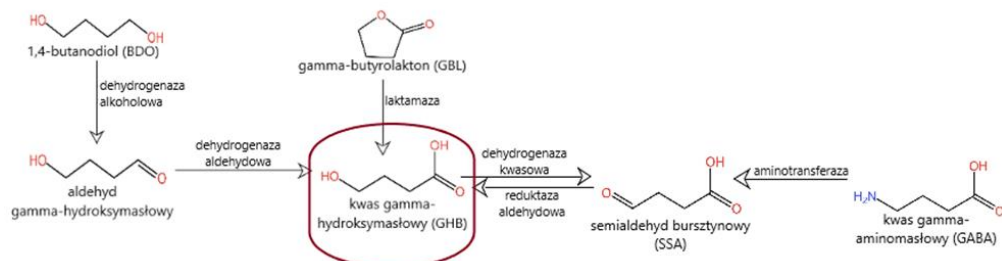
Praca ma na celu omówienie działania farmakologicznego, a także stosowania, zarówno leczniczego, jak i pozamedycznego, GHB oraz jego prekursorów: GBL i BDO, a ponadto – przedstawienie tej grupy związków na tle pozostałych wykorzystywanych jako „pigulki gwałtu”.

Praca jest wynikiem przeglądu najnowszej literatury naukowej z wykorzystaniem literaturowych baz danych PubMed, Scopus i Google Scholar.

3. Kwas γ -hydroksymasłowy (GHB)

3.1. Biosynteza i metabolizm GHB

GHB to występujący naturalnie w naszym organizmie, głównie w OUN, krótkołańcuchowy kwas tłuszczowy; powstaje w wyniku przemian w OUN z kwasu γ -aminomasłowego (GABA). Związek ten pod wpływem transaminazy kwasu γ -aminomasłowego przechodzi w semialdehyd bursztynowy (SSA), z którego pod wpływem zależnej od NADP⁺ reduktazy semialdehydu bursztynowego powstaje GHB. Na obwodzie prekursorami GHB są natomiast GBL i BDO. Przemiana GBL do GHB zachodzi przy udziale enzymu laktamazy. BDO początkowo przekształca się zaś w aldehyd γ -hydroksymasłowy przy udziale dehydrogenazy alkoholowej, by następnie pod wpływem dehydrogenazy aldehydowej przejść w GHB. Oba obwodowe prekursory łatwo przekształcają się w GHB w organizmie, prowadząc do zwiększenia jego stężenia we krwi i mózgu (rys. 1). Metabolizm GHB obejmuje natomiast jego utlenianie do SSA, który następnie jest włączany do cyklu przemian kwasów trójkarboksylowych, znanego również jako cykl kwasu cytrynowego czy też cykl Krebsa [7-9].

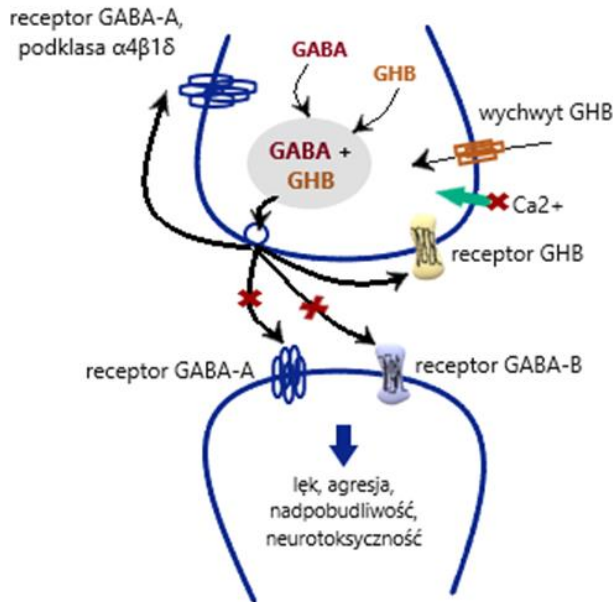


Rysunek 1. Biosynteza i metabolizm GHB, opracowanie własne na podstawie [7]

Największe ilości GHB możemy odnaleźć w istocie czarnej, wzgórzu, podwzgórzu, natomiast o wiele mniejsze w mózdku i innych strukturach OUN. W stanie fizjologicznym stężenie GHB w osoczu ludzkim wynosi poniżej 1 $\mu\text{g/ml}$, a w moczu oscyluje w granicach 2,5 $\mu\text{g/ml}$. Po spożyciu egzogenego GHB – jest on szybko wchłaniany i osiąga maksymalne stężenie w osoczu w ciągu 30-90 minut [7].

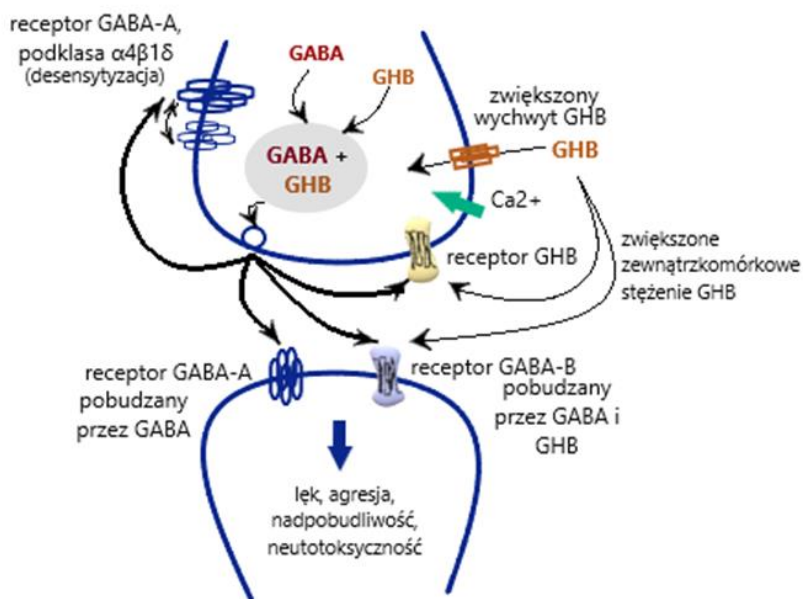
3.2. Mechanizm działania GHB w organizmie

GHB może działać jako neuroprzebiegacz lub neuromodulator i wiązać się ze specyficznymi receptorami GHB oraz receptorami GABA. Endogenne GHB pochodzący z metabolizmu GABA jest współuwalniany wraz z nim do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Następnie wiąże się ze specyficznymi receptorami GHB oraz z podklasą $\alpha 4\beta 1\delta$ receptorów GABA-A na błonie presynaptycznej. Pobudzenie tych autoreceptorów prowadzi do zahamowania uwalniania GABA do synapsy na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego. Te 2 zjawiska prowadzą do hiperpolaryzacji synapsy GABA-ergicznej i zmniejszenia aktywności tego układu. Taki stan określany jest jako fizjologiczny (rys. 2) [7, 10, 11].



Rysunek 2. Działanie fizjologiczne endogenego układu GHB, opracowanie własne na podstawie [11]

Po podaniu dużych dawek GHB – jego stężenie wewnątrz i na zewnątrz neuronów GABA znacząco wzrasta. W takim przypadku dochodzi do desensytyzacji podklasy $\alpha 4\beta 1\delta$ receptorów GABA-A, z czym związany jest brak dalszego efektu hamującego na układ GABA-ergiczny. Uwolniony w dużej ilości do przestrzeni synaptycznej GHB oddziałuje jako agonista receptorów GABA-B i pobudza ten układ, za sprawą czego dochodzi do specyficznych efektów farmakologicznych (rys. 3) [7, 10, 11].



Rysunek 3. Działanie endogenego układu GHB po podaniu egzogenego GHB, opracowanie własne na podstawie [11]

3.3. Wykorzystanie GHB w farmakoterapii

GHB został uzyskany syntetycznie w latach 60. XX wieku podczas poszukiwań analogów GABA mogących mieć znaczenie terapeutyczne. Od czasu syntezy laboratoryjnej GHB został poddany licznym badaniom. Sprawdzano między innymi jego właściwości ochronne na tkanki, łagodzące skutki zawału mięśnia sercowego czy też udaru niedokrwiennego mózgu. Pomimo początkowo obiecujących wyników analiz, GHB nie znalazł szerokiego zastosowania klinicznego. Jego pierwszym użyciem w farmakoterapii było zastosowanie w znieczuleniu ogólnym, które jednak zarzucono z powodu niepożądanych skutków ubocznych, takich jak wymioty i drgawki [9, 10].

Następnie związek zaczęto badać pod kątem wykorzystania w leczeniu narkolepsji z uwagi na podobieństwo w zapisie fal czynnościowych mózgu (w elektroencefalografii, EEG) występujących po zażyciu leku do obserwowanych w trakcie snu fizjologicznego. Dokładny mechanizm działania GHB w tym schorzeniu nie jest jednak do końca poznany. Po jego zastosowaniu u pacjentów stwierdzono zmniejszenie nadmiernej senności w ciągu dnia i ograniczenie liczby ataków katapleksji, czyli nagłej, odwracalnej utraty napięcia mięśniowego. Uważa się, że wynika to z modyfikacji struktury snu, czyli wydłużenia snu całkowitego i promowania występowania snu wolnofalowego. GHB wzmacnia stadium 3 snu wolnofalowego, podczas którego pojawiają się fale delta związane ze snem głębokim, oraz stadium 4, czyli najgłębszą fazę snu, w której fale delta dominują. Obecnie na rynku polskim GHB występuje w preparatach dostępnych na podstawie recepty lekarskiej – Xyrem® i Sodium oxybate Accord® (hydroksymaślan sodu), przeznaczonych do leczenia narkolepsji z katapleksją u pacjentów dorosłych, młodzieży i dzieci od 7. roku życia. Zgodnie z rekomendacją nr 124/2021 z dnia 12 listopada 2021 roku, wydaną przez Prezesa Agencji Oceny Technologii Medycznych i Taryfikacji produkt leczniczy Xyrem® został uznany za lek refundowany we wskazaniu: narkolepsja

z katapleksją. Jako uzasadnienie tej rekomendacji uznano wpływ stosowania preparatu na zmniejszenie ilości ataków katapleksji, wydłużenie stanu czuwania, a także zmniejszenie częstotliwości napadów senności [9, 12].

Kolejnym obszarem wykorzystania medycznego GHB jest leczenie ostrego zespołu odstawienia alkoholu oraz wspomaganie średnio- i długoterminowej abstynencji u osób dorosłych uzależnionych od alkoholu. Lekiem zarejestrowanym na terenie Włoch oraz Austrii w tym schorzeniu jest Alcover® (hydroksymaślan sodu), który przyłączając się do receptorów GABA-A na komórkach nerwowych mózgu i rdzenia kręgowego, prowadzi do zmniejszenia ich nadaktywności powstałej w wyniku uzależnienia. Jednak ze względu na działanie GHB zbliżone do działania alkoholu należy pamiętać o możliwości wystąpienia zamiany leczonego uzależnienia na równie niebezpieczne uzależnienie od GHB. Oprócz terapii choroby alkoholowej GHB testowano również w zespole abstynencyjnym po odstawieniu opioidów. Podejrzewano, że może on tłumić towarzyszące mu objawy, jednak prowadzone badania nie przyniosły, jak dotąd, na tyle obiecujących rezultatów, aby zarejestrować lek zawierający GHB w tym wskazaniu [9, 10, 13].

3.4. GHB jako „pigulka gwałtu”

Do najczęściej stosowanych substancji ułatwiających dokonanie przestępstw na tle seksualnym i rabunkowym zalicza się GHB oraz jego prekursorzy. Spotykane są zazwyczaj w postaci bezbarwnych cieczy, które doskonale rozpuszczają się zarówno w etanolu, jak i w wodzie, są pozbawione wyraźnego zapachu lub jest on trudno wyczuwalny, mają lekko słony smak, co zapobiega ich identyfikacji (zwłaszcza w połączeniu z intensywnymi w smaku napojami, czy z alkoholem). Można je podawać doustnie, poprzez wstrzyknięcie lub w formie inhalacji.

Po spożyciu doustnym GHB zaczyna działać po ok. 5-25 minutach, a jego okres półtrwania wynosi 30-60 minut, co także utrudnia jego wykrycie w materiale biologicznym. Przyjęcie wysokiej dawki (75 mg/kg) umożliwia oznaczenie tej substancji w osoczu tylko przez 8 godzin, a w moczu przez około 12 godzin. Ponadto zaledwie 5% dawki początkowej może zostać wykryte w moczu osoby, która zażyła narkotyk. Materiał biologiczny od ofiar napaści seksualnych powinien więc zostać pobrany i poddany testom na obecność związków wykorzystywanych jako „pigulki gwałtu”, w tym GHB, najszybciej jak to jest możliwe, zanim narkotyk zostanie zmetabolizowany do tego stopnia, że jego stężenie w osoczu spadnie do poziomu wartości fizjologicznych. Dodatkowo analizy próbki należy dokonać w jak najkrótszym czasie od jej pobrania ze względu na możliwość powstawania GHB *in vitro* i wynikający z tego fałszywie dodatni rezultat badania. Laboratoria w Polsce najczęściej w celu wykazania bądź wykluczenia narażenia na GHB poddają analizie próbki moczu potencjalnej ofiary. Referencyjną metodą w tym badaniu jest wysokosprawną chromatografię cieczową sprzężoną z tandemową spektrometrią mas. Obecnie w kryminalistyce opracowano techniki umożliwiające wykorzystanie próbek innych niż krew i mocz do wykrywania egzogenego GHB. Matrycę do badań mogą stanowić także włosy ofiary. Ich analiza pozwala na retrospektywne wykrycie narkotyku po około 3 tygodniach od zażycia. Jest to okres, w którym substancja wbudowuje się w strukturę włosa. W przypadku GHB precyzyjną analizę utrudnia jednak jego naturalnie występująca w ustroju ilość. Duża zmienność stężenia endogenego związku w składzie włosów uniemożliwia ustalenie wiarygodnej wartości granicznej, uniwersalnej dla wszystkich prowadzonych testów [14-17].

Wykazano, że GHB staje się dużo bardziej toksyczny, gdy jest stosowany w połączeniu z innymi substancjami, w szczególności z alkoholem. W takim przypadku, depresyjny efekt obu substancji potęguje się, powodując, że osoba narażona traci w sposób nagły przytomność. Pozwala to na łatwe wykorzystanie ofiary, ponieważ stan śpiączki może być błędnie interpretowany przez innych bywalców klubów jako zwykły stan nietrzeźwości. Ponadto GHB powoduje okresową amnezję, czyli niepamięć, co utrudnia ofiarom napaści, głównie seksualnych, identyfikację sprawców. W niektórych krajach ograniczona prawnie dostępność GHB przyczyniła się do rozszerzenia jego stosowania o prekursory, czyli GBL i BDO. Związki te są powszechnie dostępne jako chemikalia przemysłowe, a po spożyciu są szybko metabolizowane do GHB, wywierając takie same jak on efekty kliniczne. W Polsce, zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 17 sierpnia 2018 r. w sprawie wykazu substancji psychotropowych, środków odurzających oraz nowych substancji psychoaktywnych (Dz.U. z 2018 r., poz. 1591), GHB zaliczany jest do grupy II-P substancji psychotropowych, która podlega ewidencji przychodu i rozchodu – prowadzonego w formie książki kontroli. Prekursory GHB nie zostały literalnie wymienione w rozporządzeniu. Znajduje się w nim jednak zapis o uznaniu za substancje z grupy II-P związków będących ich izomerami, estrami, a także solami [14, 15, 18].

Pożądane efekty farmakologiczne (wykorzystywane w leczeniu) po zastosowaniu GHB są zwykle osiągane przy stężeniu w osoczu rzędu 60-100 µg/ml, o przedawkowaniu mówi się przy stężeniu 500 µg/ml. GHB ma więc wskaźnik terapeutyczny (IT) wynoszący zaledwie 8 (tabela 1). Dla porównania, kokaina ma IT równy 15. Ten wąski margines bezpieczeństwa jest głównym zagrożeniem związanym ze stosowaniem GHB, a łączne spożycie z alkoholem lub innymi substancjami działającymi depresyjnie na OUN jeszcze go zawęża [6].

Tabela 1. Zależność efektu od stężenia GHB w osoczu

Stężenie GHB w osoczu (µg/ml)	Odpowiedź organizmu	Efekty farmakologiczne
0-63	brak efektu	efekty wykorzystywane w leczeniu, pożądane
63-99	pobudzenie lub lekki sen	
100-150	bełkotliwa mowa, zaburzenia ruchu, lekki sen	
151-244	sen średnio nasilony	
245-395	głęboki sen/śpiączka	efekty niepożądane
395-500	śpiączka	
>500	śmierć	

Źródło: opracowanie własne na podstawie [6].

3.5. Rekreacyjne używanie GHB, skutki nadużywania

Ponieważ GHB pogłębia odczucia takie jak euforia, dobre samopoczucie, relaksacja, spokój, towarzyskość, seksualność i radość z tańca, popularne stało się jego rekreacyjne stosowanie, głównie jako „narkotyku imprezowego”. Z tego powodu zaczęto używać w kontekście tego związku nazwy „liquid ecstasy”. Choć sugestia wydaje się wyraźna, GHB nie jest ani chemicznie, ani farmakologicznie spokrewniony z substancjami takimi jak 3,4-metylenodioksymetamfetamina (MDMA). Jego działanie odpowiada raczej działaniu alkoholu lub benzodiazepin. Stwierdzono, że populacjami najbardziej narażonymi na użycie tej substancji w sposób nielegalny są osoby młode, uczęszczające

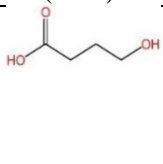
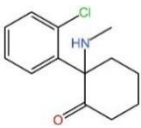
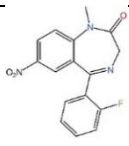
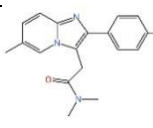
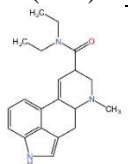
do klubów nocnych czy też biorące udział w festiwalach muzycznych, a także kobiety i mężczyźni należący do mniejszości seksualnych. Użytkownicy rekreacyjni uważają GHB za bezpieczny środek, ponieważ ich zdaniem nie wywołuje on poważnych skutków ubocznych. Jest to jednak fałszywe założenie, szczególnie gdy GHB jest stosowany często lub w wyższych dawkach. Po początkowej stymulacji, której towarzyszy euforia, odprężenie, chęć kontaktów towarzyskich oraz pobudzenie seksualne, może łatwo wywołać utratę przytomności. Odpowiada za to wąski margines bezpieczeństwa, czyli rozpiętość pomiędzy dawką stymulującą a toksyczną. Osoby uzależnione od GHB, które stosują go nawet kilka razy dziennie, są wielokrotnie przyjmowane na oddziały ratunkowe z ostrym zatruciem i zespołami odstawienia. Ciężkie objawy zatrucia GHB, które mogą pojawić się już po jednorazowym przedawkowaniu, obejmują depresję ośrodka oddechowego i hipowentylację, bradykardię oraz napady padaczkowe. Może również wystąpić pobudzenie lub opóźnione w czasie majaczenie. Przy przewlekłym nadużywaniu substancja ta wykazuje także ryzyko powikłań, takich jak kwasica metaboliczna i encefalopatia Wernickiego, które mogą okazać się śmiertelne.

Związki działające depresyjnie na OUN, takie jak GHB, przy długotrwałym stosowaniu powodują rozwój tolerancji na te efekty, co przy odstawieniu skutkuje zespołem abstynencyjnym, którego obraz kliniczny jest przeciwstawny do podstawowego działania związku. Stąd objawy odstawienia GHB wahają się od tachykardii, nadciśnienia tętniczego, lęku, pobudzenia i bezsenności po głęboką dezorientację, narastającą paranoję z omamami słuchowymi i wzrokowymi, majaczeniem i drgawkami [19-26].

4. Wybrane substancje wykorzystywane jako „pigulka gwałtu”

Nie tylko GHB oraz jego prekursorzy bywają wykorzystywane jako „pigulka gwałtu”. W tym celu często łączone z alkoholem są również takie substancje jak ketamina czy flunitrazepam (pochodna benzodiazepin). Nielegalne zastosowanie odnajdują także historycznie stosowane w lecznictwie związki, takie jak metakwalon czy wodzian chlorału (tab. 2) [1].

Tabela 2. Krótka charakterystyka substancji wykorzystywanych jako „pigulki gwałtu”

Nazwa międzynarodowa	kwas γ -hydroksymasłowy (GHB)	ketamina	flunitrazepam	zolpidem	dietyloamid kwasu D-lizergowego (LSD)
Wzór strukturalny					
Wskazania lecznicze	leczenie narkolepsji z atakami katapleksji oraz leczenie uzależnienia od alkoholu	anestezja, leczenie przewlekłego i ostrego bólu oraz terapia ciężkiej depresji	zaburzenia snu, premedykacja	krótkotrwałe leczenie bezsenności u dorosłych	substancja psychodeliczna – obecnie brak w lecznictwie zarejestrowanych wskazań do jej stosowania

Mechanizm działania	Oddziaływanie z receptorami GABA oraz GHB	Niekompetycyjny antagonist receptorów kwasu N-metylo-D-asparaginowego (NMDA)	Niekompetycyjny agonista receptorów GABA-A	selektywny agonista receptorów GABA-A, typu omega-1	agonista receptorów 5-HT _{2A}
Czas działania	3-6 h	0,5-1 h	4-36 h	6 h	8-12 h
Czas połowicznego rozpadu	0,5-1 h	2,5 h	18-26 h	2,5 h	0,5-1 h

Źródło: opracowanie własne na podstawie [1, 14, 15, 27-30].

5. Jak się chronić przed pigułką gwałtu?

Najważniejszą zasadą pozwalającą na uniknięcie kontaktu z pigułką gwałtu jest rozważa i właściwy dobór miejsca oraz towarzyszy spotkań i zabaw. Należy mieć na uwadze, że bardzo często miejscem pierwszego kontaktu sprawcy z ofiarą są dyskoteki i kluby nocne, stąd należy w nich zachować szczególną ostrożność. Ponieważ substancje odurzające najczęściej dodawane są do drinków potencjalnych ofiar, istotne jest, aby nie pozostawiać napojów bez nadzoru, a także nie przyjmować ich od nieznanymi osobami. Podejrzenia powinny również wzbudzić napoje o nietypowym wyglądzie lub smaku. Wówczas absolutnie nie wolno ich spożywać. Ważne jest także, aby obserwować bliskie nam osoby, czy nie wykazują symptomów odurzenia, a jeżeli takie wystąpią – jak najszybciej poszukać pomocy medycznej [31, 32].

Pewnym sposobem ochrony przed przypadkowym czy też umyślnie zaplanowanym zatruciem „pigułką gwałtu” są także testy na obecność niebezpiecznych substancji odurzających. Przykład takiego rozwiązania stanowią tekturowe podstawki z czujnikiem pozwalającym na wykrycie GHB oraz ketaminy. W celu skontrolowania napoju należy nanieść kilka kropli na poszczególne pola testowe i po upływie określonego przez producenta czasu odczytać wynik w postaci zmiany zabarwienia pola. Trzeba jednak mieć na uwadze możliwe nieprawidłowości w interpretacji wyniku ze względu na różne właściwości zarówno fizyczne, jak i chemiczne drinków. Może to prowadzić do fałszywie ujemnych lub fałszywie dodatnich odczytów. Oprócz podstawek o reakcje kolorymetryczne oparte są także opaski na nadgarstek, słomki do napojów czy nawet lakiery do paznokci. Wszystkie te rozwiązania, chociaż dają nadzieję na natychmiastową analizę składu napoju, nie pozostają bez wad. Z tego względu nie można pozwolić sobie na uśpienie czujności i kierowanie się jedynie wynikiem testu, gdyż może on okazać się fałszywie ujemny [1, 31, 33, 34].

W przypadku napaści na tle seksualnym z wykorzystaniem „pigułki gwałtu” kluczowym elementem jest czas. Każde przestępstwo bezwzględnie powinno być jak najszybciej zgłoszone odpowiednim służbom, a wszelkie dowody zabezpieczone. Im dłuższy czas upłynie od zdarzenia do przeprowadzenia czynności śledczych oraz analizy pobranych materiałów, tym mniejsze szanse na wykrycie w organizmie ofiary podanej substancji. Z tego powodu w razie podejrzenia o odurzenie „pigułką gwałtu” należy bezzwłocznie powiadomić policję [31, 34].

Wartą poruszenia kwestią, mogącą mieć istotny wpływ na bezpieczeństwo, jest łączenie alkoholu etylowego z lekami o depresyjnym wpływie na OUN. Etanol, aktywując receptory GABA wykazuje synergizm działania z preparatami hamującymi OUN, co dodatkowo potęguje ich działanie. Efektem takiej interakcji jest zaburzenie koordynacji ruchowej i funkcji poznawczych, sedacja, a także ryzyko wystąpienia hipotensji oraz depresji ośrodka oddechowego. W związku z tym podczas przewlekłego stosowania leków, a zwłaszcza tych o zbliżonym do alkoholu mechanizmie działania, należy całkowicie zrezygnować z jego spożywania [35].

6. Podsumowanie

„Pigułka gwałtu” może wykazywać różne, ciężkie do przewidzenia działania. Są one uzależnione głównie od użytej pod tą nazwą substancji, ale także od przyjętej dawki, drogi podania oraz wrażliwości danej osoby na konkretny środek. Do najczęstszych skutków należą jednak zwolnienie akcji serca, zawroty głowy, niemożność oceny sytuacji, senność, zwiótnienie mięśni, zmniejszenie ciśnienia krwi, zahamowanie psychiczne oraz utrata przytomności. Dodatkowo powtarzalnym elementem jest wystąpienie niepamięci następczej, która w znaczny sposób utrudnia ofiarom identyfikację sprawców zdarzenia. Najważniejszym elementem ochrony przed nieświadomym przyjęciem substancji odurzającej jest więc daleko posunięta ostrożność oraz rozważa w podejmowanych działaniach. Przysłuży się temu podnoszenie świadomości społeczeństwa na temat skali zjawiska wykorzystania „pigulki gwałtu” oraz zagrożeń, jakie ona niesie. Edukacją należy objąć rodziców, wychowawców, a także potencjalne ofiary, aby w sytuacji, gdy dojdzie do zetknięcia z substancją odurzającą nie wahały się zgłaszać tego jak najszybciej odpowiednim służbom. Szkoleniom powinni być też poddawani funkcjonariusze publiczni, by przypadki użycia „pigulki gwałtu” były sprawnie ujawniane i zwalczane. Nie należy również zapominać o wsparciu psychologicznym dla ofiar, którym takie oddziaływania pomagają uporać się z przeżyтыми zdarzeniami [29, 30].

Praca została zrealizowana w ramach międzynarodowego projektu z Funduszu Wyszehradzkiego: Education and research in the field of drug design and development within the V4 region (no. 22130144).

Literatura

1. Futoma K., Karsznia A., Loska O., *Pigułka gwałtu – ile mamy czasu na potwierdzenie jej użycia*, E-Wydawnictwo. Prawnicza i Ekonomiczna Biblioteka Cyfrowa. Wydział Prawa, Administracji i Ekonomii Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław 2014.
2. de Souza Costa, Y.R., Lavorato S.N., de Campos Baldin J.J.C.M., *Violence against women and drug-facilitated sexual assault (DFSA). A review of the main drugs*, Journal of Forensic and Legal Medicine, 74, 2020, s. 102020.
3. García M.G., Pérez-Cárceles M.D., Osuna E., Legaz I., *Drug-facilitated sexual assault and other crimes. A systematic review by countries*, Journal of Forensic and Legal Medicine, 79, 2021, s. 102151.
4. Skov K., Johansen S.S., Linnet K., Nielsen M.K.K., *A review on the forensic toxicology of global drug-facilitated sexual assaults*, European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 26, 2022, s. 183-197.
5. Matela W., *Pigułka gwałtu – jakie prawa ma ofiara przestępstwa?*
<https://www.infor.pl/prawo/prawo-karne/pokrzywdzony/272421,Pigułka-gwaltu-jakie-prawa-ma-ofiara-przestepstwa.html> [data dostępu: 10.12.2022].

6. Trombley T.A., Capstick R.A., Lindsley C.W., *Dark classics in chemical neuroscience: gamma-hydroxybutyrate (GHB)*, ACS Chemical Neuroscience, 11(23), 2019, s. 3850-3859.
7. Szukalski B., Błachut D., Bykas M., Szczepańczyk S., Taracha E., *Kwas γ -hydroksymasłowy (GHB) i jego lakton (GBL) – groźne związki psychoaktywne, właściwości i metabolizm*, Alkoholizm i Narkomania, 14(2), 2001, s. 185-193.
8. Kamal R.M., van Noorden M.S., Franzek E., Dijkstra B.A., Loonen A.J., de Jong C.A., *The neurobiological mechanisms of gamma-hydroxybutyrate dependence and withdrawal and their clinical relevance. A review*, Neuropsychobiology, 73(2), 2016, s. 65-80.
9. Kapoor P., Deshmukh R., Kukreja I., *GHB acid. A rage or reprise*, Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research, 4(4), 2013, s. 173-178.
10. Giorgetti A., Busardò F.P., Giorgetti R., *Toxicological characterization of GHB as a performance-enhancing drug*, Frontiers in Psychiatry, 13, 2022, s. 846983.
11. Maitre M., Klein C., Mensah-Nyagan A.G., *Mechanisms for the specific properties of γ -hydroxybutyrate in brain*, Medicinal Research Reviews, 36(3), 2016, s. 363-388.
12. Rekomendacja nr 124/2021 z dnia 12 listopada 2021 r. Prezesa Agencji Technologii Medycznych i Taryfikacji w sprawie zasadności wydawania zgody na refundację produktu leczniczego Xyrem (hydroksymasłan sodu) we wskazaniu: narkolepsja z katapleksją.
13. European Medicines Agency, *Alcover and associated names*, <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/referrals/alcover-associated-names> [data dostępu: 10.12.2022].
14. Anzar N., Suleman S., Parvez S., Narang J., *A review on illicit drugs and biosensing advances for its rapid detection*, Process Biochemistry, 113, 2022, s. 113-124.
15. Singh G., Singh P., Jyoti P., *Date rape drugs in sexual assaults. A threat to Indian society*, European Journal of Molecular & Clinical Medicine, 7(07), 2020, s. 4677-4683.
16. Busardò F.P., Pichini S., Zaami S., Pacifici R., Kintz P., *Hair testing of GHB – an everlasting issue in forensic toxicology*, Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 56(2), 2018, s. 198-208.
17. ALAB laboratoria, *Pigulki gwałtu – płynne ekstazy*, https://www.alaboratoria.pl/badanie/25262/pigulki_gwaltu_plynnne_ekstazy [data dostępu: 26.01.2023].
18. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 17 sierpnia 2018 r. w sprawie wykazu substancji psychotropowych, środków odurzających oraz nowych substancji psychoaktywnych (Dz.U. z 2018 r., poz. 1591).
19. Siembida J., Karakuła K., *GHB receptors – a new trend in psychopharmacology?*, Current Problems of Psychiatry, 19(4), 2018.
20. Palamar J.J., *Prevalence and correlates of GHB use among adults in the United States*, Journal of Psychoactive Drugs, 2022, s. 1-6.
21. Palamar J.J., Keyes K.M., *Trends in drug use among electronic dance music party attendees in New York City, 2016–2019*, Drug and Alcohol Dependence, 209, 2020, s. 107889.
22. Abid M., Kietzerow J., Iwersen-Bergmann S., Schnitgerhans T., Andresen-Streichert H., *Characteristics and dose-effect relationship of clinical gamma-hydroxybutyrate intoxication. A case series*, Journal of Forensic Sciences, 67(1), 2022, s. 416-427.
23. Liechti M.E., Quednow B.B., Liakoni E., Dornbierer D., von Rotz R., Gachet M.S., Gertsch J., Seifritz E., Bosch O.G., *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of γ -hydroxybutyrate in healthy subjects*, British Journal of Clinical Pharmacology, 81(5), 2016, s. 980-988.
24. Busardò F.P., Jones A.W., *Interpreting γ -hydroxybutyrate concentrations for clinical and forensic purposes*, Clinical Toxicology, 57(3), 2019, s. 149-163.
25. Brennan R., Van Hout M.C., *Gamma-hydroxybutyrate (GHB). A scoping review of pharmacology, toxicology, motives for use, and user groups*, Journal of Psychoactive Drugs, 46(3), 2014, s. 43-251.

26. Korf D.J., Nabben T., Benschop A., Ribbink K., van Amsterdam J.G., *Risk factors of γ -hydroxybutyrate overdosing*, *European Addiction Research*, 20(2), 2014, s. 66-74.
27. Maloney W.J., *The health effects of the abuse of ketamine*, *Archives of Dentistry*, 1(1), 2018, s. 1-3.
28. Edinoff A.N., Wu N., Ghaffar Y.T., Prejean R., Gremillion R., Cogburn M., Chami A.A., Kaye A.M., Kaye A.D., *Zolpidem. Efficacy and side effects for insomnia*, *Health Psychology Research*, 9(1), 2021, s. 24927.
29. Duski F., *Narkotyki. Aksjologiczne i prawne podstawy kryminalizacji*, praca doktorska (doctoral dissertation), 2018.
30. Nichols D.E., Grob C.S., *Is LSD toxic?* *Forensic Science International*, 284, 2018, s. 141-145.
31. Zadworn S., *Uwaga! Pigulka gwałtu!*, rozmowa z Ireneuszem Sołtyszewskim, prof. UWM z Katedry Kryminologii i Kryminalistyki WPiA, współautorem broszury *Uwaga! Pigulka gwałtu*, <http://www.uwm.edu.pl/egazeta/uwaga-pigulka-gwaltu> [data dostępu: 10.12.2022].
32. <https://lodz.policja.gov.pl/elp/przemoc/seksualna/2139,Pigulka-gwaltu.html> [data dostępu: 10.12.2022].
33. Son S.U., Jang S., Kang B., Kim J., Lim J., Seo S., Kang T., Jung J., Lee K.S., Kim H., Lim E.K., *Colorimetric paper sensor for visual detection of date-rape drug γ -hydroxybutyric acid (GHB)*, *Sensors and Actuators B. Chemical*, 347, 2021, s. 130598.
34. Jadhav E.B., *The drugs-facilitated sexual assaults & the date rape drugs*, *Nyayik Vigyan, Articles of Forensic Research and Criminal Investigation*, 1(2), 2020.
35. Rutkowska M., *Farmakokinetyczne i farmakodynamiczne interakcje alkoholu etylowego z lekami*, [w:] Książczyńska D. (red.), *Postępy i kontrowersje w farmakoterapii*, Wrocławskie Wydawnictwo Naukowe Atla 2, Wrocław 2018, s.107-126.

Jak nie dać się otruć GHB, czyli co wiemy o „pigulce gwałtu”?

Streszczenie

Mianem „pigulki gwałtu” określana jest szeroka grupa substancji o silnym działaniu hamującym ośrodkowy układ nerwowy (OUN) stosowanych w celach przestępczych. W zależności od rodzaju podanego środka oraz zastosowanej dawki ofiara odczuwa różne skutki – od zawrotów głowy po całkowitą utratę przytomności. Do substancji najczęściej zaliczanych do tej grupy należą kwas γ -hydroksymasłowy (GHB) oraz pochodne benzodiazepiny, głównie flunitrazepam. Pozostałe substancje, które mogą być tu wliczane, to: alkohol, ketamina, niektóre leki przeciwbólowe, przeciwdepresyjne czy też związki psychostymulujące i halucynogenne. GHB jest endogennym związkiem występującym w mózgu ssaków, jest także stosowany jako lek (narkolepsja, choroba alkoholowa). Rozluźnienie, euforia i halucynacje po jego przyjęciu wpłynęły również na jego wykorzystanie jako środka rekreacyjnego (narkotyk klubowy – *club-drug*) i wreszcie narzędzia przestępczego – dodawany do drinków wykazuje spotęgowane działanie, fizycznie obezwładnia ofiary i pozwala na dokonanie przestępstwa (stąd określany mianem pigulki gwałtu – *rape drug*). Ponadto powoduje okresową niepamięć (amnezję), co utrudnia ofiarom napaści, głównie seksualnych, identyfikację sprawców. Inną grupą użytkowników GHB są kulturyści, którzy używają tej substancji w celu zwiększenia masy mięśniowej, wierząc, że stymuluje ona uwalnianie hormonu wzrostu. Zarówno świadome stosowanie tego związku, jak i jego użycie pozamedyczne jest bardzo niebezpieczne ze względu na ryzyko ostrego zatrucia, gdyż mała jest rozpiętość pomiędzy skuteczną dawką GHB – dającą oczekiwane efekty – a dawką toksyczną, a także rozwoju uzależnienia przy stosowaniu przewlekłym.

Praca ma na celu omówienie działania farmakologicznego oraz stosowania – zarówno leczniczego, jak i pozamedycznego – GHB, a także jego prekursorów: γ -butyrolaktonu (GBL) i 1,4-butanodiolu (BDO), a ponadto ukazanie tej grupy na tle pozostałych substancji określanych mianem „pigulki gwałtu”. Przybliżenie tej tematyki wydaje się bardzo ważne z uwagi na ogromne zagrożenie związane z używaniem wymienionych substancji i fakt dość łatwej ich dostępności na narkotykowym rynku.

Metodyka wykorzystana przy tworzeniu opracowania została oparta na przeglądzie najnowszej literatury naukowej z wykorzystaniem baz danych PubMed, Scopus i Google Scholar.

Słowa kluczowe: pigulka gwałtu, kwas γ -hydroksymasłowy, przestępstwa seksualne

How not to be poisoned by GHB, that is, what do we know about the rape drug?

Abstract

A wide range of substances with strong central nervous system (CNS) inhibitory effects, used for criminal purposes are described as rape drugs. Depending on the type of drug administered and the dose used, the victim suffers various effects ranging from dizziness to complete unconsciousness. The substances most commonly included in this group are γ -hydroxybutyric acid (GHB) and benzodiazepine derivatives, mainly flunitrazepam. Other substances that may be included here are: alcohol, ketamine, certain painkillers, antidepressants or psychostimulant and hallucinogenic compounds.

GHB is an endogenous compound found in the mammalian brain and is also used as a drug (narcolepsy, alcoholic disorder). Its relaxing, euphoric and hallucinatory effects have also led to its use as a recreational drug (club drug) and finally, as a criminal tool: when added to drinks, GHB has an amplified effect, physically incapacitating the victim and allowing the crime to be committed (hence the term rape drug). In addition, it causes temporary amnesia, making it difficult for victims of predominantly sexual assaults to identify the perpetrators. Another group of GHB users are bodybuilders, who use the substance to increase muscle mass, believing that it stimulates the release of growth hormone. Both the conscious use of this compound and its non-medical use is very dangerous due to the risk of acute intoxication, as there is a small range between an effective dose of GHB – which produces the expected effects – and a toxic dose, as well as the development of addiction with chronic use.

This study aims to discuss the pharmacological effects and use – both medicinal and non-medical – of GHB and its precursors γ -butyrolactone (GBL) and 1,4-butanediol (BDO). A closer look at this topic seems very important, given the huge risks associated with the use of these substances and the fact that they are quite easily available on the drug market.

The methodology used to create the study was based on a review of recent scientific literature using PubMed, Scopus and Google Scholar databases.

Keywords: rape pill, γ -hydroxybutyric acid, sexual offences

Atopowe zapalenie skóry jako dermatоза wieku dziecięcego – czynniki ryzyka, objawy oraz przebieg schorzenia

1. Wprowadzenie

Atopowe zapalenie skóry (AZS, ang. *atopic dermatitis*, AD) to ogólnoustrojowa, przewlekła, uwarunkowana genetycznie zapalna choroba skóry [1]. Oprócz powłok może ona dotyczyć również śluzówek nosa, oskrzeli czy przewodu pokarmowego. Objawy ze strony różnych układów mogą wystąpić zarówno u jednego pacjenta, jak i dotyczyć – w odmiennej formie – kilku krewnych [2, 3]. Termin „atopia”, który Arthur Fernandez Coca i Robert A. Cooke wprowadzili w 1923 roku, wywodzi się z greckiego „âtopos” – oznaczającego chorobę bez precyzyjnie określonego miejsca [4]. Stąd właśnie pochodzi 1. człon nazwy choroby. Współcześnie pod pojęciem „atopii” kryje się nadwrażliwość immunologiczna o stosunkowo dobrze poznanych mechanizmach zależnych od nadmiernego wytwarzania przeciwciał klasy IgE. Dobrze charakteryzuje to AZS.

Pierwsze wzmianki o chorobie, znanej dzisiaj jako AZS, pochodzą jeszcze ze starożytności i należą do Swetoniusza (69-130). Rzymski kronikarz opisał skórne i oddechowe objawy atopii u cesarza Augusta [4]. Na właściwy opis i nazwanie choroby trzeba było jeszcze długo czekać – dokonali tego dopiero Fred Wise i Marion Sulzberger w 1933 roku [4, 5].

Współcześnie AZS jest chorobą istotną z punktu widzenia zdrowia publicznego. W ciągu ostatnich 50 lat częstość jej występowania wzrosła 2-3-krotnie w krajach rozwiniętych, dotykając szczególnie dzieci poniżej 5. roku życia i powodując znaczne straty – dotyczące zarówno jakości życia, jak i strat finansowych [1, 2]. W niniejszej pracy przedstawiono aktualną wiedzę na temat AZS, jego epidemiologii, patofizjologii, objawów i leczenia.

¹ s81338@365.sum.edu.pl, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Medycyny i Epidemiologii Środowiskowej, Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl.

² s81066@365.sum.edu.pl, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Medycyny i Epidemiologii Środowiskowej, Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl.

³ s81211@365.sum.edu.pl, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Medycyny i Epidemiologii Środowiskowej, Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl.

⁴ s84074@365.sum.edu.pl, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Medycyny i Epidemiologii Środowiskowej, Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl.

⁵ s82946@365.sum.edu.pl, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Medycyny i Epidemiologii Środowiskowej, Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl.

⁶ karolina.lau@sum.edu.pl, Katedra i Zakład Medycyny i Epidemiologii Środowiskowej, Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl.

⁷ jjosko@sum.edu.pl, Katedra i Zakład Medycyny i Epidemiologii Środowiskowej, Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl.

2. Epidemiologia AZS

2.1. Świat

Na całym świecie na AZS choruje od 15% do 20% dzieci i od 1% do 3% dorosłych [1, 2, 6]. Choroba może pojawić się w każdym wieku, jednak u 60% chorych rozwija się do ukończenia pierwszego roku życia, a u 85-90% – do 5. roku życia, ze szczytem zachorowalności w wieku od 3 miesięcy do 6 miesięcy [1, 2, 6]. Wśród 6-7-latków częstość występowania AZS wynosi od 0,9% w Indiach, przez 5,9% w Hiszpanii, 10,0% we Włoszech, 16% w Zjednoczonym Królestwie, 17,1% w Australii i 22,3% w Szwecji, do 22,5% w Ekwadorze [2, 7]. Z kolei w grupie wiekowej od 13 lat do 14 lat AZS występuje u 0,2% badanych w Chinach, 4,3% – w Hiszpanii, 7,4% – we Włoszech, 10,6% – w Zjednoczonym Królestwie, 10,7% – w Australii, 12,9% – w Szwecji i aż u 24,6% w Kolumbii [2, 7].

Objawy choroby zwykle ustępują przed osiągnięciem dorosłości, lecz u 10-30% pacjentów mogą się utrzymywać również powyżej tej granicy [1, 2, 8]. Istnieje jednak prawdopodobieństwo, że obserwacja dotycząca pozornego zaniku objawów w miarę upływu lat spowodowana jest faktem, że po okresie dojrzałości coraz mniej osób szuka pomocy lekarza w związku z dolegliwościami wywołanymi przez AZS [1]. W 2007 roku Hanifin i Reed oszacowali, że w samych Stanach Zjednoczonych żyje 17,8 mln osób chorych na AZS, którzy w większości nie są zdiagnozowani [9]. Choroba ta może dotyczyć 10,7% dzieci i od 7,2% do 7,4% dorosłych obywateli tego kraju [10-12].

Częste występowanie AZS (powyżej 15%) stwierdza się w Afryce, Ameryce Łacińskiej, Europie i Oceanii, aczkolwiek badacze zauważają, że w krajach wysokorozwiniętych (np. Wielkiej Brytanii), w których AZS było powszechnym problemem, w ostatnich latach zachorowalność osiągnęła stabilizację [2, 13]. Inaczej jest w biedniejszych państwach Ameryki Łacińskiej czy Azji, gdzie zachorowalność na AZS rośnie i schorzenie to staje się coraz poważniejszym problemem zdrowotnym [2, 14].

2.2. Polska

W Polsce AZS dotyka od 0,9% [15, 16] do 3,6% [17] dorosłych oraz od 4,7% [18] do 9,2% [15, 16] dzieci. Dane Departamentu Analiz i Strategii Ministerstwa Zdrowia wskazują, że w 2018 roku liczba hospitalizacji z powodu AZS u dzieci w Polsce wyniosła 1910 [15].

Na zachorowanie na AZS szczególnie narażone są kobiety, mieszkańcy dużych miast, dzieci rodziców z atopią, osoby z wyższym wykształceniem i o wyższym statusie socjoekonomicznym [17]. Zależność tę w pewnym stopniu wyjaśnia tzw. hipoteza higieniczna, opisana w dalszej części tekstu.

3. Patofizjologia i objawy choroby

3.1. Etiopatogeneza

Etiologia AZS jest złożona. Wśród przyczyn można wymienić zmiany w genomie, zaburzenia czynności układu dokrewnego oraz błędy regulacji cyklicznych nukleotydów na poziomie komórkowym. Eksperti Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego i Polskiego Towarzystwa Alergologicznego na panelu z 2015 roku określili, iż AZS jest wynikiem złożonych interakcji genetyczno-epigenetyczno-środowiskowych z nakładającym się defektem bariery naskórkowej [19]. U osób dotkniętych AZS obserwuje się

zwiększone stężenie histaminy w porównaniu z osobami zdrowymi, liczba limfocytów B wytwarzających IgE wzrasta wielokrotnie, nie stwierdza się zwiększonej ilości cząsteczek IgE na powierzchni granulocytów zasadochłonnych i komórek tucznych, a sam poziom IgE w surowicy może być podniesiony bądź nie odbiegać od norm – w wyjątkowych sytuacjach może być nawet obniżony.

U chorych na AZS często spotyka się obniżoną zawartość IgA w surowicy. Histamina wpływa na zmniejszenie zdolności tworzenia rozetek T przez limfocyty chorych z atopią. Występują również zaburzenia chemotaksji neutrofilów. U osób chorych na AZS znaczna wrażliwość skóry może być związana z zaburzeniami czynności czuciowych zakończeń nerwowych naskórka i skóry, jak też z nadmiernym pobudzeniem cholinergicznym oraz ze zmniejszeniem zawartości cAMP (cykliczny adenozyno-3',5'-monofosforan) w neuronach czuciowych. Występuje także nadwrażliwość receptorów α -adrennergicznych [20, 21]. Keratynocyty naskórka pacjentów z AZS wytwarzają unikalny profil chemokin i cytokin po stymulacji mechanicznej, np. drapaniu lub ekspozycji na cytokiny prozapalne, w tym nieprawidłowo wysokie poziomy RANTES po stymulacji TNF- α i IFN- γ . Są ważnym źródłem limfopoetyny zrębu grasicy, która aktywuje DC w celu pobudzenia naiwnych limfocytów Th do produkcji IL-4 i IL-13, co może wyjaśniać związek między drapaniem a wywoływaniem zapalenia skóry w AZS, w którym pośredniczy Th2. Charakterystycznym zjawiskiem dla atopowego zapalenia skóry jest zaburzenie równowagi pomiędzy limfocytami Th1 i Th2. W początkowym okresie odpowiedzi immunologicznej stwierdza się przewagę limfocytów Th2 wydzielających interleukiny (IL): IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 i IL-13. W fazie przewlekłej – tzw. późnej fazie odpowiedzi immunologicznej IgE-zależnej – występuje przewaga limfocytów Th1 wytwarzających IFN- γ , TNF- α , IL-2 oraz szereg innych cytokin prozapalnych odpowiedzialnych za przewlekłe zmiany zapalne o charakterze wyprysku [22]. U pacjentów z AZS obserwuje się także zmniejszoną zawartość ceramidów [21]. W metabolizmie nienasyconych kwasów tłuszczowych występują zaburzenia. Zmniejszenie aktywności enzymu Δ 6-desaturazy powoduje zahamowanie przemiany kwasu linolenowego do kwasu γ -linolenowego, co skutkuje zaburzeniami podziałów komórkowych w naskórku, a to prowadzi do znacznej suchości skóry i zwiększenia jej wrażliwości na działanie zewnętrznych czynników drażniących [22]. Według ostatnich badań istotną rolę w patogenezie AZS odgrywa filagryna [22]. Uważa się, że jest ona prekursorem wolnych kwasów tłuszczowych (FFA, ang. *free fatty acids*) oraz pyrrolidonowego kwasu karboksylowego (PCA, ang. *pyrrolidone carboxylic acid*), które wchodzą w skład naturalnego czynnika nawilżającego (NMF, ang. *natural moisturizing factor*) odpowiedzialnego za prawidłowe nawilżanie naskórka [22]. AZS jest genetycznie złożoną chorobą, która często występuje rodzinnie. Porównania pacjentów z grupy badanej i osób z grupy kontrolnej sugerowały związek genotypowy między allelem T polimorfizmu -590C/T regionu promotora genu IL-4 a AZS. Allel ten jest związany ze zwiększoną aktywnością promotora genu IL-4, co sugeruje, że może on nasilać odpowiedzi alergiczne w AZS. Również warianty regionu kodującego IL-13, polimorfizm wzmocnienia funkcji w podjednostce α receptora IL-4 i mutacja funkcjonalna w regionie promotorowym RANTES zostały odnotowane w AZS. Ustalenia powiązania między AZS a markerami na chromosomie 11q13, w tym genu kodującego łańcuch β receptora o wysokim powinowactwie do IgE (*Fc ϵ RI β*), są uznawane za kontrowersyjne. Badania przesiewowe wykazały powiązanie AZS z loci na chromosomie 3q21 – ten region koduje cząsteczki kostymulujące CD80 i CD86, a zatem może modu-

lować odpowiedzi komórek T. Wykazano też powiązanie AZS z loci na chromosomach 1q21, 17q25 i 20p. Co ciekawe, wiadomo, że te same regiony zawierają geny podatności na łuszczycę, a to sugeruje wspólne geny kandydujące zaangażowane w kontrolę zapalenia skóry. Wariant polimorfizmu Glu420Lys w genie SPINK5 wykazał istotny związek z AZS w 2 niezależnych badaniach kohortowych [21, 23].

3.2. Objawy

Rozpoznanie atopowego zapalenia skóry wymaga stwierdzenia 3 spośród 4 kryteriów większych, do których należą: nasilony świąd, typowa lokalizacja, przewlekły i nawrotowy przebieg, a także wywiad rodzinny w kierunku atopii [22]. Uporczywy, nieustający świąd to podstawowy objaw podmiotowy AZS. Nasila się zwłaszcza wieczorem, powodując zaburzenia snu [24]. Zakres zajęcia może wahać się od łagodnego i ograniczonego, np. jedynie łagodnego zajęcia obszaru zgięcia, do uogólnionego i ciężkiego. AZS podzielono na 3 fazy ze względu na wiek pacjenta i rozmieszczenie zmian: fazę niemowlęcą, fazę dzieciństwa i fazę dorosłości [25]. Niemowlęca faza AZS obejmuje okres od około 3-4 miesiąca do 2 roku życia, ujawniając rumieniowe grudki i pęcherzyk, które zazwyczaj lokalizują się na policzkach, czole lub owłosionej skórze głowy i są silnie swędzące. Zmiany mogą ograniczać się do twarzy albo rozciągać się na tułów, a zwłaszcza na wyprostne części kończyn w rozproszonych, źle odgraniczonych, często symetrycznych łatach. Charakterystyczna dla tej fazy jest tendencja do występowania na dotkniętych obszarach znacznego obrzęku prowadzącego do sączenia i tworzenia strupów niezwiązanych z wtórną infekcją. Powszechna jest uogólniona suchość skóry (kseroza). Od 8 do 10 miesiąca życia powierzchnie prostowników rąk i nóg często są objęte zapaleniem skóry, być może ze względu na rolę tarcia związanego z pełzaniem oraz narażeniem tych miejsc na czynniki drażniące i alergizujące, np. dywany. Choć zapalenie skóry w dole łokciowym i podkolanowym, w okolicach oczodołu i szyi występuje częściej u starszych dzieci i młodzieży, miejsca te mogą dotyczyć również niemowląt i małych dzieci. Diagnozę ułatwia fakt, że zmiany zazwyczaj oszczędzają okolicę pieluszkową [25, 26].

Faza dziecięca zwykle występuje w okresie od 2 roku życia do okresu dojrzewania i przekształca się z fazy niemowlęcej wypryskowo-wysiękowej lub pojawia *de novo*. Klasycznymi obszarami zajętej przez zmiany są zgięcia łokci, kolan, nadgarstków, skóra karku, grzbiety dłoni i stóp. Nieostro odgraniczone ogniska rumieniowe z drobnymi grudkami, nadżerkami, przeczosami oraz strupy z towarzyszącym świądem i lichenifikacją to obraz kliniczny tej fazy. Lokalizacja w obszarach zgięcia jest bardziej powszechna, ale niektóre dzieci wykazują „odwrotny” wzór, głównie z zajęciem obszarów prostowników. Zaangażowanie twarzy, jeżeli występuje, ma tendencję do lokalizowania się w obszarach okołoczodołowych i okołoustnych, w przeciwieństwie do względnego oszczędzania tych lokalizacji na twarzy niemowlęcej [25, 26].

Dorośla faza rozpoczyna się po 12. roku życia i trwa do dorosłości. Dotknięte zmianami obszary obejmują fałdy zgięciowe, twarz i szyję, ramiona i plecy oraz dłonie, stopy, palce rąk i nóg, obręcz barkową, biodrową, górną część klatki piersiowej. Okres ten charakteryzuje się suchymi łuszczącymi się rumieniowymi grudkami i blaszkami, skóra staje się zaczerwieniona, zgrubiała, występuje lichenifikacja (skóra sprawia wrażenie oglądanej przez szkło powiększające), nadżerki, przeczosy, strupy, a wymienionym objawom towarzyszy świąd. Może dochodzić do infekcji gronkowcowych zmian [25, 26].

Istnieją też liczne kryteria uzupełniające, które pomagają w rozpoznaniu choroby, jak suchość skóry, świąd podczas pocenia, rogowacenie przymieszkowe bądź rybia łuska, zwiększona podatność na zakażenia *Staphylococcus aureus*, podwyższony poziom IgE, dodatnie wyniki testów skórnych z alergenami, natychmiastowe reakcje skórne, wczesny początek zmian, skłonność do nawrotowych zakażeń skóry, zaćma, przebarwienia powiek i zacienienia wokół oczu, nawrotowe zapalenie spojówek, nietolerancja niektórych pokarmów, nietolerancja wełny, zaostrzenie zmian skórnych po stresie, rumień twarzy, objaw Dennie-Morgana (podwójny fałd powieki dolnej) [22].

4. Predyspozycje do wystąpienia choroby

Rozpatrując analizy danych, które wskazują na 2-krotny wzrost częstości występowania atopowego zapalenia skóry w ciągu ostatnich 3 dekad, można powiedzieć, że ta jednostka chorobowa staje się realnym problemem dla zdrowia publicznego [27]. Rosnące obciążenie populacji ogólnej to jednak przede wszystkim zagrożenie dla pacjentów, którzy przez swoje schorzenie podstawowe są bardziej narażeni na występowanie: astmy, alergicznego nieżytu nosa, bezsenności, problemów sercowo-naczyniowych, zaburzeń snu, otyłości, cukrzycy, zaburzeń wzroku, osteoporozy, złamań, powikłań stomatologicznych, a nawet chorób psychicznych [28]. Obserwując tendencję wzrostową w liczbie osób dotkniętych AZS oraz mając na uwadze potencjalne powikłania, istotne wydaje się identyfikowanie osób zagrożonych atopią w celu wdrażania strategii zapobiegawczych, które wymagają poznania predyspozycji do wystąpienia choroby [29]. Wyniki dotychczasowych badań wskazują, że czynnik genetyczny jest zaangażowany w rozwój AD, zaś mutacje w genie FLG (exon 3), kodującym białko filagrynę, leżą u podstaw narażenia na atopię. Dysfunkcja tego fragmentu, którego lokum znajduje się na chromosomie 1, prowadzi do niedoboru czynnika nawilżającego (NMF) warstwy rogowej naskórka, utraty bariery ochronnej i w efekcie do zwiększonego narażenia na penetrację alergenów wywołujących określone objawy [28].

Dynamiczny wzrost zachorowań na atopowe zapalenie skóry wśród globalnej populacji wyklucza możliwość wyłącznej podstawy genetycznej jako czynnika sprawczego i nasuwa możliwość wpływu bodźca środowiskowego. Co więcej, dowodem na zaangażowanie innych stymulatorów schorzenia jest fakt, że około 40-50% osób chorych nie ma mutacji w obrębie genu FLG [30, 31]. Badanie ISAAC Phase One wykazało, że nasilenie objawów AZS koreluje negatywnie z roczną temperaturą zewnętrzną, co prawdopodobnie jest skutkiem immunosupresyjnego działania światła UV. Dodatkowo ekspozycja na UVB i słońce indukuje wzrost wartości poziomu witaminy D, której optymalna ilość chroni przed nasileniem objawów egzemy. Zaobserwowano, iż ludność terenów miejskich jest bardziej predysponowana do wystąpienia AZS w stosunku do osób mieszkających na wsi, a przyczyn tej tendencji upatruje się w niejednakowym narażeniu na zanieczyszczenia środowiska. Dla przykładu dwutlenek azotu (element zanieczyszczającego powietrza) oraz spaliny z silników Diesla zostały uznane za środowiskowe czynniki ryzyka rozwoju atopowego zapalenia skóry [28]. Udowodniono, że prenatalna ekspozycja na skażenia (między innymi węglowodory wielopierścieniowe), a także poporodowy wpływ dymu tytoniowego to czynniki, które pozytywnie korelują z ryzykiem zachorowania dziecka na atopowe zapalenie skóry [30]. Koncentrując się na czynnikach środowiskowych, warto zaznaczyć, że metale ciężkie, między innymi rtęć, mogą indukować dysfunkcję autoimmunologiczną. Obciążenie organizmu rtęcią może

zatem predysponować do wystąpienia AZS [32]. Należy także uwzględnić związek pomiędzy prenatalną ekspozycją na arsen oraz kadm a ryzykiem późniejszego rozwoju AZS u dzieci. Wieloośrodkowy projekt Mother's and Children's Environmental Health przedstawił wynik badania, podając, że poziom kadmu we krwi pępowinowej koreluje dodatnio z narażeniem 6-miesięcznych niemowląt na wystąpienie AZS [32]. Inne badanie kohortowe wykazało, że narażenie prenatalne na arsen wiązało się z 2-4 razy częstszym diagnozowaniem AZS u dzieci w wieku 4 lat [33]. Rozpatrując wpływ parabenów (zawarte w kosmetykach, farmaceutykach i produktach spożywczych) jako czynnika predysponującego do wystąpienia AZS, można za prawdziwe uznać stwierdzenie, iż EtP oraz nBuP (2 spośród 5 badanych typów parabenów), oddziałując na płód mogą predysponować do zachorowania na AZS o bardzo wczesnym początku bez remisji [33]. Jednym z bardzo silnych czynników predysponujących do zachorowania na atopowe zapalenie skóry jest wiek – populacja pediatryczna stanowi zdecydowaną większość pacjentów dotkniętych tym schorzeniem, w grupie młodych dorosłych procentowe wskaźniki zachorowań spadają, aby pozostać stabilne w wieku dorosłym [28]. Jak się okazuje, także płeć może stanowić czynnik ryzyka zachorowania na AZS, o czym świadczy zdecydowana przewaga kobiet dotkniętych tym schorzeniem. Przypuszcza się, że estradiol oraz żeńskie hormony mogą wspólnie powodować zaostrzenie stanu zapalnego, zaś 1. z nich dodatkowo indukuje degranulację komórek tucznych. Warto podkreślić, że DHEA (dehydroepiandrosteron) w badaniach wydaje się wykazywać działanie hamujące względem progresji AZS [28]. Dyskusyjne z kolei pozostaje zagadnienie pochodzenia etnicznego jako predyktora wystąpienia AZS. Artykuł autorstwa Agaty Woldan-Tambor oraz Jolanty B. Zawilskiej z 2009 roku wskazuje, że rasa kaukaska (biała) stanowi czynnik ryzyka tej choroby. Z kolei w pracy z 2018 roku autorzy odwołują się do badania, które wykazało, iż rasa czarna oraz Latynosi są znacznie bardziej obciążeni prawdopodobieństwem choroby w stosunku do rasy białej [28, 34]. Pod koniec lat 80. XX wieku sformułowana została „hipoteza higieny”, która zakłada, że wraz ze zwiększoną ekspozycją na patogeny otoczenia spada ryzyko zachorowania na atopowe zapalenie skóry. Potwierdzeniem danego założenia jest obserwacja, że antybiotykoterapia wiąże się ze wzrostem prawdopodobieństwa zachorowania na AZS. Dodatkowo stosowanie probiotyków może zmniejszyć postęp lub nawet zapobiec AZS [35]. Jak wynika z powyższego, pomimo nie w pełni zrozumiałej patofizjologii w rozwoju atopowego zapalenia skóry, dotychczasowe badania pozwoliły na wyodrębnienie przyczyn i związanych z nimi predyspozycji do wystąpienia tej jednostki chorobowej. Współistnienie genetycznych, immunologicznych oraz środowiskowych czynników sprawczych motywuje do dogłębnego skupienia przyszłych kierunków badań na interakcji wymienionych elementów. Lepsze zrozumienie tematu pozwoli na włączenie wczesnej profilaktyki u osób szczególnie narażonych oraz na eliminację ewentualnych generatorów AZS.

5. Wpływ środowiska na objawy i występowanie choroby

5.1. Uszkodzenie bariery skórnej a AZS

Pacjenci cierpiący na atopowe zapalenie skóry często posiadają uszkodzoną barierę skórą. Umożliwia to liczniejsze przenikanie alergenów i mikroorganizmów, co może doprowadzić do aktywacji immunologicznej stanu zapalnego. W konsekwencji prowadzi to do wystąpienia objawów lub ich zaostrzenia u chorego [36]. Chorzy z AZS posiadający zaburzenia funkcjonowania bariery skórnej cechują się nawet 2-krotnie większym

wzrostem wchłaniania przez skórę substancji drażniących i alergenów w porównaniu z osobami zdrowymi [37]. Na uszkodzenie bariery skórnej wpływa wiele czynników. Najczęściej w pracach naukowych poruszane są jednak powiązania mutacji w genie filagryny z nadwrażliwością na alergeny [38-42]. Obniżona ekspresja filagryny, będącej białkiem strukturalnym bariery skórnej, sprawia, że chorzy są bardziej podatni na liczne czynniki środowiskowe takie jak zmiana klimatu czy też czynniki drażniące i alergeny kontaktowe [42]. Warto też zauważyć, że większość pacjentów z AZS ma defekty skórne przy braku znanych mutacji genetycznych, więc AZS może wystąpić u nich tylko w wyniku ekspozycji na same czynniki środowiskowe. Pozwala to na sformułowanie hipotezy, że nie u każdego pacjenta potrzebna jest mutacja do wystąpienia objawów. Choroba może pojawić się w ciągu życia, sprowokowana wyłącznie działaniem czynnika drażniącego [42].

5.2. Wpływ alergenów na AZS

Jednym z czynników drażniących są alergeny. Wykazano, że najczęstszymi alergenami prowokującymi objawy atopowego zapalenia skóry są roztocza kurzu domowego, sierść zwierząt, pyłki lub środki chemiczne zawarte w produktach do higieny, nawet tych hipoalergicznym [37, 41, 43, 44]. Roztocza kurzu domowego są jednymi z głównych alergenów obwinianych o zaostrzenie objawów AZS. Obecnie zidentyfikowano prawie 30 alergenów roztoczy [43]. W większości miast w domach obecne są koty i psy, co może wywołać u wielu ludzi uczulenie na białka znajdujące się w łupieżu psa i kota. Čelakovská i wsp. stwierdzili, że uporczywe zmiany AZS występowały częściej u pacjentów, którzy zostali uczuleni na sierść zwierząt lub HDM [45]. Ziarna pyłku są aeroalergenami w środowisku zewnętrznym i one również mogą przyczyniać się do zaostrzania objawów AZS [46-48]. Warto wspomnieć również o wcześniej poruszanych powszechnie stosowanych produktach do higieny osobistej. Niektóre z nich, nawet te uważane za hipoalergiczne, zawierały silne alergeny kontaktowe, np. substancje zapachowe, parabeny czy pochodne tokoferolu [37, 41, 43]. Mimo przekonania o bezpieczeństwie ich używania u osób z AZS okazało się, że mogą one powodować swędzenie i zmiany wypryskowe [43]. Ponadto stwierdzono, że pacjenci z AZS, którzy często stosują środki zmiękczające, mają podwyższone poziomy takich alergenów w moczu, co wskazuje, że alergeny te przenikają przez skórę [37].

5.3. Alergie pokarmowe a zaostrzenie AZS

Objawy atopowego zapalenia skóry są również łączone z występowaniem alergii pokarmowych. Silniejszy związek między zaostrzeniem objawów AZS a alergenami pokarmowymi wykryto u mniejszych dzieci. Małe dzieci z AZS mają większą tendencję do uczuleń pokarmowych, np. na jajka, mleko lub orzeszki ziemne, podczas gdy starsze dzieci i dorośli częściej uczulają się na alergeny środowiskowe, takie jak roztocza kurzu domowego, sierść zwierząt lub pyłki [43]. Alergie pokarmowe są często powiązane z AZS ze względu na IgE. Rozpoznawanie alergenów pokarmowych przez komórki prezentujące antygen w skórze z wypryskiem jest ważnym mediatorem uczuleń pokarmowych. Ciężka postać AZS wydaje się być czynnikiem ryzyka towarzyszącego alergiom pokarmowym [38]. Kilka badań miało na celu sprawdzenie częstości pozytywnych testów alergenów pokarmowych u dzieci z AZS. Kecki i wsp. ocenili wyjściową sIgE w surowicy dla 6 pokarmów u niemowląt w wieku od 3 miesięcy do 18 miesięcy

z łagodnym i ciężkim AZS bez wywiadu dotyczącego alergii pokarmowych na początku badania i ponownie po 3 latach [49]. Podczas obserwacji 90% dzieci połknęło testowane alergeny, a 20% doświadczyło natychmiastowych reakcji na 1 lub więcej pokarmów, w tym jajka, orzeszki ziemne i mleko krowie [49]. Co ciekawe, 80% dzieci nie miało ani serologicznych dowodów na alergię, ani klinicznych objawów alergii pokarmowych.

Alergie pokarmowe i AZS są często wyrażane wspólnie, a badania wykazały, że u części pacjentów wykazano związek przyczynowy między pokarmami wywołującymi zmiany skórne [36]. Należy dodać, że wyniki badań nad alergiami pokarmowymi u starszych dzieci i dorosłych były znacznie mniej przekonujące przy mniejszej liczbie badań. Przegląd związku między alergiami pokarmowymi u dorosłych wykazał, że związek przyczynowy między alergenami pokarmowymi a objawami AZS jest rzadki i tylko połowa pacjentów z potwierdzoną prowokacją miała poprawę objawów przy stosowaniu diety eliminującej alergeny pokarmowe z diety. Wprowadzenie diety eliminacyjnej w przypadku AZS mimo braku dokładnych dowodów na korelację alergii pokarmowych z AZS okazuje się jednak przydatne u niektórych pacjentów. Postrzegana poprawa ciężkości choroby skóry wydaje się bez różnicy, przy czym 1 dorosła populacja zgłosiła, że 50% badanych wypróbowało dietę eliminacyjną nabału i większość z tych pacjentów odczuła poprawę lub nawet całkowite ustąpienie choroby skóry [36].

5.4. Zaburzenia w mikrobiomie skóry podczas AZS

U pacjentów z AZS zauważalne są wahania w mikrobiomie skóry. Dochodzi do utraty różnorodności drobnoustrojów i nadmiernej liczebności niektórych gatunków drobnoustrojów [39]. Szczególnie dotyczy to drobnoustrojów z gatunku drożdży *Malassezia* i alergenów bakteryjnych *S. aureus* [40, 50]. Zauważalny jest bardzo silny związek między nasileniem AZS a toksynami wydzielanymi przez gronkowca *S. aureus* [38, 51]. W kilku badaniach wykazano, że zbiorowiska bakteryjne na skórze dzieci i dorosłych z rozpoznaną AZS są mniej zróżnicowane i zdominowane przez zwiększony odsetek *S. aureus* w porównaniu ze zbiorowiskami na zdrowej skórze [52-59]. Około 90% pacjentów z AZS jest skolonizowanych przez *S. aureus*, podczas gdy od 5% do 20% zdrowych osobników jest typowo skolonizowanych [39]. *S. aureus* inicjuje, a także nasila stan zapalny w zmianach chorobowych AZS, ponieważ wytwarza szereg czynników, które są w stanie zmodyfikować odporność gospodarza i upośledzać funkcję bariery w skórze [39]. Działanie prozapalne *S. aureus* jest ważne, ponieważ wzrostowi liczebności *S. aureus* towarzyszyło zwykle zmniejszenie względnej liczebności *Streptococcus Salivarius*, bakterii komensalnej jamy ustnej, jelit i skóry, która wykazuje działanie przeciwzapalne *in vitro* [40]. Warto zauważyć, że proporcjonalna liczebność bakterii *S. aureus* zmniejszała się znacząco w próbce po ustąpieniu ataku objawów skórnych AZS, ale mimo to i tak liczba bakterii była wyższa niż w zdrowych próbkach kontrolnych [40]. Wskazuje to na związek między zwiększoną kolonizacją skóry przez te bakterie a zaostrzeniem objawów skórnych AZS. Dodatkowo na skórze pacjentów cierpiących na AZS zaobserwowano bogatsze i bardziej zróżnicowane zbiorowiska grzybicze niż na skórze osób zdrowych. Zwiększenie liczebności dotyczy grzybów z rodziny *Malassezia*. Mimo że komensalne lipofilne drożdżaki odgrywają główną rolę w homeostazie skóry – *Malassezia*, zwłaszcza *M. globosa* i *M. restricta*, były grzybami dominującymi zarówno w skórze ze zmianami AZS, jak i zdrowej skórze kontrolnej – mogą one również przyczynić się do patogenetycznych mechanizmów AZS [40, 43]. Wskaźnik uczulenia na

Malassezia spp. z udziałem IgE jest bardzo niski lub nawet nie występuje u osób ze zdrową skórą. Z kolei wysoki odsetek pacjentów z AZS wydaje się być uczulony na tego drożdżaka, na co wykazują dodatnie testy skórne nawet u 80% dorosłych pacjentów z AZS [60]. Wcześniejsze badania wykazały, że *Malassezia* spp. wchodzi w interakcje z różnymi typami ludzkiej skóry i komórkami odpornościowymi, a to indukuje prozapalną odpowiedź immunologiczną przez te komórki odpornościowe, co wydaje się przyczyniać do stanu zapalnego podczas flar AZS [60]. Mimo dość prawdopodobnego powiązania ze zwiększoną liczebnością drożdżaków *Malassezia* – literatura dotycząca eukariotycznych społeczności drobnoustrojów skóry w AZS jest ograniczona. Potrzebne są więc dalsze badania nad *S. aureus* i *M. furfur*, aby w pełni zrozumieć związek między drobnoustrojami znajdującymi się na skórze a klinicznymi objawami AZS [40]. Należy również wspomnieć o innych dodatkowych czynnikach, które mogą wywoływać lub zaostrzać zmiany ogniskowe w AZS.

5.5. Wpływ stresu na AZS

Jednym z czynników ryzyka wystąpienia, jak i pogorszenia zaostrzeń w AZS jest stres emocjonalny [43]. Może on nasilać nie tylko swędzenie, ale także stan zapalny poprzez wzmożone uwalnianie mediatorów stanu zapalnego. Wyniki badań u pacjentów z AZS z podwyższonym poziomem lęku wykazują wzrost stężenia IgE i limfocytów Th we krwi, aktywację mastocytów i zmiany profilu wydzielanych cytokin. Ponadto obserwuje się upośledzoną odpowiedź osi podwzgórze-przysadka-nadnercza na stres oraz dysfunkcję bariery naskórkowej [43].

5.6. Hipoteza higieniczna

Choć wywiad rodzinny odgrywa ważną rolę w ocenie podatności na AZS, badania epidemiologiczne dążą również do identyfikacji czynników środowiskowych sprzyjających wystąpieniu egzemy. Znaczny wpływ środowiska na zmiany w obciążeniu chorobą sugerują różnice w częstości jej występowania w obrębie krajów, tj. gradient zachorowań pomiędzy miastem a wsią, a także pomiędzy różnymi krajami.

Wiadomo, że w populacjach o wspólnym pochodzeniu etnicznym i genetycznym ryzyko wystąpienia AZS wyższe jest w miastach niż na wsi [62], co potwierdza systematyczny przegląd 26 badań [63]. Ponadto badania na migrantach wykazały, że ci przejmują ryzyko wystąpienia choroby od społeczności, do której się przenoszą; występowanie AZS jest przy tym częstsze w krajach uprzemysłowionych niż w tych rozwijających się [64, 65].

Warto w tym miejscu odnieść się do tzw. hipotezy higienicznej, z której wynika, iż zmniejszona ekspozycja na antygeny środowiskowe we wczesnym dzieciństwie skutkuje większą podatnością na choroby alergiczne w późniejszych latach [66]. Poparciem tej teorii są następujące obserwacje: u najmłodszego z rodzeństwa ryzyko wystąpienia AZS jest najniższe; u niemowląt uczęszczających do żłobka w 1. roku życia ryzyko AZS jest niższe niż u innych dzieci. Wszystko to wskazuje na etiologię środowiskową rozwoju choroby atopowej.

5.7. pH skóry

Fizjologiczne pH skóry waha się w przedziale od 4 do 6. Tzw. kwaśny płaszcz skóry zawiera m.in. aminokwasy, kwasy tłuszczowe, kwas mlekowy oraz ceramidy – związki kluczowe dla zachowania integralnej bariery skórnej. Kwaśne pH umożliwia syntezę

ceramidów [67] oraz hamuje katalityczną aktywność proteaz skórnych – kalikreiny 5 i 7 [68].

W atopowym zapaleniu skóry jej pH jest podwyższone [69], a to skutkuje zmniejszoną ekspresją inhibitora kalikreiny LEKT 1 i w efekcie nasilonym łuszczeniem skóry atopowej.

Dla zachowania integralności skóry ważna jest także rola korneodesmosomów – struktur łączących korneocyty, zawierających naturalny czynnik nawilżający (NMF, ang. *natural moisturizing factor*). W AZS zmniejsza się ilość prekursora NMF – filagryny, co uruchamia proteazy serynowe, prowadzi do nadmiernego rozpadu korneodesmosomów i zaburza strukturę bariery skórnej [69-71].

Wykazano, że częste kąpiele i stosowanie artykułów higienicznych, takich jak mydła czy detergenty, mogą eliminować NMF i lipidy skórne, a także podnosić pH skóry [72, 73]. Mydła alkaliczne zmniejszają pojemność buforową skóry, zwiększając tym samym ryzyko podrażnień w AZS [68-70, 73-75].

5.8. Twardość wody

Twarda woda ze względu na wysoką zawartość węgla wapnia (CaCO_3) może naruszać integralność bariery skórnej, powodując suchość i stany zapalne. Ponadto istnieje ryzyko wzrostu pH skóry, nasilenia aktywności proteaz naskórka, ostatecznie zaś przyspieszonego rozpadu korneodesmosomów i upośledzenia syntezy blaszek lipidowych [76]. Mycie twardą wodą sprzyja gromadzeniu się złożeń laurylosiarczanu sodu, który zwiększa transepidermalną utratę wody i nasila podrażnienia [77].

5.9. Promieniowanie UV

Ekspozycja na promieniowanie ultrafioletowe zależy zarówno od szerokości geograficznej, jak i stężenia ozonu w stratosferze (pochlania większość promieni UV). Wykazano odwrotny związek między ekspozycją na promieniowanie ultrafioletowe a częstością występowania AZS u dzieci w Stanach Zjednoczonych [78], częstsze występowanie AZS odnotowano w stanach z wyższym stężeniem ozonu [78, 79]. Nasuwa się wniosek, iż promienie UV wywierają działanie ochronne przed powstaniem AZS ze względu na swoje właściwości przeciwzapalne [80]. Mogą także zwiększać stymulację skórnej produkcji witaminy D pełniącej ważną funkcję obronną w rozwoju choroby atopowej [81].

5.10. Zanieczyszczenia powietrza

Życie w mieście wiąże się ze zwiększonym narażeniem na czynniki drażniące. Wiele dotychczasowych badań potwierdziło związek zanieczyszczenia powietrza z częstością występowania AZS. Retrospektywne badanie przeprowadzone w Hubei w Chinach wykazało, że narażenie na zwiększone zanieczyszczenie powietrza w trakcie ciąży, a także w 1. roku życia dziecka wiąże się z wyższym prawdopodobieństwem wystąpienia u niego AZS w późniejszym okresie [82]. W innym badaniu dostrzeżono związek między czasowym wzrostem zanieczyszczenia powietrza pyłem ($\text{PM}_{2,5}$, PM_{10}), dwutlenkiem azotu (NO_2) i dwutlenkiem siarki (SO_2) a częstszymi wizytami ambulatoryjnymi z powodu egzemy bądź zapalenia skóry. Związek ten był szczególnie silny, gdy poziom zanieczyszczeń utrzymywał się przez dłuższy okres [82].

O dwutlenku azotu wiadomo, iż uszkadza barierę skórą, sprzyjając nadmiernej utracie wody u pacjentów z AZS [83]. Ponadto mechanizmy zaostrzania AZS z powodu zanieczyszczonego powietrza obejmują m.in. wnikanie zanieczyszczeń w głąb skóry

poprzez większe pory tudzież mieszki włosowe [84], generowanie wolnych rodników, a także wywoływanie reakcji zapalnych wskutek stymulacji wydzielania cytokin prozapalnych (np. TNF- α , IL-1 α , IL-8) [84].

6. Leczenie

Leczenie atopowego zapalenia skóry jest zgodne z wieloaspektowym i stopniowym podejściem, które dostosowane jest do ciężkości choroby [85, 86]. Przed rozpoczęciem leczenia należy wykluczyć możliwości wystąpienia innych podobnych schorzeń skóry [1]. Istnieje wiele chorób skóry, które swoimi objawami przypominają AZS, co może warunkować pomyłkę lub komplikację przy leczeniu. Należy także pamiętać, że inne choroby skóry mogą współistnieć z AZS. Często w okresie niemowlęcym atopowe zapalenie skóry może być mylone z łojotokowym zapaleniem skóry. Choroby te w tym okresie występują oddzielnie lub jednocześnie. Innym przykładem jest łuszczyca, kontaktowe zapalenie skóry lub świerzb.

6.1. Środki zmiękczające i kąpiele

Po potwierdzeniu diagnozy u każdego pacjenta podstawowym postępowaniem jest codzienny prysznic lub kąpiel, a następnie natychmiastowe zastosowanie środków zmiękczających i nawilżających [87]. Niezbędnym elementem profilaktyki jest stosowanie bezzapachowych emolientów, które pomagają zatrzymać i uzupełnić nawilżenie naskórka, zmniejszyć nasilenie choroby i wydłużyć odstęp między nawrotami. Dbanie o higienę i nawilżanie skóry pomaga również znacznie zmniejszyć zapotrzebowanie pacjentów na leki na receptę podczas leczenia. W dbaniu o skórę pacjentów z AZS najlepiej sprawdzają się emolienty o wysokiej zawartości lipidów (olejów) i niskiej zawartości wody, polecane ze względu na zdolność utrzymania wilgoci w skórze. Największą ilość lipidów mają maści, później kremy i balsamy. Badania nie wykazały, który z tych środków jest najlepszy, a więc wybór należy do indywidualnych potrzeb pacjenta [88]. Emolienty powinny być stosowane raz lub 2 razy dziennie [89]. Istnieją również nowoczesne urządzenia zmiękczające skórę dostępne na receptę [87], nie wykazano jednak różnicy w skuteczności używania leków tradycyjnych (np. emolientów dostępnych bez recepty) i urządzeń dostępnych na receptę [90]. Warto również stosować regularne kąpiele, które pomagają nawilżyć i oczyścić skórę, usuwając łuski, strupki, bakterie, alergeny i substancje drażniące. Zaleca się kąpiel raz dziennie w letniej wodzie, która trwa nie dłużej niż 5-10 minut [87, 90]. Pacjenci powinni używać łagodnych środków myjących, które nie zawierają mydła, barwników ani zapachów. Należy pamiętać, aby w trakcie leczenia unikać czynników drażniących, takich jak alergeny w powietrzu lub pokarmie, a także skrajne upały, zimno lub wilgoć [1].

6.2. Miejscowe kortykosteroidy

Leki te są traktowane jako metoda leczenia pierwszego rzutu w przypadku zaostrzeń atopowego zapalenia skóry [87, 91, 92]. Zmniejszają one zapalną odpowiedź immunologiczną i pozwalają łagodzić zmiany skórne [87]. Rodzaj stosowanego steroidu jest zależny od ciężkości choroby [87, 92]. Sterydy miejscowe należy stosować do 2 razy dziennie, aż zmiany skórne ulegną znacznej poprawie lub będą cieńsze. Czas trwania terapii zależny jest od poprawy klinicznej, ale zwykle trwa 2 tygodnie lub krócej. Aby zminimalizować działania niepożądane, należy stosować miejscowo steryd o najniższej możliwej sile przez możliwie najkrótszy okres, ale w dalszym ciągu utrzymywać przy tym dobrą kontrolę

objawów. Badania sugerują stosowanie proaktywnego podejścia do zmniejszania zaostrzeń poprzez stosowanie miejscowych sterydów raz lub 2 razy w tygodniu na określone obszary skóry, które były wielokrotnie dotknięte chorobą [93]. Ze względu na potencjalne działania niepożądane (głównie atrofię skóry) w leczeniu AZS, które obejmuje szyję, głowę, pachwiny i zgięcia w łokciach i kolanach, zaleca się stosowanie miejscowych sterydów o małej sile działania. Sterydy o większej sile działania zalecane są do ciężkich zaostrzeń w celu uzyskania szybkiej kontroli objawów. Maksymalny czas stosowania mocnych sterydów wynosi u pacjenta 2 tygodnie [94, 95]. Pomimo dobrego profilu bezpieczeństwa sterydów miejscowych dalej istnieją możliwe działania niepożądane związane z ich stosowaniem. Obejmują one zanik skóry i przebarwienia, plamicę, teleangiektazje, rozstępy, hipopigmentację i wykwity trądzikopodobne [87].

6.3. Miejscowe inhibitory kalcyneuryny

Inhibitory kalcyneuryny to stosunkowo nowa grupa leków o właściwościach immunomodulujących i przeciwzapalnych. Należą do nich takrolimus – produkowany przez grzyby z rodzaju *Streptomyces tsucabaenisi* i pimekrolimus – wytwarzany przez fermentację produktów *Streptomyces hygroscopicus*. Stosuje się je w leczeniu pacjentów w wieku od 2 lat i starszych [93]. Chociaż tradycyjnie są stosowane jako leczenie 2. rzutu w umiarkowanym lub ciężkim atopowym zapaleniu skóry, mogą być stosowane jako leczenie 1. rzutu w połączeniu ze steroidami miejscowymi, szczególnie u pacjentów z fobią sterydową czy zmianami na twarzy lub zgięciach łokci bądź kolan [85, 93, 96]. Miejscowe inhibitory kalcyneuryny są zalecane jako leki do krótko- lub długotrwałego stosowania, a także do leczenia podtrzymującego [96]. Pimekrolimus jest zalecany w przypadku łagodnego do umiarkowanego atopowego zapalenia skóry. Takrolimus jest wskazany w przypadku umiarkowanej do ciężkiej choroby. Takrolimus jest skuteczniejszy niż pimekrolimus, oba jednak zmniejszają stan zapalny i świąd. Leczenie podtrzymujące tym rodzajem leków polega na stosowaniu takrolimusu 2 razy w tygodniu na obszarach podatnych na zaostrzenie. Zmniejsza to częstość wykwitów skórnych, odsetek dni leczenia, a także wydłuża czas między kolejnymi zaostrzeniami [96]. Miejscowe inhibitory kalcyneuryny, w przeciwieństwie do sterydów miejscowych, nie powodują atrofii skóry i można je bezpiecznie stosować na cieńszych obszarach skóry.

6.4. Fototerapia ultrafioletowa i układowe immunomodulatory

Fototerapia wąskopasmowym promieniowaniem ultrafioletowym B jest skuteczną metodą leczenia 2. rzutu w przypadku atopowego zapalenia skóry o nasileniu od umiarkowanego do ciężkiego [92]. Fototerapia zmniejsza stan zapalny skóry przy minimalnych działaniach niepożądanych. Krótkie cykle promieniowania ultrafioletowego samodzielnie lub z uzupełnieniem o dodatkowe leczenie mogą być bezpiecznie stosowane w przypadku zaostrzeń [92, 96]. Układowe immunomodulatory stanowią opcję w przypadku, gdy tradycyjne leczenie jest nieskuteczne. Do leków tego typu należy cyklosporyna (Sandimmune) i azatiopryna (Imuran) [92].

6.5. Antybiotyki

Podczas atopowego zapalenia skóry u pacjentów często występują zaburzenia mikrobiomu skóry spowodowane uszkodzeniem naskórka. Pojawia się wtedy zwiększona skłonność do infekcji skórnych. Randomizowane badanie kontrolne (RCT, ang. *randomized controlled trial*) oceniające wpływ stosowania donosowej mupirocyny (Bactroban)

w połączeniu z kąpielami wybielającymi wykazało poprawę w odniesieniu do ciężkości choroby w ciągu 3 miesięcy [96]. Nie ma dowodów wysokiej jakości przemawiających za profilaktycznym stosowaniem antybiotyków doustnych. Powinny zatem być stosowane wyłącznie do leczenia wtórnych infekcji bakteryjnych [92].

6.6. Leki przeciwhistaminowe

Doustne leki przeciwhistaminowe nie są rutynowo stosowane w leczeniu atopowego zapalenia skóry, ponieważ nie ma dowodów, że przyczyniają się do zmniejszenia świądu podczas zaostrzeń choroby. Pacjentom z poważnymi zaburzeniami snu spowodowanymi świądem można zaproponować krótkotrwale, przerywane podawanie doustnego leku przeciwhistaminowego takiego jak difenhydramina (Benadryl) lub hydroksyzyna. Miejscowe leki przeciwhistaminowe nie są zalecane ze względu na ryzyko kontaktowego zapalenia skóry [87].

6.7. Nowe możliwości leczenia

Crisaborole (Eucrisa) jest miejscowym bezsterydowym inhibitorem fosfodiesterazy 4, który został zatwierdzony przez FDA w 2016 roku do leczenia łagodnego i umiarkowanego atopowego zapalenia skóry u pacjentów w wieku 2 lat oraz starszych. Przegląd systematyczny i metaanaliza z 2019 roku wykazały, że stosowanie crisaborolu 2 razy dziennie usuwa zmiany chorobowe szybciej niż dotychczasowe metody leczenia [97]. Kolejnym nowoczesnym lekiem w leczeniu AZS jest dupilumab. Jest to przeciwciało monoklonalne do wstrzykiwań, które zostało zatwierdzone przez FDA w 2017 roku do leczenia od umiarkowanego do ciężkiego atopowego zapalenia skóry u pacjentów w wieku 12 lat i starszych, którzy mieli niewystarczającą odpowiedź lub nie tolerowali standardowego leczenia [96]. Identyczne 2 randomizowane, kontrolowane placebo badania 3. fazy wykazały, że dupilumab działa skuteczniej w sytuacji ustępowania zmian, świądu, jakości snu i jakości życia w porównaniu z placebo [98]. W grudniu 2021 dupilumab pojawił się na liście leków refundowanych. Crisaborole natomiast jest obecnie bardzo drogim lekiem, więc nie jest on rutynowo stosowany przez pacjentów. Najważniejszym aspektem leczenia jest jednak przestrzeganie planu leczenia i rad lekarza prowadzącego. Słabe przestrzeganie zaleceń wiąże się ze złożonymi schematami leczenia, obciążeniem finansowym i zaostrzeniem choroby. Plany postępowania w przypadku atopowego zapalenia skóry, edukacja pacjentów i częste wizyty kontrolne poprawiają przestrzeganie zaleceń terapeutycznych [1, 98].

7. Podsumowanie

W przedstawionej pracy pochyłono się nad zagadnieniem atopowego zapalenia skóry, zwracając szczególną uwagę na epidemiologię, patofizjologię, objawy oraz leczenie tej jednostki chorobowej. Motywacją do podjęcia rozważań na ten temat była zauważalna w ostatnich latach tendencja wzrostowa zapadalności na AZS, a także wynikające z niej straty dotyczące jakości życia oraz kwestii finansowych osób dotkniętych schorzeniem. Atopowe zapalenie skóry jest ogólnoustrojową, przewlekłą, genetycznie uwarunkowaną dermatozą zapalną wieku dziecięcego. Według danych statystycznych dotyka ono od około 15% do 20% dzieci oraz od 1% do 3% osób dorosłych. Objawy ustępują z reguły przed okresem dojrzewania, a główną manifestacją schorzenia jest uporczywy i nieustający, a jednocześnie utrudniający codzienne funkcjonowanie, świąd skóry. Warto nadmienić, że do głównych kryteriów rozpoznania choroby należą także: typowa loka-

lizacja (zgięcia kolanowe i łokciowe), przebieg przewlekły i nawrotowy oraz dodatni wywiad w kierunku rodzinnej atopii. Z analizy dostępnych badań wynika, że istnieje szereg czynników predysponujących do rozwoju AZS, z których na 1. plan wysuwa się czynnik genetyczny. Ponadto sugeruje się, że bodziec środowiskowy (alergeny pokarmowe, roztocza, sierść zwierząt, pyłki, promieniowanie UV, twardość wody, zanieczyszczenia powietrza) także nie pozostaje bez wpływu na wzrost ryzyka wystąpienia atopowego zapalenia skóry. U pacjentów zauważalne są wahania w mikrobiomie skóry polegające na utracie różnorodności drobnoustrojów oraz nadmiernej liczebności niektórych gatunków drożdży. Co więcej, istnieją dane wskazujące na występowanie korelacji pomiędzy czynnikiem stresogennym a początkiem zaostrzeń atopowego zapalenia skóry. W pracy omówiono także wieloaspektowe i stopniowe podejście do leczenia AZS, w zależności od ciężkości objawów. Podstawą terapii są środki zmiękczające i kąpiele, bezzapachowe emolienty, miejscowe kortykosteroidy oraz inhibitory kalcyneuryny. U osób ze znacznym nasileniem świądu wspomagająco można zastosować leki przeciwhistaminowe. Drugim rzutem w leczeniu może być fototerapia UVB oraz zastosowanie inhibitorów fosfodiesterazy 4, zaś od 2017 roku zatwierdzony przez FDA został najnowszy lek – monoklonalne przeciwciało – dupilumab, przeznaczony do terapii umiarkowanego oraz ciężkiego przebiegu schorzenia. Podsumowując, atopowe zapalenie skóry to dermatoza zapalna najczęściej rozpoczynająca się we wczesnym dzieciństwie, o złożonej etiologii i uporczywych dla pacjentów objawach, zaś rozwój badań nad nowymi możliwościami w terapii chorych stwarza perspektywę na poprawę jakości ich życia.

Literatura

1. Avena-Woods C., *Overview of atopic dermatitis*, The American Journal of Managed Care, 2017, s. 115-123.
2. Nutten S., *Atopic dermatitis. Global epidemiology and risk factors*, Nutrition & Metabolism, 66, 2015, s. 8-16.
3. Jabłońska S., Majewski S., *Choroby skóry i choroby przenoszone drogą płciową*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2015.
4. Wallach D., Taëb A., *Atopic dermatitis / atopie eczema*, Chem Immunol Allergy, 100, 2014, s. 81-96.
5. Wise F., Sulzberger M., 1933. *Year Book of Dermatology and Syphilology*, Year Book Medical, Chicago 1933, s. 38-39.
6. Eichenfield L.F., Tom W.L., Chamlin S.L., *Guidelines of care for the management of atopic dermatitis. Part 1: Diagnosis and assessment of atopic dermatiti*, The Journal of the American Academy of Dermatology, 70, 2014, s. 338-351.
7. Odhiambo J.A., Williams H.C., Clayton T.O., *Global variations in prevalence of eczema symptoms in children from ISAAC Phase Three*, J Allergy Clin Immunol, 124, 2009, s. 1251-1258.
8. Ellis C.N., Mancini A.J., Paller A.S., Simpson E.L., Eichenfield L.F., *Understanding and managing atopic dermatitis in adult patients*, Semin Cutan Med Surg, 31, 2012, s. 18-22.
9. Hanifin J.M., Reed M.L., Eczema Prevalence and Impact Working Group, *A population-based survey of eczema prevalence in the United States*, Dermatitis, 18, 2008, s. 82-91.
10. Shaw T.E., Currie G.P., Koudelka C.W., Simpson E.L., *Eczema prevalence in the United States. Data from the 2003 National Survey of Children's Health*, The Journal of Investigative Dermatology, 131, 2011, s. 67-73.
11. Silverberg J.I., Garg N.K., Paller A.S., Fishbein A.B., Zee P.C., *Sleep disturbances in adults with eczema are associated with impaired overall health. A US population-based study*, The Journal of Investigative Dermatology, 135, 2015, s. 56-66.

12. Garg N.K., Silverberg J.I., *Eczema is associated with osteoporosis and fractures in adults. A US population-based study*, The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 135, 2015, s. 1085-1087.
13. Mallol J., Crane J., von Mutius E., Odhiambo J., Keil U., Stewart A., *ISAAC Phase Three Study Group, The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase Three: a global synthesis*, *Allergologia et Immunopathologia*, 41, 2013, s. 73-85.
14. Williams H., Stewart A., von Mutius E., Cookson W., Anderson H.R., *International Study of Asthma and Allergies In Childhood (ISAAC) Phase One and Three Study Groups, Is eczema really on the increase world wide?* The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 121, 2008, s. 947-954.
15. Jahnz-Różyk K., Narbutt J., Owczarek W., *Atopowe zapalenie skóry – raport*, 2021, s. 1-73.
16. Kupryś-Lipińska I., Elgalal A., Kuna P., *Epidemiologia atopowego zapalenia skóry w populacji ogólnej mieszkańców województwa łódzkiego*, *Pneumonologia i Alergologia Polska*, 77, 2009, s. 145-151.
17. Sybilski A.J., Raciborski F., Lipiec A., Tomaszewska A., Lusawa A., Samel-Kowal P., Wakiewicz A., Krzych-Fałta E., Samoliński B., *Epidemiology of atopic dermatitis in Poland according to the Epidemiology of Allergic Disorders in Poland (ECAP) study*, *The International Journal of Dermatology*, 42, 2015, s. 140-147.
18. Liebhart J., Dobek R., Małolepszy J., *The prevalence of allergic diseases in Poland – the results of the PMSEAD study in relation to gender differences*, *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 23, 2014, s. 757-762.
19. Jaworek A., Wojas-Pelc A., *Clinical phenotypes of atopic dermatitis*, *Przegląd Dermatologiczny (Dermatology Review)*, 105, 2018, s. 273-284.
20. Gendek-Kubiak H., *Etiologia, patogenеза i terapia atopowego zapalenia skóry w świetle nowych danych piśmiennictwa*, *Polski Tygodnik Lekarski*, 36, 1981.
21. Leung D.Y., Boguniewicz M., Howell M.D., Nomura I., Hamid Q.A., *New insights into atopic dermatitis*, *The Journal of Clinical Investigation*, 113, 2004, s. 651-657.
22. Woldan-Tambor A., Zawilska J.B., *Atopowe zapalenie skóry (AZS) – problem XXI wieku*, *Farmacja Polska*, 65, 2009, s. 804-806.
23. Schultz Larsen F., Hanifin J.M., *Epidemiology of atopic dermatitis*, *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 22, 2002, s.1-24.
24. Nowicki R., *Rozpoznawanie AZS*, 9. Akademia Dermatologii i Alergologii, Słupsk–Ustka 7-10.02.2013, Wydawnictwo Bernardinum, Pelplin 2013, s. 35-36.
25. Spergel J.M., Paller A.S., *Atopic dermatitis and the atopic march*, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112, 2003, s. 118-127.
26. Kamińska B., Plata-Nazar K., *Atopic dermatitis in children and the ALERNI programme*, *Forum Medycyny Rodzinnej*, 3, 2009, s. 367-371.
27. Frimat P., Boughattas W., Even D., *Atopic dermatitis: professional orientation*, *The European Journal of Dermatology*, 25, 2015, s. 3-6.
28. Sacotte R., Silverberg J.I., *Epidemiology of adult atopic dermatitis*, *Clinics in Dermatology*, 36, 2018, s. 595-605.
29. Mastroiilli C., Caffarelli C., Hoffmann-Sommergruber K., *Food allergy and atopic dermatitis: Prediction, progression, and prevention*, *Pediatric Allergy and Immunology*, 28, 2017, s. 831-840.
30. Bonamonte D., Filoni A., Vestita M., Romita P., Foti C., Angelini G., *The role of the environmental risk factors in the pathogenesis and clinical outcome of atopic dermatitis*, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2450605, 2019.
31. Wang I.J., Karmaus W.J., *The effect of phthalate exposure and filaggrin gene variants on atopic dermatitis*, *Environmental Research*, 136, 2015, s. 213-218.
32. Park H., Kim K., *Association of blood mercury concentrations with atopic dermatitis in adults: a population-based study in Korea*, *Environmental Research*, 111, 2011, s. 573-578.

33. Thürmann L., Herberth G., Seiwert B., *Prenatal paraben exposure and atopic dermatitis-related outcomes among children*, European Journal of Allergy and Clinical Immunology, 76, 2012, s. 3122-3132.
34. Woldan-Tambor A., Zawilska J.B., *Atopowe zapalenie skóry (AZS) – problem XXI wieku*, Farmacja Polska, 65, 2009, s. 807-811.
35. Flohr C., Pascoe D., Williams H.C., *Atopic dermatitis and the „hygiene hypothesis”: too clean to be true*, British Journal of Dermatology, 152, 2005, s.202-216.
36. Robison R.G., Singh A.M., *Controversies in allergy: food testing and dietary avoidance in atopic dermatitis*, Allergy, Asthma & Clinical Immunology, 7, 2019, s. 35-39.
37. Owen J.L., Vakharia P.P., Silverberg J.I., *The role and diagnosis of allergic contact dermatitis in patients with atopic dermatitis*, American Journal of Clinical Dermatology, 19, 2018, s. 293-302.
38. Amat F., Soria A., Tallon P., *New insights into the phenotypes of atopic dermatitis linked with allergies and asthma in children: An overview*, Clinical & Experimental Allergy, 48, 2018, s. 919-934.
39. Gonzalez T., Biagini Myers J.M., Herr A.B., Khurana Hershey G.K., *Staphylococcal biofilms in atopic dermatitis*, Current Allergy and Asthma Reports, 17, 2017, s. 81.
40. Edslev S.M., Agner T., Andersen P.S., *Skin microbiome in atopic dermatitis*, Acta Dermato-Venereologica, 100, 2021, s. 358-366.
41. Kantor R., Silverberg J.I., *Environmental risk factors and their role in the management of atopic dermatitis*, Expert Review of Clinical Immunology, 13, 2017, s. 15-26.
42. Ahn K., *The role of air pollutants in atopic dermatitis*, Allergy, Asthma & Clinical Immunology, 134, 2014, s. 993-1000.
43. Tamagawa-Mineoka R., Katoh N., *Atopic Dermatitis: Identification and Management of Complicating Factors*, International Journal of Molecular Sciences, 21, 2020, s. 2671.
44. Han H., Roan F., Ziegler S.F., *The atopic march: current insights into skin barrier dysfunction and epithelial cell-derived cytokines*, Immunological Reviews, 278, 2017, s. 116-130.
45. Souwer Y., Szegedi K., Kapsenberg M.L., de Jong E.C., *IL-17 and IL-22 in atopic allergic disease*, Current Opinion in Immunology, 22, 2010, s. 821-826.
46. Ciprandi G., De Amici M., Giunta V., Marseglia A., Marseglia G., *Serum interleukin-9 levels are associated with clinical severity in children with atopic dermatitis*, Pediatric Dermatology, 30, 2013, s. 222-225.
47. Werfel T., Allam J.P., Biedermann T., *Cellular and molecular immunologic mechanisms in patients with atopic dermatiti*, Allergy, Asthma & Clinical Immunology, 138, 2016, s. 336-349.
48. Ma L., Xue H.B., Guan X.H., Shu C.M., Zhang J.H., Yu J., *Possible pathogenic role of T helper type 9 cells and interleukin (IL)-9 in atopic dermatitis*, Clinical & Experimental Immunology, 175, 2014, s. 25-31.
49. Keck L.E., Simpson E.L., Berry T.M., Hanifin J.M., *Is food allergy testing reliable in pediatric atopic dermatitis? A population-based study*, Chemical Immunology and Allergy, 96, 2012, s. 108-112.
50. Campana R., Dzoro S., Mittermann I., *Molecular aspects of allergens in atopic dermatitis*, Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology, 17, 2017, s. 269-277.
51. Yang G., Seok J.K., Kang H.C., Cho Y.Y., Lee H.S., Lee J., *Skin Barrier Abnormalities and Immune Dysfunction in Atopic Dermatitis*, International Journal of Molecular Sciences, 21, 2020, s. 2867.
52. Kong H.H., Oh J., Deming C., *Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis*, Genome Research, 22, 2012, s. 850-859.
53. Clausen M.L., Agner T., Lilje B., Edslev S.M., Johannesen T.B., Andersen P.S., *Association*, JAMA Dermatology, 154, 2018, s. 293-300.

54. Brandwein M., Fuks G., Israel A., *Skin microbiome compositional changes in atopic dermatitis accompany Dead Sea climatotherapy*, Photochemistry and Photobiology, 95, 2019, s. 1446-1453.
55. Li W., Xu X., Wen H., *Inverse association between the skin and oral microbiota in atopic dermatitis*, Journal of Investigative Dermatology, 139, 2019, s. 1779-1787.
56. Byrd A.L., Deming C., Cassidy S.K.B., *Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis strain diversity underlying pediatric atopic dermatitis*, Science Translational Medicine, 9, 2017, s. 397.
57. Callewaert C., Nakatsuji T., Knight R., *IL-4Ra blockade by Dupilumab decreases Staphylococcus aureus colonization and increases microbial diversity in atopic dermatitis*, Journal of Investigative Dermatology, 140, 2020, s. 191-202.
58. Shi B., Bangayan N.J., Curd E., *The skin microbiome is different in pediatric versus adult atopic dermatitis*, The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 138, 2016, s. 1233-1236.
59. Zheng Y., Wang Q., Ma L., *Alterations in the skin microbiome are associated with disease severity and treatment in the perioral zone of the skin of infants with atopic dermatitis*, European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 38, 2019, s. 1677-1685.
60. Glatz M., Bosshard P., Schmid-Grendelmeier P., *The role of fungi in atopic dermatitis*, Immunology and Allergy Clinics of North America, 37, 2017, s. 63-74.
61. Hashiramoto A., Yamane T., Tsumiyama K., *Mammalian clock gene Cryptochrome regulates arthritis via proinflammatory cytokine TNF-alpha*, Journal of Immunology, 184, 2010, s. 1560-1565.
62. Hugg T., Ruotsalainen R., Jaakkola M.S., Pushkarev V., Jaakkola J.J., *Comparison of allergic diseases, symptoms and respiratory infections between Finnish and Russian school children*, European Journal of Epidemiology, 23, 2008, s. 123-133.
63. Schram M.E., Tedja A.M., Spijker R., Bos J.D., Williams H.C., Spuls P.I., *Is there a rural/urban gradient in the prevalence of eczema? A systematic review*, British Journal of Dermatology, 162, 2010, s. 964-973.
64. Hjern A., Haglund B., Hedlin G., *Ethnicity, childhood environment and atopic disorder*, Clinical & Experimental Allergy, 30, 2000, s. 521-528.
65. Odhiambo J.A., Williams H.C., Clayton T.O., Robertson C.F., Asher M.I., *ISAAC Phase Three Study Group. Global variations in prevalence of eczema symptoms in children from ISAAC Phase Three*, The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 124, 2009, s. 1251.
66. Flohr C., Yeo L., *Atopic dermatitis and the hygiene hypothesis revisited*, Current Problems in Dermatology, 41, 2011, s. 1-34.
67. Rawlings A.V., *Recent advances in skin „barrier” research*, Journal of Pharmacy and Pharmacology, 62, 2010, s. 671-677.
68. Kubo A., Nagao K., Amagai M., *Epidermal barrier dysfunction and cutaneous sensitization in atopic diseases*, Journal of Clinical Investigation, 122, 2012, s. 440-447.
69. Cork M.J., Danby S.G., Vasilopoulos Y., *Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis*, Journal of Investigative Dermatology, 129, 2009, s. 1892-1908.
70. Bandier J., Johansen J.D., Petersen L.J., Carlsen B.C., *Skin pH, atopic dermatitis, and filaggrin mutations*, Dermatitis, 25, 2014, s. 127-129.
71. Ali S.M., Yosipovitch G., *Skin pH: from basic science to basic skin care*, Acta Dermatovenereologica, 93, 2013, s. 261-267.
72. Leung D.Y., *New insights into atopic dermatitis: role of skin barrier and immune dysregulation*, Allergology International, 62, 2013, s. 151-161.
73. Walters R.M., Mao G., Gunn E.T., Hornby S., *Cleansing formulations that respect skin barrier integrity*, Dermatology Research and Practice, 3, 2012, s. 495917.
74. Lynde C.W., Andriessen A., *A cohort study on a ceramide-containing cleanser and moisturizer used for atopic dermatitis*, Cutis, 93(4), 2014, s. 207-213.

75. Kircik L.H., *Clinical insights about the role of skin pH in inflammatory dermatological conditions. Introduction*, Journal of Drugs in Dermatology, 18, 2019, s. 212.
76. Perkin M.R., Craven J., Logan K., *Association between domestic water hardness, chlorine, and atopic dermatitis risk in early life: A population-based cross-sectional study*, J Allergy Clin Immunol, 138(2), 2016, s. 509-516.
77. Danby S.G., Brown K., Wigley A.M., *The effect of water hardness on surfactant deposition after washing and subsequent skin irritation in atopic dermatitis patients and healthy control subjects*, Journal of Investigative Dermatology, 138, 2018, s. 68-77.
78. Silverberg J.L., Hanifin J., Simpson EL., *Climatic factors are associated with childhood eczema prevalence in the United States*, Journal of Investigative Dermatology, 133, 2013, s. 1752-1759.
79. Solé D., Camelo-Nunes I.C., Wandalsen G.F., *Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and atopic eczema in Brazilian adolescents related to exposure to gaseous air pollutants and socioeconomic status*, Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology, 17, 2007, s. 6-13.
80. Norval M., Halliday G.M., *The consequences of UV-induced immunosuppression for human health*, Photochemistry and Photobiology, 87, 2011, s. 965-977.
81. Frieri M., Valluri A., *Vitamin D deficiency as a risk factor for allergic disorders and immune mechanisms*, Allergy and Asthma Proceedings, 32, 2011, s. 438-444.
82. Deng S., Huang D., Wang W., Yan H., Li S., Xiang H., *Associations of gestational and the first year of life exposure to ambient air pollution with childhood eczema in Hubei, China*, Environmental Science and Pollution Research, 26, 2019, s. 23842-23849.
83. Eberlein-König B., Przybilla B., Kühnl P., *Influence of airborne nitrogen dioxide or formaldehyde on parameters of skin function and cellular activation in patients with atopic eczema and control subjects*, The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 101, 1998, s. 141-143.
84. Kim K.E., Cho D., Park H.J., *Air pollution and skin diseases: Adverse effects of airborne particulate matter on various skin diseases*, Life Sciences, 152, 2016, s.126-134.
85. Eichenfield L.F., Tom W.L., Berger T.G., *Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: section 2. Management and treatment of atopic dermatitis with topical therapies*, Journal of the American Academy of Dermatology, 71, 2014, s. 116-132.
86. Boguniewicz M., Fonacier L., Guttman-Yassky E., Ong P.Y., Silverberg J., Farrar J.R., *Atopic dermatitis yardstick: Practical recommendations for an evolving therapeutic landscape*, Allergy, Asthma & Clinical Immunology, 120, 2018, s. 10-22.
87. Hon K.L., Kung J.S.C., Ng W.G.G., Leung T.F., *Emollient treatment of atopic dermatitis: latest evidence and clinical considerations*, Drugs in Context, 7, 2018.
88. Hon K.L., Ching G.K., Leung T.F., Choi C.Y., Lee K.K., Ng P.C., *Estimating emollient usage in patients with eczema*, Clinical and Experimental Dermatology, 35, 2010, s. 22-26.
89. Draelos Z.D., *An evaluation of prescription device moisturizers*, Journal of Cosmetic Dermatology, 8, 2009, s. 40-43.
90. Sidbury R., Tom W.L., Bergman J.N., *Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: section 4. Prevention of disease flares and use of adjunctive therapies and approaches*, Journal of the American Academy of Dermatology, 71, 2014, s. 1218-1233.
91. Sidbury R., Davis D.M., Cohen D.E., *Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: section 3. Management and treatment with phototherapy and systemic agents*, Journal of the American Academy of Dermatology, 71, 2014, s. 327-349.
92. Schmitt J., von Kobyletzki L., Svensson A., Apfelbacher C., *Efficacy and tolerability of proactive treatment with topical corticosteroids and calcineurin inhibitors for atopic eczema: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials*, British Journal of Dermatology, 164, 2011, s. 415-428.

93. Walling H.W., Swick B.L., *Update on the management of chronic eczema: new approaches and emerging treatment options*, Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology, 3, 2010, s. 99-117.
94. Hebert A.A., *Desonide Foam Phase III Clinical Study Group. Desonide foam 0.05%: safety in children as young as 3 months*, Journal of the American Academy of Dermatology, 59, 2008, s. 334-340.
95. Frazier W., Bhardwaj N., *Atopic Dermatitis: Diagnosis and Treatment*, American Family Physician, 101, 2020, s. 590-598.
96. Yang H., Wang J., Zhang X., *Application of Topical Phosphodiesterase 4 Inhibitors in Mild to Moderate Atopic Dermatitis: A Systematic Review and Meta-analysis*, JAMA Dermatology, 155, 2019, s. 585-593.
97. Ariëns L.F.M., Bakker D.S., van der Schaft J., Garritsen F.M., Thijs J.L., de Bruin-Weller M.S., *Dupilumab in atopic dermatitis: rationale, latest evidence and place in therapy*, Therapeutic Advances in Chronic Disease, 9, 2018, s. 159-170.

Atopowe zapalenie skóry jako dermatoza wieku dziecięcego – czynniki ryzyka, objawy oraz przebieg schorzenia

Streszczenie

Atopowe zapalenie skóry (AZS) jest chorobą znaną od czasów starożytnych, jednak naukowego opisu doznało się dopiero w 1933 roku. Współcześnie choroba ta, mająca udowodnione już podłoże immunologiczne, dotyczy nawet kilkunastu procent ogółu populacji, głównie dzieci w pierwszych latach życia. Podstawowymi objawami AZS są uporczywy świąd i zmiany skórne, jednak choroba może wiązać się również z innymi oznakami atopii – dolegliwościami ze strony układu pokarmowego czy oddechowego. W niniejszej pracy przedstawiono epidemiologię AZS na świecie i w Polsce, patogenezę choroby, jej objawy oraz aktualnie dostępne ścieżki terapeutyczne.

Słowa kluczowe: atopia, hipoteza higieniczna, alergen, fototerapia, leki przeciwhistaminowe, mikrobiom skóry

Atopic dermatitis as a childhood dermatosis – risk factors, symptoms and course of the disease

Abstract

Atopic dermatitis (AD) is a disease known since ancient times, but it was not scientifically described until 1933. Nowadays, the disease, which already has a proven immunological basis, affects up to a dozen percent of the general population, mainly children in the first years of life.

The main symptoms of AD are persistent itching and skin lesions, but the disease can also be associated with other signs of atopy - gastrointestinal or respiratory complaints.

This paper presents the epidemiology of AD worldwide and in Poland, the pathogenesis of the disease, its symptoms and currently available therapeutic pathways.

Keywords: atopy, hygiene hypothesis, allergens, phototherapy, antihistamines, skin microbiome

Ultradźwięki – historia, działanie i zastosowanie w praktyce dermatologicznej

1. Wprowadzenie

Ultradźwięki to fale dźwiękowe o wysokiej częstotliwości (powyżej 20 kHz), które są niesłyszalne dla ludzkiego ucha. Ultradźwięki zostały odkryte w 1794 roku przez zoologa z Włoch – Lazzaro Spallanzaniego, który zorientował się, że nietoperze wykorzystują dźwięk o wysokiej częstotliwości do echolokacji [1-4]. Prawie 100 lat później bracia Jacques i Pierre Curie zidentyfikowali efekt piezoelektryczny związany z mechanicznym odkształceniem kryształu wywołanym przez zewnętrzne pole elektryczne, zaś 50 lat później amerykańscy wojskowi (SONAR) i Karl Dussik (austriacko-amerykański neurolog) zaadaptowali tę technologię do wykrywania guzów mózgu u pacjentów [5-8]. W dermatologii pionierskie zastosowanie ultradźwięków zostało dokonane w 1979 roku przez Alexandra i Millera, którzy wykorzystali sondę o częstotliwości 15 MHz do pomiaru grubości skóry [5, 8-10]. Pierwszy sonogram do pomiaru skóry został jednak stworzony w latach 80. XX wieku przez zespół badawczy pod kierownictwem Yano. Ich urządzenie było wyposażone w sondę o częstotliwości 40 MHz [11].

W dermatologii sonografia skóry jest jedną z najstarszych technik wizualizacyjnych, która ze względu na fakt, że jest szybka i dość tania, cieszy się również coraz większą popularnością wśród pacjentów [9, 12, 13]. Innymi powodami jej popularności jest nieinwazyjność oraz bezbolesność. [9, 14, 15]. Pozostałe zalety sonografii skóry związane są z wykorzystaniem mediów niejonizujących oraz brakiem przeciwwskazań do jej wykonania [12, 16].

Obecnie wykorzystanie ultrasonografii do pomiarów skóry staje się coraz bardziej popularne wśród dermatologów, zwłaszcza w dziedzinie onkologii [17]. W artykułach nie ma jednak zbyt wielu odniesień dotyczących zastosowania sonografii skóry.

2. Ultradźwięki – przegląd

2.1. Jak to działa? Podstawowe zasady działania ultradźwięków

Ultrasonograf składa się z sondy ultradźwiękowej z przetwornikiem oraz monitora do wyświetlania obrazu [18]. Przetwornik jest główną częścią sondy sonografu. Zawiera on tysiące kryształów piezoelektrycznych, które są pobudzane zmiennym polem elektrycznym. W wyniku tej stymulacji kryształy tworzą miliony fal akustycznych, które przechodzą przez tkanki i są odbijane do przetwornika sondy. Gdy fale wracają do przetwornika, są przekształcane w energię elektryczną, która jest interpretowana przez komputer

¹ podgorska.kosmetolog@gmail.com, Zakład Medycyny Estetycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, www.umb.edu.pl.

² niczy.ma@gmail.com, Zakład Medycyny Estetycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, www.umb.edu.pl.

³ marta.wacewicz-muczynska@umb.edu.pl, Zakład Kosmetologii Specjalistycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, www.umb.edu.pl.

i wyświetlana jako obraz na monitorze [5, 13, 19, 20]. Wyniki takiego skanowania mogą być przedstawiane poprzez zastosowanie 2 rodzajów prezentacji: typu A lub B. Prezentacje typu A są starsze i analizują amplitudę echa fali dźwiękowej, która następnie jest przedstawiana w funkcji czasu. Ten rodzaj prezentacji wykorzystywany jest do pomiaru głębokości skóry *in vivo* [21]. Prezentacje typu B są stosowane dużo częściej i powszechnie wykorzystywane w dermatologii. Umożliwiają one prezentację zadanych punktów w postaci dwuwymiarowego obrazu. Fale dźwiękowe (czyli echo), które wracają do przetwornika są zamieniane na punkty. Ich rozrzut pokrywa się z echem u jego podstawy, natomiast jasność odpowiada ilości energii, która została odebrana. Tak więc im więcej fal jest odbijanych, tym jaśniejszy jest obszar. Wyniki uzyskuje się poprzez przedstawienie kwantu powracającej energii w funkcji czasu i nałożenie go na skalę kolorów (skala szarości), która mieści się w zakresie od 0 do 255 [12]. Pozwala to na analizę ich echogeniczności [21]. Intensywność jasności zależy od zdolności fal ultradźwiękowych do przechodzenia przez tkankę, więc obszary jasne, czyli hiperechogeniczne, świadczą o nagłym wzroście gęstości tkanki, natomiast obszary ciemne, czyli hipoechogeniczne, reprezentują spadek lub brak zmiany gęstości tkanki. Czarne lub bezechowe plamy oznaczają obszar tkanki, od którego praktycznie nie odbijają się fale. Mimo że struktury lite odbijają więcej fal, co jest wynikiem hiperechogeniczności ultrasonografii, mogą one również tworzyć artefaktowy cień akustyczny będący efektem tłumienia fal na styku 2 tkanek o różnej gęstości. Innym często spotykanym artefaktem jest wzmocnienie akustyczne. Może się ono pojawić w wyniku niezakłóconego przejścia fal ultradźwiękowych przez wcześniejszy obszar o niskiej impedancji akustycznej [20]. Rozdzielczość obrazu ultrasonograficznego, podobnie jak jego penetracja, zależy od częstotliwości fali. Im wyższa częstotliwość fali, tym lepsza rozdzielczość obrazu. Rozdzielczość osiowa jest definiowana jako minimalne oddalenie, dzięki któremu można odróżnić 2 reflektory położone równolegle do kierunku snopu ultradźwięków. Dla porównania, rozdzielczość boczna jest definiowana jako minimalna odległość, która może być rozróżniona pomiędzy 2 reflektorami znajdującymi się prostopadle do toru wiązki ultradźwiękowej [22]. Jeśli chodzi o penetrację wiązki ultradźwiękowej, to do oceny narządów wewnętrznych, takich jak wątroba czy płuca, najlepsze są ultradźwięki o niższej częstotliwości. Z kolei ultradźwięki o wysokiej częstotliwości są idealne do wizualizacji narządów powierzchniowych, takich jak skóra [20]. Zależności pomiędzy częstotliwością przetwornika a rozdzielczością i głębokością penetracji zostały przedstawione w tabeli 1 [18].

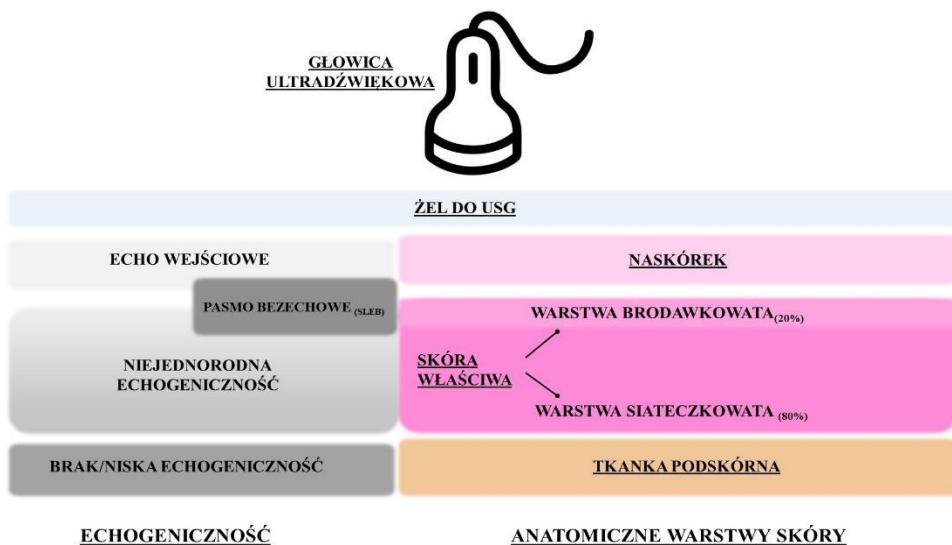
Tabela 1. Rozdzielczość i głębokość penetracji wiązek ultradźwiękowych w zależności od częstotliwości przetwornika

Częstotliwość (MHz)	Rozdzielczość/głębokość penetracji
od 7,5 do 15	rozdzielczość (osiowa i boczna): 350 μ głębokość penetracji: powyżej 1,5 cm
20	rozdzielczość: 50-200 μ głębokość penetracji: 6-7 mm
od 35 do 50	rozdzielczość: 39-120 μ głębokość penetracji: 4 mm

Źródło: opracowanie własne na podstawie [18].

2.2. Ultradźwiękowa wizualizacja skóry normalnej

Obraz ultrasonograficzny zdrowej skóry odpowiada warstwom skóry widocznym podczas badania histologicznego. Powierzchnia skóry dorosłego człowieka wynosi od $1,6 \text{ m}^2$ do $2,0 \text{ m}^2$, natomiast jej grubość może wahać się od 0,5 mm do 1,0 mm. Dzięki wykorzystaniu echogeniczności możliwe jest wyróżnienie 3 warstw skóry [5, 19, 21, 23, 24]. Najbardziej powierzchowna warstwa skóry, która jest widoczna pod przetwornikiem, stanowi jego wejście (ang. *entry echo*). Warstwa ta odpowiada naskórkowi, ale w rzeczywistości jest to linia utworzona przez odbicia generowane od żelu ultradźwiękowego i powierzchni skóry, a także odbicia schodzące z naskórka i pęcherzyków powietrza znajdujących się pomiędzy zrogowaciałymi komórkami naskórka [24, 25]. Echa wejściowe są hiperechogeniczne, ponieważ są przede wszystkim wynikiem obecności keratyny, gęstego, włóknistego białka strukturalnego, które silnie odbija fale ultradźwiękowe [5, 20, 24]. Poniżej tej warstwy leży skóra właściwa. Charakteryzuje się ona niejednorodną echogenicznością. Jej górna część, zwana warstwą brodawkowatą, jest mniej echogeniczna niż jej dolna część – warstwa siateczkowata [5, 12, 24]. Różnica ta jest wynikiem budowy anatomicznej skóry. Warstwa brodawkowata, która stanowi ponad 20% skóry właściwej, zawiera nieregularnie ułożone cienkie włókna elastyny i kolagenu, natomiast warstwa siateczkowata, stanowiąca prawie 80% skóry właściwej, posiada te same włókna, ale są one bardziej regularnie ułożone [5, 20, 24]. W obrazach ultrasonograficznych skóra właściwa stanowi niejednorodną warstwę wynikającą z połączenia hiperechogenicznych odbić włókien kolagenowych oraz hipoechogenicznej warstwy z macierzy zewnątrzkomórkowej znajdującej się pomiędzy włóknami kolagenowymi. Jest to spowodowane grubością tych warstw, jak również ich zdolnością do odbijania fal ultradźwiękowych. Regułą jest, że cienkie włókna kolagenowe odbijają fale słabiej niż grubsze [5, 24-26]. Na echogeniczność skóry właściwej wpływa wiele czynników, w tym ekspozycja włókien kolagenowych, zawartość wody czy rodzaj substancji komórkowej. Dodatkowo patologie skóry związane z odkładaniem się takich włókien w obrębie skóry również zwiększają echogeniczność. Z kolei uszkodzenie włókien lub stan zapalny powodują zmniejszenie echogeniczności skóry właściwej [12]. W obrazach ultrasonograficznych można czasem dostrzec cienkie pasmo bezechowe pomiędzy echem naskórka a skórą właściwą. Pasma to nazywane jest SLEB (ang. *subepidermal lowechogenic band*) lub SENEb (ang. *subepidermal non-echogenic band*). SLEB pojawia się zwykle w skórze osób starszych lub poddanej nadmiernej ekspozycji na promieniowanie UV, gdzie jego grubość może być większa ze względu na zatrzymanie wody w obrębie warstwy brodawkowatej. W obrębie skóry właściwej możemy również zobaczyć przydatki skóry, takie jak mieszki włosowe czy paznokcie [5, 25, 27]. Mieszki włosowe charakteryzują się hipoechogenicznością, a ultrasonografia pozwala na wykrycie niektórych patologii w mieszkach włosowych. Jeśli chodzi o paznokcie, macierz i łożysko paznokcia są hipoechogeniczne, natomiast fałd paznokciowy i płytko paznokciowa są hiperechogeniczne [5, 20, 24]. Warstwą 3 jest tkanka podskórna, która charakteryzuje się brakiem bądź niską echogenicznością, przez co granica między skórą właściwą a tkanką podskórną jest łatwo dostrzegalna w obrazie ultrasonograficznym [5, 12, 24]. W badaniu ultrasonografem stosuje się różne parametry do pomiaru stanu skóry, w tym grubości naskórka, skóry właściwej oraz tkanki podskórnej, a także grubości SLEB i powierzchni każdej z warstw [5, 25, 27-29]. Warstwy anatomiczne skóry oraz obszary echogeniczności przedstawiono na rysunku 1.



Rysunek 1. Warstwy skóry i ich echogeniczność. Opracowanie własne na podstawie [5, 12, 20, 24-29]

2.3. Zastosowanie ultradźwięków w dermatologii, medycynie estetycznej i kosmetologii

Jak wspomniano powyżej, ultrasonografia ze względu na swoją nieinwazyjność jest metodą szeroko stosowaną w dermatologii, medycynie estetycznej i kosmetologii. Do głównych zastosowań tej metody diagnostycznej należy wykrywanie chorób skóry, które można podzielić na: czerniaki, zmiany nieczerniakowe oraz choroby zapalne skóry.

2.3.1. Czerniaki i nieczerniakowe nowotwory skóry

Obecnie nowotwory skóry dzieli się na 2 główne grupy: czerniaki i nieczerniakowe nowotwory skóry. Czerniak jest jednym z najbardziej przerzutowych nowotworów człowieka, który występuje bardzo często wśród młodzieży i młodych dorosłych. Powstaje w wyniku mutacji genetycznych w melanocytach i komórkach produkujących barwnik, znajdujących się w skórze, uchu wewnętrznym, oku lub oponach miękkich. Czerniak może rozwijać się ze znamion łagodnych oraz *de novo*. Ryzyko wystąpienia czerniaka zwiększa ekspozycja na słońce, wcześniejsza rodzinna historia czerniaka, atypowe znamiona lub obecność mnogich wspólnych znamion. Ponadto jest rozpowszechniony w populacjach o jasnej karnacji i na obszarach położonych w niższych szerokościach geograficznych. Czerniak jest również pierwszą przyczyną śmierci w grupie pacjentów z nowotworami skóry [30-35]. Nieczerniakowe nowotwory skóry powstają z komórek pochodzących z naskórka i stanowią około 95% nowotworów skóry. Główne typy nowotworów w tej grupie to rak podstawnokomórkowy (BCC, ang. *basal cell carcinoma*) i rak kolczystokomórkowy (SCC, ang. *squamous cell carcinoma*). BCC jest najczęstszym nieczerniakowym nowotworem skóry, diagnozowanym od 3 do 5 razy częściej niż SCC, ale SCC ma większą zdolność do przerzutów [33, 35-40].

Wykorzystywanie ultrasonografii w dermatologii w celu oceny nieczerniakowych lub czerniakowych guzów skóry oraz wykrywania wczesnych nowotworów pozwala chirurgom na oszacowanie bocznej rozszerzeniu lub głębokości nowotworów skórnych,

co jest dużą zaletą tej metody, ponieważ zakres zabiegu operacyjnego zależy od grubości tkanki nowotworowej. Dodatkowo u pacjentów z inwazyjnymi nowotworami skóry lub węzłami chłonnymi wartowniczymi ultrasonografia może wspomóc wczesne wykrycie przerzutów do węzłów chłonnych [15, 18, 41]. Jest to szczególnie istotne w odniesieniu do czerniaków skóry, gdzie przedoperacyjna ocena marginesu chirurgicznego definiuje przyszłe działania i rokowania pacjenta [12]. Guzy skóry można zobaczyć w obrazie sonograficznych jako hipoechogeniczne zmiany w porównawczo hiperechogenicznym naskórku lub/i skórze właściwej. Wśród nowotworów złośliwych, które nie są czerniakami, najczęstszym nowotworem u ludzi jest BCC. Ten rodzaj nowotworu ma kilka podtypów histologicznych, w tym powierzchowny, guzkowy, mikronaczyniowy czy morfofobiczny, zaś najczęściej występującym jest BCC guzkowy. W obrazie ultrasonograficznym można go rozpoznać jako hipoechogeniczną zmianę o dobrze zdefiniowanych liniach, zwykle zlokalizowaną w skórze właściwej, która od czasu do czasu może być również znaleziona w tkance podskórnej. Niektóre podtypy BCC, wykazujące bardziej gwałtowne zachowanie biologiczne, mogą prezentować małe hiperechogeniczne kropki widoczne w obrębie hipoechogenicznego nowotworu. Są to tzw. plamki typu *flower cotton*. Przyczyna pojawienia się tego artefaktu nie jest znana, ale uważa się, że plamki reagują z grupą apoptotycznych komórek nowotworowych wewnątrz raka. Szanse na wystąpienie gwałtownych fenotypów BCC, takich jak mikronodularny lub morfofobiczny BCC, jak również ryzyko niepowodzenia mogą być związane ze wzrostem ilości plamek *flower cotton*. Ponadto plamy te pomagają odróżnić BCC od czerniaka, w którym nie występują [19, 20, 42].

2.3.2. Dermatofibroma

Dermatofibroma jest popularną skórą postacią łagodnego włóknistego histiocytoma i jest dość częstą zmianą powierzchowną. Występuje głównie u osób dorosłych, najczęściej u kobiet. Dermatofibroma zajmuje kończyny dolne i górne, tułów oraz twarz. Klinicznie prezentuje się jako mała, twarda, różowa grudka z bladą stroną centralną. Zazwyczaj są to pojedyncze zmiany, jednak u około 10% osób występuje od 2 do 5 zmian. Na obrazach ultrasonograficznych dermatofibroma widoczna jest jako hipoechogeniczna, ale niejednorodna zmiana w skórze właściwej o niewyraźnych granicach [29, 43, 44].

2.3.3. Rak z komórek Merkla

Rak z komórek Merkla (MCC, ang. *Merkel cell carcinoma*) jest rzadkim, ale bardzo agresywnym nowotworem neuroendokrynnym skóry. MCC najczęściej powoduje nawroty lokoregionalne i przerzuty odległe. Jego występowanie związane jest z obszarami ekspozycji na słońce, takimi jak szyja, głowa czy kończyny górne. Czynnikiem ryzyka są również: jasna karnacja, podeszły wiek, obniżenie odporności oraz wcześniejsze zachorowania na nowotwory złośliwe. W obrazie ultrasonograficznym MCC widoczny jest jako dobrze odgraniczona, hipoechogeniczna zmiana skórna i podskórna. Ponadto zauważalne są hipoechogeniczne linijne pasma w kształcie „słupów dymu”. Obrazy wykazują również tylne wzmocnienie akustyczne i ścięczenie pokrywającego je naskórka [45, 46].

2.3.4. Atyпова fibroksantoma

Atyпова fibroksantoma (AFX, ang. *atypical fibroxanthoma*) jest rzadkim powierzchownym guzem fibrohistiocytarnym. Obecnie określany jest jako nowotwór o pośrednim potencjale złośliwości, ponieważ ma zdolność do tworzenia przerzutów i może powodo-

wać śmierć. Najczęściej występuje w 2 odrębnych lokalizacjach anatomicznych, np. na tułowiu i kończynach, na głowie i szyi. Pojawia się zazwyczaj u starszych mężczyzn narażonych na działanie promieni słonecznych. Ultrasonografia wykazuje dobrze odgraniczoną heterogenną i hipoechogeniczną masę, która zawiera delikatną erozję korową i częściowo tylne wzmocnienie akustyczne [47, 48].

2.3.5. Choroby zapalne skóry

Zapalenie to odpowiedź układu odpornościowego na szkodliwe bodźce, takie jak patogeny, toksyny, uszkodzone komórki czy promieniowanie. Jego działanie polega na usunięciu szkodliwych bodźców i aktywacji procesu gojenia. Przyczyną zapalenia mogą być czynniki zakaźne, takie jak bakterie, wirusy i inne mikroorganizmy, ale także czynniki niezakaźne, takie jak czynniki chemiczne, psychiczne, biologiczne czy psychologiczne. W odpowiedzi na uszkodzenie tkanek organizm inicjuje kaskadę sygnałów chemicznych, która pobudza reakcje mające na celu naprawę uszkodzonych tkanek. Inicjuje to chemotaksję leukocytów z krążenia ogólnego do miejsc uszkodzenia. Następnie leukocyty wytwarzają cytokiny indukujące reakcje zapalne [49, 50]. Ze względu na przewlekłą ekspozycję skóry na czynniki środowiskowe, jest ona podatna na występowanie chorób zapalnych [51].

Z pomocą badania ultrasonograficznego możliwe jest zdiagnozowanie stanów zapalnych skóry, jakimi są twardzina, atopowe zapalenie skóry (AZS) czy łuszczyca. Wykorzystanie ultradźwięków do identyfikacji twardziny było jednym z ich najwcześniejszych zastosowań. Poprzez identyfikację patologicznego wzrostu odkładania włókien kolagenowych badanie ultrasonograficzne może pomóc w rozróżnieniu 2 faz twardziny – zapalnej i stwardniałej. Faza zapalna charakteryzuje się zmniejszeniem echogeniczności skóry oraz grubości skóry właściwej. Z kolei w fazie sklerotycznej następuje wyraźny wzrost echogeniczności i grubości skóry właściwej. Wreszcie zaś ultrasonograficzna charakterystyka twardziny w jej fazie zanikowej wykazuje ścięczenie skóry właściwej, której echogeniczność przypomina skórę niezmienną chorobowo. Zmiana zanikowa prezentuje się jako obszar hipoechogeniczny [10, 20]. Cechą charakterystyczną obrazu ultrasonograficznego w atopowym zapaleniu skóry jest natomiast obecność SLEB, który może wykazywać echogeniczność niższą w stosunku do skóry zdrowej we wszystkich pozostałych warstwach skóry. Pomiar grubości SLEB wiąże się z nasileniem zmian skórnych w atopowym zapaleniu skóry. Może być również stosowany jako parametr oddzielający w monitorowaniu progresji choroby. Porównanie obrazu AZS z sonogramu z badaniem histopatologicznym pozwala na wykrycie kluczowych statystycznie współzależności między grubością rozległości hipoechogenicznej a takimi parametrami jak stopień hiperplazji naskórka, hiperkeratozy, parakeratozy, a także poziomem spongiozy i nasileniem nacieków zapalnych. Ponadto w obrębie zdrowej skóry otaczającej zmienione chorobowo miejsca u osób z atopowym zapaleniem skóry również wykryto cienką warstwę SLEB. Wydaje się, że może to świadczyć o obecności subklinicznego stanu zapalnego. Obraz ultrasonograficzny atopowego zapalenia skóry jest dość podobny do obrazu łuszczycy, jednak SLEB w tej chorobie prezentuje pogrubione echo wejściowe oraz warstwowe, prostopadłe smugi echa wejściowego, najprawdopodobniej spowodowane pęcherzykami powietrza uwięzionymi pomiędzy łuskami. Ponadto ogólna grubość skóry wewnątrz blaszek łuszczykowych wzrasta wraz ze zmniejszeniem tego parametru w trakcie terapii [12].

2.3.6. Medycyna estetyczna i kosmetologia

Ultrasonograf może być również wykorzystywany w medycynie estetycznej oraz kosmetologii. Jest pomocnym narzędziem w iniekcjach toksyny botulinowej i hialuronidazy, usuwaniu przebarwień, terapii anti-aging czy ocenie wpływu kosmetyków na stan skóry [11, 12, 20, 52]. Iniekcje toksyny botulinowej objawiają się zwiększeniem echogeniczności podskórnej, co powoduje, że dyskretne granice między skórą a leżącym pod nią mięśniem stają się niewyraźne. Badanie może również pomóc w wykryciu wcześniejszych iniekcji, co jest niezwykle istotne, gdyż znaczna część pacjentów nie zgłasza wcześniejszych iniekcji toksyną botulinową. Dzięki sonogramowi możliwe jest także uwidocznienie złogów kwasu hialuronowego, które w obrazach ultradźwiękowych są okrągłe lub owalne, a także zobrazowanie pseudocyst. Zastosowanie ultrasonografii umożliwi kontrolowane podanie hialuronidazy lub dostrzeżenie spadku wielkości złogów, w tym złogów kwasu hialuronowego [12, 20]. Inną terapią, w której wykorzystuje się sonograf, jest terapia polegająca na usuwaniu hiperpigmentacji ze skóry. Hiperpigmentacja to popularne schorzenie dermatologiczne, które wiąże się ze zmianą koloru skóry. Istnieje wiele różnych czynników powodujących hiperpigmentację. Należą do nich urazy, hormony, trądzik, niektóre leki, stany zapalne, niedobory witamin czy ekspozycja na słońce. Pigmentacja i zabarwienie skóry są regulowane przez procesy biologiczne związane z produkcją melaniny – barwnika skóry wytwarzanego w melanocytach. Zaburzenia produkcji lub dystrybucji melaniny powodują hiperpigmentacje skóry [53, 54]. Charakterystyczne cechy hiperpigmentacji w obrębie obrazów ultrasonograficznych polegają na zatarciu linii pomiędzy skórą właściwą a tkanką podskórną [11]. Ultrasonografia może być również pomocna w ocenie wpływu kosmetyków na stan skóry, np. jej zdolność do zatrzymywania wilgoci. Wzrost nawilżenia skóry jest widoczny jako zmiana echogeniczności. Aby ocenić ten wzrost, wykonuje się pomiar liczby pikseli w obrębie górnych warstw skóry, gdyż to one odpowiadają za zatrzymywanie wody. Wzrost liczby pikseli staje się widoczny po około 2 tygodniach stosowania na skórze preparatów nawilżających [52].

3. Podsumowanie

Obecnie zastosowanie ultrasonografii stało się popularne w ocenie zarówno zdrowej skóry, jak i wszelkich zmian w jej obrębie, a także do monitorowania przebiegu i skuteczności różnych terapii. Stała się ona bardzo przydatnym narzędziem zarówno w dermatologii, jak i medycynie estetycznej. Liczne zalety i łatwość obsługi sprawiają, że badanie ultrasonograficzne skóry jest coraz bardziej powszechne. Wykonywanie pomiarów za pomocą ultrasonografu jest jednak stosunkowo nową praktyką i konieczne są dalsze badania nad jej rozwojem.

Literatura

1. Kane D., Grassi W., Sturrock R., Balint P.V., *A brief history of musculoskeletal ultrasound: „From bats and ships to babies and hips”*, *Rheumatology*, 43, 2004, s. 931-933.
2. Carovac A., Smajlovic F., Januzovic D., *Application of ultrasound in medicine*, *Acta Informatica Medica*, 19, 2011, s. 168-171.
3. Sippel S., Muruganandan K., Levine A., Shah S., *Review article: Use of ultrasound in the developing world*, *International Journal of Emergency Medicine*, 4, 2011, s. 72.
4. Díaz-Gómez J.L., Mayo P.H., Koenig S.J., *Point-of-care ultrasonography*, *The New England Journal of Medicine*, 385, 2021, s. 1593-1602.

5. de Oliveira Barcaui E., Carvalho A.C., Lopes F.P., Pineiro-Maceira J., Barcaui C.B., *High-frequency ultrasound with color Doppler in dermatology*, *Anais Brasileiros Dermatologias*, 91, 2016, s. 262-273.
6. Chen-Glasser M., Li P., Ryu J., Hong S., *Piezoelectric materials for medical applications*, [w:] Vassiliadis S. (red.), *Piezoelectricity – organic and inorganic materials and applications*, IntechOpen, Wielka Brytania 2018, s. 125-145.
7. Zaszczynska A., Gradyś A., Sajkiewicz P., *Progress in the applications of smart piezoelectric materials for medical devices*, *Polymers*, 12, 2020, s. 2754.
8. Raza S., Ali F., Al-Niaimi F., *Ultrasonography in diagnostic dermatology: a primer for clinicians*, *Archives of Dermatological Research*, 10, 2022, s. 1007.
9. Almuhanha N., Wortsman X., Wohlmuth-Wieser I., Kinoshita-Ise M., Alhusayen R., *Overview of ultrasound imaging applications in dermatology*, *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, 25, 2021, s. 521-529.
10. Ruaro B., Santiago T., Hughes M., Lepri G., Poillucci G., Baratella E., Salton F., Confalonieri M., *The updated role of ultrasound in assessing dermatological manifestations in systemic sclerosis*, *Open Access Rheumatology: Research and Reviews*, 13, 2021, s. 79-91.
11. Młosek R.K., Jakubowski W., *Zastosowanie ultrasonografii w medycynie estetycznej i kosmetologii – doświadczenia własne*, *Acta Bio-Optica et Informatica Medica* 3, 2011, s. 227-230.
12. Polańska A., Dańczak-Pazdrowska A., Jałowska M., Żaba R., Adamski Z., *Current applications of high-frequency ultrasonography in dermatology*, *Advances in Dermatology and Allergology*, 34, 2017, s. 535-542.
13. Csány G., Gergely L.H., Szalai K., Lőrincz K.K., Strobel L., Csabai D., Hegedüs I., Marosán-Vilimszky P., Füzesi K., Sárdy M., Gyöngy M., *First clinical experience with a novel optical-ultrasound imaging device on various skin pathologies*, *medRxiv*, 10, 2021, s. 1101.
14. Piłat P., Borzęcki A., Jazienicki M., Krasowska D., *Skin melanoma imaging using ultrasonography: a literature review*, *Advances in Dermatology and Allergology*, 35, 2018, s. 238-242.
15. Schmid-Wendtner M., Valesky E., *Ultrasonography of skin and lymph nodes*, [w:] Plewig G., French L., Ruzicka T., Kaufmann R., Hertl M. (red.), *Braun-Falco's Dermatology*, Springer, Niemcy 2022, s. 69-76.
16. Vanhoenacker F.M., Verlooy J., De Praeter M., *Samoistne ustąpienie pojedynczego ogniska histiocytozy z komórek Langerhansa – potencjalna rola badania ultrasonograficznego w diagnostyce i obserwacji*, *Journal of Ultrasound*, 18, 2018, s. 265-270.
17. Belfiore M.P., Reginelli A., Russo A., Russo G.M., Rocco M.P., Moscarella E., Ferrante M., Sica A., Grassi R., Cappabianca M., *Usefulness of high-frequency ultrasonography in the diagnosis of melanoma: mini review*, *Frontiers in Oncology*, 11, 2021, s. 1-7.
18. Bhatt K.D., Tambe S.A., Jerajani H.R., Dhurat R.S., *Utility of high-frequency ultrasonography in the diagnosis of benign and malignant skin tumors*, *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*, 83, 2017, s. 162-182.
19. Bezugly A., *High frequency ultrasound study of skin tumors in dermatological and aesthetic practice*, *Medical Ultrasonography*, 17, 2015, s. 541-544.
20. Levy J., Barrett D.L., Harris N., Jeong J.J., Yang X., Chen S.C., *High-frequency ultrasound in clinical dermatology – a review*, *The Ultrasound Journal*, 13, 2021, s. 1-12.
21. Polańska A., Jenerowicz D., Paszyńska E., Żaba R., Adamski Z., Dańczak-Pazdrowska A., *High-frequency ultrasonography-possibilities and perspectives of the use of 20 Mhz in teledermatology*, *Frontiers in Medicine*, 8, 2021, s. 1-7.
22. Ng A., Swanevelde J., *Resolution in ultrasound imaging*, *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care and Pain*, 11, 2011, s. 186-192.

23. Wolski T., Kędzia B., *Farmakoterapia skóry. Cz. 1. Budowa i fizjologia skóry*, Postępy Fitoterapii, 20, 2019, s. 61-67.
24. Catalano O., Wortsman X., *Dermatology ultrasound. Imaging technique, tips and tricks, high-resolution anatomy*, Ultrasound Quarterly, 36, 2020, s. 321-327.
25. Młosek R.K., Malinowska S., *Ultrasonograficzny obraz skóry, aparatura i podstawy obrazowania*, Journal of Ultrasonography, 12, 2013, s. 212-221.
26. Szymańska E., Maj M., Majsterek M., Litniewski J., Nowicki A., Rudnicka L., *Zastosowanie ultrasonografii wysokiej częstotliwości w diagnostyce dermatologicznej – obraz ultrasonograficzny wybranych zmian skórnych*, Polski Merkuriusz Lekarski, 31, 2011, s. 37-40.
27. Vergilio M.M., Vasques L.I., Leonardi G.R., *Characterization of skin aging through high-frequency ultrasound imaging as a technique for evaluating the effectiveness of anti-aging products and procedures: A review*, Skin Research and Technology, 27, 2021, s. 966-973.
28. Wawrzyniak Z.M., Malinowska S., Młosek R.K., *Parametry stosowane do oceny obrazów ultrasonograficznych wysokich częstotliwości skóry*, Inżynier i Fizyka Medycyny, 2, 2013, s. 222-226.
29. Csányi G., Gergely L.H., Kiss N., Szalai K., Lorincz K., Strobel L., Csabai D., Hegedüs I., Marosán-Vilimszky P., Füzesi K., Sárdy M., Gyöngy M., *Preliminary clinical experience with a novel optical – ultrasound imaging device on various skin lesions*, Diagnostics, 12, 2022, s. 204.
30. Alfageme Roldán F., *Ultrasound skin imaging*, Actas Dermo-Sifiliográficas, 105, 2014, s. 891-899.
31. Qadir M.I., *Skin cancer: etiology and management*, Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 29, 2016, s. 999-1003.
32. Kluz N., Klas J., *Treatment of malignant melanoma – a review of the literature*, Journal of Education, Health and Sport, 11, 2021, s. 55-66.
33. Khan N.H., Mir M., Qian L., Baloch M., Farhan Ali Khan M., Rehman A., Ngowi E.E., Wu D.D., Ji X.J., *Skin cancer biology and barriers to treatment: Recent applications of polymeric micro/nanostructures*, Journal of Advanced Research, 36, 2022, s. 223-247.
34. Tímár J., Ladányi A., *Molecular pathology of skin melanoma: epidemiology, differential diagnostics, prognosis and therapy prediction*, International Journal of Molecular Sciences, 23, 2022, s. 5384.
35. Zambrano-Román M., Padilla-Gutiérrez J.R., Valle Y., Muñoz-Valle J.F., Valdés-Alvarado E., *Non-melanoma skin cancer: a genetic update and future perspectives*, Cancers, 14, 2022, s. 2371.
36. Delishaj D., Rembielak A., Manfredi B., Ursino S., Pasqualetti F., Laliscia C., Orlandi F., Morganti R., Fabrini M.G., Paiar F., *Non-melanoma skin cancer treated with high-dose-rate brachytherapy: a review of literature*, Journal of Contemporary Brachytherapy, 8, 2016, s. 533-540.
37. Didona D., Paolino G., Bottoni U., Cantisani C., *Non melanoma skin cancer pathogenesis overview*, Biomedicine, 6, 2018, s. 1-15.
38. Lesiak A., Czuwara J., Kamińska-Winciorek G., Kiprian D., Maj J., Owczarek W., Placek W., Rudnicka L., Rutkowski P., Sobjanek M., Sokołowska-Wojdyło M., Szepietowski J., Zegarska B., Zegarski W., *Basal cell carcinoma. Diagnostic and therapeutic recommendations of the Polish Dermatological Society*, Dermatology Review, 106, 2019, s. 107-126.
39. Sendín-Martin M., Hernández-Rodríguez J.C., Durán-Romero A.J., Ortiz-Álvarez J., Conejo-Mir J., Pereyra-Rodríguez J.J., *Non-melanoma skin cancer mortality in Spain: a predictive model up to 2044*, Journal of Clinical Medicine, 10, 2021, s. 5750.

40. Vagher J., Gammon A., Kohlmann W., Jeter J., *Non-melanoma skin cancers and other cutaneous manifestations in bone marrow failure syndromes and rare DNA repair disorders*, *Frontiers in Oncology*, 12, 2022, s. 1-18.
41. Onol S., Ozkaya O., *Diagnostic value of real-time elastography in diagnosing lymph node metastasis of skin cancer*, *Cureus*, 12, 2020, s. 1-10.
42. Tamas T., Dinu C., Lenghel M., Băciut G., Bran S., Stoia S., Băciut M., *The role of ultrasonography in head and neck non-melanoma skin cancer approach: an update with a review of the literature*, *Medical Ultrasonography*, 23, 2021, s. 83-88.
43. Won K.Y., Park S.Y., Jin W., Lew B.L., *Dermatofibroma: sonographic findings and pathologic correlation*, *Acta Radiologica*, 59(4), 2018, s. 454-459.
44. Choi J.Y., Park H.J., Kim J.N., Kim M.S., Chae S.W., Lee Y.T., Park J.Y., *Can ultrasound distinguish between dermatofibroma and subcutaneous epidermal tumors? – Imaging features and reproducibility*, *Clinical Imaging*, 79, 2021, s. 52-55.
45. Hernández-Aragüés I., Vázquez-Osorio I., Alfageme F., Ciudad-Blanco C., Casas-Fernández L., Rodríguez-Blanco M.I., Suárez-Fernández R., *Skin ultrasound features of Merkel-cell carcinoma*, *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 31, 2017, s. 315-318.
46. García-Harana C., Fernandez-Canedo I., Rodríguez-Lobalzo S., de Troya-Martín M., *Merkel cell carcinoma: is there a distinctive ultrasound pattern?* *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 110, 2019, s. 503-506.
47. Lee S., Joo K.B., Park Ch.K., Kim T.S., Bae J., *A case of atypical fibroxanthoma of subungual type: ultrasound and magnetic resonance imaging findings*, *Clinical Imaging*, 37, 2013, s. 155-158.
48. Cazzato G., Colagrande A., Cimmino A., Liguori G., Lettini T., Serio G., Ingravallo G., Marzullo A., *Atypical fibroxanthoma-like amelanotic melanoma: a diagnostic challenge*, *Dermatopathology*, 8, 2021, s. 25-28.
49. Chen L., Deng H., Cui H., Fan G J., Zuo Z., Deng J., Li Y., Wang X., Zhao L., *Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs*, *Oncotarget*, 9, 2018, s. 7204-7218.
50. Furman D., Campisi J., Verdin E., Carrera-Bastos P., Targ S., Franceschi C., Ferrucci L., Gilroy D.W., Fasano A., Miller G.W., Miller A.H., Mantovani A., Weyand C.M., Barzilai N., Goronzy J.J., Rando T.A., Effros R.B., Lucia A., Kleinstreuer N., Slavich G.M., *Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span*, *Nature Medicine*, 25, 2019, s. 1822-1832.
51. Sawada Y., Saito-Sasaki N., Mashima E., Nakamura M., *Daily lifestyle and inflammatory skin diseases*, *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 2021, s. 5204.
52. Jaguś D., Malinowska S., Mlosek R.K., *Wykorzystanie ultrasonografii skóry w gabinecie kosmetyka*, *Kosmetologia Estetyczna*, 7, 2018, s. 279-282.
53. Desai S.R., Alexis A., *Hyperpigmentation therapy: a review*, *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, 7, 2014, s. 13-17.
54. Nautiyal A., Wairkar S., *Management of hyperpigmentation: Current treatments and emerging therapies*, *Pigment Cell & Melanoma Research*, 34, 2021, s. 1000-1014.

Ultradźwięki – historia, działanie i zastosowanie w praktyce dermatologicznej

Streszczenie

W obecnych czasach techniki obrazowe w medycynie są nieodzownym elementem diagnostyki oraz terapii. Do jednych z takich metod obrazowych zalicza się ultrasonografię. Jest ona badaniem obrazowym, wykorzystującym fale dźwiękowe o wysokiej częstotliwości – powyżej 20 kHz, niesłyszalne dla ludzkiego ucha. Dzięki niewielkiemu kosztowi i prostocie wykonania, a także bezbolesności, ultrasonografia zyskuje stale rosnącą popularność w różnych gałęziach medycyny. Do jednych z nich zaliczyć można dermatologię oraz nauki jej pokrewne, takie jak medycyna estetyczna oraz kosmetyologia. Badanie ultrasonograficzne umożliwiło między

innymi głębsze poznanie prawidłowej budowy skóry człowieka, a ponadto znalazło szerokie zastosowanie w diagnostyce, zwłaszcza wczesnej, różnorodnych chorób, takich jak nowotwory, zapalne oraz autoimmunologiczne choroby skóry. Dodatkowo, jako badanie pomocnicze, znalazło szerokie zastosowanie w zabiegach pielęgnacyjnych oraz estetycznych, takich jak terapie przeciwstarzeniowe, usuwanie przebarwień czy ocena działania kosmetyków na skórę. Poniższa praca podsumowuje dotychczasową wiedzę na temat zastosowania badania ultrasonograficznego w dermatologii, medycynie estetycznej oraz kosmetologii. Przedstawia ponadto podstawowe informacje dotyczące działania ultrasonografu oraz obraz prawidłowej fizjologicznie skóry. Słowa kluczowe: ultrasonografia, ultradźwięki, dermatologia

The ultrasound – history, how it works and its use in dermatology practice

Abstract

Nowadays, imaging techniques in medicine are an indispensable part of diagnosis and therapy. One such imaging method is ultrasonography. It is an imaging study using high-frequency sound waves – above 20 kHz, inaudible to the human ear. Thanks to its low cost and simplicity of performance as well as its painlessness, ultrasound is gaining increasing popularity in a variety of branches of medicine. These include dermatology and related sciences such as aesthetic medicine and cosmetology. Among other things, the study of ultrasound has made it possible to gain a deeper understanding of the normal structure of the human skin and has been widely used in the diagnosis, especially in the early stages, of various diseases such as tumours, inflammatory and autoimmune skin diseases. In addition, ultrasonography as an ancillary study has found wide application in skin care and aesthetic treatments such as anti-ageing therapies, removal of hyperpigmentation or assessment of the effect of cosmetics on the skin. The following paper summarises existing knowledge on the use of ultrasound in dermatology, aesthetic medicine and cosmetology. In addition, it presents basic information on how ultrasound works and an image of physiologically normal skin.

Keywords: ultrasonography, ultrasound, dermatology

Badania immunohistochemiczne w boreliozie

1. Wprowadzenie

Niniejszy artykuł został poświęcony przedstawieniu możliwie najbardziej aktualnego stanu zastosowania metod i technik immunohistochemicznych w diagnostyce boreliozy. W artykule zostały zawarte podstawowe uwagi dotyczące epidemiologii, etiologii i patogenezы boreliozы. Następnie główna część wywodu przedstawionego w artykule skupiona jest na historii i kierunkach rozwoju zastosowań immunohistochemii w diagnostyce choroby z Lyme, wskazano aktualny stan tych zastosowań oraz nowe koncepcje i propozycje rozwoju badań w tym kierunku. Celem artykułu jest charakterystyka metod immunohistochemicznych w diagnozie boreliozы oraz wskazanie opisywanych w literaturze nowych kierunków badań.

2. Borelioza

Borelioza należy do chorób przenoszonych przez kleszcze (ang. *tick-borne diseases*). Oprócz boreliozы kleszcze przenoszą: kleszczowe zapalenie mózgu, babeszjozę, riketsjozy [1]. Za transmisję odpowiedzialne są różne gatunki kleszczy z rodzaju *Ixodes*. Pierwsze przypadki tej choroby zostały zarejestrowane w 1910 roku w Szwecji i potem w 1914 roku w Austrii [2]. Borelioza, inaczej nazywana chorobą z Lyme lub boreliozą z Lyme, ograniczona jest geograficznie do północnej półkuli [3]. Borelioza jest wywoływana przez krętki *Borrelia burgdorferi sensu lato* (w Polsce występują: *B. burgdorferi*, *B. garinii*, *B. afzelii*). Rezerwuarem krętków są gryzonie i drobne ssaki. W przypadku Polski rozpoznawanie krętków *Borrelia* dotyczy obszaru całego kraju (na podstawie statystyk zgłoszeń przypadków boreliozы i badań występowania krętków u kleszczy w różnych stadiach rozwojowych). W badaniach prowadzonych w latach 1993-2001 na terenie 10 województw u zebranych 20 000 kleszczy ze 100 stanowisk zarejestrowano częstość występowania u nich krętków *Borrelia* na poziomie od 6% do 15% bez istotnych różnic między obszarami wiejskimi w pobliżu lasów a stanowiskami w parkach miejskich. Z kolei częstość rejestrowania przypadków boreliozы geograficznie wskazuje postępujący wzrost liczby przypadków, ale z przewagą powiatów Polski Północno-Wschodniej, Północnej (województwa: podlaskie, kujawsko-pomorskie, pomorskie) i Południowo-Wschodniej (województwo podkarpackie) [5].

¹ beata.cichacz-kwiatkowska@wp.pl, Katedra i Zakład Histologii, Embriologii i Cytofizjologii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, www.umlub.pl.

² joanna.sekita-krzak@wp.pl, Katedra i Zakład Histologii, Embriologii i Cytofizjologii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, www.umlub.pl.

³ martasochocka@wp.pl, Katedra i Zakład Histologii, Embriologii i Cytofizjologii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, www.umlub.pl.

⁴ patrycjachylińskawrzos@umlub.pl, Katedra i Zakład Histologii, Embriologii i Cytofizjologii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, www.umlub.pl.

⁵ barbarajodlowskajedrych@umlub.pl, Katedra i Zakład Histologii, Embriologii i Cytofizjologii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, www.umlub.pl.

3. Objawy boreliozy

Objawy boreliozy dotyczą przede wszystkim skórę, stawy, układ nerwowy i serce [4]. Najbardziej typowymi objawami są:

- rumień wędrujący (nazywany również rumieniem pełzającym, łac. *erythema migrans*);
- *Borrelia lymphocytoma* – objaw boreliozy limfatycznej polegający na obecności na skórze jednego lub więcej guzków barwy czerwonej lub sinoczerwonej o wielkości do kilku centymetrów;
- przewlekłe zanikowe zapalenie skóry kończyn (łac. *acrodermatitis chronica atrophicans*);
- zapalenie stawów;
- zapalenie mięśnia sercowego;
- neuroborelioza, która w odróżnieniu od pozostałych, może być uważana za najbardziej złożony i ewoluujący wraz ze stadiami chorobowymi zespół objawów [4].

Nie ma konsensusu w literaturze odnośnie do przebiegu etapów boreliozy ze względu na wielopostaciowość, niejednolity przebieg, a także dużą złożoność objawów, z których wiele się nie pojawia, aczkolwiek chory może być dotknięty kilkoma jednocześnie. Z tego powodu w literaturze powstają różne propozycje identyfikacji etapów tej choroby [4, 8-10, 17, 41].

Według jednej z propozycji, zachorowanie na boreliozę dzielone jest na etap wczesny i etap późny. W etapie wczesnym z reguły między 3 a 30 dniem od ukąszenia zakażonego kleszcza, pojawia rumień wędrujący. Na etapie wczesnym powodzenie antybiotykoterapii jest bardzo wysokie, ale gdy nie zostanie ono wdrożone, etap późniejszy objawia się roz-siewem zakażenia i lokalizacją narządową choroby [8].

Manifestacje boreliozy na etapie późnym są bardzo zmienne. Powyżej wymienione najczęściej rejestrowane objawy i zespoły objawów mogą współwystępować, również współwystępować z rumieniem wędrującym, ale także okresowo ustępować i nawracać. Remisje i nawroty są szczególnie charakterystyczne dla postaci stawowej. Postać stawowa cechuje się wymienionym wcześniej zapaleniem stawów, które może mieć postać wysiękową (najczęściej zajęty jest staw kolanowy) i ma charakter asymetryczny. Postać stawowa występuje też w formie wędrujących bólów kostno-stawowych [8].

Neuroborelioza, czyli postać obejmująca układ nerwowy, manifestuje się największą ilością złożonych objawów. Złożoność i trudności w leczeniu tej postaci wynikają z zewnątrzkomórkowej obecności krętków w takich obszarach jak mózg, gałki oczne, które są immunologicznie uprzywilejowane. W ten sposób krętka *Borrelia burgdorferi sensu lato* są w stanie przetrwać w tkankach OUN przez wiele miesięcy, a nawet lat, długo nie wywołując żadnych objawów [9]. Neuroborelioza dzieli się na fazę wczesną-rozsianą, wczesną zlokalizowaną i późną, może też istnieć postać nieokreślona [8-10, 19]. W fazie wczesnej najczęstszymi objawami są:

- izolowane porażenia nerwu VII (bardzo rzadko dochodzi do porażenia innych nerwów);
- limfocytarne zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych;
- równoczesna manifestacja izolowanego porażenia nerwu VII i limfocytarne zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych;
- limfocytarne zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych i mózdzku wraz z poliradikulopatią demielinizacyjną;

- zespół Bannwartha,
- zapalenie mózgu wraz z poliradikulopatią aksonalną ruchową [8, 10].
W przypadku postaci późnej mogą wystąpić następujące objawy:
- niedowłady połowicze wraz z porażeniem nerwu VII i zmianami demielinizacyjnymi w mózgu;
- niedowłady połowicze wraz ze zmianami demielinizacyjnymi w mózgu;
- przewlekłe encefalopatie;
- przewlekłe radikulopatie [8].

W neuroboreliozie notuje się także występowanie obustronnego zapalenia nerwu wzrokowego (łac. *papillitis*). Pojawia się w od 2% do 4% przypadków boreliozy. Wśród innych zaburzeń występują: zapalenia błony naczyniowej, zapalenie nerwu wzrokowego, zapalenie wnętrza gałki ocznej, neuropatie niedokrwienne nerwu II, porażenie nerwów gałkoruchowych czy zapalenie spojówek. Główne objawy to: bóle głowy w okolicy czołowej, bóle przy obracaniu gałkami ocznymi, zamglone widzenie [7]. Ponadto w neuroboreliozie może dochodzić do zaburzeń psychotycznych [11].

W literaturze wskazuje się na różnice w objawach neuroboreliozy w różnych grupach wiekowych pacjentów [8, 14]. B.J. Kullberg, H.D. Vrijmoeth i D.E. Schoor zauważają, że w krajach Ameryki Północnej częściej niż w innych rejonach świata występuje odkleszczowe zapalenie stawów jako powikłanie boreliozy, zaś w krajach europejskich – zanikowe zapalenie skóry [3].

4. Trudności diagnostyczne

W literaturze wskazuje się na trudności w rozpoznaniu choroby, przy jednoczesnym, kluczowym dla wyzdrowienia, jak najszybszym rozpoczęciu antybiotykoterapii (oraz steroidoterapii). To sugeruje konieczność rozwijania diagnostyki boreliozy [3, 4, 6, 7], zwłaszcza że obecnie nie ma w ujęciu międzynarodowym jednolitego stanowiska w sprawie tego, kiedy i w jakich warunkach stosować antybiotykoterapię lub nie (np. Niemieckie Towarzystwo Boreliozy DBG stoi na stanowisku, aby nie stosować jej jako środka profilaktycznego bez potwierdzenia obecności krętków albo bez pojawienia się objawów boreliozy) [17].

Od początku XXI wieku jako najbardziej obiecujące źródło metod diagnostycznych przedstawiana jest immunohistochemia [15], aczkolwiek w badaniach eksperymentalnych kierunek ten znany jest od początku lat 90. XX wieku [16]. Jednak pojawiają się też opinie podważające skuteczność badań immunohistochemicznych, stawiając wyżej jako wiarygodne dowody diagnostyczne uzyskanie krętków w hodowli wraz z potwierdzeniem obecności czynnika zakaźnego w badaniu PCR [17]. Przyczyną jest nie tyle pierwotna nieskuteczność bądź niska skuteczność tychże metod, co imitowanie przez boreliozę objawów wielu innych chorób. Ta cecha boreliozy idzie w parze m.in. z niską swoistością testów serologicznych [22].

Niemniej podkreśla się znaczenie metod immunohistochemicznych w diagnostyce, a przez Panczewicza i in. [20] nie jest ona rekomendowana jedynie w przypadku pojawienia się typowych objawów (m.in. rumienia wędrującego). Tymczasem należy zwrócić uwagę na fakt, że u dużego (ale zmiennego w zależności od źródła) odsetka pacjentów objaw rumienia wędrującego po ukąszeniu przez kleszcza może nie wystąpić [4, 16, 17, 25].

5. Badania immunohistochemiczne

Badania immunohistochemiczne w diagnostyce boreliozy należy podzielić na:

- badania immunologiczne (serologiczne) mające na celu stwierdzenie w surowicy obecności swoistych przeciwciał klasy IgM i IgG wytwarzanych przeciwko krętkom *Borrelia burgdorferi sensu lato* w płynie mózgowo-rdzeniowym i w osoczu;
- badania histologiczne/histopatologiczne – badanie wycinków skóry [4, 17].

Poza blokiem metod immunohistochemicznych stosuje się: wywiad lekarski, badania EKG (zaburzenia pracy mięśnia sercowego), badanie genetyczne w połączeniu z technikami biologii molekularnej (wykrywanie DNA krętków metodą PCR na podstawie wycinka skóry dotkniętego rumieniem) oraz badania płynu mózgowo-rdzeniowego pod kątem możliwości wykrycia nadmiernej liczby komórek (pleocytoza) [16, 17]. Materiałem biologicznym do wykonania diagnostyki boreliozy – w zależności od postaci i objawów – jest płyn mózgowo-rdzeniowy i osocze [13], płyn stawowy [18] oraz wycinki skóry [4, 16, 17].

Zastosowania badań immunohistochemicznych w diagnozie boreliozy są odmienne w zależności od objawów, z tego powodu metody badawcze są stosowane zależnie od postaci zakażenia, co prezentuje tabela 1.

Tabela 1. Diagnostyka w boreliozie przy różnych postaciach zakażenia

Postać zakażenia	Diagnostyka laboratoryjna
Rumień wędrujący	brak możliwości diagnostyki metodami serologicznymi, jedynie diagnostyka biologii molekularnej, w tym PCR wycinka skóry
Chłoniak limfocytowy skóry	detekcja przeciwciał IgG i IgM metodami ELISA/Western blot
Neuroborelioza – postać wczesna	badanie PMR – pleocytoza, techniki biologii molekularnej – PCR, detekcja przeciwciał IgG i IgM metodami ELISA/Western blot
Postać sercowa	detekcja przeciwciał IgG i IgM metodami ELISA/Western blot
Zapalenie stawów	detekcja przeciwciał IgG i IgM metodami ELISA/Western blot (zauważalny wzrost IgG), badanie płynu stawowego technikami biologii molekularnej – PCR
Przewlekłe zanikowe zapalenie skóry	Detekcja przeciwciał IgG metodami ELISA/Western blot, histopatologiczne badanie wycinka skóry oraz badanie technikami biologii molekularnej – PCR

Źródło: [18].

Ponadto należy zwrócić uwagę na rozwój zastosowań różnych metod diagnostycznych, które w wyniku ciągłego pogłębiania wiedzy na temat specyfiki genogatunków *Borrelia burgdorferi sensu lato* w etiologii i patologii boreliozy mogą przyczyniać się do polepszenia perspektyw rozwoju diagnostyki. Razem z metodami immunohistochemicznymi mogą one zwiększać skuteczność rozpoznania poprzez wyjście poza jednoetapowość badania. Pedrycz-Wieczorska [22] wymienia następujące metody diagnostyczne w kierunku boreliozy:

- testy EIA, w tym testy ELISA (wykorzystywane w wariantach Direct ELISA, Indirect ELISA, Sandwich ELISA, Competitive ELISA, inaczej: cElisa) i testy ELFA;
- testy WESTERN-BLOT;

- testy CIC;
- testy LTT;
- testy immunologiczne Lyme Trace ELISA IgG;
- testy immunologiczne C6 Lyme Elisa;
- metoda LUAT;
- badania histopatologiczne;
- metoda PCR.

Badania histopatologiczne w diagnostyce boreliozy są stosowane co najmniej od lat 80. XX wieku [21]. W celu realizacji badania wykonywana jest biopsja tkanki dotkniętej chorobą. Badanie histopatologiczne jest wykonywane w przypadku obecności rumienia wędrującego lub zanikowego zapalenia skóry [22]. Obecność krętków *Borrelia* wykazywana jest w brodawkach warstwy właściwej skóry przyłączających się do włókien kolagenowych, ale bardzo rzadko w ścianach i w świetle naczyń krwionośnych skóry [23].

Duże znaczenie w diagnostyce boreliozy odgrywiają testy immunoenzymatyczne (EIA), do których zalicza się testy ELISA i ELFA [22]. Testy ELISA są stosowane w diagnostyce boreliozy od lat 80. XX wieku [43]. Test ELFA nie jest stosowany powszechnie w diagnostyce boreliozy, ale jest wymieniany w wielu pozycjach literatury. Test ELFA służy do detekcji przeciwciał IgM i IgG u osób ugryzionych przez kleszcze, z podejrzeniem boreliozy [30]. Z kolei testy ELISA są prawdopodobnie najbardziej rozpowszechnione zarówno w konfiguracjach badawczych, jak w praktyce diagnostycznej. Należy też zaznaczyć, że doczekały się one nawet wariantów technologicznych specyficznych dla diagnostyki w kierunku boreliozy [22]. Testy ELISA mają na celu wykrycie przeciwciał IgM i IgG, jednakże procedura postępowania w ich przypadku wymaga uwzględnienia 2 wariantów wyników: w wariancie negatywnym wynik testu można uznać za ostateczny, ale w przypadku wyniku pozytywnego musi być on potwierdzony dodatkowym badaniem immunoblot lub WESTERN-BLOT [37, 38]. Test pośredniej fluorescencji (IIFT), podobnie jak ELISA może być wykorzystywany na etapie pierwszym diagnostyki i pozwala na wykrywanie wymienionych przeciwciał specyficznych przeciwko krętkom *Borrelia burgdorferi sensu lato* [39]. Ponadto w literaturze wymienia się także metodę immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym (FPIA) [40].

Badania diagnostyczne w boreliozie wykonywane są także z pomocą testów immunologicznych WESTERN-BLOT. W rozpowszechnionym już podejściu 2-etapowym stanowią one metodę potwierdzającą wynik dodatni badania serologicznego 1. etapu [17, 22, 34, 35]. Na początku lat 90. XX wieku rozwijano podstawy dla zastosowania WESTERN-BLOT w diagnostyce boreliozy [42, 43]. WESTERN-BLOT (inaczej: *protein immunoblot*) służy do wykrywania przeciwciał IgG i IgM, jak również OspC [41].

Nową metodą jest MICROBLOT-ARRAY, która także należy do metod serologicznych. Również zajmuje się ona wykrywaniem przeciwciał IgM i IgG specyficznych przeciwko krętkom. Jej zaletą jest znacznie wyższa wydajność pod względem liczby badanych próbek niż w WESTERN-BLOT [17].

Testy CIC polegają na wykrywaniu krążących kompleksów immunologicznych przeciwciałami a antygenami *Borrelia*. Kompleksy immunoglobuliny nie są wykrywane przez testy EIA ani w WESTERN-BLOT. Testy te składają się z 3 etapów: izolacji kompleksów, dysocjacji oraz detekcji przeciwciał uwalnianych z krążących kompleksów [22]. Dodatkowo należy wyróżnić testy: Lyme Trace ELISA IgG, testy immunologiczne C6 Lyme Elisa, które są związane z aktywnością proteiny VLsE, która jest dobrym

markerem obecności *Borrelia burgdorferi* w organizmie [22]. Proteina ta należy do rodziny lipoprotein i jest obecna na powierzchni zewnętrznej ściany komórkowej krętków [46]. Test Lyme Trace ELISA jest zorientowany na poszukiwanie przeciwciał IgG specyficznych dla proteiny VlsE. Z kolei drugi z testów – C6 Lyme Elisa – szuka przeciwciał IgG i IgM specyficznych dla peptydów C6 i IR6, które stanowią fragmenty proteiny VlsE [22].

Metoda PCR to metoda bezpośredniej detekcji, która cechuje się wysoką czułością i prostotą. Zastosowanie tej metody w diagnostyce boreliozy ma na celu wykrycie DNA krętków *B. burgdorferi*. Metodę PCR można stosować w różnych wariantach (rtPCR, PCR połączony z hybrydyzacją itp.), na różnym materiale biologicznym (fragmentach skóry, osoczu, płynie mózgowo-rdzeniowym albo płynie stawowym). Czułość testów PCR jest proporcjonalna w stosunku do objętości/masy materiału biologicznego (im mniej materiału, tym niższa czułość) [48].

Badania serologiczne są krytykowane jako mało skuteczne ze względu na wysoką czułość i niską swoistość [17, 18]. Powoduje to dość duże ryzyko wyniku fałszywie ujemnego lub fałszywie dodatniego. Ponadto fałszywie dodatnie wyniki są notowane w przypadku testów PCR [18] z uwagą, że nieco wyższa czułość jest osiągana w technice rtPCR z odwrotną transkryptazą [22]. W zależności od metody prowadzi to do nieprawidłowych interpretacji przedstawionych w tabeli 2.

Tabela 2. Najczęstsze błędy analizy wyniku diagnostycznego w badaniach diagnostycznych w kierunku boreliozy

Rodzaj wyniku	Interpretacja
Fałszywie negatywny wynik serologiczny	zakażenie przed 4-6 tygodniami, brak wywołania odpowiedzi immunologicznej ze względu na wczesny etap zakażenia
Fałszywie pozytywny wynik serologiczny	po antybiotykoterapii wciąż produkowane są przeciwciała, wynik nie świadczy o utrzymującym się zakażeniu, reakcje krzyżowe, choroby autoimmunologiczne
Fałszywie pozytywny wynik PCR	obecność martwych krętków

Źródło: [18].

Jako wsparcie metod immunohistochemicznych można wymienić mikroskopię, (metody bezpośredniej detekcji) która występuje w różnych wariantach technologicznych. Mikroskopia FFM (ang. *focus floating microscopy*) – nowa technologia opracowana w 2007 roku – jest wymieniana jako wskazana metoda w przypadku objawów skórnych: rumienia wędrującego i zanikowego zapalenia skóry [47]. Jako zaletę mikroskopii FFM podaje się elastyczność strategii wykrywania mikroorganizmów, ponadto umożliwia ona pracę na różnych rodzajach materiału biologicznego: świeżo pobranego i nieutralowanego albo zamrożonego ciekłym azotem, albo zabezpieczonego w parafinie [48].

Dodatkowo w diagnostyce boreliozy w kierunku wykrywania krętków *Borrelia* stosowane są mikroskopy działające w technologii ciemnego pola (ang. *dark-field microscopy*) [14]. Mikroskopia jest jednak traktowana jedynie jako metoda wspierająca dla immunohistochemii (tak jak hodowle tkankowe), ponieważ jej wadą jest wiele wyników fałszywych [4].

W diagnostyce boreliozy szereg metod diagnostycznych, w tym niektóre z wcześniej omawianych, nie jest zalecanych. Wśród nich:

- metoda oznaczania chemokiny CXCL13, która jest markerem migracji limfocytów do ognisk zakażeń, do której wykorzystuje się test ELISA i badany jest płyn mózgowo-rdzeniowy, głównie z powodu braku potwierdzonych dowodów naukowych na jej skuteczność, a także na status cytokiny chemotaktycznej CXCL13 jako jedynie potencjalnego markera w neuroboreliozie;
- metoda LUAT (ang. *Lyme urine antigen test*) polegająca na oznaczaniu antygenów krętka w moczu;
- izolacja form przetrwalnikowych krętków (cyst i sferocyst);
- metoda oznaczania subpopulacji limfocytów o fenotypie CD57+/CD3, obniżenie liczby tych limfocytów, zgodnie z metodą, oznacza, że zakażenie krętkami *Borrelia* wciąż trwa, a na wyleczenie ma wskazywać prawidłowy odsetek limfocytów o wymienionym fenotypie;
- test transformacji limfocytów LTT (ang. *lymphocyte transformation test*), który oceni wczesną odpowiedź komórkową na infekcję krętkami *Borrelia*, zanim rozwiną się mechanizmy odpowiedzi humoralnej w organizmie [14, 17, 18].

Oznacza to, że pomimo stosowania ich w badaniach eksperymentalnych, wciąż brakuje wystarczającego potwierdzenia ich skuteczności. Jest to zachętą nie tylko do kontynuacji badań weryfikujących użyteczność diagnostyczną metod. Ponadto trzeba zwrócić uwagę na różne kierunki poszerzające wiedzę z zakresu diagnostyki immunohistochemicznej.

6. Nowe koncepcje i propozycje

Na samym początku części głównej artykułu poświęconej badaniom immunohistochemicznym wspomniano o wadach dotyczących w szczególności metod serologicznych. Obok wyników badań prowadzonych w celu tworzenia krajowych rekomendacji diagnostyki i leczenia [17], podobne wyniki dotyczą również badań uniwersyteckich. Zespół szwedzko-fiński (Smit i in.) [33] zbadał czułość szybkich testów diagnostycznych (RTD, ang. *rapid diagnostic tests*) w kierunku boreliozy i wykazał bardzo niską czułość (od 18% do 32% w zależności od rodzaju testu) przy zachowanej dość dobrej swoistości (od 85% do 88%), odrzucając ich przydatność w porównaniu do testów odbywających się w trybie laboratoryjnym.

Z kolei w badaniach laboratoryjnych sugerowany jest schemat diagnostyczny wykluczający podejścia 1-etapowe (ang. *one-tier diagnostics*), a preferowany obejmuje co najmniej 2 etapy (ang. *two-tier diagnostics*), gdzie badanie serologiczne jest wspomagane inną metodą [34]. Proponuje się także podejście wykonania serologii 2-etapowej [35]. Nie jest to zresztą nowe podejście, ponieważ na gruncie polskim było ono proponowane już kilkanaście lat temu. Tokarczuk-Rodak i in [36] wskazywały konieczność tworzenia diagnostyki serologicznej 2-etapowej, wykorzystując jedną spośród następujących metod: IFT, ELFA i ELISA, dodatkowo weryfikowanej testem WESTERN-BLOT. O ile 2-etapowe podejście do diagnostyki serologicznej w kierunku boreliozy jest rozpowszechnione [17, 34, 35], to w niektórych komercyjnych źródłach możliwe jest przekonywanie do podejścia etapowego w związku z wprowadzeniem na rynek szybkich testów diagnostycznych. Nawet testy promowane jako „zastępujące ścieżkę 2-etapową” (np. OptiPlex firmy Dia-Mex) okazują się być mniej skuteczne niż podejście etapowe „konserwatywne” [39].

Przyszłością może być też połączenie metod immunohistochemicznych z badaniami genetycznymi. Przykładem jest badanie Brandta i in. [24], którzy zastosowali metody

immunologiczne i histopatologiczne (biopsje 22 fragmentów skóry dotkniętych zanikowym zapaleniem skóry) z połączeniem metody PCR, która miała posłużyć do wykrycia i analizy filogenetycznej genotypu ospA i ospC krętków *Borrelia*, które są uważane za predyktory boreliozy w postaci przewlekłej.

Oprócz badań genetycznych krętków w literaturze spotyka się postulaty rozwijania wiedzy o metabolizmie krętków, które mogłyby być uzupełnieniem do badań immunohistochemicznych na ludzkim materiale biologicznym [26, 29].

Niewątpliwym wyzwaniem jest także rozwój metod immunohistochemicznych dla pacjentów, u których powikłania związane z boreliozą mogą być szczególnie niebezpieczne: kobiet w ciąży, u których borelioza oprócz objawów typowych może wykazywać działanie teratogenne [20]. Innymi grupami narażonymi są myśliwi, pracownicy leśni i leśnicy ze względu na duże ryzyko kontaktu z powodu wykonywania pracy na terenach leśnych [31].

Dodatkową zmienną wpływającą na zróżnicowanie podejść diagnostycznych może określać bardzo duża i powoli rosnąca różnorodność genetyczna (genogatunkowa) *Borrelia burgdorferi sensu lato*, do której obecnie zalicza się już 15 genogatunków (*B. garinii*, *B. afzelii*, *B. andersonii*, *B. bissettii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. japonica*, *B. tanukii*, *B. turdi*, *B. sinica*, *B. miyamotoi*, *B. mayonii*, *B. spielmanii*, *B. bavariensis*, *B. kurtenbachii*) [4, 18]. Aczkolwiek Płuża [27] sam wspomina o 20 genogatunkach. Blazejak i in. [28] z kolei wskazują na to, że w przyszłości kluczowe będzie zrozumienie roli każdego z genogatunków w epidemiologii (jaka jest rola każdego genogatunku *Borrelia burgdorferi sensu lato*) i w specyfice obrazu choroby. Wskazuje się, że różne genogatunki wpływają na częstość pojawiania się objawów ogółem oraz przebieg poszczególnych stadiów boreliozy, ponadto wybrane genogatunki powodują cięższy przebieg neuroboreliozy [25, 32]. Dzięki pogłębieniu wiedzy w tym zakresie pojawią się nowe możliwości doboru optymalnych algorytmów diagnostycznych i leczenia.

Jeszcze inne podejście, mogące pogłębiać wiedzę na temat możliwości rozwoju diagnostyki immunohistochemicznej w kierunku boreliozy, to badania historyczne materiału biologicznego. Cuellar i in. [44] wykonali takie badania na próbkach osocza ($n = 994$) zebranych w latach 60. i 70. XX wieku w Finaldii w ramach ogólnokrajowych badań tzw. „mobilnej kliniki” w celu określenia obecności przeciwciał IgG specyficznych dla zakażenia *B. burgdorferi*, a także oszacowania poziomów seroprewalencji w populacjach. Badania historyczne połączone z aktualnymi badaniami przesiewowymi populacji seroprewalencji pozwoliłyby na obserwacje długoterminowe zmian w rozpowszechnieniu przeciwciał, które jest jednym z parametrów odporności populacyjnej. Pomysł napotkał krytykę ze względu na wpływ, jaki mogą mieć warunki przechowywania osocza oraz wieloletni okres trwania przechowywania [45], aczkolwiek idea wykorzystania metod immunohistochemicznych w celu badania odporności populacyjnej i jej zmian w perspektywie czasowej również może być obiecująca.

Dodatkowym czynnikiem w rozwoju zastosowań metod immunohistochemicznych w diagnostyce boreliozy są także koinfekcje (kleszcze są nosicielami wielu patogenów odpowiedzialnych m.in. za kleszczowe zapalenie mózgu, babeszjozę, riketsjozę, anaplazmozę czy ehrlichiozę i wiele innych), które należy w trakcie badań rozpoznawać bądź wykluczać [4, 17, 49].

7. Wnioski

Można uważać, że rozwój związany z zastosowaniem metod immunohistochemicznych w diagnostyce boreliozy będzie trwał, zwłaszcza że jest publikowanych coraz więcej znormalizowanych zaleceń i rekomendacji w obrębie diagnostyki i leczenia – wydawanych na szczeblu krajowym przez instytucje i organy publiczne (w USA: CDC 2018 i CDC 2019, w Australii: AGDoH 2015), przez stowarzyszenia i towarzystwa lekarskie (we Francji: French Scientific Societies – FSS 2019, w Wielkiej Brytanii: National Institute for Health and Care Excellence (NICE) 2018, w Polsce: Polskie Towarzystwo Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych (PTEiLChZ) 2018, w Niemczech: Deutsche Borreliose-Gesellschaft (DBG) 2010), a także terytorialnym (np. w Kanadzie: Prince Edward Island – PEI 2019) [17].

W niniejszym artykule dokonano charakterystyki metod immunohistochemicznych stosowanych w diagnostyce w kierunku boreliozy. Praca wskazała konieczność rozwijania dwuetapowych modeli diagnostycznych, w których wyniki testów serologicznych typu EIA są potwierdzane przez testy WESTERN-BLOT, aczkolwiek być może w przyszłości możliwe będą nawet modele diagnostyki 3-etapowej albo uproszczone modele oparte na takich testach, które będzie cechowała bardzo wysoka czułość i swoistość, zaś ich celem będą bardzo specyficzne markery obecności krętków w ustroju ludzkim (m.in. wspomniana proteina VleS oraz jej peptydy C6 i IR6).

Wskazuje to także na dalszą potrzebę badań, identyfikacji przebiegu procesu chorobowego w przypadku różnych genogatunków *Borrelia burgdorferi*, co z kolei wpływa na zróżnicowane potrzeby i możliwości diagnostyczne na poszczególnych etapach choroby. Ponadto należy kontynuować kwerendę literatury w poszukiwaniu nowo powstałych metod immunohistochemicznych dla celów diagnozowania boreliozy, jak i nawet czysto teoretycznych propozycji modeli diagnostycznych, te bowiem mogą potem wchodzić w fazę realizacji (przykładem jest 2-etapowość w postępowaniu diagnostycznym, której potrzebę wprowadzenia podejrzewano już w badaniach z początku lat 90.) [42, 43].

Literatura

1. Wasiluk A., Zalewska-Szajda B., Waszkiewicz N., Kępka A., Szajda D.S., Wojewódzka-Żeleźniakowicz M., Ładny J.R., Pancewicz S., Zwierz Z.W., Zwierz K., *Lyme disease: etiology, pathogenesis, clinical courses, diagnostics and treatment*, Progress in Health Sciences, 11(2), 2011, s. 179-186.
2. Santos M., Ribeiro R., Hadad Junior V., Talhari S., *Lyme borreliosis*, Annales Brasileiros Dermatologicos, 85 (6), 2010, s. 930-938.
3. Kullberg B.J., Vrijmoeth H.D., Schoor D.E., *Lyme borreliosis: diagnosis and management*, British Medical Journal, 369, 2020, s. 10-41.
4. Flisiak R., Pancewicz S., *Diagnostyka i leczenie Boreliozy z Lyme – zalecenia Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych*, Przegląd Epidemiologiczny, 62, 2008, s. 193-199.
5. Stefanoff P., Rosińska M., Zieliński A., *Epidemiologia chorób przenoszonych przez kleszcze w Polsce*, Przegląd Epidemiologiczny, 60, 2006, s. 151-159.
6. Ćwikliński J., Sumowska A., *Borelioza i kleszczowe zapalenie mózgu – epidemiologia w Polsce w latach 2016-2020*, [w:] Ossowska-Salamonowicz R., Giżyńska M. (red.), *Monografie MSKN 2022, t. 1: Aktualne problemy badawcze – nauki biomedyczne i techniczne*, Wydawnictwo FNCE, Poznań 2022, s. 67-76.

7. Chorążewicz J., Glasner P., Glasner L., Słomiński M., *Obustronne, wewnątrzgłowe zapalenie nerwu wzrokowego w przebiegu boreliozy ocznej – opis przypadku*, Forum Medycyny Rodzinnej, 8(5), 2014, s. 233-237.
8. Biesiada G., Czepiel J., Leśniak M., Garlicki A., Mach T., *Analiza czynników epidemiologicznych, objawów klinicznych i markerów serologicznych*, Przegląd Lekarski, 67(3), 2010, s. 181-183.
9. Dworżańska E., Bartosik-Psujek H., *Neuroborelioza*, Reumatologia, 51(1), 2013, s. 63-67.
10. Dudzińska M., Stettner D., *Manifestacje kliniczne neuroboreliozy w materiale Oddziału Neurologii Dziecięcej w Chorzowie*, Neurologia Dziecięca, 20(40), 2011, s. 27-33.
11. Brodziński S., Nasierowski T., *Zaburzenia psychotyczne w przebiegu zakażenia Borrelia burgdorferi – część II: opisy przypadków*, Psychiatria Polska, 53(3), 2019, s. 641-653.
12. Schwenkenbecher P., Pul R., Wurster U., Conzen J., Pars K., Hartmann H., Sühs K.-W., Sedlacek L., Stangel M., Trebst C., Skripuletz T., *Common and uncommon neurological manifestations of neuroborreliosis leading to hospitalization*, BMC Infectious Diseases, 17(90), 2017, <https://doi.org/10.1186/s12879-016-2112-z> [dostęp: 11.11.2022].
13. Knudtzen F.C., Skaarup Andersen N., Jensen T.G., Skarphedinnsson S., *Characteristics and clinical outcome of Lyme neuroborreliosis in a high endemic area, 1995-2014: a retrospective cohort study in Denmark*, Clinical Infectious Diseases, 65, 2017, s. 1489-1495.
14. Rupprecht T.A., Fingerle V., *Neuroborreliosis: pathogenesis, symptoms, diagnosis and treatment*, Future Neurology, 6(2), 2011, <https://doi.org/10.2217/fnl.10.89> [dostęp: 10.11.2022].
15. Oliai B.R., *Immunohistochemistry in the diagnosis of Lyme Disease*, The Focus – Immunohistochemistry, 7, 2007, s. 17-18.
16. Felber W. M., Reimer C.D., de Koning J., Fischer P., Pilz A., Pongratz D.E., *Myositis in Lyme borreliosis: An immunohistochemical study of seven patients*, Journal of Neurological Sciences, 118(2), 1993, s. 207-212.
17. Rekomendacja nr 2/2020 z dnia 30 listopada 2020 r. Prezesa Agencji Oceny Technologii Medycznych i Taryfikacji w sprawie zalecanych technologii medycznych, działań przeprowadzanych w ramach programów polityki zdrowotnej oraz warunków realizacji tych programów, dotyczących profilaktyki chorób odkleszczowych (boreliozy), https://bipold.aotm.gov.pl/assets/files/ppz/2020/REK/2_2020.pdf [dostęp: 10.11.2022].
18. Smoleńska Ż., Matyjasek A., Zdrojewski Z., *Borelioza — najnowsze rekomendacje w diagnostyce i leczeniu*, Forum Reumatologii, 2(2), 2016, s. 58-64.
19. Pancewicz S., Moniuszko-Malinowska A., Garlicki A., Grygorczuk S., Czupryna P., Dunaj J., *Diagnostyka i leczenie boreliozy z Lyme. Standardy Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych*, http://www.pteilchz.org.pl/wp-content/uploads/2018/11/borelioza_z_lyme_2018.pdf [dostęp: 5.11.2022].
20. Szymik M., Kotlińska A., Jaworowski A., Rybak-Krzyszowska M., Kaim I., Richter B., Huras H., Szymik K., *Cięża powikłana boreliozą*, GinPolMedProject, 2(52), 2019, s. 54-59.
21. Duray P.H., *Histopathology of clinical phases of human Lyme disease*, Rheumatic Disease Clinics of North America, 15(4), 1989, s. 691-710.
22. Pedrycz-Wieczorska A., *Analysis of methods for diagnosing borreliosis – Lyme disease*, Health Problems and Civilization, 11(2), 2017, s. 80-86.
23. De Koning J., Duray P.H., *Histopathology of human Lyme borreliosis*, [w:] Weber K., Burgdorfer W., Schierz G. (red.), *Aspects of Lyme boreliosis*, Springer, Berlin 1993, s. 70-92.
24. Brandt F.C., Ertas B., Falk T.M., Metz D., Böer-Auer A., *Histopathology and immunophenotype of acrodermatitis chronica atrophicans correlated with ospA and ospC genotypes of Borrelia species*, Journal of Cutaneous Pathology, 42(10), 2015, s. 674-692.
25. Trevisani G., Bonin S., Ruscio M., *A practical approach to the diagnosis of Lyme borreliosis: from clinical heterogeneity to laboratory methods*, Frontiers in Medicine,

- 7(265), J2020, <https://www.frontiersin.org/articles/j10.3389/fmed.2020.00265/full> [dostęp: 10.11.2022].
26. *Current efforts in Lyme disease research*, 2019, NIAID, <https://www.niaid.nih.gov/sites/default/files/NIAIDLymeReport.pdf> [data dostępu: 11.11.2022].
 27. Plusa T., *Aktualne zagrożenie zakażeniem Borrelia burgdorferi*, Lekarz POZ, 3, 2018, s. 227-237.
 28. Błażej K., Raulf M.-K., Janecek E., Jordan D., Fingerle V., Strube Ch., *Shifts in Borrelia burgdorferi (s.l.) geno-species infections in Ixodes ricinus over a 10-year surveillance period in the city of Hanover (Germany) and Borrelia miyamotoi – specific Reverse Line Blot detection*, Parasites & Vectors, 11, 304, 2018, <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2882-9> [dostęp: 12.11.2022].
 29. Liotta L., Luchini A., *Unconventional approaches to direct detection of borreliosis and other tick borne illnesses: a path forward*, Journal of Cellular Immunology, 3(3), 2021, s. 164-172.
 30. Tülin Gulec A., Seckin D., *False-positive Borrelia burgdorferi serology in erythema induratum of Bazin*, Journal of Ankara Medical School, 24(3), 2002, s. 143-148.
 31. Tokarska-Rodak M., Shkilna M., Plewik M., Pańczuk P., Korda M., Klishch I., Paszkiewicz J., Andreychyn M., *Badania serologiczne w kierunku boreliozy z Lyme wśród myśliwych i pracowników leśnictwa w wybranych obszarach Polski i Ukrainy*, Health Problems of Civilization 114, 2017, s. 287-292.
 32. Peter O., Bretz A.-G., Postić D., Dayer E., *Association of distinct species of Borrelia burgdorferi sensu lato with neuroborreliosis in Switzerland*, Clinical Microbiology and Infection, 3(4), 1997, s. 423-431.
 33. Smit P.W., Kurkela S., Kuusi M., Vapalahti O., *Evaluation of two commercially available rapid diagnostic tests for Lyme borreliosis*, European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 34(1), 2014, s. 109-113.
 34. Baarsma E., Schellenkens E., Meljer B.C., Breandenburg A., *Diagnostic parameters of modified two-tier testing in European patients with early Lyme disease*, European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 39(9), 2020, s. 1-10.
 35. Maulden A.B., Garro A.C., Balamuth F., Levas M.N., *Two-tier Lyme disease serology test results can vary according to the specific first-tier test use*, Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society, 9(2), 2019, s. 128-133.
 36. Tokarska-Rodak M., Pańczuk A., Koziół-Montewka M., *Dwustopniowa diagnostyka serologiczna boreliozy – weryfikacja metod*, Rozprawy Naukowe, 1, 2007, s. 165-173.
 37. Matuszek P., *Zrozumieć diagnostykę boreliozy*, Diagnosta Laboratoryjny, 3(56), 2019, s. 24-27.
 38. Alcon-Chino M.E.T., De-Simone S.G., *Recent advances in the immunologic method applied to tick-borne diseases in Brazil*, Pathogens, 11(870), <https://doi.org/10.3390/pathogens11080870> [dostęp: 10.11.2022].
 39. Wojciechowska-Koszko I., Działlik J., Kwiatkowski P., Roszkowska P., Sienkiewicz M., Dołęgowska B., *Could the Optiplex Borrelia assay replace the traditional, two-step method of diagnosing Lyme disease?*, Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 29(1), s. 63-71.
 40. Hajdrowska B., Wielkoszyński T., Strzelczyk J., Cuber P., Wiczkowski A., *Ocena zgodności wyników oznaczania przeciwciał przeciw Borrelia burgdorferi sensu lato uzyskanych techniką ELISA z wykorzystaniem testów różnych producentów*, Hygeia Public Health, 52(4), 2017, s. 367-374.
 41. Noworyta J., Machcińska M., Brasse-Rumin M., Ząbek J., Gago J., *Metoda Western blot jako niezbędny etap diagnostyki serologicznej w kierunku boreliozy z Lyme*, Reumatologia, 50(5), 2012, s. 397-402.

42. Dressler F., Whalen J.A., Reinhardt B.N., Steere A., *Western Blotting in the serodiagnosis of Lyme disease*, The Journal of Infectious Diseases, 167(2), 1993, s. 392-400.
43. Ma B., Christen B., Leung D., Vigo-Pelfrey C., *Serodiagnosis of Lyme Borreliosis by Western Immunoblot: reactivity of various significant antibodies against Borrelia burgdorferi*, Journal of Clinical Microbiology, 30(2), 1992, s. 370-376.
44. Cuellar J., Dub T., Sane J., Hytönen J., *Seroprevalence of Lyme borreliosis in Finland 50 years ago*, Clinical Microbiology and Infection, 26(5), 2020, s. 632-636.
45. Zhang R., Gong T., Chen T., Zhang N., Miao F., Chen Q., Feng Y., Ji L., Zhao J., *Re: „Seroprevalence of Lyme borreliosis in Finland 50 years ago” by Cuellar et al.*, Clinical Microbiology and Infection, 26, 2020, s. 949-950.
46. Krzemię P.J., *Role of VlsE/C6 antigen as a marker for early Lyme borreliosis diagnosis and monitoring the effectiveness of its treatment*, Health Problems of Civilization, 11(2), 2017, s. 87-92.
47. Eisendle K., Grabner T., Zelger B., *Focus floating microscopy „gold standard” for Cutaneous Borreliosis?* American Journal of Clinical Pathology, 127(2), s. 213-222.
48. Bonin S., *Diagnostic tools for Borrelia assessment in humans*, The Open Dermatology Journal, 10, 2016, s. 62-69.
49. Rocha S.C., Vasquez Velazquez C., Aquib A., Al-Nazal A., Parveen N., *Transmission cycle of tick-borne infections and co-infections, animal models and diseases*, Pathogens, 11, 1309, <https://doi.org/10.3390/pathogens11111309> [dostęp: 14.11.2022].

Badania immunohistochemiczne w boreliozie

Streszczenie

Niniejszy artykuł dotyczy zagadnienia badań immunohistochemicznych w diagnostyce boreliozy (choroby z Lyme). W pracy został przedstawiony przebieg boreliozy obejmujący 3 stadia. Stadium 1. charakteryzujące się głównie objawami skórными, m.in. rumieniem wędrującym. W stadium 2. główne objawy to bóle stawów, zapalenie opon i korzeni nerwowych czy zapalenie mięśnia sercowego. W stadium 3. choroby dochodzi do przewlekłej neuroboreliozy. Artykuł opisuje także metody leczenia boreliozy. Główna część pracy natomiast jest poświęcona znaczeniu i zastosowaniach badań immunohistochemicznych w diagnozowaniu boreliozy. Przyczyną zainteresowania tymi badaniami jest wysoka czułość i swoistość testów, na wyższym poziomie niż np. w metodzie PCR. W artykule zostało omówione zastosowanie różnych metod badań immunohistochemicznych dla diagnostyki boreliozy: badań histologicznych, barwienia immunohistochemicznego, testów EIA, WESTERN-BLOT, testów CIC i wielu innych, wraz ze wsparciem takich metod jak mikroskopia FFM. Zastosowano metodę pracy ze źródłami wtórnymi, a także metodę porównań poglądów autorów, a zatem wprowadzono elementy analizy komparatywnej. Analiza zawarta w artykule przedstawia stan prac nad rozpoznaniem zastosowań metod badań immunohistochemicznych w literaturze.

Wnioski płynące z przeprowadzonej analizy wskazują na konieczność dalszych prac nad zagadnieniem, a także nad wykorzystaniem wiedzy uzyskiwanej dzięki diagnostyce immunohistochemicznej na potrzeby skutecznego leczenia osób chorych. Dalsze badania powinny uwzględniać perspektywę rozpoznawania znaczenia efektów łącznego stosowania różnych metod.

Słowa kluczowe: badania immunohistochemiczne, borelioza, diagnostyka, leczenie, stadium

Immunohistochemical examination in borreliosis

Abstract

The following article concerns the topic of immunohistochemical examination in borreliosis diagnostics (Lyme's disease). In the text, the progress of borreliosis will be presented and this shall include 3 stage: stage no. 1 that is characterized by skin manifestations, i.e. erythema migrans. In stage no. 2 the main symptoms are arthritis, meningoradiculitis, and carditis. In stage no. 3 patients suffer from acrodermatitis chronica atrophicans. The article will also describe methods of medical treatment targeted on borreliosis patients. The main part of the article, however, is dedicated to the significance and applicability of immunohistochemical examination methods for purposes of diagnosis. The cause of interest for these examination methods, including tests, is that they are highly sensitive and specific, better in comparison to – for example – PCR tests. In the article, applicability of various immunohistochemical methods will be analysed: histological

examination, immunohistochemical staining, EIA tests, Western-Blot, CIC tests and many others, including such auxiliary methods as FFM microscopy.

Research method in the article is analysis of secondary sources, as well as comparative analysis for juxtaposition of positions of various authors. The analysis conducted in the article shows the state of the art of the scientific literature discourse for recognition of how various immunohistochemical examination methods could be applicable for the purposes of diagnostics in borreliosis cases.

The conclusions that could be drawn from the analysis show that there is a necessity to go further with work on this topic, as well as for the use of knowledge obtained from immunohistochemical examination for better treatment of borreliosis patients. Further research should take into account hybrid (combined) use of various methods of immunohistochemical examination.

Keywords: borreliosis, diagnostics, immunohistochemical examination, stage, treatment

Odkrywając tajemnice cząsteczki życia – krótka historia niezwyklej naukowej podróży. DNA i dziedziczenie

1. Wprowadzenie

W tym roku (2023) mija 70. rocznica rozszyfrowania struktury DNA, co dwóch głównych autorów tego niezwyklego odkrycia świętowało 28 lutego 1953 podczas uroczystego lunchu w pubie „Eagle” w Cambridge (Wielka Brytania). Kilka tygodni później, 25 kwietnia 1953, na łamach prestiżowego czasopisma naukowego „Nature”, ukazało się kilka krótkich komunikatów naukowych poświęconych tej cząsteczce. Publikacje te szybko okazały się przełomowe, dając początek zupełnie nowym dziedzinom wiedzy, a DNA stało się prawdziwą naukową „gwiazdą” oraz bohaterem wielu best-sellerów [np. 1-4]. Ta fascynująca naukowa opowieść zaczęła się jednak znacznie wcześniej, niemal 100 lat przed rozszyfrowaniem tajemnicy życia...

2. Życiodajna cząsteczka, czyli o tym, jak odkrywano świat DNA (i RNA)

Pierwsze badania nad grupą związków organicznych, której najbardziej znanym przedstawicielem jest DNA, zawdzięczamy nieco zapomnianemu i niedocenianemu szwajcarskiemu lekarzowi i biologowi o nazwisku Johann Friedrich Miescher (1844-1895), który pracował pod okiem bardzo znanego niemieckiego chemika i fizjologa, uważanego za pioniera biochemii oraz biologii molekularnej, Ernsta Felixa Immanuela Hoppe-Seylera (1825-1895). Początkowo Miescher interesował się białkami (które wtedy, i jeszcze długo potem, były uważane za najważniejsze składniki komórek i chemiczne „nośniki” życia), ale z czasem zaczął izolować i badać materiał zawarty w jądrach komórkowych, który, jak się niedługo okazało, zbudowany był z białek i jakiejś tajemniczej, nieznaney dotąd substancji. Dla podkreślenia jądrowego pochodzenia tego materiału nazwał go „nukleina” (od łac. *nucleus*). W wyniku swoich eksperymentów, z których najważniejsze przypadają na lata 1869-1874, Miescher odkrył, że nukleina jest nierozpuszczalna w wodzie oraz w rozpuszczalnikach organicznych, rozpuszcza się z kolei w środowisku zasadowym, w kwaśnym zaś ulega wytrąceniu. Zasugerował, że ma charakter kwaśny. W wyniku analizy składu chemicznego tajemniczej substancji odkrył, że, w przeciwieństwie do białek, nie zawiera ona w ogóle siarki, za to cechuje się dużą ilością fosforu [1, 2, 5-10].

Wyniki badań przeprowadzonych przez Mieschera zainspirowały innych naukowców, którzy zaczęli interesować się nowo odkrytą substancją. Wśród nich był niemiecki biochemik, Ludwig Karl Martin Leonhard Albrecht Kossel (1853-1927), który odkrył, że w skład nukleiny wchodzi cykliczne cząsteczki, znane obecnie pod nazwą zasad azotowych oraz wyizolował 3 z nich: adeninę (w roku 1885), którą pozyskano z trzustki bydłowej i nadano jej nazwę od gr. *aden* (gruczoł); tyminę (w roku 1893), którą pozyskano

¹ kostka@agh.edu.pl, Katedra Ochrony Środowiska, Wydział Geologii Geofizyki i Ochrony Środowiska, AGH Akademia Górniczo-Hutnicza w Krakowie, <https://www.agh.edu.pl>.

z grasicy cielejącej i której nadano nazwę od łac. *thymus* (grasica) oraz cytozynę (w roku 1894), którą również pozyskano z grasicy cielejącej i której nazwa pochodzi od gr. i łac. *cyto* (komórka). Kossel zidentyfikował także cukry i kwas fosforowy jako kolejne składniki nukleiny [5, 6, 10, 11]. W roku 1910 badacz ten został za swoje osiągnięcia uhonorowany Nagrodą Nobla z dziedziny fizjologii lub medycyny, w uznaniu wkładu w wiedzę na temat chemii komórki poczynionego w jego pracy nad białkami, włączając w to substancje nukleinowe [12]. Guaninę, czyli czwartą z pięciu zasad azotowych (choć pierwszą w kolejności historycznej) w roku 1844 odkrył niemiecki chemik, Julius Bodo Unger (1819-1885). Wyizolowano ją z ptasich odchodów, czyli guana, czemu cząsteczka ta zawdzięcza swą nazwę [10, 13]. Ostatnią zasadę azotową wchodzącą w skład kwasów nukleinowych, czyli uracyl, poznano w roku 1900 dzięki włoskiemu serologowi, biochemikowi i higieniście o nazwisku Alberto Ascoli (1877-1957), który wyizolował ten związek z komórek drożdży [10, 14]. Nazwa uracylu pochodzi od łac. *urina* (mocz), jako że kwas moczowy jest metabolitem purynowych zasad azotowych, w tym właśnie uracylu. Warto jeszcze wspomnieć o metylowanej pochodnej cytozyny, 5-metylocytozynie, którą odkryto w roku 1925 [10, 15] i która kilkadziesiąt lat później okazała się niezwykle ważna dla nowej gałęzi genetyki – epigenetyki [16].

Współcześnie używaną nazwę określającą nukleinę, czyli kwasy nukleinowe, zawdzięczamy niemieckiemu patologowi i histologowi, Richardowi Altmannowi (1852-1900), który zaproponował ten termin w roku 1889 po tym, jak udało mu się oczyścić nukleinę z białek, uzyskując czystą „substancję nukleinową” o kwaśnym charakterze [5, 7, 10]. Kolejne elementy układanki dotyczącej składu chemicznego kwasów nukleinowych dołożył rosyjsko-amerykański biochemik o polskich korzeniach, Phoebus Aaron Theodor Levene (1869-1940), który w roku 1909 wraz ze swoim zespołem odkrył, że niektóre substancje nukleinowe zawierają w swoim składzie 5-węglowy cukier – rybozę. Nazwa ta powstała jako rearanżacja liter tworzących nazwę innego cukru, arabinozy (ang. *arabinose*), będącej izomerem rybozy (ang. *ribose*.) Dwie dekady później odkryto, że niektóre kwasy nukleinowe zawierają rybozę pozbawioną jednego atomu tlenu – deoksyrybozę. Ostatecznie w roku 1930 Levene zaproponował wprowadzenie jednoznacznych określeń mających pomóc odróżnić od siebie te 2 rodzaje substancji nukleinowych i w ten sposób powstały obecnie używane nazwy: kwas rybonukleinowy (RNA, ang. *ribonucleic acid*) oraz kwas deoksyrybonukleinowy (DNA, ang. *deoxyribonucleic acid*). Levene jest też autorem takich pojęć jak „nukleotyd” oraz „nukleozyd” [2, 5, 7, 8, 10]. Badania nad budową chemiczną kwasów nukleinowych kontynuował w latach 40. i 50. XX wieku szkocki biochemik, Alexander Robert Todd (1907-1997) i wykazał on m.in., że w obrębie cząsteczki kwasów nukleinowych występują wiązania fosfodiesterowe, które łączą poszczególne nukleotydy [10]. W uhonorowaniu tych i innych osiągnięć Todda, w roku 1957 przyznano mu Nagrodę Nobla z dziedziny chemii, za badania nukleotydów i koenzymów nukleotydowych [12].

Kolejnym krokiem na drodze ku rozwikłaniu tajemnicy kwasów nukleinowych było rozszyfrowanie ich struktury, co okazało się być niełatwym zadaniem. Początkowo uważano np., że u roślin i zwierząt występują różne rodzaje kwasów nukleinowych, zawierające odpowiednio uracyl (RNA, kwas drożdżowy, fitonukleinowy, roślinny) lub tyminę (DNA, kwas grasicowy, tymonukleinowy, zwierzęcy). Przekonanie to obalili dopiero belgijski biochemik, Jean Louis Auguste Brachet (1909-1988), który w 1939 roku wykazał, że zarówno w komórkach roślinnych, jak i zwierzęcych występują obydwa

rodzaje kwasów nukleinowych. Dość długo, bo aż do końca lat 40. XX wieku, funkcjonowała także zupełnie błędna (zaproponowana przez wspomnianego wyżej Levene'a) koncepcja mówiąca o tym, że kwasy nukleinowe to małe cząsteczki zbudowane z powtarzających się zestawów 4 nukleotydów. Obalono ją dopiero po opracowaniu mniej agresywnych metod izolacji tych związków z komórki, pozwalających na uzyskanie nieuszkodzonych cząsteczek o wielkiej masie cząsteczkowej, a prawdziwym przełomem okazały się badania austriackiego biochemika, Erwina Chargaffa (1905-2002). Wykazał on, że procentowy udział poszczególnych zasad azotowych w DNA różnych gatunków jest różny (co wskazywało, że może być to cząsteczka kodująca informację), zaś w roku 1950 odkrył, że ilości zasad azotowych w poszczególnych cząsteczkach kwasów nukleinowych nie są równe (co przeczyło koncepcji ich 4-nukleotydowej, powtarzalnej struktury) oraz że:

1. ilość zasad purynowych jest równa ilości zasad pirymidynowych ($A + G = C + T$);
2. ilość guaniny jest równa ilości cytozyny ($G = C$);
3. ilość adeniny jest równa ilości tyminy ($A = T$).

Odkrycia te nazywane są obecnie „regułami Chargaffa”, a niedługo potem doprowadziły to opisanie tzw. zasady komplementarności, mówiącej o tym, że adenina łączy się zawsze z tyminą, zaś cytozyna z guaniną. Zasada ta naprowadziła wreszcie naukowców próbujących rozszyfrować strukturę DNA na właściwy trop. Prawidłowy model cząsteczki zaprezentowano światu w roku 1953, a bohaterami tego odkrycia zostali: amerykański genetyk i biochemik, James Dawey Watson (ur. w 1928) oraz brytyjski biochemik, genetyk i biolog molekularny, Francis Harry Compton Crick (1916-2004) [1, 2, 5, 7, 9, 10, 17, 18].

Należy jednak zaznaczyć, że wkład w to przełomowe odkrycie miało również wielu innych naukowców. W roku 1938 szwajcarski chemik, Rudolf Signer (1903-1990) zasugerował, że cząsteczka DNA tworzy strukturę przypominającą pierścienie ułożone prostopadle do jej osi. Dostarczył on także wysokiej jakości materiał do badań swoim kolegom po fachu, którzy wykorzystali do jego analizy dość nową wtedy metodę badawczą, a mianowicie krystalografię rentgenowską. Technika ta pozwala badać położenie poszczególnych atomów w substancji krystalicznej, gdyż atomy te zmieniają bieg promieni X w charakterystyczny dla siebie sposób, co przekłada się na uzyskanie konkretnego wzoru „wypalonego” na kliszy fotograficznej (obecnie na matrycach CCD). Interpretacja takiego obrazu nie jest łatwa, ale możliwa. Jedną z pierwszych substancji organicznych, których strukturę określono w ten sposób, była penicylina, a dokonała tego w roku 1949 brytyjska biochemiczka, Dorothy Mary Crowfoot Hodgkin (1910-1994) [2, 8, 10]. W uznaniu tych i innych zasług w roku 1964 została ona uhonorowana Nagrodą Nobla z dziedziny chemii, *za ustalenie budowy ważnych substancji biochemicznych przy pomocy techniki promieniowania rentgenowskiego* [12]. W roku 1951, dzięki wykorzystaniu promieni X, udało się ustalić drugorzędową strukturę przestrzenną pierwszego białka, a dokonał tego amerykański fizyk i chemik o bardzo szerokich zainteresowaniach i imponujących dokonaniach naukowych, później także działacz społeczny i polityk, Linus Carl Pauling (1901-1994) [1, 2]. Dwukrotnie został on laureatem Nagrody Nobla: najpierw w roku 1954 z dziedziny chemii, *za prace nad wiązaniami chemicznymi i ich zastosowanie w wyjaśnieniu budowy związków kompleksowych*, a następnie pokojowej w roku 1962, *za wysiłki na rzecz rozbrojenia i kampanię przeciwko próbom jądrowym* [12, 19]. Jest on także swoistym współtwórcą sukcesu brytyjskich odkrywców struktury DNA, gdyż jego laboratorium również nad tym intensywnie pracowało, co napędzało

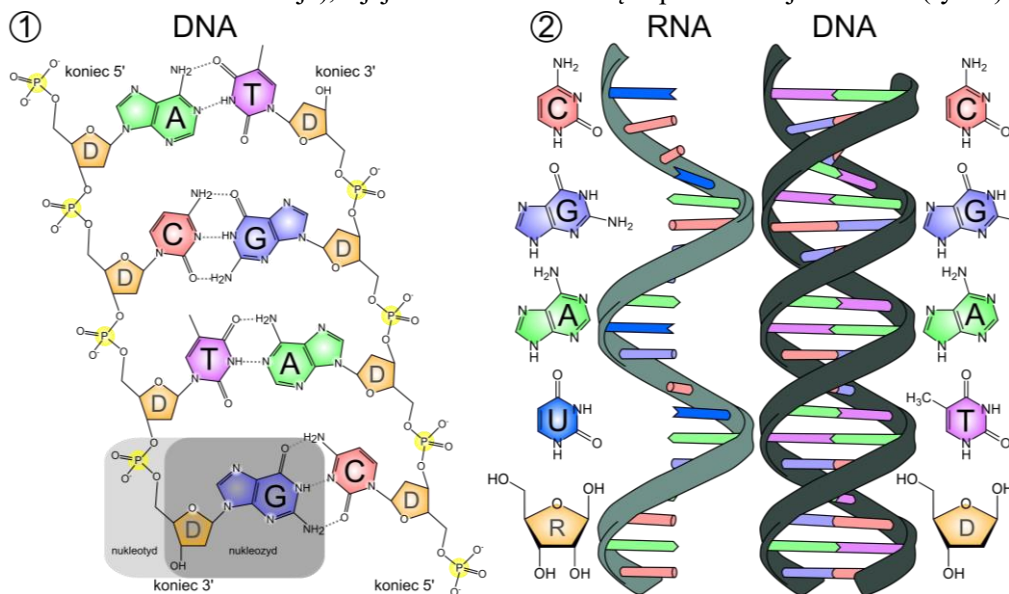
wyścig konkurencyjny i znacznie przyspieszało prace. W późniejszym czasie Paulinga dopadła niestety tzw. „choroba Noblistów” (ang. *Nobel disease* lub *nobelitis*) i zaczął on głosić zupełnie nienaukowe teorie na temat ogromnych dawek witaminy C, mających być remedium na całe spektrum problemów zdrowotnych, od przeziębienia po nowotwory, a nowo powstałą gałąź „nauki” nazwano medycyną ortomolekularną [20-22].

Pierwsze zdjęcie cząsteczki DNA z wykorzystaniem krystalografii rentgenowskiej wykonała w roku 1936 brytyjska badaczka, Florence Ogilvy Bell, później Sawyer (1913-2000) [23]. Te najcenniejsze zaś powstały w King’s College w Londynie (Wielka Brytania) i wyszły spod ręki zespołu, w skład którego wchodził: nowozelandzko-brytyjski biochemik i biofizyk, Maurice Hugh Frederick Wilkins (1916-2004), brytyjski biofizyk, Raymond George Gosling (1926-2015) oraz brytyjska biofizyczka i specjalistka z dziedziny rentgenografii strukturalnej, Rosalind Elsie Franklin (1920-1958). Ta ostatnia wykonała tę najbardziej znaną, przełomową fotografię nr 51 oraz poprawnie ją zinterpretowała, naprowadzając swoich kolegów na właściwy model struktury przestrzennej DNA. W pracach tych uczestniczyli także dwaj brytyjscy fizycy: Alexander Rawson Stokes (1919-2003) oraz Herbert Rees Wilson (1929-2008) [1, 2, 4, 7-10]. Ustalenia brytyjskiej grupy badawczej opublikowano w 3 komunikatach (w tym samym numerze prestiżowego „Nature” z roku 1953) [24-26], a zawarte w nich odkrycia okazały się przełomowe i otworzyły zupełnie nowy rozdział w naukach biologicznych.

Należało się spodziewać, że tak fundamentalne odkrycie zostanie dostrzeżone przez Komitet Noblowski. Podium tego największego naukowego wyróżnienia jest jednak ciasne (w danej kategorii w danym roku nagradza się maksymalnie 3 osoby), a zasłużonych było sporo. Franklin wkrótce zmarła na nowotwór, tym samym „ustępując miejsca” innym (nagród tych nie przyznaje się pośmiertnie). Ostatecznie Nagrodą Nobla z dziedziny fizjologii lub medycyny w roku 1962 uhonorowano Cricka, Watsona i Wilkinsa, *za odkrycie dotyczące struktury molekularnej kwasów nukleinowych i jej znaczenia w przekazywaniu informacji w substancjach ożywionych* [1, 4, 9, 12]. Watson niedługo potem (w roku 1968) wydał książkę na temat swojej przygody z DNA pt. „The Double Helix: A Personal Account of the Discovery of the Structure of DNA” [27], wielokrotnie później wznawianą i znaną pod polskim tytułem jako „Podwójna helisa. Historia odkrycia struktury DNA”. Książka ta z jednej strony została bardzo entuzjastycznie przyjęta, z drugiej wzbudzała silne kontrowersje ze względu na sposób, w jaki zostali w niej przedstawieni współtwórcy sukcesu Watsona (wyrażał się o nich z wyraźną wyższością), a w szczególności ze względu na wysoce pogardliwe, protekcyjne i bardzo niesprawiedliwe uwagi wobec, nieżyjącej już wtedy, Rosalind Franklin. Watson dołączył także do niechlubnego grona naukowców, których dotknęła „choroba Noblistów” (na czym być może zaważył jego buńczuczny charakter oraz arogancki sposób bycia) i jeszcze do roku 2018 wygłaszał kontrowersyjne i nienaukowe opinie o zabarwieniu eugenicznoracistowskim [2, 4, 22].

Budowa kwasów nukleinowych, a zwłaszcza struktura cząsteczki DNA, która budziła największe naukowe emocje, nie stanowi już obecnie tajemnicy, a jej szczegóły można znaleźć w dowolnym podręczniku do biologii lub biochemii [np. 18, 28]. Kwasy nukleinowe to makrocząsteczki zwane polinukleotydami, jako że podstawową podjednostkę tych polimerów stanowi nukleotyd. Ten z kolei składa się z zasady azotowej, połączonej wiązaniem *N*-glikozydowym z 5-węglowym cukrem, który z kolei wiąże się z resztą

kwasy ortofosforowe. Nukleotydy pozbawione reszty fosforanowej nazywane są nukleozydami. W obrębie zasad azotowych wyróżnić można 2 ich podgrupy: 2-pierścieniowe puryny (adenina, guanina) oraz 1-pierścieniowe pirymidyny (cytozyna, tymina, uracyl). Różnice pomiędzy 2 rodzajami kwasów nukleinowych, czyli DNA i RNA, zaznaczają się już na etapie budowy chemicznej. Cukrem występującym w DNA jest deoksyryboza, zaś w RNA – ryboza (stąd zresztą nazwy tych cząsteczek, o czym już wspomniano). Zasady azotowe budujące DNA to adenina, guanina, cytozyna i tymina, podczas gdy w RNA zamiast tyminy występuje uracyl. Pojedyncze nukleotydy łączą się w polimery za pośrednictwem reszt fosforanowych, które spinają poszczególne monomery wiązaniem fosfodiestrowym, łącząc cukry wchodzące w skład kolejnych nukleotydów. Końce cząsteczek kwasów nukleinowych nie są „symetryczne”, co wynika z tego, że na jednym biegunie występuje reszta fosforanowa połączona z węglem 5' rybozy bądź deoksyrybozy, podczas gdy drugi biegun zakończony jest resztą hydroksylową przy węglu 3' odpowiedniego cukru. Cząsteczka posiada więc swoistą kierunkowość (która ma swoje molekularne konsekwencje), a jej końce oznaczane są odpowiednio jako 5' i 3' (rys. 1).



Rysunek 1. Szczegóły budowy cząsteczki DNA (1) oraz porównanie RNA i DNA (2): A – adenina, G – guanina, C – cytozyna, T – tymina, U – uracyl, D – deoksyryboza, R – ryboza (dalsze szczegóły i objaśnienia w tekście); opracowanie własne na podstawie [29] (1) oraz [30] (2), zmodyfikowane (Otwarte Zasoby Edukacyjne, na licencji CC BY-SA)

Różnice pomiędzy DNA i RNA dotyczą także ich struktury, która z kolei wiąże się z ich funkcją biologiczną (o czym trochę więcej w kolejnej części tej historii [31]). RNA jest zasadniczo jednociowe, podczas gdy DNA jest dwuniciowe (dla porządku należy zaznaczyć, że jest to pewne uproszczenie, gdyż niektóre odmiany cząsteczek RNA mogą być fragmentami lub w całości dwuniciowe, zaś w świecie wirusów znaleźć można wszystkie odmiany kwasów nukleinowych w formach zarówno jedno-, jak i dwuniciowych). Największym sukcesem uhonorowanego Nagrodą Nobla brytyjskiego zespołu badawczego było właśnie rozszyfrowanie struktury DNA, które okazało się być cząsteczką dwuniciową, gdzie nici łączą się ze sobą i skręcają w charakterystyczny sposób, tworząc

podwójną helisę, wewnątrz której znajdują się zasady azotowe (na rysunkach przedstawiane często w uproszczeniu jako szczeble drabiny) i której zewnętrzny „szkielet” (na rysunkach przedstawiany jako stelaż drabiny) budują cukry oraz reszty fosforanowe. Nici podwójnej helisy są przeciwbieżne, tzn. biegną w przeciwnych kierunkach ($5' \rightarrow 3'$ oraz $3' \rightarrow 5'$), a spajają je zasady azotowe, łączące się ze sobą zgodnie z zasadą komplementarności wynikłą z reguł Chargaffa: adenina jednej nici łączy się zawsze z tyminą drugiej nici (podwójnym wiązaniem wodorowym), zaś cytozyna paruje się zawsze z guaniną (potrójnym wiązaniem wodorowym). Kolejność zasad azotowych budujących jedną nić helisy jest zatem swoistym „odbiciem” sekwencji drugiej nici i ją determinuje (rys. 1) [18, 28]. Spajająca helisę funkcja wiązań wodorowych traktowana jest w biologii niemal jako dogmat i choć wiązania te są ważne [32], najnowsze badania pokazują, że być może nie aż tak, jak się do tej pory wydawało [33] oraz że dużą rolę odgrywają tutaj także oddziaływania hydrofobowo-hydrofilowe [34]. Co ciekawe, pewnych wskazówek w tej kwestii dostarczyły już wiele lat wcześniej m.in. prace wspomnianej wyżej Rosalind Franklin, która wykazała, że helisa DNA może występować w różnych, aktywnych biologicznie, odmianach: A-DNA (forma odwodniona) oraz B-DNA (forma uwodniona) [1, 2, 7]. W roku 1979 opisano trzecią postać cząsteczki – Z-DNA [35].

Reguły Chargaffa, które pomogły Watsonowi i Crickowi rozwikłać strukturę DNA sugerowały także potencjalny mechanizm kopiowania cząsteczki:

Nie uszło naszej uwadze, że postulowane przez nas specyficzne tworzenie par zasad niesie w sobie bezpośrednie wskazówki co do możliwego mechanizmu kopiowania się materiału genetycznego [24, vide 1].

Spośród kilku hipotez – ta proponująca semikonserwatywny charakter replikacji DNA wydawała się być najbardziej prawdopodobna. Zakładała ona, że podwójna helisa ulega rozpleceniu, zrywane są wiązania wodorowe pomiędzy zasadami azotowymi i na matrycach obydwu „starych” nici dobudowywane są „nowe”, zgodnie z zasadą komplementarności, dając w efekcie 2 identyczne, potomne helisy, z których każda posiada jedną nić pochodzącą od macierzystej cząsteczki, drugą zaś – świeżo dobudowaną. Model konserwatywny zakładał, że kopie DNA powstają w jakiś sposób całkowicie na nowo, a cząsteczka macierzysta pozostaje nienaruszona. Model trzeci (dyspersyjny) opierał się na założeniu, że obydwie cząsteczki potomne składają się z rozproszonych fragmentów cząsteczki macierzystej oraz nowych kawałków [2, 7, 9, 17, 18]. Zgrabny eksperyment przeprowadzony w roku 1958 przez dwóch amerykańskich biologów molekularnych – Matthew Stanleya Meselsona (ur. w 1930) oraz Franklina (Franka) Williama Stahla (ur. w 1929) – dowiódł, że prawdziwa jest hipoteza replikacji semikonserwatywnej [36]. Badacze hodowali bakterie *Escherichia coli* na pożywce zawierającej źródło azotu (niezbędnego do syntezy DNA) wyznakowane jego ciężkim izotopem (^{15}N). Następnie przenieśli drobnoustroje na świeżą pożywkę, zawierającą wyłącznie lekki izotop azotu (^{14}N). Po 20 minutach (tyle wynosi cykl replikacyjny *E. coli*) oraz 40 minutach (2 cykle replikacyjne *E. coli*) z hodowli pobrano próbki, wyekstrahowano z nich DNA i poddano wirowaniu w celu rozdzielenia frakcji o różnych gęstościach. Z próbki pobranej po 20 minutach hodowli uzyskano w próbówce 1 prążek zawierający DNA, zaś z tej pobranej po 40 minutach – 2 prążki. Porównanie tych wyników z teoretycznymi modelami rozwiązało zagadkę mechanizmu replikacji DNA. Uzyskanie jednego prążka DNA w pierwszej

próbce wykluczyło model konserwatywny, ponieważ część bakterii (około 50%) z pierwszego pokolenia musiałaby zawierać DNA zbudowane tylko i wyłącznie z lekkiego izotopu N (cała „nowa” cząsteczka), podczas gdy pozostałe bakterie zawierałyby wyłącznie ciężki izotop N (cała „stara” cząsteczka) i co musiałoby dać dwa prążki (lżejszy i cięższy). Wiadomo już zatem było, że DNA pierwszego pokolenia bakterii budują fragmenty zarówno starych jak i nowych nici, stanowiąc mieszaninę ^{14}N oraz ^{15}N . Pozostawało tylko rozstrzygnąć, w jaki dokładnie sposób stare i nowe fragmenty DNA są ze sobą wymieszane. Uzyskanie 2 prążków DNA po drugiej replikacji obaliło hipotezę dyspersyjną, ponieważ synteza kopii DNA musiałaby dać cząsteczki o mniej więcej takim samym procentowym udziale w każdej z nich obydwu izotopów N, co oznaczałoby uzyskanie 1 prążka DNA w próbówce. Dwa prążki w drugim pokoleniu potwierdziły prawdziwość hipotezy semikonserwatywnej, ponieważ ich pojawienie się oznaczało obecność w próbce dwóch frakcji DNA: cięższej i lżejszej. Jako że w pierwszym pokoleniu wszystkie kopie DNA, które powstały, miały jedną nić starą (zbudowaną z ^{15}N) i jedną nić nową (zbudowaną z ^{14}N), to w drugim pokoleniu musiały się pojawić kopie lżejsze, zbudowane wyłącznie z ^{14}N (jeśli „lekka” nić stanowiła matrycę) oraz kopie cięższe, zbudowane z mieszaniny ^{14}N oraz ^{15}N (jeśli „ciężka” nić stanowiła matrycę) [2, 7, 9, 18].

Jeden z kluczowych enzymów niezbędnych do prawidłowego przebiegu procesu replikacji, katalizujący syntezę nici DNA – polimerazę DNA I – wyizolowano w roku 1955, a odkrycie to, którego dokonał amerykański biochemik i lekarz, Arthur Kornberg (1918-2007) [1, 37], opublikowano rok później [38]. Kornberg wykazał także, że substratem dla polimerazy DNA są trójfosforany deoksyrybonukleotydów i wyjaśnił sposób działania enzymu [7], a osiągnięcia te w roku 1959 uhonorowano Nagrodą Nobla z dziedziny fizjologii lub medycyny, *za odkrycie mechanizmów biologicznej syntezy kwasów rybonukleinowych i kwasów deoksyrybonukleinowych*. Kornberg współdzielił to wyróżnienie z hiszpańskim biochemikiem, genetykiem i biologiem molekularnym o nazwisku Severo Ochoa de Albornoz (1905-1993), który odkrył fosforylazę polinukleotydomową (enzym zdolny do łączenia nukleotydów bez udziału matrycy) [12].

3. Dziedziczenie, czyli o tym, jak poznawano świat genów

Mniej więcej w tym samym czasie, kiedy badacze zainteresowali się budową i funkcją kwasów nukleinowych, tuż obok rodziła się nowa dziedzina nauki zajmująca się dziedziczeniem i nazwana później genetyką. Musiał upłynąć niemal wiek nim naukowcy zorientowali się, że te dwa działy wiedzy mają wspólny mianownik, a odkrycie to było kolejnym wielkim przełomem w naukach biologicznych.

Za ojca genetyki uważa się austro-węgierskiego (pochodzącego z Moraw, leżących na terenie obecnych Czech) przyrodnika i zakonnika, Gregora Johanna Mendla (1822-1884), a za datę narodzin tej nowej dziedziny wiedzy przyjmuje się rok 1865, w którym to po raz pierwszy Gregor zaprezentował światu wyniki swoich eksperymentów [8, 39], opublikowane rok później [40]. Jego naukowa droga nie była całkiem przypadkowa, gdyż brneński zakon augustianów, w którym ten mieszkał i pracował, wspomagał lokalnych rolników i hodowców w próbach stworzenia lepszych gatunków i odmian roślin oraz nowych ras zwierząt użytkowych, zarabiając w ten sposób na spłatę potężnych klasztornych długów. W czeskim Brnie swoją siedzibę miało Stowarzyszenie Przyjaciół, Ekspertów i Zwolenników Hodowli Owiec dla osiągnięcia szybszego i efektywniejszego postępu w tej gałęzi gospodarki, przemyśle i handlu wełną, które są na nich oparte

(w skrócie Stowarzyszenie Hodowców Owiec) oraz Brneńskie Stowarzyszenie Pomologiczne, zrzeszające sadowników i hodowców roślin [4]. Mendel nie bez przyczyny nazywany jest cierpliwym mnichem. W trakcie swoich eksperymentów przeprowadzonych w latach 1854-1864, przebadał około 28 tysięcy roślin, 40 tysięcy kwiatów i 400 tysięcy nasion! Jego najbardziej znanym obiektem obserwacji był groszek zwyczajny (*Pisum sativum*), ale pracował też z innymi gatunkami. Cechy, które obserwował i które pozwoliły mu na wyciągnięcie właściwych wniosków na temat zasad ich przekazywania kolejnym pokoleniom, obejmowały: barwę kwiatów (białe lub fioletowe), położenie kwiatów (szczytowe lub boczne), strukturę nasion (gładkie lub pomarszczone), kolor nasion (zielone lub żółte), strukturę strąków (gładkie lub zwarte), kolor strąków (zielone lub żółte) i wysokość rośliny (wysoka lub niska). Swoją sukces Mendel zawdzięcza nie tylko miłości do roślin, ale też jednemu ze swoich mentorów, który nauczył go wykorzystywania matematyki w naukach przyrodniczych, a nie było to powszechne podejście w tamtych czasach. Umiejętności obliczeniowe umożliwiły Gregorowi okiełznanie olbrzymiej ilości danych, które uzyskiwał w swoich eksperymentach i opracowanie ich pod kątem statystycznym. Zaowocowało to powstaniem tzw. mendlowskiego modelu dziedziczenia, opartego na 2 prawidłowościach. Pierwsza z nich to „prawo czystości gamet” mówiące o tym, że do każdej gamety przechodzi tylko jeden allel, gdzie allel rozumiany jest jako jedna z dwóch alternatywnych wersji cechy, np. warunkująca kwiaty białe bądź fioletowe. W wyniku połączenia gamet przyszły organizm zyskuje 2 allele (jeden pochodzący od matki, drugi od ojca), a ich kombinacja decyduje o wynikowym wariacie danej cechy ujawniającym się w fenotypie, rozumianym jako zespół cech charakteryzujących dany organizm: 2 dominujące allele lub dominujący i recesywny dają fenotyp o dominującej wersji cechy (w przypadku koloru kwiatów – kwiaty fioletowe), zaś 2 recesywne allele dają recesywną wersję cechy (kwiaty białe). Druga prawidłowość opisana przez Mendla nazwana została „prawem niezależnej segregacji cech”. Zakłada ona, że podczas tworzenia gamet allele dla różnych cech (np. koloru kwiatów i struktury nasion) są sortowane i „pakowane” do gamet niezależnie od siebie. Innymi słowy, wzór dziedziczenia danej cechy nie wpływa na sposób dziedziczenia innych [1, 2, 4, 8, 17, 18, 28].

Oprócz niewątpliwego talentu, naukowej pasji i wyjątkowej pracowitości, Mendel miał także sporo szczęścia, gdyż analizował cechy, które dziedziczyły się według dość prostego (nazywanego dziś mendlowskim) schematu, gdzie występują 2 alternatywne allele w wersji dominującej i recesywnej. Obecnie genetyka zna wiele przypadków komplikujących ten obraz, takich jak np. dominacja niezupełna (gdzie „mieszaniec” ma pośredni fenotyp, co na pierwszy rzut oka sugeruje, że dziedziczone cechy „rozmydlają się” lub mieszają jak farby, w co dość powszechnie wierzono w czasach Mendla), kodominacja (gdzie w fenotypie ujawniają się obydwie allele i żaden nie dominuje), cechy warunkowane allelami wielokrotnymi (z większą liczbą alternatywnych alleli niż 2), geny sprzężone (gdzie cechy przez nie kodowane dziedziczą się zależnie od siebie, ponieważ położone są w bliskim sąsiedztwie na jednym chromosomie, co przeczy drugiemu prawu Mendla), geny sprzężone z płcią i geny związane z płcią (gdzie fenotyp zależny jest od płci), plejotropia (gdzie jeden gen wpływa na wiele cech obserwowanych makroskopowo), epistaza (gdzie produkty jednego genu maskują działanie innego), cechy warunkowane wieloma genami czy też cechy, na fenotyp których wpływa również środowisko [2, 18, 28], a także dziedziczenie epigenetyczne [16]. Nie umniejsza to jednak

w żaden sposób zasług pracowitego zakonnika, zwłaszcza że doszedł on do prawidłowych wniosków w czasach, w których wiedza na temat budowy komórki była raczej skromna, a przede wszystkim nie znano roli jądra komórkowego, chromosomów ani kwasów nukleinowych! Po raz pierwszy pomysł, że czynniki odpowiadające za dziedziczenie znajdują się w jądrze komórkowym, wysunął w roku 1866 niemiecki biolog, filozof, podróżnik i darwinista, Ernst Haeckel (1834-1919) [2, 8, 10], ale kluczowy okazał się rozwój mikroskopii, która pozwalała coraz śmielej zaglądać do wnętrza komórek [41]. Dzięki temu w II połowie XIX wieku opisano chromatynę oraz odkryto, że odpowiada ona miescherowskiej nukleinie i zaproponowano nazwę „chromosom” dla jej skondensowanej formy; odkryto i opisano także procesy podziałów komórkowych: mitozę i mejozę. Największy udział w tych pracach i odkryciach mieli: niemiecki botanik, Joseph Eduard Julius Zacharias (1852-1911), niemiecki embriolog i zoolog, Oscar Hertwig (1849-1922), belgijski biolog, Édouard Joseph Louis Marie van Beneden (1846-1910), niemiecki biolog, Walther Flemming (1843-1905), polski lekarz i histolog, Wacław Mayzel (1847-1916), polsko-niemiecki botanik, Eduard Adolf Strasburger (1844-1912), niemiecki biolog i genetyk, August Friedrich Leopold Weismann (1834-1914) oraz szwajcarski anatom i fizjolog, Rudolph Albert von Kölliker (1817-1905) [8, 10].

Niezwykłe i bardzo przełomowe odkrycia Mendla przeszły jednak zupełnie bez echa, choć ten wysłał kopie swoich prac wielu ówczesnym uczonym [1, 2]. Być może było to efektem tego, że wiedza o dziedziczeniu stanowiła w tych czasach domenę hodowców i rolników, których, rzecz jasna, niespecjalnie interesowała naukowa strona tej dziedziny, a raczej jej aspekt „inżynieryjny” [4]. Nieodgadnioną tajemnicą pozostaje np. to, czy Charles Robert Darwin (1809-1882), brytyjski podróżnik, przyrodnik i geolog, autor słynnego dzieła opublikowanego w roku 1859, opisującego teorię powstawania gatunków i ich ewolucji pt. „On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life” [42] oraz mniej znanej lecz nie mniej przełomowej publikacji z roku 1871 na temat ewolucji człowieka pt. „The Descent of Man, and Selection in Relation to Sex” [43], czytał Mendla. Wiele wskazuje na to, że tak. A jeśli tak, to czy rozumiał, że w odkryciach czeskiego zakonnika kryje się odpowiedź na pytanie, jakimi narzędziami „posługuje się” ewolucja? Wiele wskazuje na to, że nie. Darwin wyobrażał sobie, że różne organy wysyłają do narządów rozrodczych rodzaj cząstek informacyjnych (nazywanych pangunami albo gemmulami/gemulami), które współtworzą komórki rozrodcze o odpowiednim zestawie cech przydatnych w danych warunkach. Teorię tę nazwano pangenezą. Darwin śledził z uwagą osiągnięcia najlepszych hodowców, takich jak np. Robert Bakewell (1725-1795) – angielski agronom i zootechnik, który wyhodował nową rasę owiec o angielskiej nazwie *Leicester Longwool*, zwaną też od jego nazwiska *Bakewell Leicester*. Podobną sprawność, tym razem w świecie roślin, osiągnął amerykański botanik, ogrodnik i pionier agrotechniki, zainspirowany publikacjami Darwina, Luther Burbank (1849-1926), który wyprowadził wiele nowych odmian roślin użytkowych, np. śliwę o bezpestkowych owocach, grusze i jabłonie o wyjątkowo smacznych i dużych owocach czy odmianę ziemniaka o angielskiej nazwie *Russet Burbank* (nawiązującej do jego nazwiska) – jedyną, którą sieć McDonald's aprobuje do produkcji swoich frytek. Darwin prowadził też własne hodowle, próbując uzyskiwać nowe rasy i odmiany, a wszystkie te obserwacje utwierdzały go w przekonaniu, że gemmule istnieją i to one, w odpowiedzi na środowisko, powodują, że u zwierząt i roślin hodowlanych powstają nowe lub zmienione cechy (np. zmniejszone płuca u jednej z ras

bydła uważał za „pangeniczną” odpowiedź na dobre warunki hodowli, które nie wymagały od zwierząt zbyt dużego wysiłku, aby przetrwać) [1, 2, 4, 17].

Darwinowskie wyobrażenie o tajemniczych pangenach było pokłosiem tzw. lamarizmu – pierwszej materialistycznej teorii ewolucji, której autorem był francuski żołnierz, lekarz i przyrodnik, Jean Baptiste de Lamarck (1744-1829) i która zakładała, że to środowisko w jakiś aktywny sposób generuje dziedziczne zmiany w organizmach, a także dopuszczała możliwość dziedziczenia cech nabytych (uważano np. że żyrafa, która wyjątkowo wysoko wyciąga szyję w celu zerwania listków ze szczytu drzewa, spłodzi potomstwo z dłuższą szyją) [2, 4, 44]. W tych czasach zastanawiano się także, na ile człowieka kształtują owe gemmule, a na ile wychowanie i środowisko, w którym żyje (ang. *nature versus nurture*). Rozważania te kojarzone są przede wszystkim z osobą Francisa Galtona (1822-1911), brytyjskiego podróżnika, przyrodnika, antropologa, wynalazcy, meteorologa, pisarza, lekarza i statystyka w jednym [45], a prywatnie kuzyna Darwina, któremu próbował niemal obsesyjnie dorównać jakimś przełomowym, naukowym osiągnięciem. Podejmując próby doświadczalnego udowodnienia istnienia gemmul, Galton wykonał serię eksperymentów, które miały pokazać, czy da się zmienić kolor futerka u potomstwa królika, wstrzykując mu krew innego osobnika o innym kolorze futra (w założeniu w krwi zwierzęcia powinny znajdować się odpowiednie gemmule). Jak łatwo się domyślić, eksperymenty te nie dowiodły pangenezy [2, 4]. Galton jest obecnie najbardziej kojarzony jako pionier eugeniki (selektywnego krzyżowania zwierząt i ludzi w celu uzyskiwania kolejnych pokoleń o coraz lepszych cechach), która sama w sobie kontrowersyjna i, co już dziś wiadomo, nie mająca naukowego sensu, dodatkowo jeszcze później wypaczona, doprowadziła w pierwszej połowie XX wieku w wielu krajach na całym świecie do okrutnych eugenicznych praktyk. Na przykład w USA „testy na inteligencję” stosowane przez amerykańskiego psychologa, Henry’ego Herberta Goddarda (1866-1957) „wykazały” m.in., że średni wiek umysłowy amerykańskich żołnierzy wynosi zaledwie 13 lat oraz że przeważająca większość migrantów z Europy wschodniej i południowej, a także osób czarnoskórych cechuje się znaczną „słabością na umyśle” (pomijając wątpliwą wartość naukową tych testów, ignorowano zupełnie czynniki, które mogły wpływać na wynik badania, takie jak uwarunkowania kulturowe, społeczne czy chociażby bariera językowa). Niezwykle popularna książka Goddarda pt. „The Kallikak Family: A Study in the Heredity of Feeble-mindedness”, wydana w roku 1912 [46], która opisywała rodowód pewnej rodziny, „dowodząc” dziedziczności niskiej inteligencji i wszelkich patologii typu pijaństwo, rozwiążłość, skłonność do chuligaństwa itp., doprowadziła do przymusowych sterylizacji i zakazów zawierania małżeństw osób „nieprzydatnych”, masowych eutanazji, aborcji i zabijania noworodków oraz rozwoju rasizmu, nacjonalizmu i antysemityzmu. Idee te trafiły na bardzo podatny grunt także w Europie, m.in. w Skandynawii, ale w szczególności w Niemczech, gdzie wysterylizowano przynajmniej 400 tys. osób, głównie chorych psychicznie, głuchych, Romów i Żydów, kolejne 200 tys. zamordowano i były to opóźnione umysłowo i zdeformowane fizycznie dzieci, potem także dzieci przyłapano na drobnych wykroczeniach oraz dorośli przebywający w szpitalach psychiatrycznych. Kulminacją ideologii nazistowskiej oraz programów eugenicznych zmierzających do stworzenia czystej rasy germańskiej (aryjskiej) były obozy zagłady, w których w trakcie II wojny światowej zamordowano kilkanaście mln ludzi [1, 4, 47].

Tymczasem Mendel, a przede wszystkim jego badania, ponownie ujrzęły światło dzienne dopiero na początku XX wieku, kiedy wiedza o dziedziczeniu przestała być jedynie dziedziną „inżynierii rolniczej” i weszła wreszcie na naukowe salony oraz kiedy kilku badaczy, niezależnie od siebie, na nowo odkryło opisane przez czeskiego mnicha zasady dziedziczenia. Byli to: holenderski botanik i genetyk, Hugo Marie de Vries (1848-1935) [48], austriacki botanik, genetyk i agronom, Erich von Tschermak-Seysenegg (1871-1962) [49], niemiecki genetyk i botanik, Carl Erich Correns (1864-1933) [50] oraz amerykański pionier ekonomii rolniczej, William Jasper Spillman (1863-1931) [2, 51]. Ten pierwszy początkowo przemilczał fakt pierwszeństwa Mendla w odkryciach reguł dziedziczności, ale upomniany przez Corrensa oddał sprawiedliwość czeskiemu pionierowi genetyki [1, 2]. Wkrótce powiązano prawa Mendla z chromosomami i w latach 1902-1904 kształtów nabrała pierwsza chromosomowa teoria dziedziczenia. Jej opracowanie przypisuje się amerykańskiemu genetykowi i lekarzowi o nazwisku Walter Stanborough Sutton (1877-1916) [52, 53] oraz niemieckiemu zoologowi i anatomowi o nazwisku Theodor Heinrich Boveri (1862-1915) [54, 55], aczkolwiek po raz pierwszy sformułowana została przez, wspomnianego wyżej, Augusta Weismanna już w latach 80. XIX wieku. Na fali popularności teorii pangenezы przeprowadził on serię eksperymentów, w których obcinał myszom ogony, a mimo to, nawet po wielu pokoleniach, rodziły się młode z normalnymi ogonami (gdyby istniały *gemmae*, powinny pozabawić w końcu myszy ogonów). Te i kolejne, wspomniane wcześniej, odkrycia dotyczące chromatyny, chromosomów, mitozy i mejozy skłoniły go do sformułowania teorii plazmy zarodkowej, która stała w opozycji do pangenezы i była swoistym prototypem teorii chromosomalnej, a jej najważniejsze założenia opublikowane zostały w roku 1892 [56]. Teoria ta zakładała, że dziedziczność jest domeną gamet (plemników i komórek jajowych), a cechy nabyte przez komórki somatyczne nie mogą „przeplýwać” do komórek rozrodczych (tzw. bariera Weismanna) [2, 4]. Choć wkład Boveriego i Suttona w chromosomową teorię dziedziczenia uważany jest za przeceniany (głównie ze względu na to, że wielu uczonych w tamtych czasach prowadziło podobne badania i dochodziło do analogicznych wniosków) [57], utrwaliła się ona pod nazwą teorii Boveriego i Suttona. Zakładała, że czynniki dziedziczenia – nazwane genami (jako skrót od darwinowskich pangenów i w nawiązaniu do gr. *genos* oznaczającego początek) w roku 1909 przez duńskiego farmaceutę, botanika i genetyka, Wilhelma Ludwiga Johannsena (1857-1927) – to jednostki fizycznie znajdujące się w chromosomach, ułożone na nich liniowo i zajmujące zawsze te same miejsca (łac. *locus* w l. poj., *loci* w l. mn.), a także to, że geny leżące na jednym chromosomie dziedziczą się zależnie od siebie (geny sprzężone), zaś geny zlokalizowane na różnych chromosomach dziedziczą się niezależnie od siebie (zgodnie z drugim prawem Mendla). Stwierdzała ona także, iż zachowanie chromosomów w trakcie procesu mejozy wyjaśnia mendlowskie reguły dziedziczności [2, 9, 17, 18, 28].

W tym samym czasie klarowały się także takie pojęcia jak „genetyka” (jako nazwa dziedziny biologii obejmującej wiedzę o dziedziczeniu i nawiązująca do gr. *genesis* oznaczającego pochodzenie), „homozygota”, „heterozygota”, „epistaza”, „pokolenie F1”, „pokolenie F2”, „alleomorf” (zastąpione później przez „allel”), zaproponowane przez brytyjskiego biologa i genetyka oraz głównego popularyzatora osiągnięć Mendla, Williama Batesona (1861-1926) [1, 2, 58, 59] czy też „gen”, „genotyp” i „fenotyp”, zaproponowane przez wspomnianego już Johannsena [17]. W roku 1902 powstała koncepcja, której autorem był amerykański zoolog, Clarence Erwin McClung (1870-1946) i która

mówiła o tym, że płęć u wielu zwierząt determinowana jest przez specjalną parę chromosomów [60], a już 3 lata później odkryto chromosomy płci (XY), czego dokonała amerykańska biologka i genetyczka, Nettie Maria Stevens (1861-1912), we współpracy z amerykańskim zoologiem i genetykiem, Edmundem Beecherem Wilsonem (1856-1939) [1, 2, 61]. Brytyjski genetyk (najbardziej znany ze swoich diagramów służących do rozpisywania krzyżówek genetycznych), Reginald Crundall Punnett (1875-1967) opisał następnie zasady determinacji płci i dziedziczenie cech sprzężonych z płcią oraz odkrył zjawisko sprzężenia genów (we współpracy ze wspomnianym wyżej Batesonem) [62]. Z kolei szwedzki botanik i genetyk, Nils Herman Nilsson-Ehle (1873-1949) dokonał pierwszych obserwacji cech dziedziczonych wielogenowo [63], a brytyjski lekarz i genetyk molekularny, Archibald Edward Garrod (1857-1936) opisał pierwszą chorobę genetyczną (alkaptonurię) dziedziczną zgodnie z regułami Mendla [1, 64]. Zwieńczeniem prac nad chromosomową teorią dziedziczenia było jej potwierdzenie na gruncie doświadczalnym, czego dokonał zespół pod kierownictwem amerykańskiego biologa, genetyka i embriologa, Thomasa Hunta Morgana (1866-1945), laureata Nagrody Nobla z dziedziny fizjologii lub medycyny w roku 1933, *za odkrycia dotyczące roli chromosomu w dziedziczeniu* [12].

Morgan rozpoczął swoje przełomowe badania w połowie pierwszej dekady XX wieku i wraz ze swoim amerykańskim zespołem genetyków, do którego należeli m.in.: Alfred Henry Sturtevant (1891-1970), Calvin Blackman Bridges (1889-1938), George Wells Beadle (1903-1989) oraz Hermann Joseph Muller (1890-1967), prowadził je przez kolejne 20 lat, mniej więcej do połowy lat 20. XX wieku. Obiektem doświadczalnym została wywilżna karłowata (*Drosophila melanogaster*), zwana potocznie muszką owocówką lub muszką owocową, a o wyborze tym zdecydowała łatwość hodowli tych owadów i wysokie tempo uzyskiwania kolejnych pokoleń oraz to, że ma jedynie 4 pary chromosomów, w dodatku dużych i dobrze widocznych pod mikroskopem. Przez kilka pierwszych lat w „pokoju muszek” wiało nudą i Morgan był już gotów porzucić swoje badania, kiedy wreszcie uzyskano samca o białych oczach (osobniki muszki owocowej występujące dziko w przyrodzie mają oczy czerwone). Po skrzyżowaniu tego samca z czerwonoooką samicą otrzymano w pokoleniu F1 osobniki tylko i wyłącznie o oczach czerwonych (co sugerowało, że jest to allel dominujący), zaś w pokoleniu F2 uzyskano klasyczny, spodziewany, mendlowski rozkład kolorów oczu (75% czerwonych i 25% białych), ale okazało się, że oczy białe miały tylko samce (co już spodziewane nie było)! W ten sposób zespół Morgana zaobserwował doświadczalnie pierwszą cechę sprzężoną z płcią. Cechy takie mają nieco odmienne wzory dziedziczenia ze względu na to, że ich allele zlokalizowane są na chromosomie X, których samice większości zwierząt mają 2, samce zaś 1 (dla porządku należy zaznaczyć, że w przyrodzie istnieją też inne sposoby determinacji płci). Tworzący z nim parę chromosom Y jest bardzo mały i zawiera relatywnie niewielką ilość genów, więc pod względem pewnych cech samce są tzw. hemizygotami, posiadającymi pojedynczy allel (zamiast dwóch). W związku z tym, już jeden recesywny allel u samców wystarczy do jego ujawnienia się w fenotypie, podczas gdy u samic niezbędne są dwa (samice z białymi oczami nie mogły się zatem pojawić w pokoleniu F2; uzyskiwano je dopiero w kolejnych krzyżówkach i rzecz jasna ze znacznie mniejszą częstotliwością niż białookie samce). W „komnacie muszek” odkryto także, że dziedziczenie niektórych cech (np. barwy ciała i rozmiaru skrzydeł) jest zależne od siebie, co przeczyło drugiemu prawu Mendla, a na co odpowiedź dała chromosomowa teoria dziedziczenia

– geny te leżały po prostu na jednym chromosomie, dlatego „pakowane” były do gamet razem. Szybko okazało się jednak, że nie do końca, bowiem zdarzało się, że cechy te rozdzielały się, co wskazywało na to, że istnieje jakiś mechanizm przełamujący fizyczne połączenie genów leżących w obrębie jednego chromosomu. Odpowiedzią okazał się proces *crossing-over*, który zachodzi na wczesnym etapie mejozy i polega na wymianie fragmentów chromosomów homologicznych, czyli matczynego i ojcowskiego (zjawisko to po raz pierwszy zaobserwował belgijski ksiądz, Frans Alfons Janssens (1865-1924)), co może „rozprzęgać” geny. Zespół Morgana opracował nawet mapę sprzężeń, która dość precyzyjnie pozwalała oszacować położenie poszczególnych genów względem siebie na danym chromosomie, w zależności od częstotliwości ich „rozprzęgania”. Warto wspomnieć, że niektóre cechy groszku obserwowane przez Mendla były w rzeczywistości sprzężone, ale leżały tak daleko od siebie na chromosomie, że prawie zawsze były rozdzielane w trakcie *crossing-over*, co pozwoliło mu na wysnucie obserwacji o niezależnej segregacji cech. Zespół pod kierownictwem Morgana odkrył i obserwował także przykłady zaburzeń struktury chromosomów, takie jak inwersja, delecja, duplikacja, translokacja czy nondysjunkcja [1, 2, 4, 9, 17, 18, 28, 58].

4. DNA a dziedziczenie, czyli o tym, jak nauka połączyła rozdzielne dotąd światy

Z perspektywy czasu wydaje się to naprawdę zadziwiające, ale jeszcze w połowie XX wieku uważano, że to białka, a nie kwasy nukleinowe, są nośnikiem informacji genetycznej! Białka uważano za cząsteczki o wiele bardziej szlachetne – buduje je aż 20 aminokwasów, cechują się znaczną różnorodnością, a ich struktura jest niejednokrotnie wysoce skomplikowana. Ponadto białka obecne są niemal w każdym zakątku komórki i znano już wtedy wiele ich funkcji, np. budulcową, enzymatyczną, transportową, regulatorową itd. Białka współtworzą także jądro komórkowe, stanowiąc równie ważny składnik chromatyny i chromosomów, jak kwasy nukleinowe. Tymczasem te wydawały się być cząsteczkami o dość prostej oraz powtarzalnej strukturze i budowały je zaledwie 4 rodzaje nukleotydów [1, 2]. Max Delbrück (1906-1981), niemiecko-amerykański genetyk, mikrobiolog i biofizyk, jeden z laureatów Nagrody Nobla w roku 1969 z dziedziny fizjologii lub medycyny, za *odkrycia dotyczące mechanizmów replikacji i struktury genetycznej wirusów* [12], nazwał nawet DNA „głupią cząsteczką” [1]. W owych czasach zdawano sobie sprawę z tego, że cząsteczka, która mogłaby być nośnikiem informacji genetycznej, musi być bardzo duża, bo to zapewnia jej stabilność (tutaj na niekorzyść kwasów nukleinowych działała dodatkowo wspomniana wyżej i długo traktowana niemal jako dogmat, tetranukleotydowa hipoteza dotycząca ich budowy). Uważano, że owa informacja jest „zamknięta” w trójwymiarowej strukturze wiązań chemicznych jej nośnika. Pogląd ten ubrał w słowa austriacki fizyk, współtwórca mechaniki kwantowej i jeden z laureatów Nagrody Nobla z dziedziny fizyki w roku 1933, za *odkrycie nowych, produktywnych aspektów teorii atomów*, Erwin Rudolf Josef Alexander Schrödinger (1887-1961) [12] (uważany także przez niektórych za kolejną ofiarę *nobelitis* ze względu na tzw. mistycyzm kwantowy [65]) – w słynnym popularnonaukowym esej, opublikowanym w roku 1944 pt. „What Is Life? The Physical Aspect of the Living Cell” [66]. Warto zauważyć, że w podobny sposób o informacji genetycznej myślał wspomniany wyżej Friedrich Miescher [2], otwierający tę historię. W roku 1893 wypowiedział on następujące słowa:

Dziedziczenie zapewnia ciągłość formy z pokolenia na pokolenie; podstawy tej ciągłości tkwią nawet głębiej niż w cząsteczce chemicznej. Tkwią w budowie grup atomów. W tym sensie jestem zwolennikiem teorii dziedziczenia chemicznego [67].

Jaką zatem rolę miałyby pełnić kwasy nukleinowe? Uważano wtedy, że stanowią coś w rodzaju szkieletu lub swoistego usztywnienia, dającego podporę dla białkowej informacji genetycznej [1, 17]. Pierwsze przesłanki na temat rzeczywistej roli kwasów nukleinowych dostarczyły badania brytyjskiego lekarza i bakteriologa, Fredericka Griffitha (1877-1941), który pracował nad stworzeniem szczepionki przeciwko pneumokokom (*Streptococcus pneumoniae*, dawniej *Diplococcus pneumoniae*) odpowiedzialnym za jedną z odmian zapalenia płuc, które w tamtym czasie było częstym powikłaniem po słynnej „grypie hiszpance”, zbierającej swoje największe śmiertelne żniwo w latach 1918-1920 [1, 68]. Próby otrzymania atenuowanych (o osłabionej wirulencji) drobnoustrojów szczepionkowych doprowadziły do uzyskania tzw. szczepu R (od ang. *rough*), tworzącego kolonie o nieregularnym kształcie i szorstkiej z wyglądu powierzchni, podczas gdy szczep S (od ang. *smooth*) miał powierzchnię gładką, a kolonie posiadały regularny kształt. Najważniejsze jednak było to, że szczepy S były zjadliwe (wywoływały chorobę), podczas gdy szczepy R były łagodne (nie powodowały choroby lub dawały tylko niewielkie objawy), a różnica ta wynikała z tego, że szczepy S posiadały otoczkę pozwalającą bakteriom „ukrywać się” przed układem odpornościowym, zaś szczepy R były bezotoczkowe. Griffith prowadził doświadczenia na myszach, wstrzykując im drobnoustroje żywe, ale niezjadliwe (zwierzęta przeżywały), szczepy żywe, ale zjadliwe (myszy padały) oraz bakterie zjadliwe, ale zabite wysoką temperaturą (gryznie przeżywały). Wyniki te były zgodne z oczekiwaniami i stanem ówczesnej wiedzy. Szokujący jednak okazał się rezultat innej części eksperymentu, w której Griffith podał myszom mieszaninę żywych bakterii szczepu R (niezjadliwego) i martwych (nieszkodliwych) bakterii szczepu S. Wbrew oczekiwaniom zwierzęta padały w wyniku silnej infekcji, a po wyizolowaniu patogenów z martwych ciał myszy okazało się, że były w nich obecne żywe szczepy typu S! Badacz założył (słusznie), że w organizmach zwierząt musiało dojść do przekształcenia nieszkodliwych drobnoustrojów w zjadliwe, najprawdopodobniej na drodze jakiejś mutacji [1, 2, 7, 8, 18, 58]. Griffith opublikował wyniki swoich eksperymentów z oporami, po długiej zwłoce (wynikłej z wrodzonej skromności i nieśmiałości), w roku 1928 [69] i był to pierwszy udokumentowany przypadek zjawiska, które współcześnie znane jest pod nazwą transformacji – jednego z 3 możliwych sposobów nabywania nowych genów, obok transdukcji i koniugacji, charakterystycznych dla mikroorganizmów [70-73]. Pozostałe 2 mechanizmy międzygatunkowego transferu genów, czyli transdukcję i koniugację, poznano i opisano w latach 40. i 50. XX wieku, a w odkryciach tych mieli udział: amerykański genetyk, Edward Lawrie Tatum (1909-1975), żydowsko-amerykański genetyk i mikrobiolog, Joshua Lederberg (1925-2008), amerykański biolog, Norton David Zinder (1928-2012) oraz brytyjski lekarz, mikrobiolog i genetyk, William Hayes (1913-1994). Wprowadzono wtedy także pojęcie plazmidu. W roku 1958 osiągnięcia te przyniosły Lederbergowi Nagrodę Nobla z dziedziny fizjologii lub medycyny, *za odkrycia dotyczące rekombinacji genetycznej i organizacji materiału genetycznego bakterii*. Drugą część nagrody (w tym samym roku i w tej samej dziedzinie) przyznano Tatumowi, *za odkrycie, że geny działają poprzez regulowanie określonych wydarzeń chemicznych*, a dzielił ją ze wspomnianym wyżej Georgem Beadlem z „komnaty muszek” [12] (o czym nieco więcej w drugiej części tej opowieści [31]).

Odkrycie Griffitha zapoczątkowało „polowanie” na tajemniczy czynnik transformujący. Spodziewano się, zgodnie z ówczesnymi przekonaniem, że będzie to jakieś białko, ewentualnie polisacharyd stanowiący element ściany komórkowej bakterii. Pierwsze kroki w tym kierunku poczynił amerykański lekarz, James Lionel Alloway (1900-1954), któremu udało się pozyskać ekstrakt zawierający czynnik transformujący, co pozwalało wykonywać eksperymenty bezpośrednio na hodowlach bakteryjnych, bez udziału myszy [74, 75]. Dalsze prace prowadził zespół w składzie: kanadyjsko-amerykański lekarz i genetyk, Oswald Theodore Avery (1877-1955), kanadyjsko-amerykański genetyk, Colin Munro MacLeod (1909-1972) oraz amerykański genetyk i lekarz, Maclyn McCarty (1911-2005). Powtórzono eksperymenty Griffitha *in vivo* na myszach, a następnie analogiczne przeprowadzono w warunkach *in vitro* na hodowlach bakteryjnych, uzyskując te same wyniki. Doświadczenia, w trakcie których dzięki zastosowaniu odpowiednich enzymów usuwano z mieszaniny transformującej kolejnych „podejrzanych” (tłuszcze, cukry, białka itd.), zdawały się coraz wyraźniej przemawiać przeciwko białkom i coraz jednoznaczniej wskazywać na kwasy nukleinowe jako nośniki genów. Mieszanina transformująca utrzymywała bowiem swoje właściwości tylko wtedy, kiedy obecne było w niej, niezniszczone działaniem enzymów, DNA [1, 2, 7-9, 17, 18]! Wyniki otrzymane przez zespół Avery’ego opublikowano w roku 1944 [76], ale znaczna część środowiska nadal nie chciała przyjąć do wiadomości, że „głupia cząsteczka” może być kluczowa dla ciągłości życia i zarzucano amerykańskiemu zespołowi niedbałość naukową, upierając się, że czynnik transformujący musiał być zanieczyszczony białkami. Sam Avery, przez wrodzoną skromność i zdrowy naukowy sceptycyzm, wypowiadał się w tym temacie z entuzjazmem, ale jednak ostrożnie:

Jeśli mamy rację – co, rzecz jasna, nie zostało jeszcze dowiedzione – kwasy nukleinowe są istotne nie tylko strukturalnie, ale i funkcjonalnie (...), wywołują bowiem przewidywalne i dziedziczne zmiany w komórkach [1].

Ostatecznych dowodów w roku 1952 dostarczyli: amerykański bakteriolog i genetyk, Alfred Day Hershey (1908-1997) oraz amerykańska genetyczka, Martha Cowles Chase (1927-2003) [77]. Wybrali oni do swoich eksperymentów bakteriofaga T2, czyli wirusa pasożytującego na bakteriach z gatunku *Escherichia coli*. Wiedzano już wtedy, że wirusy te składają się tylko z kwasu nukleinowego i białek, a ich znacznie prostsza (w porównaniu z komórką bakteryjną) budowa mocno upraszczała eksperyment i ułatwiała interpretację wyników. Znany był w tych czasach także mechanizm powielania się wirusa, który wnika do zainfekowanej komórki i przejmuje nad nią kontrolę, zmuszając ją do produkcji jego własnych kopii. Wystarczyło ustalić tylko, która z „konkurujących o miano nośnika życia” cząsteczek odpowiada za przejęcie tej kontroli: białko czy DNA. Badacze wykorzystali fakt, że kwasy nukleinowe nie zawierają w ogóle siarki, która za to występuje w białkach. Te zaś są bardzo ubogie w fosfor, który z kolei stanowi znaczącą część składu chemicznego DNA. Obydwa te pierwiastki posiadają radioaktywne izotopy, które wykorzystano w eksperymencie. Część hodowli bakteryjnych prowadzono więc na pożywkach z dodatkiem znakowanego radioaktywnie fosforu (w celu łatwej identyfikacji DNA), pozostałe – z dodatkiem znakowanej siarki (w celu łatwej identyfikacji białek). Bakteriofagi, atakując bakterie, które stanowią dla nich rodzaj swoistej pożywki, wykorzystują ich zasoby komórkowe do powielania się. Zatem w obydwu seriach eksperymentu otrzymano linie fagów wyznakowane odpowiednio fosforem lub

siarką, którym pozwolono następnie zainfekować niewyznakowane linie bakterii. Po oddzieleniu (przy pomocy wirowania) zainfekowanych wirusem bakterii od płynu hodowlanego, stwierdzono, że białkowy kapsyd wirusa zostaje na zewnątrz komórki bakteryjnej (w płynie hodowlanym), podczas gdy do jej środka wprowadzany jest materiał genetyczny bakteriofaga i to on stanowi nośnik jego genów umożliwiających mu przejęcie kontroli nad zainfekowaną bakterią [2, 18, 58]. Alfred Hershey został uhonorowany Nagrodą Nobla z dziedziny fizjologii lub medycyny w roku 1969, *za odkrycia dotyczące mechanizmów replikacji i struktury genetycznej wirusów*. Dzielił ją ze wspomnianym wyżej Maxem Delbrückiem (tym od „głupiej cząsteczki”) oraz włosko-amerykańskim mikrobiologiem, Salvadorem Edwardem Luria (1912-1991), którzy udowodnili, że bakterie, podobnie jak bardziej złożone organizmy, ewoluują dzięki mutacjom [12].

Uwagi ogólne

Finansowanie: Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie, Wydział Geologii, Geofizyki i Ochrony Środowiska; nr umowy: 16.16.140.315.

Literatura

1. Mukherjee S., *Gen. Ukryta historia*, Wydawnictwo Czarne, Wołowiec 2017.
2. Myśliwiec D., *Przepis na człowieka, czyli krótki wstęp do odpowiedzi na pytanie: dlaczego jesteśmy, jacy jesteśmy*, Altenberg, Warszawa 2020.
3. Sullivan B., *Więcej niż DNA. Geny, drobnoustroje i osobliwe moce*, Burda Media Polska, Warszawa 2020.
4. Zimmer C., *Śmiech ma po matce. Tajemnice genów*, Wydawnictwo Poznańskie, Poznań 2020.
5. Skarżyński B., *Dzieje zagadnienia kwasów nukleinowych*, Postępy Biochemii, 2, 1956, s. 3-13.
6. Dahm R., *Friedrich Miescher and the discovery of DNA*, Developmental Biology, 278, 2005, s. 274-288.
7. Gabryelska M.M., Szymański M., Barciszewski J., *DNA – cząsteczka, która zmieniła naukę. Krótka historia odkryć*, NAUKA, 2, 2009, s. 111-134.
8. Straus E.W., Straus A., *100 największych osiągnięć medycyny*, Świat Książki, Warszawa 2009.
9. Portin P., *The birth and development of the DNA theory of inheritance: sixty years since the discovery of the structure of DNA*, Journal of Genetics, 93, 2014, s. 239-302.
10. Korczmar E.A., Belter A., Naskręt-Barciszewska M.Z., Jurga S., Barciszewski J., *100 lat RNA. Diamentowy jubileusz informacyjnego RNA*, Postępy Biochemii, 67, 2021, s. 212-222.
11. Jones M.E., *Albrecht Kossel, a biographical sketch*, Yale Journal of Biology and Medicine, 26, 1953, s. 80-97.
12. <https://www.nobelprize.org> [data dostępu: 10.2022].
13. Plósz P., *Ueber das chemische verhalten der kerne der vogel und schlange blutkörperchen*, Medicinisch-chemische Untersuchungen, 4, 1871, s. 461-462.
14. Ascoli A., *Ueber ein neues spaltungsprodukt des hefenucleins*, Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie, 31, 1901, s. 161-214.
15. Johnson T.B., Coghill R.D., *Researches on pyrimidines. C111. The discovery of 5-methylcytosine in tuberculinic acid, the nucleic acid of the tubercle bacillus*, Journal of the American Chemical Society, 47, 1925, s. 2838-2844.
16. Kostka A., *Odkrywając tajemnice cząsteczki życia – krótka historia niezwyklej naukowej podróży. Geny to nie wszystko*, [w:] Danielewska A., Mołdoch-Mendoń I. (red.), *Przegląd aktualnych zagadnień z zakresu medycyny i biologii*, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, Lublin 2023, s. 176-192.

17. Chorąży M., *Gen strukturalny – ewolucja pojęcia i dylematy*, NOWOTWORY. Journal of Oncology, 3, 2011, s. 279-288.
18. Campbell N.A., Reece J.B., Urry L.A., Cain M.L., Wasserman S.A., Minorsky P.V., Jackson R.B., *Biologia*, Dom Wydawniczy REBIS, Poznań 2012.
19. Barankin B., *The impact of Linus Pauling on modern medicine and society*, Bulletin of Anesthesia History, 17, 1999, s. 15-16.
20. Diamandis E.P., *Nobelitis: a common disease among Nobel laureates?* Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 51, 2013, s. 1573-1574.
21. Rotkiewicz M., *Genialni naukowcy też błędzą*, Polityka, 40, 2017, s. 70.
22. Basterfield C., Lilienfeld S.O., Bowes S.M., Costello T.H., *The Nobel disease: when intelligence fails to protect against irrationality*, Skeptical Inquirer, 44, 2020, s. 32-37.
23. Astbury W.T., Bell F.O., *X-ray study of thymonucleic acid*, Nature, 141, 1938, s. 747-748.
24. Watson J.D., Crick F.H.C., *Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid*, Nature, 171, 1953, s. 737-738.
25. Wilkins M.H.F., Stokes A.R., Wilson H.R., *Molecular structure of nucleic acids: molecular structure of deoxypentose nucleic acids*, Nature, 171, 1953, s. 738-740.
26. Franklin R.E., Gosling R.G., *Molecular configuration in sodium thymonucleate*, Nature, 171, 1953, s. 740-741.
27. Watson J.D., *The double helix: a personal account of the discovery of the structure of DNA*, Atheneum, New York 1968.
28. Maćkowiak M., Michalak A. (red.), *Biologia. Jedność i różnorodność*, Wydawnictwo Szkolne PWN, Warszawa 2008.
29. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:DNA_chemical_structure.svg; na licencji CC0 (<https://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/deed.en>), autor: Madeleine Price Ball [data dostępu: 09.2022].
30. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Difference_DNA_RNA-EN.svg; na licencji CC BY-SA 3.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/deed.en>), tłum.: Sponk [data dostępu: 09.2022].
31. Kostka A., *Odkrywając tajemnice cząsteczki życia – krótka historia niezwykle naukowej podróży. Geny i ich ekspresja*, [w:] Danielewska A., Mołdoch-Mendoń I. (red.), *Przegląd aktualnych zagadnień z zakresu medycyny i biologii*, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, Lublin 2023, s. 158-175.
32. Goodman M.F., *Hydrogen bonding revisited: Geometric selection as a principal determinant of DNA replication fidelity*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 94, 1997, s. 10493-10495.
33. Matsuda S., Romesberg F.E., *Optimization of interstrand hydrophobic packing interactions within unnatural DNA base pairs*, Journal of the American Chemical Society, 126, 2004, s. 14419-14427.
34. Feng B., Sosa R.P., Mårtensson A.K.F., Jiang K., Tong A., Dorfman K.D., Takahashi M., Lincoln P., Bustamante C.J., Westerlund F., Nordén B., *Hydrophobic catalysis and a potential biological role of DNA unstacking induced by environment effects*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 116, 2019, s. 17169-17174.
35. Wang A.H.-J., Quigley G.J., Kolpak F.J., Crawford J.L., van Boom J.H., van der Marel G., Rich A., *Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution*, Nature, 282, 1979, s. 680-686.
36. Meselson M., Stahl F.W., *The replication of DNA in Escherichia coli*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 44, 1958, s. 671-682.
37. Lehman I.R., *Discovery of DNA polymerase*, Journal of Biological Chemistry, 278, 2003, s. 34733-34738.

38. Kornberg A., Lehman I.R., Bessman M.J., Simms E.S., *Enzymic synthesis of deoxyribonucleic acid*, Biochimica et Biophysica Acta, 21, 1956, s. 197-198.
39. Matalova E., *Johann Gregor Mendel: Born to be a scientist?* PLoS Biology, 20, 2022, s. 1-3.
40. Mendel G., *Versuche über pflanzen-hybriden*, Verhandlungen des Naturforschenden Vereines in Brünn, Brünn 1866.
41. Kostka A., *Człowiek kontra choroby zakaźne i mikroorganizmy chorobotwórcze – krótka historia fascynującego starcia. Mit samoródtwa i odkrycie drobnoustrojów*, [w:] Pilarz L.B. (red.), *Komórki, tkanki i narządy ludzkie – wybrane zagadnienia medyczne i prawne*, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, Lublin 2022, s. 195-210.
42. Darwin Ch., *On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life*, John Murray, Albemarle Street, London 1859.
43. Darwin Ch., *The descent of man, and selection in relation to sex*, John Murray, Albemarle Street, London 1871.
44. Wool D., Paz N., Friedman L., *Jean Baptiste de Lamarck: The theory of descent*, [w:] Wool D. (red.), *Milestones in the evolving theory of evolution*, CRC Press, Boca Raton 2020, s. 43-51.
45. Keynes M. (red.), *Sir Francis Galton, FRS. The legacy of his ideas*, Proceedings of the Twenty-Eight Annual Symposium of the Galton Institute, London 1991.
46. Goddard H.H., *The Kallikak family: a study in the heredity of feeble-mindedness*, MacMillan Co., New York 1912.
47. Kevles D.J., *Eugenics and human rights*, British Medical Journal, 319, 1999, s. 435-438.
48. de Vries H., *Sur la loi de disjonction des hybrides*, Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, 130, 1900, s. 845-847.
49. Tschermak-Seysenegg E., *Über künstliche kreuzung bei Pisum sativum*, Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft, 18, 1900, s. 232-239.
50. Correns C.E., *G. Mendel's regel über das verhalten der nachkommenschaft der rassenbastarde*, Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft, 18, 1900, s. 158-168.
51. Carlson L., *Forging his own path: William Jasper Spillman and progressive era breeding and genetics*, Agricultural History, 79, 2005, s. 50-73.
52. Sutton W.S., *On the morphology of the chromosome group in Brachystola magna*, Biological Bulletin, 4, 1902, s. 24-39.
53. Sutton W.S., *The chromosomes in heredity*, Biological Bulletin, 4, 1903, s. 231-251.
54. Boveri T., *Über mehrpolige mitosen als mittel zur analyse des zellkerns*, Verhandlungen der Physikalisch-Medizinischen Gesellschaft zu Würzburg, 35, 1902, s. 67-90.
55. Boveri T., *Ergebnisse über die konstitution der chromatischen substanz des zellkerns*, Verlag von Gustav Fisher, Jena 1904.
56. Weismann A., *Das keimplasma: eine theorie der vererbung*, Verlag von Gustav Fisher, Jena 1892.
57. Martins L.A.-C.P., *Did Sutton and Boveri propose the so-called Sutton-Boveri chromosome hypothesis?* Genetics and Molecular Biology, 22, 1999, s. 261-272.
58. Gerstein M.B., Bruce C., Rozowsky J.S., Zheng D., Du J., Korbel J.O., Emanuelsson O., Zhang Z.D., Weissman S., Snyder M., *What is a gene, post-ENCODE? History and updated definition*, Genome Research, 17, 2007, s. 669-681.
59. Cock A.G., Forsdyke D.R., *Treasure your exceptions. The science and life of William Bateson*, Springer, New York 2008.
60. McClung C.E., *The accessory chromosome – sex determinant?* The Biological Bulletin, 3, 1902, s. 43-84.
61. Brush S.G., *Nettie M. Stevens and the Discovery of Sex Determination by Chromosomes*, ISIS, 69, s. 162-172.

62. Edwards A.W.F., *Reginald Crundall Punnett: First Arthur Balfour professor of genetics, Cambridge, 1912*, Genetics, 192, 2012, s. 3-13.
63. Höglund M., Bengtsson B.O., *The origin of the Mendelian Society in Lund and the start of Hereditas*, Hereditas, 151, 2014, s. 110-114.
64. Bearn A.G., Miller E.D., *Archibald Garrod and the development of the concept of inborn errors of metabolism*, Bulletin of the History of Medicine, 53, 1979, s. 315-328.
65. Marin J.M., „Mysticism” in quantum mechanics: the forgotten controversy, European Journal of Physics, 30, 2009, s. 807-822.
66. Schrödinger E., *What is life? The physical aspect of the living cell*, Cambridge University Press, Cambridge 1944.
67. Watson J.D., Berry A., *DNA. Tajemnica życia*, CiS, W.A.B., Warszawa 2005.
68. Kostka A., *Człowiek kontra choroby zakaźne i mikroorganizmy chorobotwórcze – krótka historia fascynującego starcia. Trzy rodzaje broni masowego rażenia*, [w:] Pilarz Ł.B. (red.), *Komórki, tkanki i narządy ludzkie – wybrane zagadnienia medyczne i prawne*, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, Lublin 2022, s. 211-235.
69. Griffith F., *The significance of pneumococcal types*, Journal of Hygiene, 27, 1928, s. 113-159.
70. Schlegel H.G., *Mikrobiologia ogólna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005.
71. Salyers A.A., Whitt D.D., *Mikrobiologia. Różnorodność, chorobotwórczość i środowisko*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2012.
72. Kowalczyk P., Jankiewicz U., *Metody przenoszenia informacji genetycznej i ich wpływ na zdrowie człowieka*, Nowa Medycyna, 2, 2013, s. 124-129.
73. Kasprzykowska U., Sobieszkańska B.M., *Plastyczność bakteryjnych genomów – międzykomórkowy transfer informacji genetycznej*, Postępy Mikrobiologii, 53, 2014, s. 165-171.
74. Alloway J.L., *The transformation in vitro of R pneumococci into S forms of different specific types by the use of filtered pneumococcus extracts*, Journal of Experimental Medicine, 55, 1932, s. 91-99.
75. Alloway J.L., *Further observations on the use of pneumococcus extracts in effecting transformation of type in vitro*, Journal of Experimental Medicine, 57, 1933, s. 265-278.
76. Avery O.T., MacLeod C.M., McCarty M., *Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III*, Journal of Experimental Medicine, 79, 1944, s. 137-158.
77. Hershey A., Chase M., *Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage*, Journal of General Physiology, 36, 1952, s. 39-56.

Odkrywając tajemnice cząsteczki życia – krótka historia niezwyklej naukowej podróży. DNA i dziedziczenie

Streszczenie

Gdyby można było powiedzieć, że jakaś cząsteczka chemiczna jest królową współczesnej biologii molekularnej, pewnie większość pomyślałaby o DNA. Koduje ono informację genetyczną, która jest niezbędna dla ciągłości życia, zatem DNA to życie. Jest też ono często, dość obrazowo zresztą, nazywane biologicznym programem komputerowym o niezwyklej złożoności. Nauka zaczęła poznawać świat DNA (i RNA) dopiero w połowie XIX wieku, ale od tamtej pory zalew wiedzy naukowej na temat kwasów nukleinowych jest olbrzymi, a rozwój tej dziedziny niejednokrotnie obfitował w niezwykle „naukowe zwroty akcji”. Poznawanie budowy chemicznej oraz struktury kwasów nukleinowych (w szczególności DNA) oraz pierwsze odkrycia dotyczące dziedziczności przez niemal wiek toczyły się odrębnymi torami, ponieważ bardzo długo nie wiązano kwasów nukleinowych z genetyką. Uważano, że DNA, w porównaniu z o wiele bardziej szlachetnymi białkami, ma zbyt prostą budowę i nazywane było nawet „głupią cząsteczką”. Dopiero w połowie XX wieku odpowiednie elementy molekularnej układanki powskakiwały na swoje miejsca, kiedy w jednym z eksperymentów wykazano, że to DNA jest czynnikiem transformującym odpowiedzialnym za przekształcenie łagodnego szczepu bakterii w zjadliwy, w innym zaś udowodniono, że elementem wirusa, który odpowiada za przejście kontroli nad zainfekowaną komórką, jest jego DNA, a nie białko. Opowieść o kwasach nukleino-

wych wiąże się też z innymi wielkimi naukowymi ideami, np. z rozwojem ewolucjonizmu, a zawile historyczno-naukowe sploty zdarzeń stawiają niekiedy ciekawe pytania, np. o to, co by było, gdyby Charles Darwin wiedział, jaka moc kryje się w odkryciach skromnego czeskiego zakonnika, Gregora Mendla? DNA i geny mają też swoje mroczne karty w historii. Eugenika i wywodzące się z niej straszliwe idee pokazały, jak nauka w rękach nieodpowiednich ludzi może się stać śmiertelnym „narzędziem”.

Słowa kluczowe: kwasy nukleinowe, Gregor Mendel, teoria pangenezы, Thomas Morgan, chromosomowa teoria dziedziczenia

Discovering the secrets of the molecule of life – a short history of an incredible scientific journey. DNA and heredity

Abstract

If we were to name a molecule as the queen of modern molecular biology, most of us would probably think of the DNA. It encodes the genetic information that is essential for life to continue, therefore the DNA represents life. It is also frequently and figuratively described as a biological computer programme of incredible complexity. Scientists only began to explore the world of DNA (and RNA) in the middle of 19th century, but since then the influx of scientific knowledge about nucleic acids has been enormous, while the development of this scientific field has led to some incredible „scientific twists”. For almost a century, research into the chemical composition and structure of nucleic acids (especially the DNA) and the first discoveries in the field of heredity followed separate routes, because nucleic acids were not associated with genetics for a long time. The structure of DNA was considered to be too simple when compared to that of the much more sophisticated proteins, and it was even referred to as the ‘stupid molecule’. It was not until the middle of the 20th century that the individual pieces of the molecular puzzle began to fall into place, when one of the experiments demonstrated that DNA itself was the transforming factor responsible for the transformation of a non-virulent bacterial strain into a virulent one, while another showed that the DNA, and not a protein, is the viral element responsible for the control of an infected cell. The story of nucleic acids is also connected with other great scientific ideas, such as the development of evolutionism, while the complex historical/scientific links sometimes raise interesting questions, such as what if Charles Darwin had known the true power behind the discoveries of a modest Czech monk, Gregor Mendel? The history of the DNA and genes, however, also contains some dark sides. The field of eugenics and some horrific ideas associated with it, have shown how science can become a deadly „tool” in the hands of the wrong people.

Keywords: nucleic acids, Gregor Mendel, theory of pangenezы, Thomas Morgan, chromosomal theory of inheritance

Odkrywając tajemnice cząsteczki życia – krótka historia niezwyklej naukowej podróży. Geny i ich ekspresja

1. Wprowadzenie

Pierwsza część tej historii [1] opowiada o narodzinach biologii molekularnej (o tym, jak odkrywano świat DNA i RNA), genetyki (o tym, jak poznawano mechanizmy dziedziczenia) oraz o tym, jak rozumiano, że „nośnikiem życia” są kwasy nukleinowe, a nie białka. Ta część przedstawia dalszy rozdział tej fascynującej naukowej historii, opowiadając o tym, jak złamano biologiczny kod i rozumiano naturę przepływu informacji genetycznej. Spróbuje także odpowiedzieć na naprawdę trudne pytanie o to, czym właściwie jest gen.

2. DNA, RNA i białka, czyli o przepływie informacji genetycznej i o tym, jak odkrywano kod życia

Odkrycie roli kwasów nukleinowych oraz rozszyfrowanie ich struktury (zwłaszcza DNA) było wielkim przełomem i otworzyło nowy rozdział w naukach biologicznych [1]. Natychmiast też zaczęły się rodzić dalsze pytania, wśród nich to najważniejsze – o molekularny mechanizm przekazywania informacji genetycznej. Początkowo sugerowano, że białka powstają bezpośrednio na matrycy DNA, ale na początku lat 40. XX wieku coraz więcej naukowców było przekonanych o tym, że RNA pełni pośredniczącą rolę między DNA a białkami. Należeli do nich m.in.: szwedzki cytolog i genetyk, Torbjörn Oskar Caspersson (1910-1997), francuski biochemik, André Boivin (1895-1949) oraz belgijski biochemik, Jean Louis Auguste Brachet (1909-1988), który obalił hipotezę o istnieniu roślinnego (RNA) i zwierzęcego (DNA) kwasu nukleinowego. Badacz ten wyróżnił także 2 typy chromatyny (luźną – euchromatynę i skondensowaną – heterochromatynę), wykazał, że ilość DNA w komórkach jednego organizmu jest stała, zaś ilość RNA zmienna, dostrzegł korelację pomiędzy ilością RNA a syntezą białek, zaś jego wyobrażenie o przepływie informacji genetycznej stanowiło zarys przyszłego „centralnego dogmatu biologii molekularnej” [2, 3]. W roku 1950 belgijski biolog molekularny, Raymond Jeener (1904-1995) zasugerował, że u eukariontów RNA powstaje w jądrze komórkowym, po czym przedostaje się do cytoplazmy, gdzie zachodzi synteza białek [3, 4]. W latach 40. i 50. XX wieku badania belgijsko-amerykańskiego biologa, lekarza i cytologa, Alberta Claude’a (1899-1983) oraz rumuńsko-amerykańskiego biologa komórkowego, George’a Emila Palade’a (1912-2008) doprowadziły do odkrycia ciał komórkowych, na których zachodzi synteza białek i które nazwano „mikrosomami”. W roku 1958 amerykański biofizyk, Howard Marvin Dintzis (ur. w 1927) przemianował je na „rybosomy” w celu podkreślenia, że w ich składzie znajduje się RNA. Poznano w ten sposób pierwszy rodzaj kwasu rybonukleinowego, rRNA (rybosomowy RNA) i początko-

¹ kostka@agh.edu.pl, Katedra Ochrony Środowiska, Wydział Geologii Geofizyki i Ochrony Środowiska, Akademia Górniczo-Hutnicza w Krakowie, <https://www.agh.edu.pl>.

wo zakładano, że stanowi on rodzaj szablonu, na podstawie którego aminokwasy łączą się, tworząc białka. Uważano, że jeden rybosom stanowi produkt jednego genu i odpowiada za produkcję jednego, konkretnego białka [3, 5]. Claude i Palade w roku 1974 uhonorowani zostali Nagrodą Nobla z dziedziny fizjologii lub medycyny, za *odkrycia dotyczące strukturalnej i funkcjonalnej organizacji komórki*, a wyróżnienie to dzielili z belgijskim lekarzem i cytologiem, Christianem René de Duve (1917-2013), który odkrył lizosomy [6].

Brytyjski biochemik, genetyk i biolog molekularny, Francis Harry Compton Crick (1916-2004), współodkrywca struktury DNA [1] i jeden z laureatów Nagrody Nobla z dziedziny fizjologii lub medycyny w roku 1962, za *odkrycie dotyczące struktury molekularnej kwasów nukleinowych i jej znaczenia w przekazywaniu informacji w substancjach ożywionych* [6], zakładał, że musi istnieć cząsteczka „adaptorowa”, pośrednicząca między aminokwasami a DNA oraz jakaś inna, „matrycowa”, zawierająca przepis na białko. Obydwie role przypisywał nierozpoznanym jeszcze rodzajom RNA. Sformułowany został także tzw. „centralny dogmat biologii molekularnej” zakładający jednokierunkowy przepływ informacji genetycznej: DNA → RNA → białko [2, 3, 7, 8] i opisujący proces ekspresji genów następująco: najpierw informacja genetyczna kopiowana jest z DNA na RNA (w procesie zwanym transkrypcją), następnie na rybosomach zachodzi proces syntezy białek (zwany translacją), w którym informacja zawarta w RNA konwertowana jest na sekwencję aminokwasów w białku [9]. Warto też zaznaczyć, że to upowszechnione brzmienie dogmatu jest formą uproszczoną i pokazuje tylko dominujące kierunki przepływu informacji genetycznej, „zakazując” jedynie kierunku białko → kwasy nukleinowe oraz białko → białko, pozostałe uznając za możliwe (co potwierdziły późniejsze odkrycia) [5, 7]. Poglądy te Crick przedstawił światu w roku 1957, a opublikowane zostały rok później [10]. Już w tym samym roku udało się doświadczalnie potwierdzić istnienie „adaptorowego” RNA. Eksperyment przeprowadzony przez dwóch amerykańskich biochemików, Mahlona Busha Hoaglanda (1921-2009) oraz Paula Charlesa Zamecnika (1912-2009), wykazał, że część frakcji RNA miała zdolność przyłączania aminokwasów i dostarczania ich do miejsc syntezy białek, a usunięcie tych cząsteczek RNA z układu hamowało syntezę peptydów. W ten sposób poznano drugi rodzaj kwasu rybonukleinowego, tRNA (transportujący, transferowy RNA) [2, 3, 5, 11]. W tym samym czasie świat nauki odkrył także i trzeci rodzaj cząsteczek RNA, a przyczyniły się do tego 2 eksperymenty. Pierwszy, przeprowadzony w roku 1956 przez amerykańskiego biologa, Elliotta (Kena) Volkina (1919-2011) oraz amerykańskiego genetyka, Lazarusa Astrachana (1925-2003) [12, 13], pokazał, że w wyniku infekcji bakterii *Escherichia coli* bakteriofagiem T2 powstawała nowa frakcja RNA, której sekwencja nie była zgodna z bakteryjnym rRNA, ale za to była zgodna z fagowym DNA [3]. Drugi eksperyment, przeprowadzony w roku 1957 przez francuskiego genetyka, François Jacoba (1920-2013), francuskiego biochemika, Jacquesa Luciena Monoda (1910-1976) oraz amerykańskiego biochemika, Arthura Becka Pardee (1921-2019) [14], pokazał, że bakterie, które pozyskiwały nowy gen w wyniku transformacji, zaczynały wytwarzać jego produkt niemal natychmiast. Kluczowe jest tu słowo „natychmiast”, ponieważ oznaczało to, że komórka nie miała czasu na wyprodukowanie odpowiedniego rybosomu dedykowanego danemu białku, co przeczyło panującej dotąd hipotezie, że to rRNA jest pośrednikiem w przepływie informacji genetycznej od DNA do białka [2, 3, 5, 8, 9]. Ostatecznie elementy genetycznej układanki „trafiły na swoje miejsca” w trakcie burzliwej naukowej dyskusji, która odbyła się w słynnym King’s College (Londyn, Wielka

Brytania), związanym z rozszyfrowaniem struktury DNA [1], w gabinecie Sydneya Brennera (1927-2019) [3, 5, 8], zasłużonego brytyjskiego biologa o południowoafrykańskim pochodzeniu, późniejszego laureata Nagrody Nobla z dziedziny fizjologii lub medycyny (w roku 2002), *za odkrycia dotyczące genetycznej regulacji rozwoju organów i programowanej śmierci komórki* [6]. Wyniki naukowych dociekań opublikowały jednocześnie, w roku 1961 w prestiżowym „Nature”, 2 zespoły [15, 16], a nowy rodzaj cząsteczki kwasu rybonukleinowego zyskał nazwę mRNA (matrycowy, informacyjny RNA). Jacob i Monod uhonorowani zostali w roku 1965 Nagrodą Nobla z dziedziny fizjologii lub medycyny, *za odkrycia dotyczące genetycznej kontroli enzymów i syntezy wirusów*, a wyróżnienie to dzielili z francuskim mikrobiologiem i wirusologiem o nazwisku André Michel Lwoff (1902-1994), który wyjaśnił mechanizm lizogennej infekcji wirusowej [6].

Dalsze eksperymenty dowiodły, że rybosomy to trwałe oraz uniwersalne „fabryki białek”, które nie powstają *ad hoc* w odpowiedzi na zapotrzebowanie komórki na produkt danego genu oraz że mRNA ma zdolność łączenia się z nimi [5]. W roku 1960 wykazano także, iż DNA i RNA wchodzi we wzajemne, bezpośrednie interakcje [17], zaś w roku 1967 – że tylko jedna z dwóch nici DNA jest wykorzystywana w trakcie transkrypcji (nazywana jest ona nicią matrycową, ta druga zaś – kodującą) i że dla różnych genów mogą być to różne nici [18]. W tym samym czasie badania amerykańskiego biochemika, Samuela Weissa (1926-1997) zaowocowały odkryciem polimerazy RNA oraz wykazały, że enzym ten syntetyzuje RNA, wykorzystując trifosforany rybonukleotydów i z użyciem DNA jako matrycy, zgodnie z zasadą komplementarności, podobnie jak w przypadku replikacji DNA [7, 19]. Biologia molekularna powoli odsłaniała zatem swoje tajemnice. Pozostało jednak jeszcze rozwiązanie jednej z ważniejszych zagadek: poznanie mechanizmu zamieniającego informację zawartą w DNA (mRNA) na strukturę białek, czyli rozszyfrowanie kodu genetycznego.

2.1. Kod genetyczny

Pierwsze hipotezy sugerujące, że kolejność nukleotydów w DNA determinuje kolejność aminokwasów w białku, pojawiły się około lat 50. XX wieku, a ich autorami byli m.in. [2, 9]: wspomniany już wcześniej André Boivin i francuski farmaceuta, Roger Vendrely (1910-1988) [20], amerykański biochemik, Alexander Latham Dounce (1909-1997) [21] oraz sowiecko-amerykański fizyk i kosmolog, George (Georgiy Antonovich) Gamov (1904-1968) [22]. Dość szybko zorientowano się, że do zakodowania informacji o aminokwasie nie wystarczą pojedyncze nukleotydy, których jest zaledwie 4, podczas gdy aminokwasów – 20. Kod nie mógłby być także dwójkowy, ponieważ 4 nukleotydy w kombinacji po 2 dają 16 możliwych wariantów (4^2), a to nadal za mało. Za najbardziej prawdopodobny uznano więc kod trójkowy, który daje 64 kombinacje (4^3) – 3 kolejne nukleotydy stanowią podstawowy „znak” kodu genetycznego, zwany kodonem. Doświadczalnie udowodniono, że kod rzeczywiście jest trójkowy, w roku 1961, a dokonali tego: przywoływani już wyżej Francis Crick i Sydney Brenner z King’s College oraz brytyjski lekarz i fizyk, Richard John Watts-Tobin (1934-2016) i amerykańska biologka, Leslie Barnett (1920-2002) [23]. Ich eksperyment polegał na wywoływaniu u bakteriofagów mutacji, które polegały na usunięciu odpowiednio 1, 2 lub 3 kolejnych nukleotydów. Tylko w przypadku usunięcia 3 nukleotydów białkowy produkt wydawał się być niezmienny lub niewiele zmieniony, podczas gdy w pozosta-

tych 2 przypadkach informacja genetyczna stawała się zupełnie nieczytelna. Przyczyna leżała w tym, co dziś nazywamy „przesunięciem ramki odczytu” – usunięcie nukleotydów w ilości nie będącej wielokrotnością 3 powoduje, że kodony mają zupełnie inny skład, ponieważ zaczynają i kończą się w innych miejscach. Tylko usunięcie 3 kolejnych nukleotydów nie niszczy zupełnie informacji genetycznej, ponieważ reszta kodonów pozostaje nienaruszona. Badacze określili także cechy kodu, takie jak to, że jest zdegenerowany (ze względu na „nadmiar” kodonów niektóre aminokwasy kodowane są przez kilka różnych kombinacji trójek nukleotydów), niezachodzący (kolejne kodony nie nakładają się na siebie) i bezprzecinkowy (pomiędzy kodonami nie ma przerw) [2, 5, 9, 24]. Pozostałe cechy dopełniające charakterystykę kodu genetycznego obejmują to, że jest kolinearny (kolejność kodonów w DNA odpowiada kolejności aminokwasów w białku), jednoznaczny (dana trójka nukleotydów koduje zawsze ten sam aminokwas) i uniwersalny (u wszystkich organizmów żywych występuje ten sam kod genetyczny i o tych samych cechach, choć dla porządku należy zaznaczyć, że można w przyrodzie znaleźć wyjątki) [5, 25-27].

Ostatnim elementem układanki pozostawało złamanie kodu, czyli rozszyfrowanie tego, które kodony odpowiadają poszczególnym aminokwasom. W roku 1954 wspomniany już George Gamov oraz James Dawey Watson (ur. w 1928), amerykański genetyk i biochemik, współodkrywca struktury DNA [1] i jeden z laureatów Nagrody Nobla z dziedziny fizjologii lub medycyny w roku 1962, za *odkrycie dotyczące struktury molekularnej kwasów nukleinowych i jej znaczenia w przekazywaniu informacji w substancjach żywych* [6], założyli „Krawatowy Klub RNA”. Liczba członków stowarzyszenia odpowiadała ilości aminokwasów białkowych, a każdy z nich nosił spinę do krawata z 3-literowym skrótem „swojego” aminokwasu. Klubowiczom, mimo szczerego zapału, nie udało się złamać kodu [3, 5, 8]. W latach 1961-1965 rzecz ta udała się innemu zespołowi badawczemu. Pierwszym ku temu krokiem był eksperyment przeprowadzony przez amerykańskiego biochemika i genetyka, Marshalla Warrena Nirenberga (1927-2010) oraz niemieckiego biochemika, Heinricha Matthaei (ur. w 1929). Uчени inkubowali łańcuch RNA zbudowany z samych uracyli, z odpowiednimi odczynnikami, enzymami i aminokwasami, a analiza powstałego peptydu wykazała, że jest on zbudowany wyłącznie z fenyloalaniny [2, 3, 27, 28]. W ten sposób rozszyfrowano molekularne znaczenie pierwszego kodonu (UUU). W pracach tych istotny udział miał też izraelski chemik, biochemik i immunolog o polskich korzeniach, Michael Sela *vel* Mieczysław Salomonowicz (1924-2022), który pomógł odpowiednio ustawić warunki eksperymentu. Dość szybko udało się rozszyfrować pozostałe kodony zbudowane z jednakowych nukleotydów, podczas gdy kodony złożone z różnych nukleotydów stanowiły większe wyzwanie, ponieważ wymagały umiejętności syntetyzowania łańcuchów RNA o ściśle określonej sekwencji nukleotydowej. Tę niezwykle cenną umiejętność opanował hindusko-amerykański biochemik, Har Gobind Khorana (1922-2011) [2, 3, 29]. Swoją wkład w złamanie kodu genetycznego miał także amerykański biochemik, Robert William Holley (1922-1993), który zsekwencjonował cząsteczkę tRNA specyficzną dla alaniny [3, 30]. Dzięki tym wszystkim badaniom i odkryciom wiemy, że z możliwych 64 trójkowych kombinacji nukleotydów (kodonów), 61 koduje aminokwasy, zaś pozostałe 3 (UAA, UAG oraz UGA) stanowią tzw. sygnał „stop” kończący syntezę białka (z racji tego, że nie kodują żadnego aminokwasu nazywane są także kodonami nonsensownymi). W roku 1968

Holley, Khorana i Nirenberg otrzymali Nagrodę Nobla z dziedziny fizjologii lub medycyny, *za interpretację kodu genetycznego i jego funkcji w syntezie białka* [6].

Dość szybko udało się dowieść, że kod genetyczny i jego właściwości są prawdziwe także w warunkach *in vivo*. Potwierdziły to np. eksperymenty prowadzone przez amerykańskiego genetyka, Charlesa Yanofsky'ego (1925-2018), w których obserwowano efekty mutacji genów bakterii *Escherichia coli* [9, 31, 32] oraz doświadczenia z wykorzystaniem wirusa mozaiki tytoniu (TMV, ang. *tabacco mosaic virus*) przeprowadzone przez niemieckiego biochemika o nazwisku Heinz-Günter Wittmann (1927-1990) oraz niemiecką biochemiczkę, Brigitte Wittmann-Liebold (ur. w 1931), w których obserwowano, w jaki sposób mutacje materiału genetycznego wirusa (RNA) wpływają na jego białkowy kapsyd [9, 33]. Eksperymenty te potwierdziły ponadto uniwersalność kodu genetycznego (pomijając wspomniane już wyżej wyjątki).

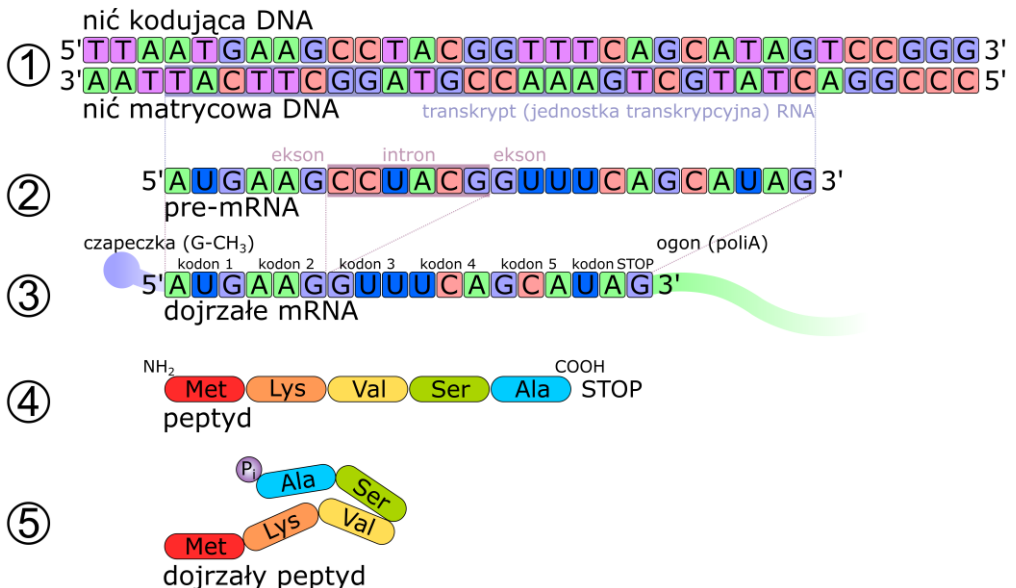
2.2. DNA → RNA → białko

Te i inne odkrycia (głównie przełomowe badania na hodowlach *Escherichia coli*, przeprowadzone przez wspomnianych już François Jacoba, Jacquesa Monoda oraz Arthura Pardee [14]) doprowadziły do tego, że już w latach 60. XX wieku poznano i opisano mechanizmy ekspresji genów u bakterii, czyli w komórce prokariotycznej (procesy te są skomplikowane, ale i tak znacznie prostsze niż te zachodzące w przypadku komórki eukariotycznej, której DNA jest upakowane w jądrze komórkowym i których szczegóły poznano znacznie później). Sekwencja DNA oznaczająca początek genu bakteryjnego nazywana jest promotorem i leży powyżej genu (ang. *upstream*), w kierunku końca 5' cząsteczki. W wyniku aktywacji promotora (np. w przypadku genów związanych z metabolizmem laktozy aktywatorem jest laktoza) przyłącza się do niego kompleks transkrypcyjny (w przypadku bakterii jest to tylko polimeraza RNA) i rozpoczyna się proces transkrypcji, czyli syntezy nici RNA na matrycy DNA, zgodnie z zasadą komplementarności, w kierunku 5'→3'. Proces ten zachodzi aż do momentu napotkania sekwencji kończącej transkrypcję, czyli tzw. terminatora, leżącego poniżej genu (ang. *downstream*), w kierunku końca 3' cząsteczki. Rozdzielone nici DNA ponownie spleatają się w helisę, a powstałe mRNA oddziela się i jest od razu gotowe do translacji. W większości przypadków zawiera ono informację o kilku peptydach, ponieważ geny bakteryjne zwykle występują w zespołach zwanych operonami, kierowanych przez jeden promotor i jeden terminator (operony obejmują przeważnie geny związane z jednym, konkretnym szlakiem, np. metabolizmem laktozy). Aktywność genów (objawiająca się ilością odpowiednich transkryptów mRNA) związanych z danym szlakiem metabolicznym ustaje, kiedy spada ilość cząsteczek aktywatora (np. laktozy) [2, 8, 26, 27, 34].

Proces transkrypcji jest nieco bardziej skomplikowany u eukariontów, ponieważ ich DNA upakowane jest w jądrze komórkowym, zaś geny mają nieco inną „konstrukcję” i nie tworzą operonów. Eukarionty posiadają ponadto przynajmniej 3 różne rodzaje polimerazy RNA (I, II oraz III), a ich kompleks transkrypcyjny zawiera także inne białka (tzw. czynniki transkrypcyjne), które odpowiadają m.in. za uruchomienie dostępności danego fragmentu DNA. Wraz z polimerazą RNA tworzą one tzw. transkrypcyjny kompleks inicjacyjny, który rozpoznaje specyficzne miejsca w obrębie promotora genu, zwane kasetą TATA [26, 27]. Poznanie szczegółów transkrypcji u eukariontów nastąpiło dopiero w początkach XXI wieku i zawdzięczamy to amerykańskiemu biochemikowi o nazwisku Roger David Kornberg (ur. w 1947) – synowi amerykańskiego biochemika i lekarza,

Arthura Kornberga (1918-2007), laureata Nagrody Nobla z dziedziny fizjologii lub medycyny w roku 1959, za odkrycie mechanizmów biologicznej syntezy kwasów rybonukleinowych i kwasów deoksyrybonukleinowych [1, 6] – oraz jego współpracownikom, którzy prowadzili doświadczenia na drożdżach (*Saccharomyces cerevisiae*). Badaczom udało się m.in. zidentyfikować polimerazę RNA II (odpowiada ona za syntezę informacyjnego RNA, podczas gdy inne typy polimerazy syntetyzują pozostałe rodzaje RNA) oraz inne białka uczestniczące w transkrypcji, określić trójwymiarową strukturę kompleksu transkrypcyjnego, a także odkryć rolę nukleosomu w regulacji transkrypcji. W roku 2006 Roger Kornberg uhonorowany został Nagrodą Nobla z dziedziny chemii, za badania molekularnego mechanizmu transkrypcji w komórkach eukariotycznych [6].

Powstała w wyniku transkrypcji eukariotyczna cząsteczka RNA nie jest jeszcze dojrzałym mRNA gotowym do translacji, ale tzw. pre-mRNA, które musi zostać poddane obróbce potranskrypcyjnej (rys. 1). Odbywa się ona w jądrze komórkowym i obejmuje kilka elementów, w tym dobudowanie na końcu 5' tzw. czapeczki w postaci zmodyfikowanego nukleotydu guaninowego oraz dołączenie na końcu 3' tzw. ogona poli-A, zbudowanego z 50-250 reszt adeniny. Modyfikacje te najprawdopodobniej umożliwiają cząsteczce opuszczenie jądra, chronią ją przed przedwczesną degradacją i ułatwiają łączenie z rybosomami. Trzeci element obróbki to usunięcie niekodujących fragmentów z cząsteczki pre-mRNA [27]. Geny eukariotyczne (w przeciwieństwie do prokariotycznych) są bowiem nieciągłe, tzn. składają się z wzajemnie przeplatających się fragmentów kodujących (eksonów) oraz niekodujących (intronów). Odkrycia tego w roku 1977 dokonali niezależnie od siebie: amerykański genetyk, Phillip Allen Sharp (ur. w 1944) [35, 36] oraz brytyjski biochemik i biolog molekularny, Richard John Roberts (ur. w 1943) [37]. W 1993 roku zostali oni uhonorowani Nagrodą Nobla z dziedziny fizjologii lub medycyny, za odkrycie genów nieciągłych [6].



Rysunek 1. Ekspresja genu eukariotycznego: transkrypcja (1 → 2), obróbka potranskrypcyjna (2 → 3), translacja (3 → 4), obróbka potranslacyjna (4 → 5); opracowanie własne

Nazwy dla fragmentów kodujących i niekodujących zaproponował amerykański fizyk, biochemik i biolog molekularny, Walter Gilbert (ur. w 1932) [2, 8], jeden z laureatów Nagrody Nobla z dziedziny chemii w roku 1980, za wkład związany z określeniem sekwencji zasad w kwasach nukleinowych [6], dotknięty, przynajmniej czasowo, tzw. „chorobą Noblistów” (ang. *Nobel disease* lub *nobelitis*) [38] – kwestionował związek wirusa HIV z AIDS [39]. Usuwanie intronów z pre-mRNA nazwane zostało z ang. *splicingiem* (spotykana jest także spolszczona wersja tego terminu – splajsing), czyli składaniem RNA, a badania wykazały, że za proces ten odpowiadają tzw. małe jądrowe rybonukleoproteiny (snRNPs, ang. *small nuclear ribonucleoproteins*), które rozpoznają odpowiednie sekwencje sygnałowe na końcach intronów, wycinają je i łączą sąsiednie eksony. W skład snRNPs wchodzi snRNA (ang. *small nuclear RNA*) [27] – w ten sposób poznano kolejny rodzaj cząsteczek RNA. Obecnie znane są także cząsteczki RNA o właściwościach autokatalicznych, tzw. rybozymy oraz antysensowne RNA – krótkie interferujące RNA (siRNA, ang. *small interfering RNA*) i mikroRNA (miRNA, ang. *microRNA*), pełniące ważną rolę w ekspresji genów [3].

Fragmenty kodujące są zwykle znacznie dłuższe od niekodujących: średnia długość eksonu wynosi od kilkudziesięciu do kilkuset nukleotydów, podczas gdy w przypadku intronów jest to od kilkudziesięciu do kilku tysięcy nukleotydów. Statystyczna długość transkryptu (fragmentu DNA przepisywanego na pre-mRNA) wynosi 27 tysięcy nukleotydów, z czego po *splicingu* zostaje około 1200; eksony przeważnie stanowią około 5-10% genu, skrajnie zaś może to być zaledwie 1%. W całym genomie ludzkim eksony stanowią około 1,2%. Niekodujące DNA nazywane było dawniej „śmieciowym” (ang. *junk*), co wedle współczesnej wiedzy jest już zupełnie nieadekwatne. Intryny bowiem mogą zawierać sekwencje regulatorowe dla danego genu, odcinki wzmacniające transkrypcję, a nawet fragmenty kodujące dla innych genów (o czym nieco więcej trochę później). Powszechne jest także zjawisko alternatywnego *splicingu*, polegające na łączeniu eksonów w różnych kombinacjach, co pozwala na zakodowanie więcej niż jednego białka za pomocą jednego genu (zwykle są to pokrewne peptydy). Uważa się także, iż niekodujące DNA zmniejsza ryzyko przerwania jakiejś ważnej sekwencji kodującej w trakcie procesu *crossing-over* oraz stwarza ewolucyjny potencjał do powstawania nowych genów [2, 5, 27, 34].

Dojrzałe mRNA ulega translacji, a w procesie tym, który zachodzi na rybosomach (wolnych, zawieszonych w cytoplazmie i/lub związanych z siateczką śródplazmatyczną w przypadku eukariontów), informacja zawarta w tej cząsteczce tłumaczona jest, zgodnie z kodem genetycznym, na sekwencję aminokwasów w białku. Przebieg translacji jest podobny (choć nie identyczny) u prokariotów i eukariontów, z tą zasadniczą różnicą, że u tych drugich jest on oddzielony przestrzennie od transkrypcji, która zachodzi w jądrze komórkowym. Translacja wymaga także obecności wolnych aminokwasów, które dostarczane są na miejsce syntezy białka za pośrednictwem cząsteczek tRNA, specyficznych dla każdego z nich. Dołączanie kolejnych aminokwasów do rosnącego łańcucha peptydowego odbywa się zgodnie z informacją zapisaną w mRNA i odczytywaną w kierunku 5'→3', a za rozpoznawanie kolejnych kodonów odpowiedzialne są cząsteczki tRNA posiadające tzw. antykodon (pasujący zgodnie z zasadą komplementarności do kodonu na mRNA), co nie pozwala na wbudowanie niewłaściwego aminokwasu. Cząsteczki tRNA pełnią zatem rolę genetycznego tłumacza. Rybosomy spełniają z kolei funkcję spajającą cały aparat produkcji białek, umożliwiając fizyczny kontakt

wszystkim niezbędnym do translacji elementom. Katalizują także tworzenie wiązań peptydowych pomiędzy aminokwasami w rosnącym peptydzie [26, 27]. W roku 2000 odwzorowano strukturę rybosomów, wykorzystując metodę krystalografii rentgenowskiej, a dokonali tego: amerykański biofizyk indyjskiego pochodzenia, Venkatraman „Venki” Ramakrishnan (ur. w 1952), amerykański biochemik i biofizyk molekularny, Thomas Arthur Steitz (1940-2018) oraz izraelska specjalistka krystalografii rentgenowskiej, Ada Yonath (ur. w 1939). Cała trójka uhonorowana została w roku 2006 Nagrodą Nobla z dziedziny chemii, za badania nad strukturą i funkcją rybosomu [6]. Powstały w wyniku translacji łańcuch aminokwasowy ulega następnie dojrzewaniu, przyjmując odpowiednio strukturę drugo-, trzecio- i ewentualnie czwartorzędową [26, 27]. W roku 1961 amerykański biochemik, Christian Boehmer Anfinsen (1916-1995) wykazał, że sekwencja aminokwasów sama w sobie determinuje sposób, w jaki łańcuch peptydowy się fałduje, a także to, że proces ten nie wymaga żadnej dodatkowej informacji genetycznej, a te i inne osiągnięcia przyniosły mu w roku 1972 Nagrodę Nobla z dziedziny chemii, za badania rybonukleaz, w szczególności za odkrycie związku między kolejnością aminokwasów w białku i jego biologicznie aktywną konformacją [6]. W trakcie obróbki potranslacyjnej peptyd może także zostać przycięty, ulec fosforylacji, metylacji lub acetylacji czy też może być do niego dołączony jakiś składnik niebiałkowy (np. lipid, cukier, jon metalu) itd. (rys. 1). Dojrzałe, prawidłowo uformowane białko jest końcowym produktem genu [26, 27]. Tylko czym właściwie jest gen?

3. Jednostki dziedziczenia i mutacje, czyli o tym czym właściwie jest gen i skąd się bierze zmienność

3.1. Gen w wyobrażeniu ewolucjonistów

Pierwsze poważne rozważania na temat natury genu sięgają II połowy XIX wieku, który dał nauce ojca genetyki, austro-węgierskiego (pochodzącego z Moraw, leżących na terenie obecnych Czech) przyrodnika i zakonnika, Gregora Johanna Mendla (1822-1884), a także twórcę ewolucjonizmu, brytyjskiego podróżnika, przyrodnika i geologa, Charlesa Roberta Darwina (1809-1882) [1]. Próby wyjaśnienia procesów kierujących ewolucją doprowadziły w początkach XX wieku do tego, że zaczęto wreszcie dostrzegać jej związku z genetyką i ostatecznie pomogła ona zrozumieć naturę enigmatycznej jednostki dziedziczenia. Odrzucano już wtedy lamarckizm – pierwszą materialistyczną teorię ewolucji, której autorem był francuski żołnierz, lekarz i przyrodnik, Jean Baptiste de Lamarck (1744-1829) – zakładający możliwość dziedziczenia cech nabytych [40], za podstawowy mechanizm ewolucyjny uznając dobór naturalny, a za źródło zmienności – mutacje [2]. Termin ten zaproponował w roku 1900 holenderski botanik i genetyk, Hugo Marie de Vries (1848-1935), używając go do opisu nowych, pojawiających się spontanicznie cech. Warto zaznaczyć, że ze względu na brak w owych czasach wiedzy na temat molekularnej struktury genu, ówczesne rozumienie tego pojęcia znacząco odbiegało od współczesnego, jednak kluczowy był tu pogląd de Vriesa na temat natury mutacji. Uważał on bowiem (w przeciwieństwie do lamarckistów), że nie dochodzi do nich celowo (za sprawą domniemanych gemmul/gemul *vel* pangenów – tajemniczych cząstek informacyjnych, wysyłanych przez różne organy do narządów rozrodczych, które miały współtworzyć komórki rozrodcze o cechach przydatnych w danych warunkach [1]), ale są dziełem zupełnego przypadku. Jego teoria mutacji [41, 42] próbowała „pogodzić” dwa przeciwstawne obozy. Po pierwsze, tych, którzy uważali, że zmiany są nagłe i nieciągłe

(tzw. mutacjonistów lub saltacjonistów) oraz tych, którzy postulowali raczej drobne zmiany i rozciągnięty w czasie proces ewolucji (tzw. neodarwinistów lub gradualistów). Po drugie – tych, którzy uważali, że wszystkie zmiany są korzystne dla gatunku oraz tych, którzy postulowali, że w toku ewolucji pojawiają się także zmiany szkodliwe w danych warunkach. Naukowe poglądy de Vriesa, które były efektem doświadczeń z kontrolowanym krzyżowaniem wielu odmian różnych gatunków roślin i w wyniku których otrzymywał nowe odmiany, kierowały go raczej w stronę saltacjonizmu. Jego teoria zaś, choć ostatecznie nie przetrwała próby czasu, na przełomie XIX i XX wieku bardzo dobrze korespondowała z ewolucjonizmem, zgrabnie, jak na owe czasy, wyjaśniając przyczynę zmienności i powstawania w efekcie nowych gatunków. Współczesna wiedza biologiczna niejako „pogodziła” historyczne obozy: zmiany obserwowane fenotypowo mają raczej charakter gradualny, ale wynikają ze skokowych zmian molekularnych w obrębie materiału genetycznego, czyli mutacji – w obecnym rozumieniu tego terminu [5, 8, 43-45]. Rozważania de Vriesa zainspirowały ponadto Thomasa Hunta Morgana (1866-1945), wybitnego amerykańskiego biologa, genetyka i embriologa, do szukania mutacji u wywilżny karłowatej, zwanej potocznie muszką owocówką (*Drosophila melanogaster*), co przyniosło jego zespołowi wielkie sukcesy [1], a jemu samemu Nagrodę Nobla z dziedziny fizjologii lub medycyny w roku 1933, *za odkrycia dotyczące roli chromosomu w dziedziczeniu* [6].

Do najbardziej zasłużonych zwolenników i twórców neodarwinizmu należeli: niemiecki biolog i genetyk, August Friedrich Leopold Weismann (1834-1914) [46, 47], najbardziej znany jako autor koncepcji tzw. plazmy zarodkowej [1], opisaney w roku 1892 w dziele pt. „Das Keimplasma: eine Theorie der Vererbung” [48]; brytyjski biolog ewolucyjny i eugenik, Julian Sorell Huxley (1887-1975), autor wydanej w roku 1942 książki popularyzującej ewolucjonizm pt. „Evolution: The Modern Synthesis” [49]; ukraińsko-amerykański genetyk i biolog ewolucyjny, zagorzały przeciwnik eugeniki i koncepcji ras ludzkich, Theodosius Grygorowych Dobzhansky (1900-1975), autor przełomowej książki opublikowanej w roku 1937 na temat genetyki ewolucyjnej pt. „Genetics and the Origin of Species” [50] i słynnego cytatu, będącego jednocześnie tytułem jednej z jego publikacji: *nie w biologii nie ma sensu, jeśli jest rozpatrywane w oderwaniu od ewolucji* [51] oraz niemiecko-amerykański ornitolog i ewolucjonista, Ernst Walter Mayr (1904-2005) [52], autor opublikowanej w roku 1942 książki pt. „Systematics and the Origin of Species from the Viewpoint of a Zoologist” [53], na łamach której zaproponował „ewolucyjną” (do dziś stosowaną) definicję gatunku. Założenia neodarwinizmu dopracowano ostatecznie w połowie XX wieku i jest on nazwany obecnie „syntetyczną teorią ewolucji”, ponieważ scala osiągnięcia darwinizmu, współczesnej genetyki (w szczególności genetyki populacyjnej), ekologii i paleontologii. Teoria ta mówi o tym, że podstawową jednostką dziedziczenia jest gen (co dały badania Mendla czy Morgana) oraz że genotypy (objawiające się w fenotypach) podlegają naturalnej selekcji (co zauważył Darwin). Trzeci filar teorii, którego do tej pory brakowało, opisuje mechanizmy doboru naturalnego i zakłada, że zmienność wynika z losowych rekombinacji materiału genetycznego (przetasowania genów w procesie *crossing-over*) oraz przypadkowych (nieukierunkowanych) mutacji. Populacje zaś ewoluują poprzez zmiany w częstotliwości występowania poszczególnych alleli, a gromadzące się z czasem drobne zmiany mogą doprowadzić do izolacji rozrodczej (wynikającej z izolacji genetycznej) i powstania nowego gatunku. Współczesna syntetyczna teoria ewolucji korzysta także z osiągnięć embriologii i biologii rozwojowej, genetyki rozwoju [8, 54] czy epigenetyki [54, 55].

3.2. Gen w wyobrażeniu genetyków

Pomimo tego, że w początkach XX wieku przedstawiciele różnych obszarów nauk przyrodniczych coraz śmieiej posługiwali się słowem „gen” (zaproponowanym zresztą dopiero w roku 1909 przez duńskiego farmaceutę, botanika i genetyka, Wilhelma Ludwiga Johannsena (1857-1927) jako skrót od darwinowskich pangenów i pochodzącym od gr. *genos* oznaczającego początek), pojęcie to przez długi czas pozostawało niezdefiniowane, a gen pojmowano jako jakąś bliżej nieokreśloną, enigmatyczną jednostkę dziedziczenia, w klasycznym (mendelowskim) rozumieniu, przekazującą cechy od rodziców do potomstwa. Gen Mendla, jako niepodzielna cząstka dziedziczości, miał dyskretną naturę (dając np. kwiaty albo białe, albo fioletowe), podczas gdy niektóre obserwowane cechy fenotypowe, takie jak np. wzrost, masa ciała czy kolor włosów wydają się mieć charakter ciągły, dający się opisać w danej populacji rozkładem gaussowskim. Tę pozorną niezgodność wyjaśnił na gruncie matematycznym brytyjski statystyk, Ronald Aylmer Fisher (1890-1962), zakładając (słusznie), że za cechy te odpowiada kilka (lub więcej) genów jednocześnie, a wszystkie ich możliwe permutacje dają wachlarz fenotypów tak szeroki, że powstaje wrażenie ciągłości cechy [2, 5, 8, 34, 56, 57]. Chromosomowa teoria dziedziczenia, która nabrała kształtów w latach 1902-1904, a której autorstwo przypisuje się amerykańskiemu genetykowi i lekarzowi o nazwisku Walter Stanborough Sutton (1877-1916) oraz niemieckiemu zoologowi i anatomowi o nazwisku Theodor Heinrich Boveri (1862-1915), określiła geny jako jednostki fizycznie znajdujące się w chromosomach, ułożone na nich liniowo i zajmujące zawsze te same miejsca (łac. *locus* w l. poj., *loci* w l. mn.) [1]. Z kolei badania wspomnianego wcześniej Morgana i jego zespołu doprowadziły do zdefiniowania genu jako jednostki dziedziczenia niepodzielnej w trakcie rekombinacji i zlokalizowanej w stałym *locus* na chromosomie. Geny wyobrażano sobie jako koraliki nawleczone na „nitkę” chromosomu [5, 7-9, 56]. Tymczasem droga do zrozumienia natury genu wiodła, jak się niedługo okazało, poprzez mutacje.

W roku 1927 amerykański genetyk, uczeń Morgana, Hermann Joseph Muller (1890-1967) odkrył, że promieniowanie X powoduje mutacje u muszki owocówki [2, 5, 8, 34], co zaowocowało przyznaniem mu w roku 1946 Nagrody Nobla z dziedziny fizjologii lub medycyny, za *odkrycie indukcji mutacji za pomocą napromieniowywania promieniami X* [6]. Rok później amerykański genetyk, Lewis John Stadler (1896-1954) zauważył, że podobne działanie ma także promieniowanie UV [58]. Kolejnych wskazówek dostarczyły badania dwóch amerykańskich genetyków: George’a Wellsa Beadle’a (1903-1989), wychowanka Morgana oraz Edwarda Lawrie Tatum (1909-1975). Badacze indukowali, z użyciem promieniowania X, mutacje u różnych szczepów grzyba pleśniowego o nazwie *Neurospora crassa*, a następnie obserwowali zmiany w zdolności wzrostu tych organizmów na pożywkach o ściśle kontrolowanym składzie, co pozwalało im śledzić poszczególne szlaki metaboliczne i ich zaburzenia. Beadle i Tatum wysunęli wniosek, że jeden gen odpowiada za jeden szlak metaboliczny, a wyniki swoich badań opublikowali w roku 1941 [59]. Dalsze, bardziej szczegółowe eksperymenty, rozszerzone także o śledzenie przemian metabolicznych u bakterii *Escherichia coli*, doprowadziły badaczy do wniosku, że jeden gen odpowiada za jeden „kawałek” danego szlaku metabolicznego (które niejednokrotnie są wieloetapowe), a ponieważ reakcje biologiczne warunkowane są przez enzymy (najczęściej za każdy „kawałek” szlaku odpowiada inny enzym), które najwyraźniej były uszkodzane w wyniku mutacji, przełożyło się to na słynną hipotezę „jeden gen – jeden enzym”. Warto zaznaczyć, że pomysł, iż geny wpływają na fenotyp poprzez

enzymy odpowiadające za poszczególne szlaki metaboliczne, zrodził się już wcześniej, w głowie brytyjskiego lekarza i genetyka molekularnego, Archibalda Edwarda Garroda (1857-1936), który badał alkaptonurię i opisywał ją jako wrodzone (dziedziczne) zaburzenie metaboliczne. Hipoteza „jeden gen – jeden enzym” została następnie nieco uogólniona do postaci „jeden gen – jedno białko” (wszak nie wszystkie białka to enzymy) oraz „jeden gen – jeden polipeptyd” (w celu uwzględnienia także białek złożonych) [2, 5, 8, 27, 34]. Warto zwrócić uwagę, że w tamtym okresie uważano, że gen jest białkiem [1], co korespondowało z wynikami badań nad szlakami metabolicznymi (mutacje genów prowadziły do uszkodzania białek). W roku 1958 Beadle i Tatum otrzymali Nagrodę Nobla z dziedziny fizjologii lub medycyny, *za odkrycie, że geny działają poprzez regulowanie określonych wydarzeń chemicznych* [6].

3.3. Gen w wyobrażeniu biologów molekularnych

Udowodnienie, że nośnikiem informacji genetycznej są kwasy nukleinowe, a nie białka [1], całkowicie przemodelowało rozważania o genach. Wraz z rozwojem biologii molekularnej zaczęto o nich myśleć jak o wydzielonych fragmentach nici DNA (określonych sekwencjach nukleotydów), które po przepisaniu na mRNA stają się instrukcją do budowy konkretnego białka [56], o mutacjach zaś, jak o zmianach w DNA. Współczesna nauka definiuje mutację jako trwałą zmianę w materiale genetycznym, niewynikającą z procesów rekombinacyjnych. Zmiany te mogą być generowane przez fizyczne czynniki mutagenne (np. promieniowanie, wysoką temperaturę) lub chemiczne czynniki mutagenne (np. analogi zasad azotowych, związki modyfikujące zasady azotowe, czynniki interkalujące, kolchicynę), ale mogą też być efektem spontanicznych pomyłek aparatu replikacyjnego. Polimeraza DNA myli się raz na 10 tysięcy, do 100 tysięcy nukleotydów, ale ostatecznie, dzięki komórkowym mechanizmom naprawczym, „przegapione” mutacje, które ulegają utrwaleniu, zdarzają się średnio raz na 10 miliardów nukleotydów [27, 60]. Poznanie szczegółów procesu korekty błędów replikacji uhonorowane zostało w roku 2015 Nagrodą Nobla z dziedziny chemii, *za badania mechanistyczne nad naprawą DNA*, a jej laureatami zostali: szwedzki biochemik, Tomas Lindahl (ur. w 1938), amerykański biochemik, Paul Lawrence Modrich (ur. w 1946) oraz turecki biolog molekularny, Aziz Sancar (ur. w 1946) [6].

Mutacje mogą polegać na zamianie pojedynczego nukleotydu na inny (nazywane są wtedy punktowymi) bądź na utracie kilku nukleotydów (delecje), wstawieniu kilku (insercje) czy też powieleniu niewielkiego fragmentu sekwencji DNA (mutacje dynamiczne). Takie drobne zmiany nazywane są mutacjami genowymi (ponieważ swoim zasięgiem obejmują pojedyncze geny) i choć dotyczą niewielkiej liczby nukleotydów, mogą mieć bardzo poważne konsekwencje, leżąc np. u podłoża takich zaburzeń (występujących u ludzi) jak albinizm, anemia sierpowata, daltonizm, dystrofia mięśniowa Duchenne’a, dystrofia miotoniczna, fenyloketonuria, galaktozemia, hemofilia, mukowiscydoza czy płasawica Huntingtona [26, 27]. Mutacje mogą dotyczyć nie tylko sekwencji kodującej konkretny produkt genu, ale też jego regulatorów, co może doprowadzić do tego, że gen taki, mimo że nieuszkodzony w swojej zasadniczej części, nie będzie działał prawidłowo lub w ogóle [8]. Zmiany genetyczne mogą także występować na poziomie chromosomu. Obejmują one np. delecje (utrata fragmentu chromosomu), inwersje (odwrócenie fragmentu chromosomu), translokacje (przeniesienie fragmentu chromosomu na inny), duplikacje (zduplikowanie fragmentu chromosomu, np. w wyniku dołączenia

fragmentu chromosomu homologicznego, który uległ delecji), pęknięcie centromeru (rozdzielenie chromosomu na 2 oddzielne) czy chromosom pierścieniowy (połączenie ramion chromosomu). Wreszcie mutacje mogą obejmować cały genom, co wiąże się z powstaniem garnituru chromosomowego o charakterze pośrednim (tzw. aneuploidie). U człowieka są to najczęściej trisomie: $2n + 1$ (np. trisomia 21 pary chromosomów – zespół Downa, trisomia 13 pary chromosomów – zespół Patau) lub monosomie: $2n - 1$ (np. monosomia 5 pary chromosomów – zespół *cri du chat*). Poliploidie z kolei wiążą się ze zwielokrotnieniem całego garnituru chromosomowego, a w ewolucyjnej historii życia na Ziemi w ten sposób powstało wiele nowych gatunków, szczególnie w obrębie świata roślin. Sporo powszechnych roślin użytkowych to poliploidy, np. bananowiec (*Musa paradisiaca*) jest triploidem ($3n$), a pszenica (*Triticum aestivum*) jest heksaploidem ($6n$). W świecie zwierząt poliploidia, choć znacznie rzadsza, też jest spotykana, np. u gryzonia z gatunku wiskaczoszczur czerwony (*Tympanoctomys barrerae*), który jest tetraploidem ($4n$) [26, 27].

3.4. Gen w świetle współczesnej wiedzy

Czym zatem jest gen? Jedną z współczesnych propozycji zdefiniowania tego pojęcia podaje, że *gen to podstawowa fizyczna i funkcjonalna jednostka dziedziczności*. Funkcjonalność genu dość łatwo zrozumieć, ponieważ przejawia się ona w obserwowanych makroskopowo cechach fenotypowych. Mutacje zaś, objawiające się w postaci różnorodnych zaburzeń, wynikają ze zmian w materiale genetycznym, które współcześnie stosunkowo łatwo można zlokalizować w cząsteczce DNA i powiązać z określonym genem. Niektórzy badacze są zwolennikami czysto funkcjonalnego podejścia do genu, uważając, że jego struktura i molekularna charakterystyka jest mniej istotna, a najważniejsze jest to, co gen „robi” albo czego „nie robi” (jeśli jest np. zmutowany), niezależnie od tego, jakie jest podłoże tej funkcji (prawidłowej bądź zaburzonej) lub jej braku. Nie istnieje także naukowy konsensus w kwestii tego, czy odcinki regulatorowe (np. promotory, terminatory, sekwencje wzmacniające), niestanowiące zasadniczej informacji o produkcie genu, a wpływające na jego ekspresję, należy traktować jako jego część, czy też nie. W drugim przypadku najprostsza definicja genu opisałaby go jako *fragment DNA ulegający transkrypcji (przepisaniu na mRNA)*, w pierwszym zaś np. jako *fragment DNA potrzebny do wytworzenia mRNA, na bazie którego syntetyzowane jest białko*. Nie wszystkie jednak jednostki genomowe kodują informację o białkach. Na bazie sekwencji DNA powstają także cząsteczki RNA, inne niż mRNA (np. tRNA, rRNA i wiele innych, których ilość jest znacznie większa niż do tej pory przypuszczano, a funkcja poznana tylko częściowo). Być może zatem genami należy nazywać *fragmenty DNA kodujące funkcjonalne produkty (RNA lub białko)* w celu odróżnienia ich chociażby od tzw. pseudogenów, czyli fragmentów DNA, które w przeszłości były genami, ale utraciły swoją funkcję w wyniku nagromadzenia wielu mutacji i które mogą ulegać transkrypcji, choć zwykle nie dają funkcjonalnego produktu? Nie jest to jednak regułą, a na domiar złego odkryto, że możliwe jest powstawanie chimerycznych transkryptów gen–pseudogen. Obecnie najszersza definicja genu, obejmująca jego funkcjonalną charakterystykę, podaje, że jest to *niepodzielna jednostka dziedziczenia zakodowana sekwencją genomową, która wpływa na daną cechę organizmu poprzez ekspresję tego genu, w wyniku której powstaje funkcjonalny produkt (białko lub RNA) lub poprzez regulację jego ekspresji* [34, 56, 61].

Opisanie struktury (fizyczności) genu okazuje się być zagadnieniem jeszcze bardziej złożonym. Wyobrażenie klasycznej teorii chromosomowej na temat genu jako jednostki dziedziczenia, która jest przypisana na stałe konkretnemu *locus* w chromosomie, zostało rozbite wraz z odkryciem transpozonów, czyli ruchomych elementów genetycznych. Mają one zdolność do zmieniania swojego położenia w genomie, stąd nazywane są także skaczącymi genami. Odkryła je wybitna amerykańska genetyczka i botaniczka, Barbara McClintock (1902-1992), która prowadziła eksperymenty na kukurydzy, analizując mechanizmy dziedziczenia barwy jej nasion. Warto zwrócić uwagę, że McClintock rozpoczęła swoje badania w latach 30. XX wieku (te najważniejsze trwały kolejne 2 dekady), czyli na długo przed tym, zanim poznano strukturę DNA oraz mechanizmy ekspresji genów, w szczególności eukariotycznych! Jej eksperymenty dowiodły ponadto m.in. istnienia procesu *crossing-over* czy telomerów [5, 34], a tę najbardziej przełomową pracę opublikowała w roku 1950 [62]. Niedługo potem nakreśliła opartą o swoje badania teorię dotyczącą ekspresji genów oraz mechanizmów kontroli tej ekspresji, ale świat nauki nie był jeszcze na to gotowy. Badania w tej dziedzinie dopiero ruszały, zatem wyprzedzające swoje czasy odkrycia McClintock doceniono dopiero w latach 80. XX wieku [5], a w roku 1983 przyznano jej Nagrodę Nobla z dziedziny fizjologii lub medycyny, *za odkrycie ruchomych elementów genetycznych* [6]. Transpozony mają zdolność nie tylko przemieszczania się, ale i powielania, i co ciekawe, wcale nie są rzadkie. Szacunki podają, że np. u kukurydzy nawet 90% genów może „skakać” po genomie, u człowieka zaś około 40-45%. Ruchome elementy genetyczne regulują aktywność innych genów, mogą być też powiązane z niektórymi chorobami, np. hemofilią, porfirią, pewnymi odmianami dystrofii mięśniowej czy chorobą Alzheimera, a jedna z „samolubnych, wędrujących sekwencji” zapewniła najprawdopodobniej ludziom trichromatyzm (zdolność trójbarwnego widzenia) [5]. Takie skaczące geny nazywane są także, głównie ze względu na swoją zdolność do powielania, genami pasożytniczymi lub samolubnymi. Ich istnienie stało się jednym z filarów koncepcji zaproponowanej w roku 1976 przez brytyjskiego zoologa, etologa, ewolucjonistę i publicystę, Clintona Richarda Dawkinsa (ur. w 1941) i opublikowanej w bestsellerowej książce pt. „The Selfish Gene” [63], znanej pod polskim tytułem jako „Samolubny gen”. Koncepcja ta zakłada, że jednostką podlegającą doborowi naturalnemu jest gen, organizm zaś to tylko „opakowanie”, swoiste narzędzie, którego geny używają do własnej replikacji [34, 57].

Kolejne odkrycia komplikujące tradycyjne postrzeganie genu pojawiły się w latach 70. XX wieku, kiedy wykazano, że geny są nieciągłe i opisano związane z tym (wspomniane wcześniej) zjawisko alternatywnego *splicingu*. Najnowsze badania, prowadzone głównie w ramach projektu ENCODE (ang. *Encyclopedia of DNA Elements*) i oparte o bardzo szczegółowe sekwencjonowanie genomów, wykazały, że eksony będące elementami jednego genu mogą fizycznie znajdować się bardzo daleko od siebie, także w obrębie intronów innych genów, a takich nakładających się transkryptów wykryto całe zatrzęsienie. Niekiedy w jednym genie „ukrywa” się cała odrębna sekwencja kodująca (gen w genie). Promotory, choć zwykle poprzedzają gen, czasem znajdują się na jego końcu, a regiony regulatorowe dla danej jednostki kodującej mogą leżeć nawet na innym chromosomie! Odkryto także, że geny mogą się na siebie nakładać oraz że niektóre cząsteczki mRNA zbudowane są z eksonów należących do dwóch różnych genów [2, 8, 34, 56, 61]. Analiza bardzo szczegółowo zsekwencjonowanego 1% ludzkiego genomu wykazała, że tylko około 2% zbadanego DNA kodowało białka, ale ekspresji ulegało

80%! Podobne wyniki uzyskano w badaniach prowadzonych na myszach, gdzie około 1-2% analizowanego genomu kodowało białka, a ekspresji ulegało 63%. Powstająca frakcja cząsteczek RNA niekodujących białek okazała się być zatem zaskakująco duża i chociaż ich rola nie jest jeszcze szczegółowo poznana, wiadomo, że przynajmniej część z nich aktywnie uczestniczy w regulacji ekspresji genów [56, 61], wykorzystując mechanizmy epigenetyczne [55], a ich znaczenie jest ogromne. Podobne obserwacje poczyniono już w roku 1998, kiedy zsekwencjonowano genom nicienia *Caenorhabditis elegans* i zidentyfikowano w nim bardzo liczne fragmenty kodujące RNA, ale niekodujące białek [8]. Te i inne odkrycia prowadzą niektórych biologów do wniosku, że pojęcie genu jest przestarzałe, nasze przywiązanie w tym kontekście do DNA również, a w poszukiwaniach podstawowych jednostek funkcjonalnych genomów odpowiadających za daną cechę fenotypową należy się raczej skupiać na transkryptach DNA, czyli cząsteczkach RNA niż na samym kwasie deoksyrybonukleinowym. W definicji genu opartej o DNA nie mieszczą się także wirusy, których nośnikiem informacji genetycznej jest RNA [5, 34, 56, 61]. Okazuje się ponadto, że rośliny, a być może także i zwierzęta, mogą dziedziczyć pewne cechy za pośrednictwem RNA [56]. Odkryto np., że rośliny z rodzaju *Arabidopsis* dziedziczyły informację genetyczną o sekwencji DNA specyficznej dla alleli, które nie były obecne w genomach ich rodziców, ale były obecne w poprzednich pokoleniach. Zasugerowano, że w nasionach obecne jest RNA dziadków i może być ono wykorzystane jako swoisty szablon służący do „skorygowania” zapisu odpowiedniego genu [64]. Jeśli jednak „uprzemy się”, aby pojęcie genu odnosić do DNA, potencjalna definicja mogłaby brzmieć następująco: *gen to możliwy do zlokalizowania region sekwencji genomowej, odpowiadający jednostce dziedziczenia, która jest powiązana z regionami regulatorowymi, regionami transkrybowanymi i/lub innymi funkcjonalnymi regionami tej sekwencji* [56] lub: *gen to zbiór sekwencji genomowych kodujących spójny zestaw potencjalnie nakładających się funkcjonalnych produktów* [34].

Zważywszy na to, jak trudno jest określić, czym właściwie jest gen, może rozważania na temat natury biologicznego dziedzictwa powinny się skupiać raczej na całych genomach? Podsumowując wszystkie aspekty funkcjonalnej i strukturalnej natury genu, warto sobie uświadomić, że powszechne wyobrażenie na jego temat jest bardzo dalekie od rzeczywistości. Gen nie jest ani ciągły, ani nieciągły, nie ma wyraźnych granic ani stałej lokalizacji w genomie i nie jest nawet kodowany przez stałą, jednorodną i niezmienną sekwencję nukleotydową. Jedyne zaś, co wytrzymało próbę czasu i oparło się olbrzymiemu zalewowi danych (uzyskanych na przestrzeni wielu lat badań nad dziedziczeniem i genami), to fakt, że genotyp determinuje fenotyp [34].

Uwagi ogólne

Finansowanie: Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie, Wydział Geologii, Geofizyki i Ochrony Środowiska; nr umowy: 16.16.140.315.

Literatura

1. Kostka A., *Odkrywając tajemnice cząsteczki życia – krótka historia niezwyklej naukowej podróży. DNA i dziedziczenie*, [w:] Danielewska A., Mołdoch-Mendoń I. (red.), *Przegląd aktualnych zagadnień z zakresu medycyny i biologii*, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, Lublin 2023, s. 138-157.
2. Chorąży M., *Gen strukturalny – ewolucja pojęcia i dylematy*, NOWOTWORY. Journal of Oncology, 3, 2011, s. 279-288.

3. Korczmar E.A., Belter A., Naskręt-Barciszewska M.Z., Jurga S., Barciszewski J., *100 lat RNA. Diamentowy jubileusz informacyjnego RNA*, Postępy Biochemii, 67, 2021, s. 212-222.
4. Jeener R., Szafarz D., *Relations between the rate of renewal and the intracellular localization of ribonucleic acid*, Archives of Biochemistry, 26, 1950, s. 54-67.
5. Myśliwiec D., *Przepis na człowieka, czyli krótki wstęp do odpowiedzi na pytanie: dlaczego jesteśmy, jacy jesteśmy*, Altenberg, Warszawa 2020.
6. <https://www.nobelprize.org> [data dostępu: 10.2022].
7. Gabryelska M.M., Szymański M., Barciszewski J., *DNA – cząsteczka, która zmieniła naukę. Krótka historia odkryć*, NAUKA, 2, 2009, s. 111-134.
8. Mukherjee S., *Gen. Ukryta historia*, Wydawnictwo Czarne, Wołowiec 2017.
9. Portin P., *The birth and development of the DNA theory of inheritance: sixty years since the discovery of the structure of DNA*, Journal of Genetics, 93, 2014, s. 293-302.
10. Crick F.H., *On protein synthesis*, Symposia of the Society for Experimental Biology, 12, 1958, s. 138-163.
11. Hoagland M.B., Stephenson M.L., Scott J.F., Hecht L.I., Zamecnik P.C., *A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis*, Journal of Biological Chemistry, 231, 1958, s. 241-257.
12. Volkin E., Astrachan L., *Phosphorus incorporation in Escherichia coli ribonucleic acid after infection with bacteriophage T2*, Virology, 2, 1956, s. 149-161.
13. Hall B., Spiegelman D.S., *Sequence complementarity of T2-DNA and T2-specific RNA*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 47, 1961, s. 137-163.
14. Pardee A.B., Jacob F., Monod J., *The genetic control and cytoplasmic expression of „Inducibility” in the synthesis of β -galactosidase by E. coli*, Journal of Molecular Biology, 2, 1959, s. 165-178.
15. Brenner S., Jacob F., Meselson M., *An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis*, Nature, 190, 1961, s. 576-581.
16. Gros F., Hiatt H., Gilbert W., Kurland C.G., Risebrough R.W., Watson J.D., *Unstable ribonucleic acid revealed by pulse labelling of Escherichia coli*, Nature, 190, 1961, s. 581-585.
17. Rich A., *A hybrid helix containing both deoxyribose and ribose polynucleotides and its relation to the transfer of information between the nucleic acids*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 46, 1960, s. 1044-1053.
18. Taylor K., Hradecna Z., Szybalski W., *Asymmetric distribution of the transcribing regions on the complementary strands of coliphage λ DNA*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 57, 1957, s. 1618-1625.
19. Geiduschek E.P., Haselkorn R., *Professor Samuel B. Weiss, 1926-1997*, Trends in Biochemical Sciences, 24, 1999, s. 45-46.
20. Cavaillon J.-M., *André Boivin: A pioneer in endotoxin research and an amazing visionary during the birth of molecular biology*, Innate Immunity, 26, 2020, s. 165-171.
21. Dounce A.L., *Duplicating mechanism for peptide chain and nucleic acid synthesis*, Enzymologia, 15, 1952, s. 251-258.
22. Gamov G., *Possible relation between deoxyribonucleic acid and protein structures*, Nature, 173, 1954, s. 318.
23. Crick F.H.C., Barnett L., Brenner S., Watts-Tobin R.J., *General nature of the genetic code for proteins*, Nature, 192, 1961, s. 1227-1232.
24. Yanofsky C., *Establishing the triplet nature of the genetic code*, Cell, 128, 2007, s. 815-818.
25. Straus E.W., Straus A., *100 największych osiągnięć medycyny*, Świat Książki, Warszawa 2009.
26. Maćkowiak M., Michalak A. (red.), *Biologia. Jedność i różnorodność*, Wydawnictwo Szkolne PWN, Warszawa 2008.

27. Campbell N.A., Reece J.B., Urry L.A., Cain M.L., Wasserman S.A., Minorsky P.V., Jackson R.B., *Biologia*, Dom Wydawniczy REBIS, Poznań 2012.
28. Nirenberg M.W., Matthaei J.H., *The dependence of cell-free protein synthesis in E. coli upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 47, 1961, s. 1588-1602.
29. Khorana H.G., *Polynucleotide synthesis and the genetic code*, Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 31, 1966, s. 39-49.
30. Holley R.W., Apgar J., Everett G.A., Madison J.T., Marquisee M., Merrill S.H., Penswick J.R., Zamir A., *Structure of ribonucleic acid*, Nature, 147, 1965, s. 1462-1465.
31. Yanofsky C., *Amino acid replacements associated with mutation and recombination in the A gene and their relationship to in vitro coding data*, Cold Springs Harbor Symposia on Quantitative Biology, 28, 1963, s. 581-588.
32. Yanofsky C., Ito J., Horn V., *Amino acid replacements and the genetic code*, Cold Springs Harbor Symposia on Quantitative Biology, 31, 1966, s. 151-162.
33. Wittmann H.G., Wittmann-Liebold B., *Protein chemical studies of two RNA viruses and their mutants*, Cold Springs Harbor Symposia on Quantitative Biology, 31, 1966, s. 163-172.
34. Gerstein M.B., Bruce C., Rozowsky J.S., Zheng D., Du J., Korbel J.O., Emanuelsson O., Zhang Z.D., Weissman S., Snyder M., *What is a gene, post-ENCODE? History and updated definition*, Genome Research, 17, 2007, s. 669-681.
35. Berget S.M., Moore C., Sharp P.A., *Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74, 1977, s. 3171-3175.
36. Sharp P.A., *The discovery of split genes and RNA splicing*, Trends in Biochemical Sciences, 30, 2005, s. 279-281.
37. Chow L.T., Gelinas R.E., Broker T.R., Roberts R.J., *An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA*, Cell, 12, 1977, s. 1-8.
38. Diamandis E.P., *Nobelitis: a common disease among Nobel laureates?* Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 51, 2013, s. 1573-1574.
39. Weiss R.A., Jaffe H.W., *Duesberg, HIV and AIDS*, Nature, 345, 1990, s. 659-660.
40. Wool D., Paz N., Friedman L., *Jean Baptiste de Lamarck: The Theory of Descent*, [w:] Wool D. (red.), *Milestones in the evolving theory of evolution*, CRC Press, Boca Raton 2020, s. 43-51.
41. de Vries H., *Die mutationstheorie. Versuche und beobachtungen über die entstehung von arten im pflanzenreich. 1 band. Die entstehung der arten durch mutation*, Verlag von Veit & Comp., Leipzig 1901.
42. de Vries H., *Die mutationstheorie. Versuche und beobachtungen über die entstehung von arten im pflanzenreich. 2 band. Elementare bastardlehre*, Verlag von Veit & Comp., Leipzig 1903.
43. Hall A.D., *Hugo de Vries. 1848-1935*, Obituary Notices of Fellows of the Royal Society, 1, 1935, s. 371-373.
44. Allen G.E., *Hugo de Vries and the reception of the „mutation theory”*, Journal of the History of Biology, 2, 1969, s. 55-87.
45. Stamhuis I.H., Meijer O.G., Zevenhuizen E.J., *Hugo de Vries on heredity, 1889-1903. Statistics, Mendelian laws, pangenes, mutations*, ISIS, 90, 1999, s. 238-267.
46. Mayr E., *Weismann and evolution*, Journal of the History of Biology, 18, 1985, s. 295-329.
47. Haig D., *Weismann Rules! OK? Epigenetics and the Lamarckian temptation*, Biology & Philosophy, 22, 2007, s. 415-428.
48. Weismann A., *Das keimplasma: eine theorie der vererbung*, Verlag von Gustav Fisher, Jena 1892.
49. Huxley J., *Evolution: the modern synthesis*, Allen & Unwin, London 1942.

50. Dobzhansky T., *Genetics and the origin of species*, Columbia University Press, New York 1937.
51. Dobzhansky T., *Nothing in biology makes sense except in the light of evolution*, The American Biology Teacher, 35, 1973, s. 125-129.
52. Bock W.J., *Ernst Walter Mayr. 5 July 1904 – 3 February 2005*, Biographical Memoirs of Fellows of the Royal Society, 52, 2006, s. 167-187.
53. Mayr E., *Systematics and the origin of species from the viewpoint of a zoologist*, Columbia University Press, New York 1942.
54. Singh V., Singh K., *Modern synthesis*, [w:] Vonk J., Shackelford T. (red.), *Encyclopedia of animal cognition and behavior*, Springer, Cham 2018, s. 1-5.
55. Kostka A., *Odkrywając tajemnice cząsteczki życia – krótka historia niezwykle naukowej podróży. Geny to nie wszystko*, [w:] Danielewska A., Mołdoch-Mendoń I. (red.), *Przegląd aktualnych zagadnień z zakresu medycyny i biologii*, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, Lublin 2023, s. 176-192.
56. Pearson H., *What is a gene?* Nature, 441, 2006, s. 398-401.
57. Zimmer C., *Śmiech ma po matce. Tajemnice genów*, Wydawnictwo Poznańskie, Poznań 2020.
58. Rhoades M.M., *Lewis John Stadler, 1896-1954*, Biographical Memoir of the National Academy of Sciences, 1957, s. 329-347.
59. Beadle G.W., Tatum E.L., *Genetic control of biochemical reactions in Neurospora*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 27, 1941, s. 499-506.
60. Preston B.D., Albertson T.M., Herra A.J., *DNA replication fidelity and cancer*, Seminars in Cancer Biology, 20, 2010, s. 281-293.
61. Pennisi E., *DNA study forces rethink of what it means to be a gene*, Science, 316, 2007, s. 1556-1557.
62. McClintock B., *The origin and behavior of mutable loci in maize*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 36, 1950, s. 344-355.
63. Dawkins R., *The selfish gene*, Oxford University Press, New York 1976.
64. Lolle S.J., Victor J.L., Young J.M., Pruitt R.E., *Genome-wide non-mendelian inheritance of extra-genomic information in Arabidopsis*, Nature, 434, 2005, s. 505-509.

Odkrywając tajemnice cząsteczki życia – krótka historia niezwykle naukowej podróży. Geny i ich ekspresja

Streszczenie

Rozpoczęte w połowie XIX wieku badania nad dziedziczeniem doprowadziły do powstania terminu „gen”, jednak przez pierwsze kilkadziesiąt lat był on jedynie niezdefiniowaną, enigmatyczną jednostką dziedziczenia, odpowiedzialną za przekazywanie cech z rodziców na potomstwo. Ewoluściści próbowali zrozumieć gen przez pryzmat doboru naturalnego, zmienności i wreszcie tego, skąd ona się bierze, czyli mutacji. Mutacje interesowały także biologów molekularnych, a odkrycie, że promieniowanie X oraz UV wywołuje zmiany w genach, doprowadziło do powstania słynnej hipotezy „jeden gen – jedno białko”. Pierwsi genetycy widzieli z kolei geny jako jednostki stanowiące fragmenty chromosomów, ułożone na nich w określonej kolejności i nanizane na te chromosomy jak koraliki na sznur. Dopiero odkrycie w połowie XX wieku, że nośnikami genów są kwasy nukleinowe (a nie białka) zrewidowało pierwotne wyobrażenie o genach i zaczęto o nich myśleć jak o wydzielonych sekwencjach DNA, mutacje zaś definiować jako trwałe zmiany w tych sekwencjach. W latach 60. XX wieku poznano mechanizmy ekspresji genów u prokariotów, z kolei niuanse tych procesów u eukariotów udało się rozszyfrować dopiero w początkach wieku XXI. Najnowsze zdobycze biologii molekularnej, m.in. bardzo szczegółowe sekwencjonowanie genomów, zrewidowało po raz kolejny tradycyjne wyobrażenie na temat genu. Okazało się bowiem na przykład, że kodujące fragmenty genów (eksony) oraz ich sekwencje regulatorowe mogą być porzucane po całym genomie i znajdować się niekiedy bardzo daleko od siebie, a poszczególne geny mogą zachodzić na siebie. Odkryto także transpozony, które potrafią skakać po genomie i powielać się, a DNA, które uważano za „śmieciowe”, ukrywa całe zatrzęsienie

ważnych sekwencji i jest niezwykle aktywne. Gen zatem nie jest ani ciągły, ani nieciągły, nie ma wyraźnych granic ani stałej lokalizacji w genomie i nie jest nawet kodowany przez stałą, jednorodną i niezmienną sekwencję nukleotydową. Wszystkie te fakty skłaniają obecnie niektórych uczonych do przekonania, że nie należy pielęgnować zbytniego przywiązania do pojęcia „genu”, a aspekty genetyczne i molekularne lepiej rozważać w kontekście całych genomów.

Słowa kluczowe: gen, genom, mutacje, kod genetyczny, informacja genetyczna

Discovering the secrets of the molecule of life – a short history of an incredible scientific journey. Genes and their expression

Abstract

Research into heredity commenced in the middle of 19th century has helped to introduce the term ‘gene’, but for the first several decades it functioned only as an unidentified, enigmatic unit of heredity responsible for the transfer of traits from parents to their offspring. Evolutionists have tried to understand genes through the lens of natural selection, variability and finally their origin, i.e. mutations. Mutations were of interest to molecular biologists as well, and the discovery that X-rays and ultraviolet radiation causes genetic changes has led to the famous ‘one gene – one protein’ hypothesis. The first geneticists, on the other hand, saw genes as fragments of chromosomes, arranged in a specific sequence and threaded onto these chromosomes like beads on a string. It was not until the middle of 20th century, when it was proved that nucleic acids, rather than proteins, are the carriers of genes, that the original image of genes was redrawn and they began to be seen as distinct DNA sequences, while mutations were now perceived as permanent changes in these sequences. The mechanisms of gene expression in prokaryotes were discovered in the 1960s, while the nuances of these processes in eukaryotes were not understood until the beginning of the 21st century. Recent discoveries in the field of molecular biology, such as very detailed genome sequencing, have once again redefined the traditional perception of genes. For example, it has been shown that the coding fragments of genes (exons) and their regulatory sequences can be scattered across the entire genome and sometimes situated very far apart, while the individual genes may overlap. There has also been the discovery of transposons, which have the ability to change their position within a genome and duplicate themselves, as well as the fact that DNA, previously considered as ‘junk’, contains many important sequences and is extremely active. A gene is therefore neither continuous nor discontinuous, has no clear boundaries or a permanent location within a genome and is not even coded by a constant, uniform and invariable nucleic acid sequence. All of these facts lead some of the contemporary scientists to believe that we should not be too attached to the term ‘gene’ and that we should consider genetic and molecular aspects in the context of entire genomes.

Keywords: gene, genome, mutations, genetic code, genetic information

Odkrywając tajemnice cząsteczki życia – krótka historia niezwyklej naukowej podróży. Geny to nie wszystko

1. Wprowadzenie

Świat DNA fascynuje biologów od ponad 100 lat, w trakcie których w imponującym tempie rozwijały się powiązane z nim dziedziny wiedzy takie jak ewolucjonizm, genetyka, biologia molekularna, biochemia czy biofizyka, a „naukowe zwroty akcji” zapierały niekiedy dech w piersiach [1, 2]. DNA stało się także bohaterem wielu bestsellerowych pozycji popularnonaukowych [np. 3-6]. Kiedy naukowcy złamali biologiczny kod życia i wydawało się, że zrozumieli, czym jest gen, jak grzyby po deszczu zaczęły pojawiać się nowe komplikacje, a jedna rozwiązana zagadka prowadziła do kolejnych tajemnic. Trzeci rozdział tej genetycznej historii próbuje wyjaśnić jedną z nich i opowiedzieć o tym, dlaczego geny to nie wszystko. Mało tego – własne geny to nie wszystko!

2. Dziedziczenie epigenetyczne, czyli o tym, dlaczego geny to nie wszystko

Po wielu latach badań nad DNA nadal nie udało się precyzyjnie naukowo zdefiniować tego, czym właściwie jest gen, co wynika z niezwykle skomplikowanej natury tej tajemniczej jednostki dziedziczenia [2]. Jedyne, co nie budzi większych wątpliwości to fakt, że genotyp determinuje fenotyp [7], ale całą tę złożoną genetyczną układankę komplikują dodatkowe czynniki decydujące o ostatecznym fenotypie. Niektóre z nich, takie jak chociażby wpływ środowiska, są dość oczywiste. Na przykład na kolor kwiatów niektórych odmian hortensji (*Hydrangea* sp.) wpływa pH podłoża, gdyż jej barwnik jest wrażliwy na ten parametr fizykochemiczny: przy naturalnym, lekko kwaśnym odczynie gleby kwiaty są niebieskofioletowe, zaś przy obojętnym i zasadowym – różowe [8, 9]. Nikt nie ma też wątpliwości, że u osoby skrajnie niedożywionej nie wystąpi otyłość, nawet jeśli wszystkie znane obecnie nauce geny związane ze skłonnością do przybierania masy ciała występowałyby u niej w wersjach sprzyjających tyciu, zaś osoba utalentowana muzycznie, nawet wybitnie, nigdy nie zostanie zawodowym pianistą ani gitarzystą, jeśli nie dostanie szansy zetknięcia się z żadnym instrumentem muzycznym. W przypadku niektórych cech fenotypowych decydujące znaczenie mają geny, w przypadku innych środowisko, a w przypadku jeszcze innych wpływ genów i środowiska jest równie ważny. Jedną z najlepiej pod tym względem rozpoznanych cech jest wzrost. Liczne badania prowadzone na przestrzeni wielu lat, w różnych krajach, różnym czasie oraz w różnych kontekstach naukowych i historycznych wykazały, że wzrost jest w wysokim stopniu odziedziczalny i, jak dotąd, zidentyfikowano około 800 genów wpływających na tę cechę. Jednakże wzrost jest także silnie zależny od warunków środowiskowych, gdyż w okresach znacznego niedożywienia, często dodatkowo związanych z wysoką zapadalnością na choroby zakaźne, genetyka „schodzi na dalszy plan”, ponieważ organizm niejako

¹ kostka@agh.edu.pl, Katedra Ochrony Środowiska, Wydział Geologii Geofizyki i Ochrony Środowiska, Akademia Górniczo-Hutnicza w Krakowie, <https://www.agh.edu.pl>.

przestawia się z trybu „wzrost” na tryb „przetrwanie”, a ograniczone zasoby zużywane są na bieżące podtrzymanie funkcji życiowych oraz na potrzeby układu odpornościowego. Wpływ środowiska na wzrost jest tak duży, że cecha ta okazuje się być niezwykle trafnym wskaźnikiem warunków socjalno-bytowych w czasie dorastania, a najbardziej dla niej krytyczny jest okres około trzeciego roku życia (wzrost osoby dorosłej najlepiej koreluje z jej wzrostem w wieku 3 lat). Dzieci z ubogich krajów, regionów czy dzielnic są statystycznie wyraźnie niższe niż ich rówieśnicy wychowujący się w dostatku, a średni wzrost w poszczególnych populacjach czy grupach społecznych dobrze koresponduje z ogólnym dobrobytem bądź jego brakiem w danym okresie historycznym [4, 6]. Wzrost jest przykładem cechy fenotypowej warunkowanej omnigenicznie. Oznacza to, że wpływa na nią tak wiele genów (powiązanych dodatkowo w skomplikowanych sieciach wzajemnych interakcji i oddziałujących przeważnie także na wiele innych cech), że nie sposób wskazać jednego bądź kilku głównych genów determinujących daną cechę. Wpływ każdego z tych wielu genów jest niemal niezauważalny, ale ich wspólne działanie prowadzi do wyraźnego zróżnicowania fenotypowego [10]. Podobnie skomplikowanym warunkowaniem genetyczno-środowiskowym cechuje się inteligencja [6].

Analizę tego, w jakim stopniu daną cechę kształtują geny, a w jakim środowisko, w stosunkowo prosty sposób można wykonać dla roślin, gdyż w ich przypadku łatwo jest kontrolować warunki środowiskowe (nasłonecznienie, wilgotność gleby, nawożenie itd.). Wystarczy identyczne oraz różne genetycznie osobniki uprawiać w tych samych oraz w różnych warunkach, a następnie obserwować stopień zróżnicowania poszczególnych cech fenotypowych. W przypadku ludzi nie można oczywiście zastosować takiego podejścia, stąd najlepszym „naturalnie dostępnym” sposobem uzyskiwania informacji o stopniu odziedziczalności danej cechy jest obserwacja bliźniąt, najlepiej w różnych „konfiguracjach”, tzn.: bliźnięta jednojajowe wychowywane razem (te same geny, to samo środowisko), bliźnięta jednojajowe wychowywane oddzielnie (te same geny, różne środowiska), bliźnięta dwujajowe wychowywane razem (różne geny, to samo środowisko), bliźnięta dwujajowe wychowywane oddzielnie (różne geny, różne środowiska). Porównanie zgodności poszczególnych cech fenotypowych u bliźniaczego rodzeństwa pozwala ocenić, który z czynników ma decydujący wpływ na kształtowanie tych cech [3, 4, 6]. Wysoka zgodność w takich kwestiach jak wygląd zewnętrzny, wzrost, masa ciała czy skłonność do pewnych chorób (np. schizofrenii, cukrzycy) nie jest zaskakująca. Jednak już wysoka zgodność w przypadku cech, które wydają się być warunkowane wychowaniem i środowiskiem, w którym człowiek dorasta (społeczeństwo, kultura, status społeczny i materialny, szkoła, przyjaciele itd.), jest o wiele bardziej interesująca. Badania bliźniąt wychowywanych osobno wykazały np., że osiągały one zdumiewająco wysoką zgodność (świadcząca o znaczącym wpływie genów) m.in. w kwestii takich cech jak zachowania ekonomiczne, postawy społeczne, poglądy polityczne, religijność, przywiązanie do tradycji, poczucie sprawiedliwości, empatia, altruizm, asertywność, dążenie do przywództwa, zwracanie na siebie uwagi, gust muzyczny, poczucie humoru, inteligencja, zamiłowanie do poszczególnych sportów czy fobie. W innym badaniu stwierdzono, że już w wieku przedszkolnym z dość dużą zgodnością da się przewidzieć postawę społeczną i światopogląd przyszłych dorosłych. Odważne, pewne siebie, ciekawe świata i otwarte dzieci wyrastały w większości na tolerancyjnych dorosłych o liberalnych poglądach. Z kolei dorośli o raczej konserwatywnym światopoglądzie byli przeważnie dziećmi płacziwymi, lękliwymi i nieśmiałymi. Jest to kolejny przykład tego, jak mocno

geny mogą warunkować cechy, które wydają się być kształtowane głównie przez środowisko [3]. Sprawa jest jednak jeszcze bardziej złożona, ponieważ pomiędzy genami a środowiskiem istnieje coś jeszcze, co powoduje np., że nawet bliźnięta jednojajowe wychowywane razem potrafią się znacząco różnić. Jest to swoisty trzeci poziom kształtowania ostatecznego fenotypu, oparty na wzajemnych interakcjach pomiędzy organizmem a środowiskiem, które wywołują dziedziczne zmiany w ekspresji genów, nie wpływając jednocześnie bezpośrednio na zmiany w sekwencji nukleotydów. Poznawaniem tych mechanizmów zajmuje się epigenetyka.

2.1. Epigenetyczny krajobraz

Pojęcie epigenetyki wprowadził do nauk biologicznych w roku 1939 [11], a następnie rozwinął na początku lat 40. XX wieku [12], brytyjski biolog rozwoju, paleontolog, genetyk, embriolog i filozof, Conrad Hal Waddington (1905-1975), który zdefiniował ją jako *gałąź biologii, która bada interakcje między genami i ich produktami, wpływające na fenotyp*. Epigenetyka (z gr. *epi* – coś dodatkowego, coś ponad, w tym wypadku ponad genetyką) narodziła się jako pochodna epigenetyki, opisującej rozwój zwierząt jako proces polegający na stopniowym różnicowaniu pierwotnie niezróżnicowanych komórek oraz wzroście złożoności rozwijającego się organizmu i która stała w opozycji do teorii formacji zakładającej, że cała złożoność przyszłego organizmu jest już „obecna” w zygocie, a może nawet w gametach, a w trakcie rozwoju ulega jedynie ekspansji [6, 13-15]. Teoria formacji została zdyskredytowana m.in. dzięki badaniom przeprowadzonym przez niemieckiego embriologa, Hansa Spemanna (1869-1941), któremu towarzyszyła jego doktorantka, Hilde Mangold, z domu Pröscholdt (1898-1924). W eksperymentach, których wyniki opublikowano w roku 1924 [16] usuwano niektóre komórki wczesnego zarodka płazów lub zmieniano ich położenie i obserwowano konsekwencje takich manipulacji (wymagało to niezwyklej precyzji, dlatego też Spemann został okrzyknięty mistrzem mikrochirurgii, a jako narzędzie służyły mu dziecięce włosy). Zauważono, że niektóre komórki „dostosowują się” do swojego otoczenia i to ono wpływa na ich dalsze różnicowanie, inne zaś same działają jak swoiste „organizatory” decydując o dalszych losach sąsiednich komórek i obecnie nazywa się je organizatorami Spemanna i Mangold (ang. *Spemann-Mangold organizers*) lub organizatorami Spemanna. Badacz ten w roku 1935 uhonorowany został Nagrodą Nobla z dziedziny fizjologii lub medycyny, za *odkrycie efektu organizatora podczas rozwoju zarodkowego* [17] (jego naukowe zasługi zostały nieco przyćmione pro-nazistowskimi sympatiami). Część naukowców uważała także, że rozwój i różnicowanie się komórek wynika ze stopniowej utraty kolejnych porcji informacji genetycznej. Wyobrażano sobie ten proces jak rzeźbienie w kamieniu, gdzie, aby uzyskać pożądaną formę, należy kolejno odrzucać fragmenty zbędnego materiału [4]. Ten z kolei pogląd obaliły eksperymenty brytyjskiego biologa, Johna Bertranda Gurdon (ur. w 1933), których wyniki opublikowano w roku 1962 [18]. Badacz przenosił jądra uzyskane z komórek dorosłych ropuch do komórek jajowych innych osobników (usuwając z nich wcześniej ich własne jądra), uzyskując z tak zmodyfikowanych komórek rozwój normalnych płazów. Doświadczenia te rzadko kończyły się sukcesem (za ich niepowodzenie odpowiadało wiele czynników, m.in. znakowanie epigenetyczne), ale udało się dowieść w ten sposób, że nawet zróżnicowana, dojrzała komórka (a dokładniej jej jądro komórkowe) posiada komplet informacji genetycznej [3, 4].

Waddingtona fascynowało to, jak i dlaczego komórki o identycznym genotypie różnicują się w poszczególne typy, tkanki i narządy, czyli jak to się dzieje, że ten sam genotyp daje odmienne fenotypy. Zauważył ponadto w swoich badaniach na muszkach owocówkach (*Drosophila melanogaster*), że do pewnego stopnia można kierować ich wczesnym rozwojem, zmieniając nieco warunki środowiskowe. Co więcej, po kilku pokoleniach nowy „wzorzec dziedziczenia” zdawał się być już utrwalony, pomimo zaprzestania stosowania wywołującego go bodźca środowiskowego. Waddington wyobrażał sobie ten „epigenetyczny krajobraz” jako trójwymiarowy model terenu i toczącą się po nim piłeczkę. Na początku kulka ma wiele możliwych ścieżek do wyboru, z czasem jednak kolejne potencjalne drogi przestają być dla niej dostępne, aż utyka ona w jakiejś dolinie (symbolizującej ostateczne zróżnicowanie się pierwotnie totipotencjalnej komórki), z kolei drobne zmiany topografii (np. czynniki środowiskowe, interakcje międzykomórkowe i międzytkankowe) mogą spowodować, że losy piłeczki będą zupełnie inne. Współcześnie epigenetykę definiuje się na różne sposoby i nie ma w tej kwestii naukowego konsensusu. Jedną z szerzej akceptowanych propozycji opisuje ją jako *dziedzinę nauk przyrodniczych zajmującą się badaniem zmian funkcji genów, które są mitotycznie i/lub mejotycznie dziedziczne i które nie pociągają za sobą zmian w sekwencji DNA*, a cechą epigenetyczną jako *stabilnie dziedziczny fenotyp wynikający ze zmian w chromosomie, bez zmian w sekwencji DNA* [3, 6, 13-15, 19-22]. Zaś nieco żartobliwie mówi się, że znanymi produktami znanych genów zajmuje się biologia molekularna, nieznanymi produktami znanych genów zajmuje się genetyka, znanymi produktami nieznanymi genów zajmuje się biochemia, zaś nieznanymi produktami nieznanymi genów zajmuje się epigenetyka [13].

2.2. Mechanizmy epigenetyczne

Pierwszy udokumentowany przypadek zjawiska epigenetycznego zaobserwowano w roku 1928 [23], gdzie młode liście roślin zakażonych wirusem pierścieniowej plamistości tytoniu (TRSV, ang. *tobacco ringspot virus*) zdawały się być niewrażliwe na obecność patogenu. Nie potrafiąco wtedy wyjaśnić molekularnego podłoża tego zjawiska. Odkryto je dopiero pod koniec XX wieku, a przyczyną okazała się interferencja RNA polegająca na wyciszaniu ekspresji genów przez dwuniciowe RNA (dsRNA, ang. *double-stranded RNA*) [15]. Zaczęło się od pewnego eksperymentu, w którym naukowcy próbowali uzyskać odmianę petunii ogrodowej (*Petunia hybrida*) o ciemniejszych kwiatach, wprowadzając do jej genomu dodatkową kopię genu kodującego odpowiedni pigment. Zamiast spodziewanego zwiększenia intensywności barwy, zmodyfikowana roślina wydała kwiaty jaśniejsze i upstrzone białymi plamami. Po zbadaniu poziomu mRNA genu odpowiadającego za produkcję pigmentu okazało się, że jest on niższy niż u odmiany wyjściowej, co wyjaśniało obserwowaną barwę kwiatów, ale nic nie mówiło na temat mechanizmu, który za tym stał [24]. Zagadkę rozwiązano w roku 1998 dzięki badaniom prowadzonym na obleńcu *Caenorhabditis elegans*, gdzie śledzono wzajemne interakcje dwóch genów, z których jeden blokował działanie drugiego [25]. Wykryto wtedy małe (liczące niewiele ponad dwadzieścia par zasad) fragmenty RNA nieulegające translacji, które cechowały się bardzo wysoką (choć nie całkowitą) komplementarnością w stosunku do mRNA blokowanego genu. Poznano w ten sposób jeden z rodzajów cząsteczek interferującego RNA, mikroRNA (miRNA, ang. *microRNA*), które łączy się z mRNA uniemożliwiając jego translację, tym samym wyciszając gen. W układ ten zaangażowane są także pewne białka,

a miRNA ulega dojrzewaniu, przyjmując początkowo strukturę nazywaną spinką do włosów. Sekwencje DNA kodujące miRNA często leżą w obrębie danego genu i szacuje się, że ten sposób regulacji ekspresji dotyczy co trzeciego genu [4]. Wyjaśnienie tego mechanizmu w roku 2006 uhonorowane zostało Nagrodą Nobla z dziedziny fizjologii lub medycyny, za *odkrycie interferencji RNA – wyciszania genów przez dwuniciowe RNA*, którą otrzymali: amerykański biolog, Andrew Zachary Fire (ur. w 1959) oraz amerykański biochemik, Craig Cameron Mello (ur. w 1960) [17]. Drugi znany obecnie rodzaj dsRNA to małe interferujące RNA (siRNA, ang. *small interfering RNA*). Cechuje się ono 100% zgodnością sekwencji z matrycowym RNA, z którym interferuje, a także towarzyszy mu białko degradujące mRNA. Mechanizm ten powstał w toku ewolucji najprawdopodobniej jako sposób ochrony komórki przed wirusami, których materiałem genetycznym jest dwuniciowe RNA [4, 13].

Mechanizmy epigenetyczne obejmują także procesy wpływające na strukturę chromatyny. Najpowszechniejszym z nich jest modyfikacja histonów poprzez acetylację, co zmniejsza ich powinowactwo do DNA i tym samym rozluźnia chromatynę. Taka luźna jej forma nosi nazwę euchromatyny i cechuje się zwiększoną dostępnością do transkrypcji, co sprzyja ekspresji genów. Bardziej skondensowana forma chromatyny – heterochromatyna – ma zwykle niski poziom acetylacji i niską aktywność transkrypcyjną. Mechanizm ten opisał w roku 1996 amerykański biolog molekularny, Charles David Allis (1951-2023), ale jego istnienie postulował już w latach 60. XX wieku amerykański biochemik, Vincent George Allfrey (1921-2002). Jednakże najbardziej znanym molekularnym mechanizmem epigenetycznym jest metylacja DNA (obniżająca jego aktywność transkrypcyjną), najczęściej w obrębie cytozyny [3, 4]. Metylowaną formę tej cząsteczki odkryto już w roku 1925 [15, 26], ale powiązanie jej z epigenetyczną kontrolą ekspresji genów nastąpiło dopiero w połowie lat 70. XX wieku. Szybko okazało się, że jest to jeden z najpowszechniejszych mechanizmów epigenetycznych, dlatego też w roku 1987 brytyjski biolog molekularny, Robin Holliday (1932-2014) zaproponował zawężenie rozumienia epigenetyki do dziedziny, w której o aktywności ekspresji genów decyduje metylacja DNA [27]. Odpowiada ona np. za inaktywację jednego z chromosomów X u samic niektórych zwierząt (tych, u których płeć determinowana jest chromosomami płci w układzie: XX – samica, XY – samiec), co odbywa się losowo w każdej komórce bardzo wczesnego zarodka (inaktywowany jest chromosom X ojcowski lub matczyzny). Zjawisko to odkryła i opisała w roku 1961 brytyjska genetyczka, Mary Frances Lyon (1925-2014) [28]. Ten nieaktywny chromosom jest silnie skondensowany i w obrazie mikroskopowym przyjmuje postać zlokalizowanej tuż pod otoczką jądrową grudki, zwanej ciałkiem Barra od nazwiska kanadyjskiego lekarza i badacza medycznego, Murraya Llewellyna Barra (1908-1995), który opisał tę strukturę komórkową w roku 1948. Takie znakowanie chromosomu X dziedziczone jest przez wszystkie komórki potomne wywodzące się z danej linii – osobniki żeńskie są więc epigenetycznymi mozaikami, czego jednym z najbardziej znanych i łatwych do zaobserwowania przykładów jest szylkretowe umaszczenie u kocię [3, 4, 6, 9]. Inaktywacja jednego z chromosomów X chroni najprawdopodobniej rozwijający się organizm żeński przed nadekspresją mieszczących się tam genów (samce mają tylko jeden chromosom X, podczas gdy Y zawiera stosunkowo niewiele informacji genetycznej i odpowiada głównie za „uruchomienie programu pt. samiec”) i przeciętnie mniej więcej w połowie komórek inaktywowany jest matczyzny chromosom X, w pozostałych zaś ojcowski. Z kolei skrajnie asymetryczny schemat

inaktywacji jednego z chromosomów X (rzędu 9:1) wiązany jest np. z wyższym ryzykiem wystąpienia autyzmu, zaburzeń metabolizmu glukozy, chorób autoimmunologicznych, nowotworu jajnika lub przełyku, a także poronienia czy urodzenia syna o skłonnościach homoseksualnych [3, 4] (jeden z odcinków chromosomu X jest wiązany z kształtowaniem się orientacji seksualnej [3, 29]).

Metylacja DNA oraz zmiany w obrębie histonów stoją także za zjawiskiem określanym jako imprinting genomowy bądź piętno rodzicielskie. W przypadku większości genów, ich ekspresja i związane z nimi cechy fenotypowe nie są zależne od tego, czy dany allel pochodzi od matki, czy od ojca. Są jednak i takie geny (np. u ssaków wiadomo o kilkudziesięciu), w przypadku których kierunek dziedziczenia ma znaczenie, a wynika to z tego, że w trakcie formowania się gamet dochodzi do wyciszenia pewnych sekwencji nukleotydomowych, innych w komórkach jajowych, innych w plemnikach, a wzór tego wyciszenia jest właśnie nazywany piętnem rodzicielskim. Każda komórka powstała z zygoty dziedziczy także jej wzór imprintingu, co oznacza, że w przypadku genów podlegających znakowaniu rodzicielskiemu w każdej komórce organizmu będzie aktywny tylko jeden, ten sam (ojcowski lub matczyński) allel. W trakcie gametogenezy piętno rodzicielskie jest wymazywane i na komórki rozrodcze nakładany jest nowy imprinting, zgodny z płcią danego osobnika [9]. Błędy imprintingu wiązane są z szeregiem zaburzeń rozwojowych, takich jak np. zespół Pradera-Williego [30] czy zespół Angelmana [31] i mogą prowadzić nawet do obumarcia zarodka. Metylacja DNA pełni też rolę molekularnego znacznika pozwalającego enzymom naprawczym rozpoznać oryginalną nić DNA, która ma stanowić wzór do naprawy ewentualnych uszkodzeń cząsteczki. Część naukowców uważa ponadto, że metylacja DNA powstała jako ewolucyjna obrona przed retrowirusami (które mogą wbudowywać swój materiał genetyczny w genom gospodarza) oraz przed „nadmiernie panoszącymi się genami”. Mowa o transpozonach, zwanych też ruchomymi elementami genetycznymi, ponieważ mają zdolność do zmieniania swojego położenia w genomie oraz powielania się. Odkryła je pod koniec lat 40. XX wieku wybitna amerykańska genetyczka i botaniczka, Barbara McClintock (1902-1992) [2, 4, 6, 7, 32], a osiągnięcie to wiele lat później (w roku 1983) uhonorowane zostało Nagrodą Nobla z dziedziny fizjologii lub medycyny, *za odkrycie ruchomych elementów genetycznych* [17].

Za zjawisko epigenetyczne (dość osobliwe, ale jednak) część naukowców uważa istnienie prionów, czyli infekcyjnych form białek (odpowiedzialnych za różne formy encefalopatii ośrodkowego układu nerwowego, zwanej potocznie gąbczastym zwyrodnieniem mózgu), które mają zdolność do wywoływania zmiany struktury przestrzennej innych białek [33]. Cząsteczki te nie wywołują zmian w genach, ale jednocześnie niesiona przez nie informacja molekularna jest przekazywana dalej, czyli dziedziczona [34, 35].

To właśnie opisane mechanizmy epigenetyczne stoją za procesami, które tak fascynowały wspomnianego wyżej Waddingtona. Epigenetyka odpowiada za różne wykorzystanie genów w trakcie rozwoju i stopniowe różnicowanie komórek w tkanki i narządy, za plastyczność rozwojową, w tym za powstawanie i utrwalanie śladów pamięciowych [36], procesy poznawcze czy też starzenie się mózgu i zmiany neurodegeneracyjne [37], a epigenetyczne znaczniki towarzyszą rozwojowi wielu chorób o złożonym podłożu, takich jak nowotwory czy cukrzyca [38]. W przypadku procesów nowotworzenia może dochodzić do hipometylacji i tym samym aktywacji oraz zwiększenia ekspresji genów odpowiedzialnych za proliferację komórek lub do hipermetylacji i tym samym hamo-

wania aktywności tzw. genów supresorowych, kontrolujących aktywność onkogenów. Efekt w obydwu przypadkach jest podobny – nadmierne i niekontrolowane namnażanie się komórek [39]. Epigenetyka ma również duży udział w tym, że osobniki poszczególnych gatunków różnią się od siebie o wiele bardziej niż wynikałoby to z samych genów, a w genomach większości organizmów żywych kryje się wiele wyciszonych sekwencji, które są ich ewolucyjnym dziedzictwem. Epigenetyka jest także jednym z czynników wpływających na to, że bliźnięta jednojajowe nigdy nie są całkowicie identyczne, zwłaszcza jeśli wychowują się w innym otoczeniu [4, 6]. Niekiedy odpowiedni bodziec środowiskowy może epigenetycznie przeprogramować genom na zupełnie inny efekt fenotypowy. Na przykład u pszczoł to dieta larwy decyduje o tym, czy zostanie ona królową, rozwiną się u niej jajniki i będzie zdolna do rozmnażania płciowego, czy skończy jako bezpłodna robotnica, choć genotyp obydwu form jest taki sam [40]. U muszki owocówki o powstaniu dodatkowych odnóży w trakcie rozwoju może zadecydować temperatura [6], z kolei u niektórych gadów (np. krokodyli czy aligatorów) czynnik ten determinuje płeć rozwijających się w jajach osobników [41].

2.3. Epigenetyczne dziedzictwo

Jak już wspomniano, Waddington zauważył w swoich eksperymentach m.in. to, że epigenetyczne znaczniki mogą się utrzymywać przez kilka pokoleń. Potwierdziły to liczne późniejsze eksperymenty. W jednym z nich wpojono myszom strach przed przypominającym woń wiśni lub migdałów zapachem acetofenonu (poprzez stosowanie skojarzenia z rażeniem delikatnym impulsem elektrycznym), który, jak się później okazało, odziedziczyło ich potomstwo, choć nie było ono już poddawane nieprzyjemnym bodźcom. W mózgach kolejnych pokoleń wykryto więcej receptorów tego zapachu, a odpowiednie DNA w plemnikach wykazywało niższy stopień metylacji. Wielopokoleniowe dziedziczenie epigenetyczne opisano też u ludzi. Na przykład w Överkalix, szwedzkiej miejscowości leżącej pod kołem podbiegunowym, odbył się naturalny epigenetyczny eksperyment, którego wyniki można było prześledzić dzięki temu, że przez wiele lat prowadzono tam bardzo skrupulatną dokumentację genealogiczną, w której notowano lata życia poszczególnych mieszkańców, ich związki rodzinne oraz przyczynę śmierci, a także wiele innych faktów historycznych i socjologicznych. Ze zgromadzonych danych wynikało, że jeśli chłopiec doświadczał głodu w wieku 9-12 lat, to jego męscy potomkowie żyli statystycznie dłużej oraz rzadziej chorowali na cukrzycę i choroby serca, co przypisano temu, że w jego ciele zachodziły „ochronne” zmiany epigenetyczne, które były dziedziczne. W przypadku dziewcząt sytuacja była odwrotna, tzn. były one statycznie zdrowsze i bardziej długowieczne, jeśli ich matki i babki nie doświadczały głodu. Zaobserwowane różnice pomiędzy płciami wynikają z fizjologii rozrodu: dziewczynki rodzą się z gotowym zestawem komórek jajowych, które potem tylko dojrzewają, zatem krytycznym momentem dla znakowania epigenetycznego jest okres płodowy; z kolei u chłopców plemniki produkowane są na bieżąco, więc krytyczny jest dla nich początek dojrzewania płciowego. Inny naturalny eksperyment na ludziach odbył się na przełomie lat 1944 i 1945, kiedy w akcie zemsty nazisci odcięli dostawy żywności do północnej części Holandii, wywołując *Hongerwinter* (głodową zimę). Wielu głodujących Holendrów zmarło, a obserwacje potomstwa tych, którzy przetrwali, wykazały, że jeśli głód obejmował pierwszy trymestr ciąży matki, to wśród potomków częściej pojawiała się nadwaga i choroby serca; jeśli obejmował drugi trymestr – rosło ryzyko chorób płuc i nerek; jeśli

zaś trzeci – częściej dochodziło do zaburzeń metabolizmu glukozy. Konsekwencje zdrowotne wielkiego głodu obserwowano także wyraźnie jeszcze u wnuków okrutnie doświadczonych Holendrów [3-6].

Styl życia przyszłej matki ma kluczowe znaczenie dla jej potomstwa, a negatywny wpływ takich czynników jak dym papierosowy, alkohol czy narkotyki, które mogą bezpośrednio uszkodzić płód (w tym jego DNA), jest powszechnie znany. Na nieco bardziej subtelnym poziomie „działa” tzw. programowanie płodowe, czyli epigenetyczne znakowanie DNA potomka (zwykle poprzez mechanizm metylacji), co ma go możliwie najlepiej przygotować do życia poza macicą. Bardzo ważną rolę odgrywa tu m.in. dieta ciężarnej i nie chodzi tylko o dostarczanie odpowiedniej ilości substancji odżywczych, witamin czy minerałów. Na przykład spożywanie przez matkę dużych ilości niezdrowego jedzenia programuje jej dziecko w taki sposób, że ono też będzie preferowało taki styl odżywiania i, co więcej, tego epigenetycznego piętna nie da się „zmasać” zdrową dietą. Sposób odżywiania i styl życia ojca również jest istotny, ponieważ determinuje znakowanie genów obecnych w jego plemnikach. Podobny epigenetyczny wpływ na potomstwo mają używki (oprócz wspomnianych wcześniej możliwych uszkodzeń płodu), tzn. dzieci rodziców uzależnionych lub nadużywających mają znacznie większe szanse na wpadnięcie w nałóg i nie jest to tylko kwestia wychowywania się w sprzyjającym temu środowisku, ale także epigenetycznego zaprogramowania genów. Swoje epigenetyczne piętno na potomstwie odciska też stres, którego matka doświadcza w trakcie ciąży. W mózgach dzieci zestresowanych matek wykształca się mniej receptorów dopaminy (w wyniku wyciszenia kodujących je genów), co zaburza ich „ścieżki przyjemności” i powoduje, że w przyszłości mają większą skłonność do poszukiwania wrażeń, ryzykownych zachowań i sprawiania kłopotów wychowawczych. Obserwacje potomstwa matek, które przeżyły w 2001 roku zamach na *World Trade Center* (Nowy Jork, USA) pokazały, że cechuje się ono zwiększoną podatnością na zaburzenia lękowe i gorzej radzi sobie ze stresem. Epigenetyka może znakować geny także już po zakończeniu życia płodowego. Na przykład potomstwo, które jest otoczone czułą opieką rodziców (zwłaszcza matek) lepiej radzi sobie w przyszłości z różnymi trudnościami emocjonalnymi, zaś doświadczenie traumy we wczesnym dzieciństwie wpływa na metylację genów związanych z reakcją na stres i poprzez oddziaływanie na układ serotoninergeiczny sprzyja wystąpieniu depresji. U osób, które miały trudne dzieciństwo (np. wychowywały się w sierocińcach) obserwuje się także zwiększoną metylację genów związanych z prawidłowym rozwojem mózgu oraz układu odpornościowego. W wielu wypadkach tego epigenetycznego piętna nie da się „zmasać”, a ponadto jest ono dziedziczne [5, 6]. Epigenom zmienia się także naturalnie wraz z wiekiem, ale na razie nie wiadomo jeszcze dokładnie, jak ten „epigenetyczny zegar” działa [6].

Wobec epigenetyki warto jednak zachować pewną ostrożność, aby nie ulec np. złudzeniu, że Jean Baptiste de Lamarck (1744-1829), francuski żołnierz, lekarz i przyrodnik, autor pierwszej materialistycznej teorii ewolucji, która dopuszczała możliwość dziedziczenia cech nabytych, miał rację! Dziedziczenie epigenetyczne polega w pewien przewrotny sposób na przekazywaniu potomstwu cech nabytych, ale trzeba wyraźnie zaznaczyć, że podłoże biologiczne i mechanizmy stojące za zjawiskami epigenetycznymi są dalekie od tajemniczych *gemmul/gemul* *vel* *pangenów*, w istnienie których wierzyli lamarkiści oraz sam Charles Robert Darwin (1809-1882), brytyjski podróżnik, przyrodnik, geolog oraz twórca ewolucjonizmu [1]. Warto też mieć na uwadze, że choć

współcześnie znamy sporo przykładów działania różnych mechanizmów epigenetycznych, to nie w każdym obszarze dziedziczenia mają one istotne znaczenie. Część naukowców podaje także w wątpliwość to, czy markery epigenetyczne poprzednich pokoleń rzeczywiście są w stanie przetrwać momenty takie jak gametogeneza, zapłodnienie, a następnie rozwój embrionu oraz związane z tym różnicowanie się jego poszczególnych linii komórkowych, tkanek i narządów, kiedy to epigenetyczne znaczniki są wielokrotnie reorganizowane [6]. Znakowanie epigenetyczne nie musi być także „wyrokiem”. Te same czynniki, które nakładają charakterystyczne markery epigenetyczne (środowisko, sposób odżywiania, traumy itd.), mogą być także wykorzystane do ich usunięcia bądź przeprogramowania. Doświadczenia z płazami wspomnianego wyżej Johna Gurдона dowiodły nie tylko tego, że nawet zróżnicowana, dojrzała komórka posiada komplet genów, ale pokazały też, że taki epigenetyczny reprograming rzeczywiście istnieje [4]. Ten aspekt jego badań przyczynił się do przyznania mu w roku 2012 Nagrody Nobla z dziedziny fizjologii lub medycyny, *za odkrycie, że dorosłe komórki można przeprogramować tak, by stały się one komórkami pluripotentnymi*, a wyróżnienie to dzielił z japońskim lekarzem i naukowcem o nazwisku Shin'ya Yamanaka (ur. w 1962), któremu udało się przekształcić komórki skóry myszy w komórki macierzyste [17]. Nowsze badania również potwierdzają, że epigenetyczny reprograming istnieje. Wykazano np., że aktywność fizyczna zmienia korzystnie metylację genów związanych z metabolizmem, odpornością oraz pamięcią, a zmiany te są dziedziczone. Z kolei medytacja wpływa na geny powiązane z reakcją na stres, obniżając go [5]. Współczesna medycyna dysponuje także lekami epigenetycznymi i choć dziedzina ta ma jeszcze przed sobą długą drogę, to już dziś z powodzeniem wykorzystuje się związki, które hamują metylację pewnych genów (np. azacytydynę) w leczeniu takich zaburzeń jak zespół mielodysplastyczny, ostra białaczka szpikowa czy przewlekła białaczka limfocytowa. Druga obiecująca grupa leków epigenetycznych to inhibitory deacetylazy histonowej (np. vorinostat), które zapobiegają deacetylacji histonów, sprzyjając utrzymaniu luźnej formy chromatyny, co podtrzymuje ekspresję antyonkogenów i hamuje proliferację komórek nowotworowych oraz sprzyja ich apoptozie. Związki te wykorzystuje się np. w leczeniu skórnych chłoniaków T-komórkowych czy szpiczaków mnogich [5, 39, 42]. W badaniach na szczurach dowiedziono także, że leki epigenetyczne wpływają na pamięć i zdolność uczenia się. Przypuszcza się, że w przyszłości ta grupa substancji będzie wykorzystywana w leczeniu zaburzeń neurologicznych (np. schizofrenii), metabolicznych (np. otyłości) czy chorób sercowo-naczyniowych, a być może także do spowalniania lub nawet odwracania procesów starzeniowych [5].

Warto na koniec tego podrozdziału zauważyć, że niekiedy epigenetyka stoi za niepowodzeniem we wprowadzaniu nowych genów do organizmów modyfikowanych genetycznie [4]. Pokazał to chociażby wspomniany wcześniej eksperyment z petunią ogrodową, w którym próbowano uzyskać odmianę o ciemniejszych kwiatach, wprowadzając dodatkową kopię genu odpowiadającego za wytwarzanie pigmentu, a uzyskany efekt był odwrotny do zamierzonego [24].

3. Obcy w nas, czyli o tym, dlaczego własne geny to nie wszystko

Szacunkowa ilość komórek budujących ciało człowieka waha się w szerokich granicach, ale najczęściej podawana wartość to 35-37 bilionów [3, 4]. Czy wszystkie te komórki są „własne”? Niekoniecznie... Liczne badania wykazały, że zwierzęta, w tym także

ludzie, mogą być i często są tzw. mikrochimerami, zawierającymi w swoich ciałach niewielką ilość komórek innych osobników, uzyskanych najczęściej w okresie życia płodowego. Pewna pula komórek macicznych dostaje się bowiem do rozwijającego się w macicy zarodka, który również przekazuje swoje komórki matce, co może mieć zresztą praktyczne zastosowania (np. na pozyskanych z krwi matki komórkach płodu można przeprowadzać nieinwazyjną diagnostykę). Bliźnięta dwujajowe często dzielą pewną pulę komórek, a nawet u zwykłego rodzeństwa wykrywane są komórki starszych braci lub sióstr. Skala i trwałość takiego chimeryzmu nie są do końca znane, ale komórki potomstwa wykrywano nawet u kobiet po 70. roku życia, co oznacza, że musiały przetrwać w ich ciałach co najmniej kilka dekad, choć uważa się, że z czasem ich ilość się zmniejsza. Nie jest też do końca jasne, jak duże znaczenie dla organizmu mają te obce komórki, ale wiadomo, że potrafią rozrastać się we własne linie komórkowe, znajduje się je w różnych organach (np. nerkach, wątrobie, mózgu), są przesłanki, że mogą zwiększać ryzyko wystąpienia chorób o podłożu autoimmunologicznym (ze względu na obecność obcych genów, które układ odpornościowy próbuje zwalczyć), ale też podejrzewa się, że ich obecność może być terapeutyczna (mogą np. zastępować niesprawne komórki gospodarza). Inny zadziwiający fenomen genetyczny stanowią chimery tetragametyczne, które powstają poprzez zlanie się na wczesnym etapie rozwoju płodowego zarodków bliźniąt dwujajowych, co może się zdarzyć nawet w przypadku płodów dwóch różnych płci! Określenie w takim wypadku, które geny są „własne”, które „obce” i kto tu jest „intruzem” jest w zasadzie niemożliwe... [4, 6].

O ile genetyczny chimeryzm może być postrzegany jako swoista ciekawostka przyrodnicza, o tyle obecności obcych genów, których nośnikami są liczne mikroorganizmy zasiedlające różne partie ciała (przede wszystkim przewód pokarmowy, skórę, drogi rodne, drogi oddechowe, błony śluzowe), nie sposób przeoczyć. Drobnoustroje te nazywane są ogólnie mikrobiotą i obejmują wirusy, archeony, bakterie, grzyby oraz pierwotniaki. Niektórzy zaliczają do tego grona także wielokomórkowe pasożyty. Zarówno ilość, jak i skład gatunkowy mikroorganizmów kolonizujących ciało człowieka są zmienne i zależne od płci oraz wieku nosiciela, jego sposobu życia, miejsca zamieszkania, wykonywanej pracy itd. [4, 43-49]. Utrwalone w latach 70. XX wieku oszacowanie (długo traktowane jako pewnik) mówiło, że liczba drobnoustrojów zasiedlających ludzkie ciało 10-krotnie przekracza ilość jego własnych komórek, ale nowsze opracowania podają wartość rzędu od 1,3 do 3 komórek mikrobioty przypadającą na każdą ludzką komórkę. „Referencyjny człowiek” (mężczyzna w wieku 20-30 lat, ważący 70 kg i mający 170 cm wzrostu) zbudowany jest z 30 bilionów komórek, a liczebność jego mikrobioty wynosi 39 bilionów komórek [4, 50].

W odniesieniu do drobnoustrojów kolonizujących organizmy wielokomórkowe używa się także terminu mikrobiom, a za autora tego pojęcia powszechnie uważa się żydowsko-amerykańskiego genetyka i mikrobiologa, Joshuę Lederberga (1925-2008) [51-53], laureata Nagrody Nobla w roku 1958 z dziedziny fizjologii lub medycyny, za odkrycia dotyczące rekombinacji genetycznej i organizacji materiału genetycznego bakterii [17]. Lederberg nie jest jednak autorem ani pojęcia mikrobiomu, ani jego definicji, a termin ten był używany na długo przed rokiem 2001 (na który datuje się jego powstanie), co najmniej od lat 60. XX wieku i definiowano go na różne sposoby [54]. Obecnie pojęcie mikrobiomu odnosi się do ogółu genomów, których nośnikiem jest mikrobiota zasiedlająca daną niszę (np. przewód pokarmowy) [52, 53]. W roku 2007

ruszył projekt poznania ludzkiego mikrobiomu (HMP, ang. *Human Microbiome Project*), stanowiący swoiste rozszerzenie projektu poznania ludzkiego genomu (HGP, ang. *Human Genome Project*), który oficjalnie rozpoczął się w roku 1990, a zakończył w roku 2003 (badania w tym zakresie są jednak nadal intensywnie prowadzone). HMP ma na celu szczegółowe scharakteryzowanie drobnoustrojów kolonizujących ludzkie ciało, opisanie ich wzajemnych interakcji oraz szeroko rozumianych związków ze zdrowiem i chorobą gospodarza [53].

Mikrobiota ma olbrzymi wpływ na to, w jaki sposób funkcjonuje ciało jej gospodarza, a temat ten jest w ostatnich latach bardzo intensywnie badany, dostarczając nieustannie niezwykle cennych i interesujących faktów. Niektórzy badacze skłaniają się ku tezie, że większa ilość genów niezbędnych do przeżycia pochodzi od mikrobiomu niż z własnego genomu! Najważniejsza i najlepiej poznana jest mikrobiota jelitowa i choć wciąż skrywa ona wiele tajemnic, wiadomo, że jest kluczowa dla prawidłowego rozwoju i funkcjonowania układu pokarmowego. Mikroorganizmy zamieszkujące jelito wpływają na wzrost i różnicowanie jego nabłonka, zwiększają ilość kalorii pozyskiwanych z pożywienia, wspomagają procesy wchłaniania substancji pokarmowych oraz soli mineralnych i elektrolitów, syntetyzują niektóre substancje odżywcze (np. witaminy, aminokwasy), fermentują niestrawialne składniki pokarmowe, rozkładają toksyny oraz chronią jelita przed kolonizacją przez drobnoustroje patogenne. Drobnoustroje jelitowe są także niezwykle ważne dla prawidłowego funkcjonowania innych układów, np. nerwowego czy immunologicznego, a dysbiozy mikrobioty jelitowej wiązane są m.in. z zaburzeniami metabolicznymi (np. cukrzycą typu I, celiakią), chorobami o podłożu autoimmunologicznym (np. reumatoidalnym zapaleniem stawów, nieswoistym zapaleniem jelit, toczeniem rumieniowatym układowym), alergiami czy nowotworami [4, 43, 45-48, 53, 55]. Rozwijający się w macicy płód już na tym etapie jest zasiedlany, choć jeszcze nielicznie, przez pewne drobnoustroje, ale zasadnicza kolonizacja następuje w trakcie porodu, „z punktu widzenia” mikrobioty, najlepiej naturalnego. Badania pokazują, że kompozycje gatunkowe drobnoustrojów jelitowych osób urodzonych siłami natury oraz przez cesarskie cięcie, różnią się jeszcze nawet w dorosłości, a dzieci rodzone naturalnie rzadziej chorują, ponieważ prawidłowo wykształcona mikrobiota (uzyskiwana w trakcie przejścia noworodka przez drogi rodne matki) jest niezbędna do sprawnego funkcjonowania układu odpornościowego, stanowiąc jednocześnie dla niego rodzaj „poligonu treningowego”, na którym uczy się odróżniać drobnoustroje przyjazne od patogennych. Dobroczynne działanie karmienia piersią jest także obecnie powszechnie znane. Niemowlęta i dzieci karmione naturalnie rzadziej zapadają na choroby zakaźne, wykazują w przyszłości mniejszą podatność na cukrzycę, choroby autoimmunologiczne, otyłość, a nawet są statystycznie inteligentniejsze. Co ciekawe, uważa się, że naturalny pokarm (zwłaszcza pierwsze mleko, tzw. siara) jest „przeznaczony” nie tylko dla dziecka, ale też dla jego mikrobioty. Zawiera on np. pewne oligosacharydy, które dla dziecka są trudno przyswajalne, za to doskonale stymulują namnażanie dobroczynnych bakterii jelitowych z rodzaju *Bifidobacterium* [4, 6, 46, 48, 53].

Zmiany w obrębie mikrobioty jelitowej łączone są z wieloma zaburzeniami dotyczącymi układu nerwowego, takimi jak depresja, schizofrenia, choroba Alzheimera, choroba Parkinsona czy autyzm. Wpływ drobnoustrojów jelitowych na centralny układ nerwowy jest tak duży, że niektórzy nazywają nawet jelita drugim mózgiem. Mikroorganizmy zamieszkujące przewód pokarmowy odpowiadają za wytwarzanie licznych hormonów

i neuroprzekazników, np. aż 90% serotoniny pochodzi z jelit! Kontakt tych dwóch organów odbywa się poprzez nerw błędny, a około 90% informacji płynie w kierunku od jelit do mózgu. Wiele informacji na temat subtelnej równowagi pomiędzy gospodarzem a jego mikrobiotą nauka czerpie z eksperymentów, w których porównuje się zwierzęta sterylne, urodzone i hodowane bez kontaktu z mikroorganizmami (GF, ang. *germ free*) ze zwierzętami naturalnie zasiedlonymi przez drobnoustroje. Doświadczenia takie wykazały, że zwierzęta GF gorzej znoszą stres, zaś ich mózgi są pod pewnymi względami niedorozwinięte albo nieprawidłowo rozwinięte. Upośledzone są m.in. mechanizmy tworzenia śladów pamięciowych oraz uczenia się, gdyż obecność prawidłowej mikrobioty jelitowej wpływa na ekspresję genów w mózgu odpowiedzialnych za te procesy. Wykazano także, że niektóre bakterie (np. *Lactobacillus helveticus*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*), a dokładniej wytwarzane przez nie i wydzielane zewnątrzkomórkowo metabolity, działają kojąco na układ nerwowy, zmniejszając stres i redukując zły nastrój. W innym eksperymencie sterylnym myszom przeszczepiono mikrobiotę jelitową pochodzącą od ludzi z autyzmem, w wyniku czego zwierzęta zaczęły wykazywać autystyczne zachowania. Okazało się, że nowo nabyta mikrobiota wpływała na ich mózgi w taki sposób, że w obrębie genów związanych z autyzmem dochodziło do alternatywnego *splicingu*. Ale wykazano również, iż wzbogacenie mikrobioty w pewne gatunki bakterii, np. *Bacteroides fragilis* czy *Bifidobacterium infantis*, łagodzi objawy autystycznych zaburzeń rozwojowych [4, 5, 46].

Inny przykład epigenetycznego sterowania genami gospodarza stanowi doświadczenie, w którym sterylnym myszom (są one zwykle chorowite, cherlawe i bardzo chude pomimo spożywania relatywnie dużych ilości pokarmu) przeszczepiono mikrobiotę jelitową normalnych osobników. Te pierwsze odzyskiwały wigor i zaczynały szybko przybierać na wadze, pomimo tego, że jadły mniej. Pozyskane mikroorganizmy stymulowały m.in. powstawanie nowych komórek tłuszczowych u myszy, regulując tym samym (poprzez wytwarzanie odpowiednich białek sygnałowych) ekspresję ich genów. Wiele badań wskazuje na to, że kompozycja mikrobioty jelitowej jest być może nawet ważniejsza dla prawidłowej masy ciała niż ilość spożywanych kalorii czy ruch (a przynajmniej równie ważna). Wiadomo np., że u osób szczupłych przeważają bakterie z grupy *Bacteroidetes*, u otyłych zaś wzrasta ilość przedstawicieli *Firmicutes*. Obserwuje się u nich także większą ilość metanogennych archeonów w porównaniu do osób szczupłych. Przeszczepienie otyłym myszom mikrobioty jelitowej pobranej od osobników szczupłych powoduje, że te pierwsze chętniej się ruszają i jedzą mniej. Od dawna znane jest dobroczynne działanie na układ pokarmowy pewnych grup bakterii, które nazywane są probiotycznymi. Należą do nich przede wszystkim gatunki zdolne do wytwarzania kwasu mlekowego, obejmujące takie rodzaje jak *Enterococcus*, *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* oraz wybrane szczepy *Bacillus* spp., *Escherichia coli* i *Streptococcus* spp. Metabolity wytwarzane przez te drobnoustroje działają ochronnie na przewód pokarmowy i modulują stany zapalne. W jednym z eksperymentów wykazano, że doustne podawanie myszom bakterii *Lactobacillus rhamnosus* spowodowało zredukowanie masy ich ciała (przy zachowaniu dotychczasowego sposobu odżywiania), co związane było najprawdopodobniej ze zmniejszeniem ilości komórek tłuszczowych [4, 5, 43, 44, 46, 48, 53, 56, 57]. Niewykluczone, że w niedalekiej przyszłości analiza składu mikrobioty jelitowej znajdzie się w pakiecie podstawowych badań medycznych, zaś tzw. przeszczep kałowy (FMT, ang. *fecal microbial transplantation*), czyli transfer prozdrowotnej

mikrobioty stanie się rutynową formą terapii. Historia tego typu zabiegów zaczęła się najprawdopodobniej w Chinach i sięga IV wieku n.e., a w kontrolowanych warunkach szpitalnych została po raz pierwszy zastosowana pod koniec lat 50. XX wieku. Obecnie przeszczep kałowy stosuje się najczęściej w ciężkich przypadkach nawracających, poantybiotykowych zakażeń bakterią *Clostridioides difficile* (dawniej *Clostridium difficile*), wywołujących ostre biegunki, zwykle u pacjentów hospitalizowanych, z obniżoną odpornością lub w podeszłym wieku. Procedurę tę zaczęto wdrażać na początku lat 80. XX wieku, w Polsce zaś po raz pierwszy zastosowana została w roku 2012 w szpitalu w Wejherowie [57-62].

Interesujący przykład epigenetycznej kontroli drobnoustroju nad organizmem gospodarza stanowi przypadek jednokomórkowego pasożyta o nazwie *Toxoplasma gondii*. Pierwotniak ten ma skomplikowany cykl życiowy, z wieloma stadiami rozwojowymi i wieloma gospodarzami (żywicielem ostatecznym są przedstawiciele kotowatych, pośrednimi zaś ptaki oraz ssaki, w tym człowiek) i najczęściej powoduje oportunistyczne zakażenia u osób z obniżoną odpornością, a szczególnie niebezpieczny jest dla kobiet w ciąży. Pasożyt ten wykazuje neurotropizm, a jego cysty lokują się w mózgu, co wpływa na jego funkcjonowanie. Na przykład zakażone myszy i szczury przestają bać się drapieżników będących ich naturalnymi wrogami (kotów), a to ułatwia ich zjedzenie i tym samym sprzyja transmisji pasożyta. W mózgach tych gryzoni stwierdza się m.in. podwyższony poziom dopaminy, co najprawdopodobniej jest stymulowane obecnością w tkance pierwotniaka (poprzez wydzielane przez niego cząsteczki) i co, przynajmniej częściowo, wyjaśnia zmianę zachowania tych zwierząt. W przypadku ludzi wykazano m.in., że wśród osób cierpiących na różne zaburzenia psychiczne występuje znacząco wyższy odsetek pacjentów zakażonych toksoplazmozą (np. u schizofreników obecność przeciwciał skierowanych przeciwko temu pierwotniakowi stwierdzano prawie trzykrotnie częściej w porównaniu z grupą kontrolną). Obecność pasożyta wpływa najprawdopodobniej na syntezę neuroprzekaźników, takich jak np. dopamina czy GABA (poprzez regulację na drodze mechanizmów epigenetycznych ekspresji odpowiednich genów w mózgu nosiciela), co związane jest z objawami zaburzeń psychicznych, z kolei niektóre leki przeciwpsychotyczne mogą hamować namnażanie *Toxoplasma gondii*. Badania wykazały także, że pasożyt ten ma zdolność wyciszania genów gospodarza związanych z prawidłowym funkcjonowaniem jego układu odpornościowego, ułatwiając tym samym pierwotniakowi przetrwanie w organizmie nosiciela [4, 63-65].

Uwagi ogólne

Finansowanie: Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie; Wydział Geologii, Geofizyki i Ochrony Środowiska; nr umowy: 16.16.140.315.

Literatura

1. Kostka A., *Odkrywając tajemnice cząsteczki życia – krótka historia niezwykle naukowej podróży. DNA i dziedziczenie*, [w:] Danielewska A., Mołdoch-Mendoń I. (red.), *Przegląd aktualnych zagadnień z zakresu medycyny i biologii*, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, Lublin 2023, s. 138-157.
2. Kostka A., *Odkrywając tajemnice cząsteczki życia – krótka historia niezwykle naukowej podróży. Geny i ich ekspresja*, [w:] Danielewska A., Mołdoch-Mendoń I. (red.), *Przegląd aktualnych zagadnień z zakresu medycyny i biologii*, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, Lublin 2023, s. 158-175.

3. Mukherjee S., *Gen. Ukryta historia*, Wydawnictwo Czarne, Wołowiec 2017.
4. Myśliwiec D., *Przepis na człowieka, czyli krótki wstęp do odpowiedzi na pytanie: dlaczego jesteśmy, jacy jesteśmy*, Altenberg, Warszawa 2020.
5. Sullivan B., *Więcej niż DNA. Geny, drobnoustroje i osobliwe moce*, Burda Media Polska, Warszawa 2020.
6. Zimmer C., *Śmiech ma po matce. Tajemnice genów*, Wydawnictwo Poznańskie, Poznań 2020.
7. Gerstein M.B., Bruce C., Rozowsky J.S., Zheng D., Du J., Korbel J.O., Emanuelsson O., Zhang Z.D., Weissman S., Snyder M., *What is a gene, post-ENCODE? History and updated definition*, Genome Research, 17, 2007, s. 669-681.
8. Maćkowiak M., Michalak A. (red.), *Biologia. Jedność i różnorodność*, Wydawnictwo Szkolne PWN, Warszawa 2008.
9. Campbell N.A., Reece J.B., Urry L.A., Cain M.L., Wasserman S.A., Minorsky P.V., Jackson R.B., *Biologia*, Dom Wydawniczy REBIS, Poznań 2012.
10. Boyle E.A., Li Y.I., Pritchard J.K., *An expanded view of complex traits: from polygenic to omnigenic*, Cell, 169, 2017, s. 1177-1186.
11. Waddington C.H., *Introduction to modern genetics*, Allen and Unwin, London 1939.
12. Waddington C.H., *The epigenotype*, Endavour, 1, 1942, s. 18-20.
13. Zilberman D., Henikoff S., *Epigenetic inheritance in Arabidopsis: selective silence*, Current Opinion in Genetics & Development, 15, 2005, s. 557-562.
14. Singh V., Singh K., *Modern synthesis*, [w:] Vonk J., Shackelford T. (red.), *Encyclopedia of animal cognition and behavior*, Springer, Cham 2018, s. 1-5.
15. Korczmar E.A., Belter A., Naskręt-Barciszewska M.Z., Jurga S., Barciszewski J., *100 lat RNA. Diamentowy jubileusz informacyjnego RNA*, Postępy Biochemii, 67, 2021, s. 212-222.
16. Spemann H., Mangold H., *Über induktion von embryonalanlagen durch implantation artfremder organisatoren*, Archiv für Mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik, 100, 1924, s. 599-638.
17. <https://www.nobelprize.org> [data dostępu: 10.2022].
18. Gurdon J.B., *The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles*, Journal of Embryology and Experimental Morphology, 10, 1962, s. 622-640.
19. Wu C.-T., Morris J.R., *Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence*, Science, 293, 2001, s. 1103-1105.
20. Bard J.B.L., *Waddington's legacy to developmental and theoretical biology*, Biological Theory, 3, 2008, s. 188-197.
21. Berger S.L., Kouzarides T., Shiekhattar R., Shilatifard A., *An operational definition of epigenetics*, Genes & Development, 23, 2009, s. 781-783.
22. Noble D., *Conrad Waddington and the origin of epigenetics*, Journal of Experimental Biology, 218, 2015, s. 816-818.
23. Wingard S.A., *Hosts and symptoms of ring spot, a virus disease of plants*, Journal of Agricultural Research, 37, 1928, s. 127-153.
24. Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R., *Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans*, Plant Cell, 2, 1990, s. 279-289.
25. Fire A., Xu S.Q., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*, Nature, 391, 1998, s. 806-811.
26. Johnson T.B., Coghill R.D., *Researches on pyrimidines. C111. The discovery of 5-methyl-cytosine in tuberculinic acid, the nucleic acid of the tubercle bacillus*, Journal of the American Chemical Society, 47, 1925, s. 2838-2844.
27. Holliday R., *Epigenetics: a historical overview*, Epigenetics, 1, 2006, s. 76-80.

28. Lyon M.F., *Gene action in the X-chromosome of the mouse (Mus musculus L.)*, Nature, 190, 1961, s. 372-373.
29. Hamer D.H., Hu S., Magnuson V.L., Hu N., Pattatucci A.M.L., *A linkage between DNA markers on the X chromosome and male sexual orientation*, Science, 261, 1993, s. 321-327.
30. Butler M.G., *Prader-Willi syndrome: Current understanding of cause and diagnosis*, American Journal of Medical Genetics, 35, 1990, s. 319-332.
31. Mabb A.M., Judson M.C., Zylka M.J., Philpot B.D., *Angelman syndrome: insights into genomic imprinting and neurodevelopmental phenotypes*, Trends in Neurosciences, 34, 2011, s. 293-303.
32. McClintock B., *The origin and behavior of mutable loci in maize*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 36, 1950, s. 344-355.
33. Kostka A., *Człowiek kontra choroby zakaźne i mikroorganizmy chorobotwórcze – krótka historia fascynującego starcia. Mit samoródtwa i odkrycie drobnoustrojów*, [w:] Pilarz Ł.B. (red.), *Komórki, tkanki i narządy ludzkie – wybrane zagadnienia medyczne i prawne*, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, Lublin 2022, s. 195-210.
34. Yool A., Edmunds W.J., *Epigenetic inheritance and prions*, Journal of Evolutionary Biology, 11, 1998, s. 241-242.
35. Manjrekar J., *Epigenetic inheritance, prions and evolution*, Journal of Genetics, 96, 2017, s. 445-456.
36. Bernstein C., *DNA methylation and establishing memory*, Epigenetics Insights, 15, 2022, s. 1-15.
37. Hwang J.-Y., Aromolaran K.A., Zukin R.S., *The emerging field of epigenetics in neurodegeneration and neuroprotection*, Nature Reviews Neuroscience, 18, 2017, s. 347-361.
38. Chahwan R., Wontakal S.N., Roa S., *The multidimensional nature of epigenetic information and its role in disease*, Discovery Medicine, 11, 2011, s. 233-243.
39. Giannopoulos K., *Epigenetyka w hematologii*, Onkologia w Praktyce Klinicznej, 6, 2010, s. 333-342.
40. Chittka A., Chittka L., *Epigenetics of royalty*, PLoS Biology, 8, 2010, s. 1-4.
41. Yatsu R., Miyagawa S., Kohno S., Saito S., Lowers R.H., Ogino Y., Fukuta N., Katsu Y., Ohta Y., Tominaga M., Guillette L.J., Iguchia T., *TRPV4 associates environmental temperature and sex determination in the American alligator*, Scientific Reports, 5, 2015, s. 1-10.
42. Stepulak A., Stryjecka-Zimmer M., Polberg K., *Inhibitory deacetylaz histonów jako potencjalne cytotatyki nowej generacji*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 59, 2005, s. 68-74.
43. Dibaise J.K., Zhang H., Crowell M.D., Krajmalnik-Brown R., Decker G.A., Rittmann B.E., *Gut microbiota and its possible relationship with obesity*, Mayo Clinic Proceedings, 83, 2008, s. 460-469.
44. Efenberger M., Wódz K., Brzezińska-Błaszczyk E., *Archeony – istotny składnik mikrobiomu człowieka*, Przegląd Lekarski, 71, 2014, s. 346-351.
45. Wołkowicz T., Januszkiewicz A., Szych J., *Mikrobiom przewodu pokarmowego i jego dysbiozy jako istotny czynnik wpływający na kondycję zdrowotną organizmu człowieka*, Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia, 66, 2014, s. 223-235.
46. Gliński Z., Kostro K., *Mikrobiom – charakterystyka i znaczenie*, Życie Weterynaryjne, 90, 2015, s. 446-450.
47. Malinowska M., Tokarz-Deptuła B., Deptuła W., *Mikrobiom człowieka*, Postępy Mikrobiologii, 56, 2017, s. 33-42.
48. Lazar V., Ditu L.-M., Pircalabioru G.G., Gheorghe I., Curutiu C., Holban A.M., Picu A., Petcu L., Chifiriuc M.C., *Aspects of gut microbiota and immune system interactions in infectious diseases, immunopathology, and cancer*, Frontiers in Immunology, 9, 2018, s. 1-18.

49. Gnat S., Łagowski D., Dylał M., Nowakiewicz A., *Ludzki mykobiom w stanach normobiozy i dysbiozy – charakterystyka i metody analizy*, Postępy Mikrobiologii, 60, 2021, s. 31-46.
50. Sender R., Fuchs S., Milo R., *Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body*, PLoS Biology, 14, 2016, s. 1-21.
51. Lederberg J., McCray A.T., *Ome sweet omics: a genealogical treasury of words*, Scientist, 15, 2001, s. 8.
52. Liu X., *Microbiome*, Yale Journal of Biology and Medicine, 89, 2016, s. 275-276.
53. Olszewska J., Jagusztyn-Krynicka E.K., *Human Microbiome Project – mikroflora jelit oraz jej wpływ na fizjologię i zdrowie człowieka*, Postępy Mikrobiologii, 51, 2012, s. 243-256.
54. Prescott S.L., *History of medicine: Origin of the term microbiome and why it matters*, Human Microbiome Journal, 4, 2017, s. 24-25.
55. Biniek M., *Mikrobiom człowieka – zdrowie i choroba*, Postępy Mikrobiologii, 51, 2012, s. 27-36.
56. Ozen M., Dinleyici E.C., *The history of probiotics: the untold story*, Beneficial Microbes, 6, 2015, s. 159-165.
57. Szewc M., *Badania nad mikrobiotą jelitową i metodami jej modyfikacji w ujęciu historycznym*, Acta Medicorum Polonorum, 7, 2017, s. 54-63.
58. Borody T.J., Warren E.F., Leis S.M., Surace R., Ashman O., Siarakas S., *Bacteriotherapy using fecal flora: toying with human motions*, Journal of Clinical Gastroenterology, 38, 2004, s. 475-483.
59. Albrecht P., Pituch H., *Clostridium difficile – narastający problem diagnostyczny i terapeutyczny*, Gastroenterologia Kliniczna, 5, 2013, s. 40-51.
60. Kim K.K., Gluck M., *Fecal microbiota transplantation: an update on clinical practice*, Clinical Endoscopy, 52, 2019, s. 137-143.
61. Oksi J., Anttila V.-J., Mattila E., *Treatment of Clostridioides (Clostridium) difficile infection*, Annals of Medicine, 52, 2020, s. 12-20.
62. Kiersnowska Z., Lemiech-Mirowska E., Ginter-Kramarczyk D., Kruszelnicka I., Michalkiewicz M., Marczak M., *Problems of Clostridium difficile infection (CDI) in Polish healthcare units*, Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 28, 2021, s. 224-230.
63. Śliwowska J.H., Górecki M.T., Tryjanowski P., *Wprowadzenie do neuroekologii – czyli czy znajomość układu nerwowego zwierząt pozwala zrozumieć ich relacje ze środowiskiem?* KOSMOS, 61, 2012, s. 195-211.
64. Rybakowski J., *Infekcje a choroby psychiczne: od gruźlicy do COVID-19*, Psychiatria Polska, 56, 2022, s. 931-944.
65. Yin K., Xu C., Zhao G., Xie H., *Epigenetic manipulation of psychiatric behavioral disorders induced by Toxoplasma gondii*, Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 12, 2022, s. 1-12.

Odkrywając tajemnice cząsteczki życia – krótka historia niezwyklej naukowej podróży. Geny to nie wszystko

Streszczenie

Niecałe 2 wieki badań nad genami i dziedziczeniem dostarczyły nauce olbrzymiej ilości danych. Nie dały co prawda odpowiedzi na jedno z najbardziej fascynujących pytań o to, czym właściwie jest gen, ale podtrzymały jedno z fundamentalnych obserwacji genetyki, że genotyp determinuje fenotyp. Na jego ostateczną formę ma także wpływ środowisko, a różne cechy mogą być w różnym stopniu kształtowane przez te 2 główne czynniki. Geny i środowisko to jednak nie wszystko. Efekty ich wspólnego oddziaływania na fenotyp modulowane są dodatkowo przez zjawiska epigenetyczne, które wywołują dziedziczne zmiany w materiale genetycznym, nie powodując jednocześnie zmian w sekwencji DNA i opierają się na takich zjawiskach, jak metylacja DNA, acetylacja histonów czy interferencja RNA. Mechanizmy epigenetyczne powodują, że

z jednej zapłodnionej komórki rozwijają się różne linie komórkowe, tkanki i narządy (choć wyjściowy genom jest ten sam), nakładają tzw. piętno rodzicielskie (które wycisza pewne geny pochodzenia ojcowskiego i nie-które geny matczyne) oraz czynią samice wielu zwierząt genetycznymi chimerami (w wyniku losowej inaktywacji jednego z chromosomów X we wczesnym zarodku). Epigenetyka wpływa (obok innych czynników) na to, że bliźnięta jednojajowe nigdy nie są w pełni identyczne i decyduje o tym, że różnice fenotypowe pomiędzy różnymi gatunkami są znacznie głębsze, niż wynikałoby to z samych genów. Zmiany epigenetyczne towarzyszą także rozwojowi wielu chorób (np. nowotworów) i stoją niekiedy za niepowodzeniem eksperymentów z zakresu inżynierii genetycznej. Na ekspresję genów i ostateczny fenotyp mają też wpływ „obce” geny, np. te, których nosicielami są drobnoustroje naturalnie zasiedlające organizmy wielokomórkowe, a najlepiej pod tym względem rozpoznana jest mikrobiota jelitowa. Dobra kondycja symbiotycznych mikroorganizmów to dobra kondycja fizyczna i psychiczna gospodarza, gdyż wzajemne interakcje mikrobiota–gospodarz wpływają na wiele aspektów jego fizjologii poprzez różne mechanizmy, m.in. poprzez zdolność drobnoustrojów do wpływania na ekspresję genów gospodarza.

Słowa kluczowe: epigenetyka, metylacja DNA, acetylacja histonów, interferencja RNA, mikrobiota jelitowa

Discovering the secrets of the molecule of life – a short history of an incredible scientific journey. Genes are not everything

Abstract

Almost two centuries of research into genes and heredity have provided scientists with an enormous amount of data. Although this data has not answered one of the most fascinating questions about what a gene actually is, nevertheless it has confirmed one of the most fundamental observations in genetics, i.e. that a genotype determines the phenotype. Its final form is also determined by the environment and different features can be shaped to a various extent by these two main factors. But apart from the genes and the environment there is also something else that acts in a more subtle way, and without causing any changes in DNA sequences generates hereditary changes in the genetic material. The processes that govern these effects are the subject of epigenetics and involve such mechanisms as DNA methylation, histone acetylation and RNA interference. Epigenetic processes cause one fertilised cell to develop into different cell cultures, tissues and organs (although the original genome is the same), impose a so-called genomic imprinting (which silences some paternal and some maternal genes) and turn the females of many animal species into genetic chimeras (as a result of the random inactivation of one of the X chromosomes in the early embryonic phase). Epigenetics is the reason (among others) why monozygotic twins are never fully identical and enhances phenotypic differences between different species caused by the genes themselves. Epigenetic changes accompany the development of many illnesses (such as cancer) and sometimes are the reason for the failure of experiments in the field of genetic engineering. The expression of genes and the final phenotype are also affected by ‘foreign’ genes, such as those carried by microorganisms that are a natural inhabitants of multicellular organisms and the best-known in this regard is the gut microbiota. Good condition of symbiotic microbes translates into a good physical and psychological condition of the host, because the microbiota–host interaction affects many aspects of his physiology through various mechanisms, including the microbes' ability to influence the gene expression of the host.

Keywords: epigenetic, DNA methylation, histone acetylation, RNA interference, gut microbiota

Indeks Autorów

Biała G.....	73, 83
Chylińska-Wrzos P.....	125
Cichacz-Kwiatkowska B.	125
Hmaidan S.	73, 83
Huk-Wieliczuk E.....	7
Jodłowska-Jędrych B.....	125
Joško-Ochojska J.....	45, 95
Kamińska D.....	27
Kamiński J.....	73, 83
Kędzierska E.....	73, 83
Khalavka M.	16
Kostka A.....	138, 158, 176
Krawiec M.....	95
Krawiec M.....	45
Kruk-Słomka M.....	73, 83
Kryśka A.M.	16
Lau K.....	45, 95
Lecnar A.	45, 95
Lis-Sochocka M.....	125
Niczyporuk M.....	114
Odrzywolska O.....	45, 95
Orzelska-Górka J.....	73, 83
Podgórska A.	114
Sekita-Krzak J.....	125
Skórska G.	45
Skórska G..	95
Śliżewska K.....	35
Wacewicz-Muczyńska M.....	114
Ziółkowska G.	45, 95